

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Mohamed Boudiaf - M'sila



FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Numéro d'inscription :.....

Numéro de série

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ème} cycle (LMD)

Filière : BIOTECHNOLOGIE

Option : BIOTECHNOLOGIE VEGETALE

THEME

Recherche de substances bioactives de quelques Centaurées de la flore de M'sila

Présenté Par : Mme. Hechaichi Fatima Zohra

Soutenue le : .../7/2024 Devant le jury composé de :

<u>Nom & Prénom</u>	<u>Grade</u>	<u>Etablissement</u>	<u>Qualité</u>
Mr. GHADBANE Mouloud	Pr.	Univ. de M'sila	Président
Mr. BENDIF Hamdi	Pr.	Univ. de M'sila	Encadrant
Mme. SOUILAH Nabila	MCA	Univ. de Skikda	Co-encadrant
Mr. KAMELI Abdelkarim	Pr.	ENS Kouba, Alger	Examineur
Mr. LAZALI Mohamed	Dr.	Univ. de Khemis meliana	Examineur
Mr. REBBAS Khellaf	Pr.	Univ. de Msila	Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mon mari : **RAFIK MABRAK**

À mes enfants, Ahmed Amine, Amdjed Rassim et Dhikra,

À mes chers parents, dont la foi en moi n'a jamais vacillé et qui m'ont constamment encouragé, je vous adresse ma plus profonde gratitude pour les sacrifices que vous avez consentis. Je n'oublierai jamais votre soutien indéfectible et je vous exprime mes remerciements les plus sincères et chaleureux.

À ma tendre petite sœur, Ritedj, merci pour ta gentillesse et ton soutien
inconditionnel.

À mes frères, Ismail et Chrif, vous faites partie des rares personnes qui ont laissé
une empreinte significative dans ma vie.

À tous les membres des familles Hechaichi et Mabrak, pour votre dévouement
infatigable, votre soutien inébranlable et votre habileté à trouver les mots justes au
moment opportun.

Fatima

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance envers Allah le Tout-Puissant pour m'avoir guidé et éclairé sur cette voie noble, ainsi que pour m'avoir accordé la force et la sagesse nécessaires pour accomplir cette humble tâche.

Je tiens à exprimer ma gratitude sincère et reconnaissante envers mon promoteur de thèse, le **Pr. Hamdi BENDIF**, pour avoir accepté de superviser ma thèse et pour m'avoir accueilli avec soin, votre disponibilité, votre expérience et vos encouragements exemplaires. Vos encouragements et votre soutien tout au long de cette période ont été précieux pour moi, et je suis extrêmement reconnaissant de votre investissement dans mon travail académique.

Je suis profondément reconnaissant envers mon co-directeur de thèse, le Dr. Nabila Souillah, pour avoir accepté sans réserve de co-diriger ma thèse. Son soutien, ses conseils et son expertise ont été essentiels pour enrichir mon travail et lui apporter une véritable innovation. Sa sagesse et son expérience m'ont beaucoup inspiré et ont été déterminantes dans ma progression en tant que chercheur. Vous êtes un modèle pour les générations à venir !

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Pr. GHADBANE Mouloud**, pour avoir eu accepté de servir en tant que président de jury.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au **Pr. KAMELI Abdelkarim**, pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Votre engagement, votre expertise et vos précieux commentaires ont grandement enrichi mon travail de recherche.

Je suis particulièrement reconnaissant au **Pr. LAZALI Mohamed** pour le temps que vous avez consacré à examiner attentivement chaque partie de ma thèse et à fournir des commentaires détaillés. Votre expertise dans le domaine a été une source d'inspiration pour moi et m'a poussé à viser l'excellence dans mes recherches.

Je suis particulièrement reconnaissante au **Pr. REBBAS Khellaf**, pour le temps que vous avez consacré à examiner ma thèse, votre évaluation approfondie et constructive a été essentielle pour m'aider à perfectionner ma thèse et à identifier les domaines où des améliorations étaient nécessaires. Vos suggestions et recommandations m'ont permis de voir mon travail sous un angle nouveau et ont contribué à renforcer sa qualité académique.

Encore une fois, merci infiniment pour vous tous. Je suis honoré d'avoir eu l'opportunité de bénéficier de vos connaissances et de votre expérience

Production scientifique

Publications scientifiques

1. **Hechaichi, F. Z.**, Bendif, H., Bensouici, C., Alsalamah, S. A., Zaidi, B., Bouhenna, M. M., ... & Boufahja, F. (2023). Phytochemicals, Antioxidant and Antimicrobial Potentials and LC-MS Analysis of *Centaurea parviflora* Desf. Extracts. *Molecules*, 28(5), 2263. <https://doi.org/10.3390/molecules28052263>
2. Bendif H., Harir M., Yahiaoui M., Souilahd N., **Hechaichi F.Z.**, Miara M.D., Medila I. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in El Hammadia (Southern region of the province of Bordj Bou Arreridj, Algeria). *Algerian Journal of Biosciences*. **2021**, 02(01):006-015. <http://www.ajbjournal.periodikos.com.br/journal/ajbjournal/article/doi/10.5281/zenodo.5045031>
Submitted date:12/09/2020 Reviewed date:05/22/2021 Accepted date:06/14/2021 Publication date:06/30/2021 [AUTRE1](#) ISSN 2716-9375 (Online)

Communications au seminaires

National

1. **Fatima Zohra Hechaichi**, Chawki Bensouici, **Hamdi Bendif**, Mustapha Mounir Bouhenna, **Nabila Souilah**, Mohamed Djamel Miara. Phytochemical profile by LC-MS of extracts of *Centaurea parviflora*: An Algerian medicinal plant. 1st national seminar on Biodiversity, Biotechnology and Sustainable Development (BB & DD 2022). Department of Biology, Faculty of Nature and Life and Earth Sciences, University of Ghardaia, April 16, 2022.
<https://fsnv.univ-ghardaia.dz/events/1er-seminaire-national-sur-biodiversite-biotechnologie-et-developpement-durable-bb-dd-2022>
 2. **Hechaichi Fatima zohra**, Benderradji ugly, **Hamdi bendif**. Improvement of the in vitro growth capacity of *Astragalus gombo* coss. & hard. 1st National Seminar "Plant Improvement: Strategies and Perspectives" (AMPSP-1), BOUSSOUF Abdelhafid Mila University Center, Department of Nature and Life Sciences Laboratory of Natural and Materials Sciences (LSNM), May 05, 2022, (AMPSP-1), webinar.
<http://www.centre-univ-mila.dz/?lang=en>
 3. **Hechaichi Fatima Zohra**, Chawki Bensouici, Mounir Bouhenna Mustapha, Boutheina Zaidi, **Nabila Souilah** And **Hamdi Bendif**. Poster communication, Determination of the compositional diversity (polyphenols, flavonoids and flavanols) of *Centaurea parviflora*. 1st National Seminar on Sustainable Agriculture and Biodiversity May 11 and 12, 2022 via Google meet. University August 20, 1955 Skikda, Department of Agronomic Sciences, Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Zones (LOPAZS).
 4. **HECHAICHI Fatima zohra**, Chawki Bensouici, Nabila Souilah, Mohamed Djamel Miara, **Hamdi Bendif**. Antioxidant activity by different methods of *Centaurea parviflora* extracts from Algeria, 1st National Seminar on Agriculture and Sustainable Development in Semi-Arid Zones, ADDZSA-2022, University - Souk Ahras. November 15 and 16, 2022. <https://www.univ-soukahras.dz/en/service/relex/a/63373>
 5. **Hechaichi Fatima zohra**, Chawki Bensouici, Bouhenna Mustapha Mounir, Zaidi Boutheina, **Souilah Nabila, Bendif Hamdi**. In vitro antimicrobial activity and the phytochemical profiling of the extracts of *Centaurea parviflora*.
13–14 December 2022. University of M'sila, Department of Chemistry, Faculty of Sciences.
<http://virtuelcampus.univ-msila.dz/facsience/wp-content/uploads/2022/10/depliant-snampd22.pdf>
 6. Hamdi BENDIF, ADOUI Nabila, DERBAK Larbi, **HECHAICHI Fatima Zohra**, HAOUEME Imane, KHALFA Hanane, MERABTI Karim, SERRALHEIRO Maria Luísa, BELGHIT Said. Iridoids and flavonoids present in decoctions from aerial parts of *Verbas*. Séminaire national sur les Substances Bioactives 14 mars 2023. Université de Ghardaïa, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre (SNV-ST)
<https://fsnv.univ-ghardaia.dz/seminaire-national-sur-les-substances-bioactives-14-mars-2023.html>
 7. **HECHAICHI Fatima Zohra, BENDIF Hamdi, SOUILAH Nabila, ZAAK Hadjerd, Hanane Khalfaa, Mohamed Djamel Miarae** *Centaurea tougourensis* : Contenu phénolique par une LC-MS/MS. 2 Colloque national de chimie 2024 "CNC2", 6-7 Mai 2024, Département de chimie, Faculté des Sciences, Université de M'sila.
<http://virtuelcampus.univ-msila.dz/facsience/wp-content/uploads/2022/10/depliant-snampd22.pdf>
-

Communications internationales

1. **Fatima Zohra HECHAICHIA**, Chawki BENSOUICI, **Hamdi BENDIF**, Boutheina ZAIDI, Nabila SOUILAH, Mohamed Djamel MIARA. Antioxidant potential of Centaurea parviflora extracts: An Algerian medicinal plant from semi-arid zone. International Seminar on Valorization of Agronomic, Ecological and Food Resources, October 18, 19 and 20, 2022, University August 20, 1955 Skikda, Faculty of Sciences, Department of Agricultural Sciences.
<http://sivraea2022.univ-skikda.dz/>
 2. **BENDIF Hamdi**, BAHLOULI Imane, BRANTI Sylia, YAHIA Ahlam, **HECHAICHI Fatima Zohra**, ADOUI Nabila. Effects of pre-treatment on seeds germination in vitro and in soil of some medicinal plants. 1st International Seminar on Green Biotechnology and Food Safety (BVSA, webinar). University of KHENCHELA, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of Biotechnology, Water, Environment and Health. November 16 and 17, 2022.
<https://univ-khenchela.com>
 3. **HECHAICHI Fatima Zohra**, Chawki BENSOUICI, Nabila SOUILAH, Mohamed Djamel MIARA, **Hamdi BENDIF**. Phytochemicals profiling with thin layer chromatography and antimicrobial activity of Centaurea parviflora extracts: an Algerian medicinal plant. 1st International Webinar on Plant and Microbial Biodiversity and Valorization (WIBVVM) December 13-15, 2022. Poster communication. University of Science and Technology of Oran Mohamed BOUDIAF, Laboratory of Plant and Microbial Production and Valorization (LPVVM).
-

Résumé :

Centaurea tougourensis Boiss. & Reut. et *Centaurea dimorpha* Viv., ainsi que *Centaurea parviflora*, appartenant à la famille des Astéracées, sont des plantes médicinales algériennes utilisées en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies liées aux troubles hyperglycémiques et inflammatoires, ainsi que dans l'alimentation. Plusieurs études ont examiné les effets biologiques de différents extraits d'espèces de *Centaurea*, mais les études portant sur la composition phénolique des extraits de *Centaurea parviflora*, *Centaurea tougourensis* et *Centaurea dimorpha* sont très limitées. La présente étude visait à évaluer le contenu phénolique total, l'activité antioxydante et antimicrobienne in vitro, ainsi que le profil phytochimique des extraits de *C. parviflora*. Alors que notre étude visait à réaliser le profilage phénolique de l'extrait méthanolique/eau de *C. tougourensis* et *C. dimorpha* (80/20, v/v). En ce qui concerne *C. parviflora*, l'extraction des composés phénoliques des parties aériennes a été réalisée en utilisant des solvants de polarité croissante à partir de méthanol, donnant un extrait brut, à l'extrait chloroformique, l'extrait d'éthyle acétate et l'extrait butanolique. Le contenu phénolique, flavonoïde et flavonol total des extraits a été déterminé en utilisant les méthodes Folin-Ciocalteu et $AlCl_3$, respectivement. L'activité antioxydante a été mesurée avec sept méthodes : l'essai au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), le test de piégeage des radicaux libres galvinoxyl, l'essai ABTS au 2,2'-azino-Bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), la capacité antioxydante de réduction cuprique (CUPRAC), le pouvoir réducteur, l'essai de réduction du fer (Fe^{+2} -phénanthroline) et le test de piégeage des superoxydes. La méthode de diffusion sur disque visait à tester la sensibilité des souches bactériennes à nos extraits. Une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique a été réalisée. De plus, la HPLC-DAD-MS a été utilisée pour établir le profil phytochimique d'extrait butanolique. En revanche, pour *C. tougourensis* et *C. dimorpha*, l'examen des composés phénoliques a été réalisé en utilisant une méthode de chromatographie liquide à ultra-performance nouvelle et validée couplée à un instrument MS/MS en mode négatif d'ionisation par électrospray (LC-MS/MS). En outre, les deux extraits méthanoliques ont été évalués pour leur contenu phénolique, flavonoïdes et flavonols, ainsi que pour leurs propriétés antioxydantes en utilisant les essais DPPH, FRAP, ABTS et phénanthroline. Pour *C. parviflora*, le BUE a été trouvé à contenir des quantités élevées de phénols totaux ($175.27 \pm 2.79 \mu\text{g GAE/mg E}$), de flavonoïdes ($59.89 \pm 0.91 \mu\text{g QE/mg E}$) et de flavonols ($47.30 \pm 0.51 \mu\text{g RE/mg E}$). En utilisant la CCM, différents composants tels que des flavonoïdes et des polyphénols ont été notés. La meilleure capacité de piégeage des radicaux a été enregistrée pour le BUE contre le DPPH ($IC_{50} = 59.38 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$), le galvinoxyl ($IC_{50} = 36.25 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$), l'ABTS ($IC_{50} = 49.52 \pm 1.54 \mu\text{g/mL}$) et le superoxyde ($IC_{50} = 13.61 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$). Le BUE avait le meilleur pouvoir réducteur selon le CUPRAC ($A_{0.5} = 71.80 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$), le test de phénanthroline ($A_{0.5} = 20.29 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$) et le FRAP ($A_{0.5} = 119.17 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$). L'analyse LC-MS du BUE nous a permis d'identifier huit composés, dont six acides phénoliques et deux flavonoïdes : l'acide quinique, cinq dérivés d'acide chlorogénique, la rutine et la quercétine 3-O-glucoside. Alors que les résultats de l'analyse LC-MS/MS ont montré que les extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis* contenaient respectivement 16 et 10 composés. Plus spécifiquement, 8 acides phénoliques, 7 flavonoïdes et 2 acides organiques non phénoliques ont été détectés dans la fraction de *C. dimorpha* ; et seulement 7 acides phénoliques, 1 flavonoïde et 2 acides organiques non phénoliques ont été détectés dans la fraction de *C. tougourensis*. Le composé phénolique le plus abondant dans les deux extraits a été déterminé comme étant l'acide quinique, et la quantité de ce composé était de 20533.796 et 57164.13 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les extraits de *C. dimorpha* et de *C. tougourensis*, respectivement. Les résultats des contenus totaux en phénols et en flavonoïdes ont montré que l'extrait de *C. dimorpha* présentait les valeurs les plus élevées avec $219.8 \pm 0.47 \text{ mg GAE/g}$ et $82.8 \pm 0.9 \text{ QE/g}$, respectivement. Ainsi, le contenu en flavonols de l'extrait de *C. tougourensis* ($46.3 \pm 0.116 \text{ mg QE/g}$) était supérieur à celui de l'extrait de *C. dimorpha* ($29.01 \pm 0.245 \text{ mg QE/g}$). Le potentiel antioxydant de l'extrait de *C. dimorpha* dépassait significativement celui de l'extrait de *C. tougourensis*, comme le prouvaient une activité plus élevée à travers les essais ABTS, de pouvoir réducteur, et de phénanthroline. Plus spécifiquement, dans les essais DPPH et ABTS, l'extrait de *C. dimorpha* présentait des valeurs de CI_{50} de $8.79 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ et $1.92 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, respectivement, contre $27.77 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$ et $7.75 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait de *C. tougourensis*. Cette enquête préliminaire a révélé que ces espèces peuvent être utilisées comme source de nouveaux produits naturels dans les domaines pharmaceutique et de transformation alimentaire.

Mots-clés : *Centaurea dimorpha*, *Centaurea tougourensis*, *Centaurea parviflora*, Acide quinique, activité antioxydante ; activité antimicrobienne ; LC-MS ; flavonoïdes ; polyphénols

Abstract

Centaurea tougourensis Boiss. & Reut., *Centaurea dimorpha* Viv., and *Centaurea parviflora*, belonging to the family Asteraceae, are delete Algerian medicinal plants used in traditional medicine to treat different diseases related to hyperglycemic and inflammatory disorders, as well as in food. Several studies have investigated the biological effects of different extracts of *Centaurea* species, but studies involving the phenolic composition of *Centaurea parviflora*, *Centaurea tougourensis* and *Centaurea dimorpha* extracts are very limited. The present study aimed to assess the total phenolic content, in vitro antioxidant and antimicrobial activity and phytochemical profile of the extracts of *C. parviflora*. While, our study aimed to perform phenolic profiling of *C. tougourensis* and *C. dimorpha* methanolic/water extract (80/20, v/v). Regarding *C. parviflora*, the extraction of phenolic compounds from aerial parts was conducted using solvents of increasing polarity starting from methanol, resulting in crude extract (CE), to chloroform extract (CHE), ethyl acetate extract (EAE) and butanolic extract (BUE). The total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the extracts were determined using the Folin–Ciocalteu and AlCl_3 methods, respectively. The antioxidant activity was measured with seven methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, galvinoxyl free-radical-scavenging test, 2,2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) (ABTS) assay, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), reducing power, Fe^{+2} -phenanthroline reduction assay and superoxide-scavenging test. The disc-diffusion method aimed at testing the sensitivity of bacterial strains toward our extracts. A qualitative analysis with thin-layer chromatography of the methanolic extract was performed. Moreover, HPLC-DAD-MS was used to establish the phytochemical profile of the BUE. Wherese, for *C. tougourensis* and *C. dimorpha*, the examination of phenolic compounds was by using a novel and validated ultra-performance liquid chromatography method coupled to a tandem MS instrument (LC-MS/MS) in a negative mode of electrospray ionization. Furthermore, the both methanolic extracts were assessed for their phenolic, flavonoids and flavonol contents and antioxidant properties using DPPH, FRAP, ABTS and Phenanthroline assays. for *C. parviflora*, the BUE was found to contain high amounts of total phenolics ($175.27 \pm 2.79 \mu\text{g GAE/mg E}$), flavonoids ($59.89 \pm 0.91 \mu\text{g QE/mg E}$) and flavonols ($47.30 \pm 0.51 \mu\text{g RE/mg E}$). Using TLC, different components such as flavonoids and polyphenols were noted. The highest radical-scavenging ability was recorded for the BUE against DPPH ($\text{IC}_{50} = 59.38 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$), galvinoxyl ($\text{IC}_{50} = 36.25 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$), ABTS ($\text{IC}_{50} = 49.52 \pm 1.54 \mu\text{g/mL}$) and superoxide ($\text{IC}_{50} = 13.61 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$). The BUE had the best reducing power according to the CUPRAC ($\text{A}_{0.5} = 71.80 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$), phenanthroline test ($\text{A}_{0.5} = 20.29 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$) and FRAP ($\text{A}_{0.5} = 119.17 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$). The LC-MS analysis of BUE allowed us to identify eight compounds including six phenolic acids and two flavonoids: quinic acid, five chlorogenic acid derivatives, rutin and quercetin 3-*o*-glucoside. While, the results of LC-MS/MS analysis showed that methanolic extracts of *C. dimorpha* and *C. tougourensis* were found to contain 16 and 10 compounds, respectively. More specifically, 8 phenolic acids, 7 flavonoids, and 2 non-phenolic organic acids were detected in *C. dimorpha* fraction; and only 7 phenolic acids, 1 flavonoid, and 2 non-phenolic organic acids were detected in *C. tougourensis* fraction. The most abundant phenolic compound in both extracts was determined to be quinic acid, and the amount of this compound was 20533.796 and 57164.13 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the extracts of *C. dimorpha* and *C. tougourensis*, respectively. The results of the total phenolic and flavonoid contents showed that *C. dimorpha* extract have the highest values with $219.8 \pm 0.47 \text{ mg GAE/g}$ and $82.8 \pm 0.9 \text{ QE/g}$, respectively. Thus, flavolnol contents of the *C. tougourensis* extract ($46.3 \pm 0.116 \text{ mg QE/g}$) was greater than that of *C. dimorpha* extract ($29.01 \pm 0.245 \text{ mg QE/g}$). The antioxidant potential of the *C. dimorpha* extract significantly exceeded that of the *C. tougourensis* extract, as proved by higher activity across ABTS, reducing power, and phenanthroline assays. Specifically, in the DPPH and ABTS assays, the *C. dimorpha* extract exhibited IC_{50} values of $8.79 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ and $1.92 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, respectively, compared to $27.77 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$ and $7.75 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ for the *C. tougourensis* extract. This preliminary investigation revealed that these species, can be used as a source of new natural products in pharmaceutical and food processing fields.

Keywords: *Centaurea dimorpha*, *Centaurea tougourensis*, *Centaurea parviflora*, Quinic acid, antioxidant activity; antimicrobial activity; LC-MS; flavonoids; polyphenols

المخلص:

تعتبر كل من *Centaurea parviflora*، *Centaurea dimorpha* Viv. و *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. التابعة لعائلة النجميات (Asteraceae)، نباتات طبية جزائرية تستخدم في الطب الشعبي لعلاج مختلف الأمراض المتعلقة بارتفاع مستويات السكر في الدم والاضطرابات الالتهابية، فضلاً عن استخدامها في الغذاء. لقد قامت العديد من الدراسات بالتحقيق في التأثيرات البيولوجية لمستخلصات مختلفة من أنواع *Centaurea*، ولكن الدراسات التي تتضمن التركيب الفينولي لمستخلصات *Centaurea parviflora* و *Centaurea tougourensis* و *Centaurea dimorpha* محدودة للغاية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم المحتوى الكلي للفينولات، والنشاط المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات في المستخلصات من *C. parviflora*. بينما، تهدف دراستنا إلى أداء تحليل الفينولات لمستخلصات *C. tougourensis* و *C. dimorpha* بالميثانول/الماء (20/80، حجم/حجم). الطرق: بالنسبة لـ *C. parviflora*، تم إجراء استخلاص المركبات الفينولية من الأجزاء الهوائية باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة ابتداءً من الميثانول، مما أدى إلى الحصول على مستخلص خام (CE)، ثم مستخلص الكلوروفورم (CHE)، ومستخلص الأسيتات الإيثيلي (EAE)، ومستخلص البوتانول (BUE). تم تحديد المحتوى الكلي للفينول، والفلافونويد، والفلافونول، والفرافونول في المستخلصات باستخدام طرق فولين-سيوكالتو وألكوريد الألومنيوم الثلاثي، على التوالي. تم قياس النشاط المضاد للأكسدة باستخدام سبع طرق: اختبار 2،2-ديفينيل-1-بيكريليهيدرازيل (DPPH)، واختبار إزالة الراديكال الحر galvinoxyl، واختبار 2،2-أزينو-بيس (3-إثيل بنزوثيرازولين-6-سلفونيك أسيد) (ABTS)، واختبار قدرة الاختزال النحاسي المضاد للأكسدة (CUPRAC)، واختبار القدرة الاختزالية، واختبار إزالة الحديد الفينانثرولين واختبار إزالة الأكسجين النشط الفضي. هدفت طريقة الانتشار على الأقراص إلى اختبار حساسية سلالات البكتيريا تجاه مستخلصاتنا. تم إجراء تحليل كمي مع الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلص الميثانولي. علاوةً على ذلك، تم استخدام HPLC-DAD-MS لتحديد الملاح الفيتوكيميائية لـ BUE. بينما، لـ *C. tougourensis* و *C. dimorpha*، تم فحص المركبات الفينولية باستخدام طريقة كروماتوغرافية سائلة فائقة الأداء جديدة ومعتمدة مزدوجة الطيف متصلة بجهاز MS/MS في وضعية سالبة للتأين الكهربائي. علاوةً على ذلك، تم تقييم المستخلصين الميثانوليين لـ *C. tougourensis* و *C. dimorpha* بالنسبة لمحتوى الفينولات والفلافونويدات والفلافونولات وخصائصها المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات DPPH، و FRAP، و ABTS واختبار الفينانثرولين. النتائج: بالنسبة لـ *C. parviflora*، وُجد أن مستخلص البوتانول (BUE) يحتوي على كميات عالية من المركبات الفينولية الكلية (2.79 ± 175.27 ميكروغرام GAE/ملغ E)، والفلافونويدات (0.91 ± 59.89 ميكروغرام QE/ملغ E) والفلافونولات (0.51 ± 47.30 ميكروغرام RE/ملغ E). باستخدام TLC، لوحظت مكونات مختلفة مثل الفلافونويدات والبولىفينولات. تم تسجيل أعلى قدرة على امتصاص الجذور الحرة لمستخلص BUE ضد DPPH ($IC_{50} = 49.52 \pm 1.54$) ABTS ($IC_{50} = 36.25 \pm 0.42$) ميكروغرام/مل، ($IC_{50} = 13.61 \pm 0.38$) ميكروغرام/مل. كان لدى مستخلص BUE أفضل قدرة على الاختزال وفقاً لاختبارات CUPRAC ($A_{0.5} = 71.80 \pm 1.22$) ميكروغرام/مل، اختبار فينانثرولين ($A_{0.5} = 20.29 \pm 1.16$) ميكروغرام/مل) واختبار FRAP ($A_{0.5} = 119.17 \pm 0.29$) ميكروغرام/مل). أما تحليل LC-MS لـ BUE فسمح لنا بتحديد ثمانية مركبات بما في ذلك ستة أحماض فينولية واثنين من الفلافونويدات: حمض الكينيك، خمسة مشتقات لحمض الكلوروجينيك، روتين، والكويرسيتين 3-أو-غلوكوسيد. بينما، أظهرت نتائج تحليل LC-MS/MS أن مستخلصات *C. tougourensis* و *C. dimorpha* بالميثانول تحتوي على 16 و 10 مركبات، على التوالي. وبالتحديد، تم اكتشاف 8 أحماض فينولية، و 7 فلافونويدات، و 2 أحماض عضوية غير فينولية في كسر *C. dimorpha*؛ فقط 7 أحماض فينولية، وفلافونويد واحد، و 2 أحماض عضوية غير فينولية تم اكتشافها في كسر *C. tougourensis*. تم تحديد العنصر الفينولي الأكثر وفرة في كل من المستخلصات على أنه حمض الكينيك، وكانت كمية هذا المركب 20533.796 و 57164.13 ميكروغرام/غ في مستخلصات *C. dimorpha* و *C. tougourensis*، على التوالي. أظهرت نتائج المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات أن مستخلص *C. dimorpha* يحتوي على أعلى القيم مع 0.47 ± 219.8 ملغ GAE/غ و 0.9 ± 82.8 ملغ QE/غ، على التوالي. بالتالي، كان محتوى الفلافونولات لمستخلص *C. tougourensis* (0.116 ± 46.3 ملغ QE/غ) أكبر من ذلك لمستخلص *C. dimorpha* (0.245 ± 29.01 ملغ QE/غ). أظهر الاستخلاص الفعال لـ *C. dimorpha* ميزانية المضادات الأكسدة أنشطة أعلى بكثير من تلك التي لـ *C. tougourensis*، كما أثبت ذلك نشاط أعلى عبر اختبارات ABTS والقدرة الاختزالية، واختبار فينانثرولين. على وجه الخصوص، في اختبارات DPPH و ABTS، أظهر مستخلص *C. dimorpha* قيم IC_{50} قدرها 0.19 ± 8.79 ميكروغرام/مل و 0.03 ± 1.92 ميكروغرام/مل، على التوالي، مقارنة بـ 0.60 ± 27.77 ميكروغرام/مل و 0.36 ± 7.75 ميكروغرام/مل لمستخلص *C. tougourensis*. الاستنتاج: كشفت هذه الدراسة الاستقصائية الأولية أن هذه الأنواع يمكن استخدامها كمصدر لمنتجات طبيعية جديدة في مجالات الصناعة الدوائية

الكلمات المفتاحية: *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. و *Centaurea dimorpha* Viv. و *Centaurea parviflora*، حمض الكينيك، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، LC-MS، الفلافونويدات، البولىفينولات

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des publications et communication	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction.....	1
Chapitre I : Généralités	
I. Plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires	4
I.1. Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales	4
I.2. La phytothérapie	4
I.3. Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire	5
I.3.1. Les polyphénols	5
I.3.2. Terpènes	16
I.3.3. Alcaloïdes	18
I.4. Techniques d'extraction à partir de plantes.....	19
I.5. Techniques de séparation, d'analyse et de caractérisation chimique des extraits	20
I.5.1. Techniques chromatographiques.....	22
I.5.2. Techniques spectroscopiques	23
I.6. Activités biologiques des extraits de plantes.....	25
I.6.1. Activité cytotoxique.....	25
I.6.2. Activité antioxydante	26
I.6.3. Activité antibactérienne	27
II. Monographie de plantes étudiées	34
II.1. La famille des Astéraceae	34
Description, systématique, distribution, utilisation et intérêt.....	34
II.2. Le genre <i>Centaurea</i>	35
II.2.1. Description, systématique et distribution du genre <i>Centaurea</i>	35
II.2.2. Phytochimie du genre <i>Centaurea</i>	36
II.2.3. Activités biologiques et usage du genre <i>Centaurea</i>	38
II.3. Description des plantes étudiées.....	41
II.3.1. La plante médicinale : <i>C. parviflora</i>	41
II.3.1.1. Généralités, description habitat et distribution et taxonomie de <i>C. parviflora</i>	41
II.3.1.2. Phytochimie de <i>Centaurea parviflora</i>	42
II.3.1.3. Activité biologique et usage traditionnel de <i>Centaurea parviflora</i>	42
II.3.2. La plante médicinale <i>Centaurea tougourensis</i> Boiss. & Reut	43
II.3.2.1. Généralités, discription habitat, distribution et taxonomie de <i>C. tougourensis</i>	43
II.3.2.2. Phytochimie de <i>Centaurea tougourensis</i>	44
II.3.2.3. Activité biologique et usages thérapeutiques de <i>C. tougourensis</i>	45
II.3.3. La plante médicinale <i>Centaurea dimorpha</i> Viv..	47
II.3.3.1. Généralités, discription, habitat, distribution et taxonomie de <i>C. dimorpha</i>	47
II.3.3.2. Phytochimie de <i>Centaurea dimorpha</i>	48
II.3.3.3. Activité biologique et usages thérapeutiques de <i>Centaurea dimorpha</i>	49

Chapitre II : Matériels et méthodes	
II.1. Etude phytochimique et activités biologiques de <i>C. parviflora</i>	
II.1.1. Matériel végétal	50
II.1.2. Préparation des extraits	50
II.1.3. Analyse chromatographique et spectrophotométrique	51
II.1.3.1. Analyse qualitative avec la chromatographie sur couche mince (CCM)	51
II.1.3.2. Analyse LC-MS	52
II.1.3.3. Teneur totale en composés phénoliques	52
II.1.3.4. Teneur totale en flavonoïdes	52
II.1.3.5. Contenu total en flavonols	53
II.1.4. Activités antioxydantes	53
II.1.4.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH	53
II.1.4.2. Activité de piégeage des radicaux libres de galvinoxyl	53
II.1.4.3. Test de piégeage de l'ABTS	54
II.1.4.4. Activité de piégeage des radicaux superoxydes (O₂•-)	54
II.1.4.5. Capacité Antioxydante de Réduction de Cuivre (CUPRAC)	55
II.1.4.6. Pouvoir Réducteur Ferrique	55
II.1.4.7. Test de Phénantroline	55
II.1.5. Examen de l'activité antimicrobienne	55
II.1.6. Analyses statistiques	56
II.2. Etude phytochimique et activité biologique de <i>C. tougourensis</i> et <i>C. dimorpha</i>	56
II.2.1. Matériel végétal	56
II.2.2. Préparation des extraits	57
II.2.3. Analyse chromatographique et spectrophotométrique	58
II.2.3.1. Analyse qualitative avec LC-MS/MS	58
II.2.3.2. Contenu phénolique	59
II.2.3.1. Quantification du contenu phénolique total	59
II.2.3.2. Quantification du contenu total en flavonoïdes	59
II.2.3.3. Quantification du contenu en flavonols	59
II.2.4. Activités antioxydantes	59
II.2.4.1. Activité de piégeage des radicaux libres (essai DPPH)	59
II.2.4.2. Essai de décoloration des cations radicaux ABTS	59
II.2.4.3. Pouvoir réducteur (essai FRAP)	60
II.2.4.4. Test de phénanthroline	60
II.2.5. Analyse statistique	61
Chapitre III : Resultats et discussion	
III.1. Etude pytochimique et activité biologique de la plante <i>C. parviflora</i>	62
III.1.1. Rendement d'extraction	62
III.1.2. Analyse qualitative	62
III.1.2.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (TLC)	62
III.1.2.2. Résultats d'analyses LC-MS	64

III.1.2.3. Le contenu phénolique	66
III.1.3. Activité antioxydante	68
III.1.4. Activité antimicrobienne	73
III.2. Etude de la plante <i>Centaurea tougourensis</i> et <i>Centaurea dimorpha</i>	75
III.2.1. Rendement d'extraction	75
III.2.2. Analyse chromatographique et spectrophotométrique	76
III.2.2.1. Analyse chromatographique par LC-MS/MS	76
III.2.2.2. Quantification des contenus totaux de phénols, flavonoïdes et flavonols	85
III.2.2.3. Capacité antioxydante <i>in vitro</i>	86
Conclusion générale	88
Référence bibliographique	89
ANNEXES	

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse of variance

A0,5 : Absorbance de l'échantillon pouvant inhiber la moitié des radicaux

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

ACQ : Acide caféylquinique

CCM : Chromatographie sur couche mince

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CG-FID : CG avec détection par ionisation de flamme

CG-SM : CG couplée à la spectrométrie de masse

CAT : Catalase

CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

DPPH : 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle

DMSO : diméthylsulfoxyde

EAG : équivalents d'acide gallique

EPS : Extraction en phase solide

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ET : électrons simples

EA : acétate d'éthyle

ESI : Ectrospray ionization

FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GSH-Px: Glutathion peroxydase

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

HPLC-DAD: High-Performance Liquid Chromatography- Diode-Array Detection

HPLC-RMN : HPLC couplée à la résonance magnétique nucléaire

HPLC-SM : HPLC couplée à la spectrométrie de masse

HPLC-UV : HPLC avec détection ultraviolette

HAT : Hydrogen Atom Transfer

HSD: Honest Significant Difference

IC50: inhibitory concentration median

LC/MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LLE: liquid-liquid extraction

LDL: Low-Density Lipoprotein

LODs : Limit of Detection

LOQs : Limit of Quantification

MRM : Multiple Reaction Monitoring

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

nBuOH : n-butanol

RE : Rutin equivalent

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SD : Standard Deviation

SE : Standard Error

SM : Spectrométrie de masse

UICPA : Union internationale de chimie pure et appliquée

UV-Vis : Ultraviolet-visible.

µg EQ/mg : microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme.

1D : unidimensionnelle

λmax : Longueur d'onde maximale

Liste des figures

Figure 1. Voies du métabolisme secondaire des plantes et la relation avec le métabolisme primaire	6
Figure 2. Structure du noyau phénol	6
Figure 3. Principales classes des composés phénoliques	7
Figure 4. Structure de base des quinones.	11
Figure 5. Différents types structuraux de flavonoïdes	13
Figure 6. Structure du noyau des coumarines.	14
Figure 7. Structure générale des anthocyanes.	15
Figure 8. Structure de base des tanins	16
Figure 9. Structure de base du précurseur des terpènes (isoprène)	17
Figure 10. Structure de quelques alcaloïdes vrais.	18
Figure 11. Structures de quelques pseudo-alcaloïdes	19
Figure 12. Exemple des proto-alcaloïdes.	19
Figure 13. Types des fleurs des plantes d'Astéraceae.	35
Figure 14. Aspects morphologiques de <i>C. parviflora</i>	41
Figure 15. Aspects morphologiques de <i>C. tougourensis</i> Boiss. & Reut.	43
Figure 16. <i>C. tougourensis</i> , photos de spécimen de la plante pour herbier	44
Figure 17. Aspects morphologiques de <i>C. dimorpha</i> Viv.	48
Figure 18. Aspect morphologique de <i>C. parviflora</i> Desf.	50
Figure 19. <i>C. tougourensis</i> et <i>C. dimorpha</i>	57
Figure 20. Résultats de CCM de l'extrait méthanolique de <i>C. parviflora</i> .	63
Figure 21. Chromatogramme de l'ionisation positive de l'extrait butanolique de <i>C. parviflora</i>	64
Figure 22. Acide quinique (C ₇ H ₁₂ O ₆)	65
Figure 23. Acide chlorogénique (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)	65
Figure 24. La rutine (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆)	65
Figure 25. Photographies des résultats de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion sur disque d'agar de <i>C. parviflora</i> .	74
Figure 26. Chromatogramme LC-MS/MS des mélanges de standards (1µg/ml)	83
Figure 27. Chromatogramme LC-MS/MS d'extraits méthanoliques de <i>C. dimorpha</i> (µg/g d'extrait)	83
Figure 28. Chromatogramme LC-MS/MS d'extraits méthanoliques de <i>C. tougourensis</i> (µg/g d'extrait)	84

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux acides hydroxybenzoïques	8
Tableau 2. Principaux acides hydroxycinnamiques	9
Tableau 3. Différentes classes des composés phénoliques	10
Tableau 4. Différentes méthodes d'extraction de produits naturels	21
Tableau 5. Méthodes chimiques courantes pour déterminer l'activité antioxydante des molécules Naturelles.	28
Tableau 6. Techniques non spectrophotométriques utilisées pour mesurer l'activité antioxydante	30
Tableau 7. Méthodologies traditionnelles et émergentes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des produits naturels	31
Tableau 8. Rendement d'extraction	62
Tableau 9. Analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>C. parviflora</i> avec CCM	63
Tableau 10. Composés tentatifs de l'extrait butanolique de <i>C. parviflora</i> identifiés avec LC-MS.	66
Tableau 11. Contenu des composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols des extraits de <i>C. parviflora</i> .	66
Tableau 12. Activité antioxydante in vitro utilisant différentes analyses des extraits de <i>C. parviflora</i>	69
Tableau 13. Activités antimicrobiennes et antifongiques de l'extrait méthanolique de <i>C. parviflora</i> .	73
Tableau 14. Rendement d'extraction méthanolique des espèces : <i>C. tougourensis</i> et <i>C. dimorpha</i>	75
Tableau 15. Conditions optimales utilisées pour l'analyse des 37 composés phénoliques.	76
Tableau 16. Plage de concentration, linéarité (R ²), limites de détection (LODs), limites de quantification (LOQs) et pourcentages de récupération des composés testés.	79
Tableau 17. Détermination quantitative de 37 composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de <i>C. dimorpha</i> et <i>C. tougourensis</i> (µg/g d'extrait) par LC-MS/MS	82
Tableau 18. Teneurs totales en phénols, flavonoïdes et flavonols des extraits méthanoliques de <i>C. dimorpha</i> et <i>C. tougourensis</i> .	85
Tableau 19. Activité antioxydante des extraits méthanoliques de <i>C. dimorpha</i> et <i>C. tougourensis</i> .	86

Introduction

Les recherches scientifiques ont établi au cours des dernières décennies que la plupart des plantes médicinales utilisées de manière empirique depuis des millénaires ont des vertus thérapeutiques. Aujourd'hui, même si la chimie de synthèse s'est développée, les plantes médicinales sont encore couramment employées en raison de leur efficacité dans différentes pratiques thérapeutiques. En tant qu'ensemble numérique étendu, ils renferment des composants actifs qui sont employés dans le traitement de différentes affections. Outre leur utilisation directe comme médicaments, ils sont également employés dans les secteurs pharmaceutique et cosmétique (**Lazli et al., 2019**).

En raison de sa situation géographique spécifique et de sa variété climatique, l'Algérie possède une végétation abondante et très étendue. Plus de 3000 espèces de plantes sont recensées, dont 15% sont endémiques, et elles font partie de diverses familles botaniques (**Sánchez-Chávez et al., 2019**). De nombreuses plantes appartenant à la famille des Astéracées sont cultivées pour leur apport nutritionnel (tournesol, artichaut, laitue, chicorée, camomille, etc.) ou pour leur utilisation en tant que plantes décoratives (dahlias, asters, etc.) (**Lawrence, 1973**). En effet, il a été rapporté que Astéracées possèdent une activité antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire, antiproliférative et anti-leishmaniose (**Da Silva et al., 2019**).

La vaste gamme de métabolites secondaires présents chez les Astéracées est responsable de leur multitude d'activités pharmacologiques, ce qui explique pourquoi de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle (**Sarembaud et Poitevin, 1996**). Le genre *Centaurea*, appartenant à la famille des Asteraceae, compte environ 700 espèces à travers le monde, réparties notamment en Europe du Sud, dans le Bassin Méditerranéen, en Asie occidentale et sur le continent américain (**Mabberley, 1987**). En Algérie, 45 espèces sont répertoriées, parmi lesquelles sept sont présentes dans le désert du Sahara (**Labed et al., 2019**).

Les *Centaurea* sont des plantes à résine ou à essence, dépourvues de latex, qui se développent en touffes ou en semis, principalement au printemps. Leur habitat varie, allant des déserts et semi-déserts aux pentes abruptes, en passant par les hautes montagnes, les terres arables, les zones périodiquement inondées, les zones sèches et les zones partiellement exposées au soleil (**Hellwig, 2004**). En Algérie, la Centaurée est souvent désignée sous le nom de "Mers'gousse" (**Bouafia et al., 2023**).

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référencées pour une large utilisation en médecine traditionnelle et sont depuis longtemps connues en médecine populaire pour leur

richesse en substances naturelles cicatrisantes utilisées contre plusieurs maladies, dans la littérature, Plusieurs études phytochimiques et pharmacologiques récentes et ancienne ont examiné différents types de Centaurée traditionnellement utilisés à des fins différentes, notamment dans le traitement des abcès, des hémorroïdes, des ulcères gastriques, des infections microbiennes, du cancer. Des études ont également révélé l'importance de ces espèces pour les industries alimentaires et pharmacologiques, par exemple : **Sharonova et al., 2021 ; Ali et al., 2023 ; Askari et al., 2023 ; Badalamenti et al., 2023 ; Bancheva et al., 2023 ; Bouafia et al., 2023 ; Carev et al., 2023 ; Kısa et al., 2023 ; Yırtıcı et al., 2023 ; Bibi et al., 2024 ; Sgadari et al., 2024 ; Zorrilla et al., 2024 et Tüfekçi et al., 2024.**

En raison de leurs propriétés intéressantes pour la santé, les polyphénols font l'objet d'un intérêt et d'une popularité croissante, même si leurs quantités dans la plupart des sources naturelles ne sont souvent pas suffisantes pour un apport alimentaire optimal (**Arfaoui, 2021**).

Les composés phénoliques sont largement répandus dans le règne végétal et nombreux parmi eux présentent une gamme d'activités biologiques, incluant des propriétés antioxydantes, antidiabétiques, anticancérigènes, antimicrobiennes, antiallergiques, antimutagènes et anti-inflammatoires (**Arfaoui, 2021**).

L'objectif principal de ce travail est la valorisation de la flore algérienne et plus particulièrement des espèces de la région de M'sila. Ainsi, trois espèces en particulier fait l'objet de cette étude. Ces espèces endémique s'appelles *Centaurea tougourensis*, *C. dimorpha*, *C. parviflora* et le peu de travaux antérieurs réalisés sur sa phytochimie nous a poussé à l'investiguer en profondeur afin d'identifier les molécules bioactives responsables de ces propriétés pharmacologiques, mais également d'utiliser des modèles d'expérimentation in vitro afin de déceler les propriétés biologiques de ces espèces.

On est intéressé dans la présente étude aux molécules ayant des propriétés biologiques. Dans ce cadre, elle sera étudier les extraits des espèces végétale de genre *Centaurea* de la région de M'sila. Cette région abrite un site naturel exceptionnel, composé de diverses formations végétales, qui hébergent une flore riche et diversifiée, d'intérêt économique et écologique. Cet aspect a encouragé de nombreux chercheurs locaux et nationaux à explorer ce patrimoine végétal, en particulier dans les domaines de l'utilisation traditionnelle et de la valorisation pharmacologique et ethnobotanique des espèces récoltées (**Bendif, 2017**). Nous étudierons les espèces suivantes : *C. tougourensis*, *C. dimorpha* et *C. parviflora*, toutes appartenant à la famille des Asteraceae. Ces

plantes sont particulièrement reconnues en phytothérapie traditionnelle pour leurs propriétés remarquables, leur richesse en métabolites secondaires, notamment en polyphénols, *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut., endémique du nord-est algérien, a été utilisé pour ses propriétés hypoglycémiantes (**Nacer et al., 2012**)

L'espèce *Centaureae dimorpha* Viv. est une plante endémique, Utilisée dans certaines cultures pour ses propriétés médicinales, elle peut avoir des effets anti-inflammatoires ou antioxydants, De nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques ont été menées sur le genre Ceutaureae au cours de cette période. (**Akkal et al., 2007 ; Nacer et al., 2012**).

L'espèce *Centaurea parviflora*, est une plante médicinale algérienne utilisée dans la médecine populaire pour traiter différentes maladies liées aux troubles hyperglycémiques et inflammatoires, ainsi que dans l'alimentation (**Koca et al., 2009**).

Ce travail sera structuré comme suit : Le premier chapitre présente une analyse bibliographique décrivant les notions essentielles en rapport avec le contexte global de notre étude (les plantes médicinales, la famille des Astéracées et le genre *Centaurea*, la classification et l'intérêt des métabolites secondaires, les utilisations et les recherches antérieures sur les espèces étudiées, ainsi que leurs activités biologiques : antioxydantes, antimicrobiennes). Avec le second chapitre ; nous décrivons le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail notamment : Les tests de criblages phytochimiques des espèces étudiées *C. tougourensis*, *C. dimorpha*, *C. parviflora*, l'extraction des substances bioactives (métabolites secondaires rencontrés dans extraits organiques, les polyphénols), l'analyse quantitative et qualitative par chromatographie CCM, LC/MS/MS, HPLC-DAD-MS.... Ainsi, de tenter d'analyser plus précisément les résultats de dosage et d'activités biologiques : Anti-oxydants, Anti-microbiens, et de lier ces activités à la composition des extraits organiques.

Le troisième chapitre, sera consacré pour les résultats et la discussion, dans lequel seront exposés tous nos résultats aux moyens de tableaux et graphiques, interprétés et discutés. En conclusion de cette thèse, nous présenterons une synthèse générale des principaux résultats obtenus ; Enfin, ce travail sera cloturé par une conclusion générale avec des perspectives envisagées pour permettre de poursuivre ce travail et d'explorer de nouvelles voies et nous fournirons les références bibliographiques ainsi qu'une section dédiée aux annexes.

Chapitre I : Généralités

I. Plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires

I.1. Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales

Malgré les progrès considérables de la science et de la médecine moderne au cours des dernières décennies, les plantes médicinales jouent un rôle crucial dans l'amélioration de la santé des populations, notamment dans les pays en développement (**Mukherjee, 2002**). L'utilisation de méthodes modernes a suscité un intérêt grandissant pour ces plantes médicinales, ce qui permet d'évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité des métabolites secondaires, ainsi que l'impact potentiel des médicaments fabriqués à partir de ces métabolites sur la santé. Effectivement, en raison de leur grande diversité de composés phytochimiques, les plantes ont la capacité de soigner de multiples maladies chez les êtres humains et les animaux (**Dongock et al., 2018**). Selon **Ouedraogo et al., (2021)**, ces plantes représentent une source prometteuse de médicaments, car les composés phytochimiques d'intérêt thérapeutique peuvent être extraits de différentes parties de la plante, telles que l'écorce, les feuilles, les fleurs, les racines, les fruits, et les graines, avec des concentrations variables. D'après l'Organisation mondiale de la santé (**Hosseinzadeh et al., 2015**), environ 80 % de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle et de l'utilisation d'extraits végétaux pour les traitements traditionnels. Beaucoup de plantes médicinales sont consommées ou prescrites par un médecin ou un pharmacien. Ils peuvent être employés individuellement ou en combinaison avec des médicaments de synthèse.

Bien que la phytothérapie ne soit pas complémentaire de la médecine, la médecine traditionnelle occupe une place importante en Algérie, un pays très riche en fleurs. Dans plusieurs pays comme la Chine, la Turquie, etc., les botanistes, les phytochimistes, les pharmacologues et les médecins sont invités à rassembler leurs connaissances scientifiques afin de faire de la phytothérapie une discipline médicale reconnue (**Kabouche, 2005**). Effectivement, les plantes médicinales ont une action qui découle de leurs métabolites primaires et secondaires, et probablement de la synergie entre les divers composés présents (**Reguieg, 2011**).

I.2. La phytothérapie

La phytothérapie, une branche qui étudie les plantes médicinales et leurs propriétés pour les utiliser dans la fabrication de médicaments, a longtemps été considérée comme une expression de la "sagesse populaire". Elle a désormais une signification scientifique reconnue, sanctionnée

Par un diplôme spécifique permettant un examen systématique de cette discipline. La phytothérapie est reconnue par la Société médicale à part entière depuis 1987 (**Institut Européen des Substances Végétales, 2008**). Elle consiste à utiliser des plantes ou uniquement leurs "parties actives" ayant des propriétés thérapeutiques pour soigner ou prévenir les maladies (**Wichtl, 2003**).

I.3. Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire

- **Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont produits par divers organismes vivants, y compris les plantes, les champignons et les bactéries. Ces composés se distinguent par une large gamme de caractéristiques en raison de leurs variations structurales et physiologiques significatives (**Peters et al., 2019**). Ils peuvent jouer un rôle crucial dans la défense contre les herbivores et dans les interactions entre la plante et son environnement, ce qui leur confère une diversité d'activités biologiques. Ainsi, les plantes occupent une place importante dans notre écosystème. Cette diversité explique en partie pourquoi les métabolites secondaires sont actuellement privilégiés dans diverses applications industrielles et pharmaceutiques (**Shen et al., 2019**). On distingue trois grandes catégories de composés du métabolisme secondaire : les composés phénoliques, les composés terpéniques, et les alcaloïdes et composés azotés (Figure 1). Selon **Merghem (2009)**, la diversité des molécules permet de tenter une classification chimique des végétaux par la chimiotaxonomie. Cette classification vise à établir des liens entre la présence de certains types de métabolites secondaires et les taxons.

I.3.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques, ou polyphénols, sont une famille de molécules organiques très répandues dans le règne végétal. Leur principal élément structural est la présence d'un cycle aromatique avec des groupements hydroxyles libres ou liés à un glucide (**Boizot et Charpentier, 2006**) (Figure 2). Selon **Middleton et al., (2000)**, les polyphénols se trouvent dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de toutes les plantes. Ils sont également présents dans les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et les boissons telles que le jus de fruits, le café et le thé représentent environ la moitié de notre apport en polyphénols.

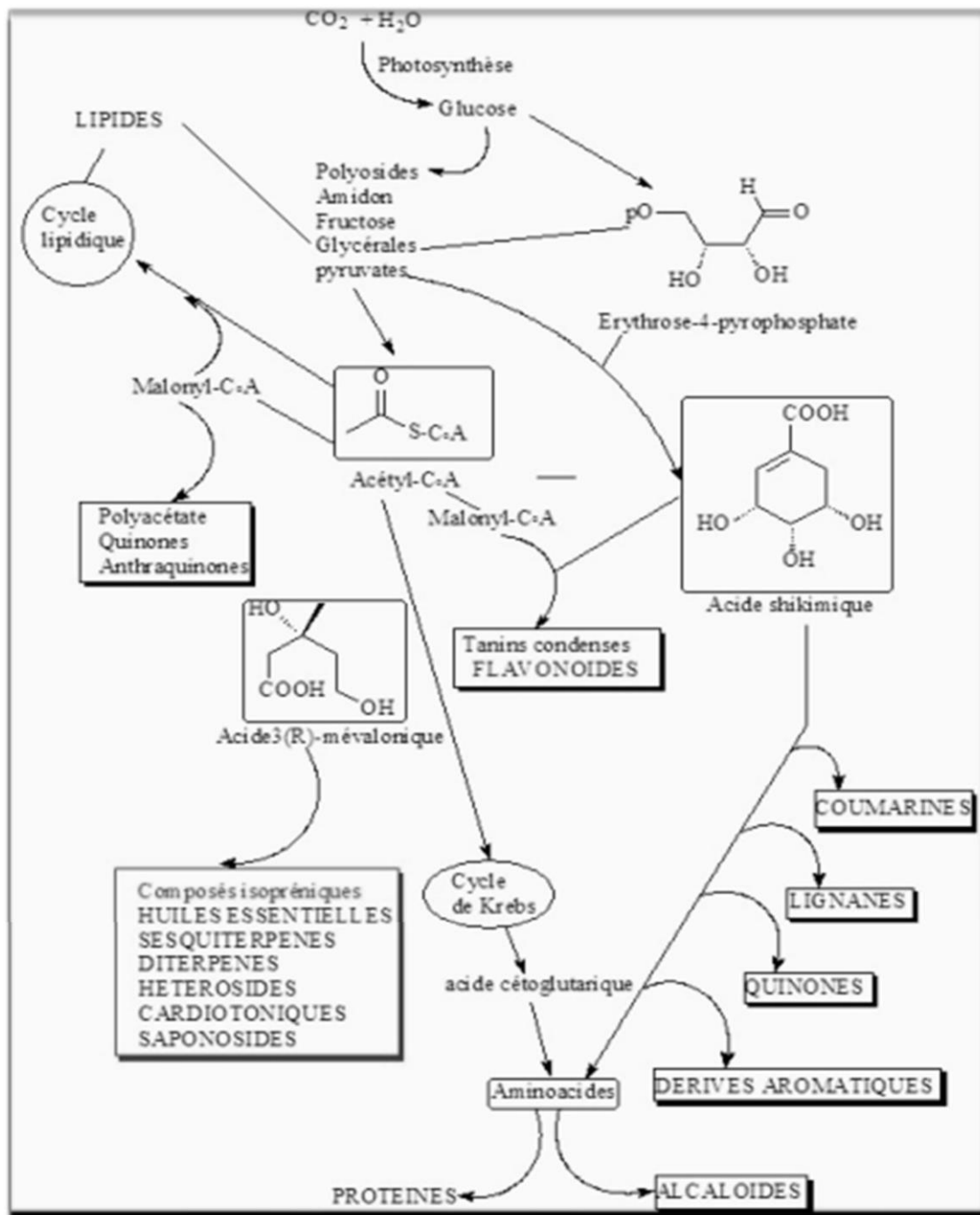


Figure 1. Voies du métabolisme secondaire des plantes et la relation avec le métabolisme primaire (Lincoln et Zeiger, 2006)

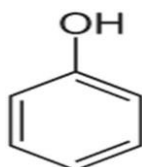


Figure 2. Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Les polyphénols sont couramment classés en fonction de leur structure, du nombre de noyaux aromatiques, et des éléments structuraux attachés à ces noyaux. On distingue deux grandes catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes. Les polyphénols sont divisés en plusieurs groupes, notamment les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques), les flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, flavanones et anthocyanines), les stilbènes (resvératrol, picéatannol), les lignanes (sesamol, pinosésinol, sinol, enterodiol), ainsi que d'autres comme les tanins (hydrolysables, non-hydrolysables et tanins condensés), les lignines, les xanthones, les chromones et les anthraquinones, comme illustré dans la Figure 3 (Prabhu *et al.*, 2021).

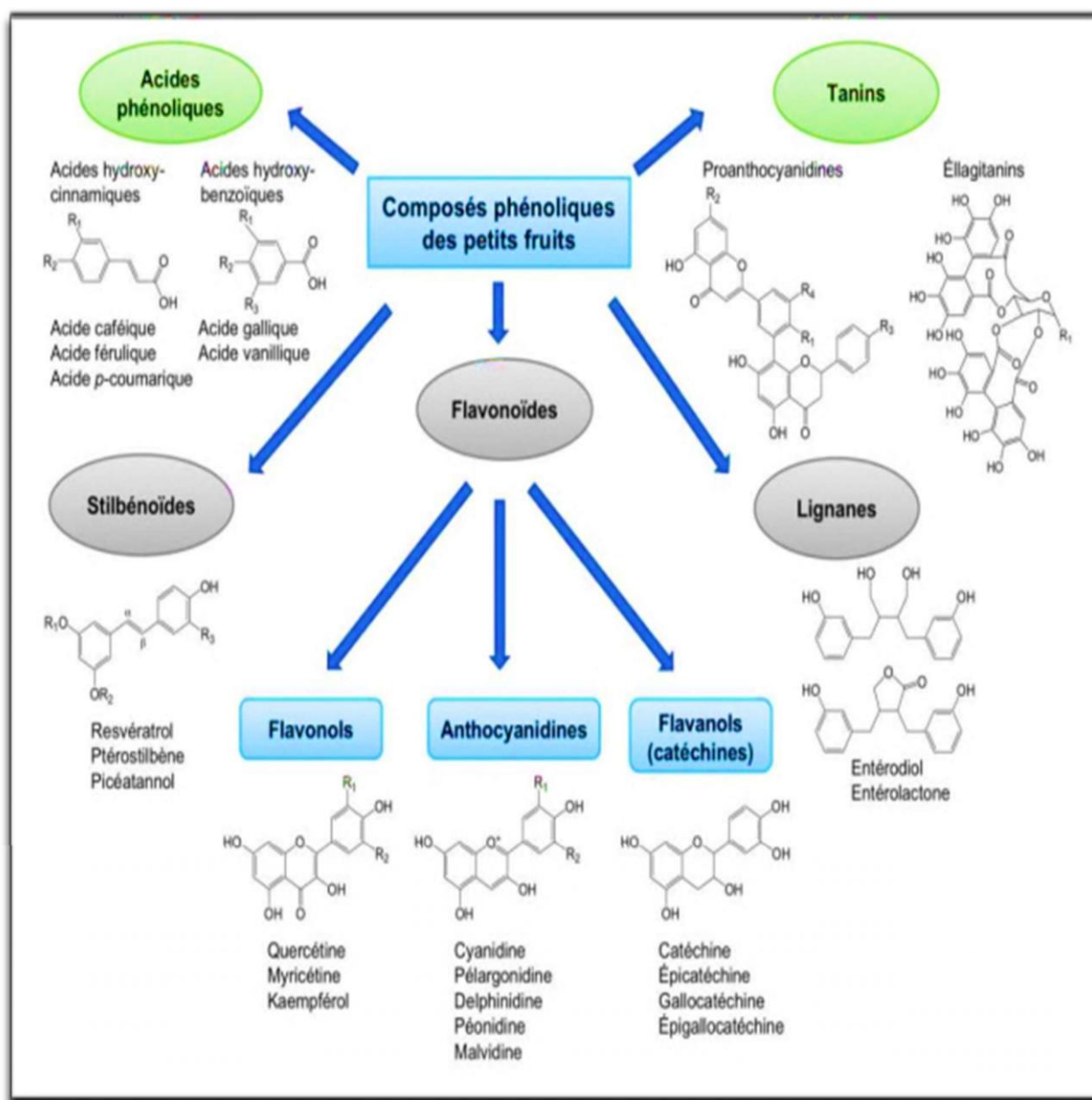


Figure 3. Principales classes des composés phénoliques (Fettah, 2019)

- **Acides phénoliques simples**

Les acides phénoliques simples comprennent tous les composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les groupes hydroxyles et les cycles phénoliques des acides phénoliques sont réputés pour leurs propriétés antioxydantes (**Kumar et Goel, 2019**). Parmi ces acides phénoliques, on peut citer l'acide rosmarinique, l'acide vanillique, l'acide férulique et l'acide citrique. L'acide gallique et l'acide coumarique ont démontré des effets antioxydants (**Kiokias et al., 2020**), ce qui explique leur présence dans de nombreux médicaments.

On distingue deux types d'acides phénoliques :

1. Les acides hydroxybenzoïques, qui sont des composés dérivés de l'acide benzoïque et présentent une structure de base de type (C6-C1) (Tableau 1). Ces molécules se trouvent généralement sous forme d'esters ou de glycosides. Le tableau 1 présente les acides hydroxybenzoïques les plus courants (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Tableau 1 : Principaux acides hydroxybenzoïques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
H	H	H	H	Acide benzoïque
H	H	OH	H	Acide phydroxy benzoïque
H	OH	OH	H	Acide protocatechique
H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
H	OH	OH	OH	Acide gallique
H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique

- **Acides hydroxycinnamiques**

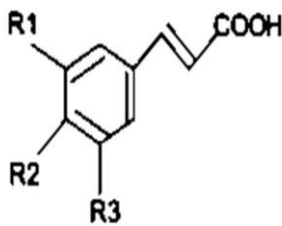
Les acides aromatiques dérivés de l'acide cinnamique sont représentés par la famille des acides hydroxycinnamiques (C6-C3) (**Singla et al., 2019**). Ils se trouvent fréquemment en association avec des molécules organiques comme l'acide chlorogénique, formant des mono-esters tels que l'acide caféylquinique (ACQ) ou les acides chlorogéniques : 3-ACQ, 5-ACQ, selon la position de la liaison sur les hydroxyles de l'acide quinique en position 3 ou 5. Des combinaisons de plusieurs acides hydroxycinnamiques avec un acide quinique, comme

l'acide 3,5-O-dicaféylquinique, existent également. La réactivité chimique de ces molécules est fortement influencée par les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique (Tableau 2).

Les sources courantes d'acides hydroxycinnamiques comprennent le café, les baies, les pommes, les céréales et les kiwis. Par exemple, le café contient de l'acide chlorogénique et de la caféine, tandis que les baies et les pommes contiennent de l'acide caféique, et les céréales contiennent de l'acide férulique. La plupart des agrumes contiennent de la caféine et de l'acide chlorogénique (acide cinnamique) (Teixeira *et al.*, 2013).

En général, les acides phénoliques sont peu abondants dans la nature, à l'exception de l'hydroquinone, présente dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae, Asteraceae...), le plus souvent sous forme de glucoside du diphenol (arbutoside) ou de son monométhyléther. Des alcénylphénols (Urushiol) et des phénoliques monoterpènes (Thymol) sont également présents.

Tableau 2 : Principaux acides hydroxycinnamiques

R1	R2	R3	Acides phénoliques	
H	H	H	Acide cinnamique	
H	OH	H	Acide <i>p</i> -coumarique	
OH	OH	H	Acide caféique	
OCH ₃	OH	H	Acide férulique	
OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique	

- **Quinones**

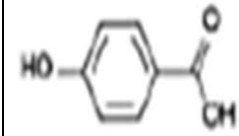
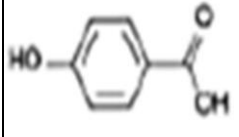
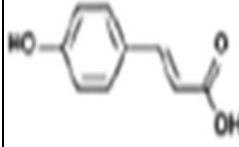
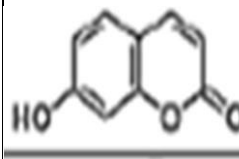
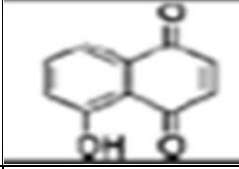
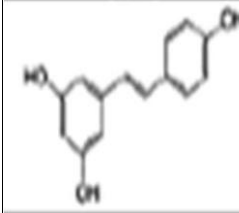
Les quinones sont une famille de composés naturels et synthétiques caractérisés par leur structure de dione insaturé cyclique totalement conjugué (Figure 4). Beaucoup de ces composés sont antimicrobiens, agissant principalement sur les bactéries à Gram positif. Les quinones, qui possèdent un noyau benzénique (C₆) comme les benzoquinones (Tableau 03), ont deux atomes d'hydrogène remplacés par deux atomes d'oxygène, formant ainsi deux liaisons carbonyles (dicétones éthyléniques conjuguées cycliques). Elles sont utilisées dans les colorants, les médicaments, les fongicides et parfois même comme vermifuges. Les quinones jouent un rôle important dans le transport des électrons au niveau des membranes mitochondriale interne et des thylakoïdes. Par exemple, la vitamine K1 (méthyl 2-naphtoquinone) est présente en grande quantité dans la luzerne. Les plantes tinctoriales appartiennent également à ce groupe. De plus, la

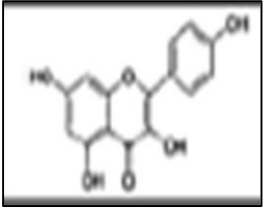
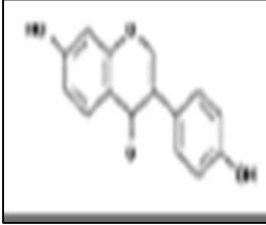
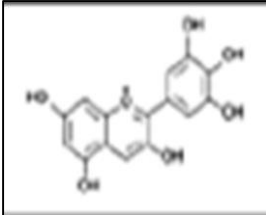
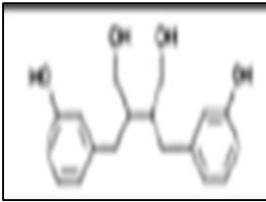
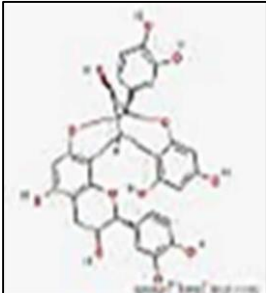
plupart des anthraquinones ont des propriétés purgatives et apéritives, agissant directement sur la musculature lisse du côlon et empêchant la résorption de l'eau. Les quinones produisent une coloration distinctive en présence d'une base (NaOH ou KOH) (Bruneton, 2009) (Figure 4).

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires très abondants dans les plantes, les fruits et les graines, responsables des caractéristiques de couleur, de parfum et de saveur, dans les plantes, les flavonoïdes remplissent de nombreuses fonctions telles que la régulation de la croissance cellulaire, l'attraction des insectes pollinisateurs et la protection contre les stress biotiques et abiotiques (De Luna *et al.*, 2020).

Tableau 3. Différentes classes des composés phénoliques (Daayf & Lattanzid, 2008)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule
C2	Phénols simples	Hydroquinone	
C6-C1	Acide hydroxybenzoïques	Acide p-hydroxybenzoïque	
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique	
	coumarines	Ombelliférone	
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	
C6-C3-C6	Stilbénoides	Trans-resvératrol	

C6-C3-C6	Flavonoides	Kaempférol	
	Isoflavonoides	Daidzéine	
	Anthocyanes	Delphinidol	
(C6-C3)2	Lignanes	Entérodiol	
(C6-C3-C6)	Tanins condensés	Procyanidol	

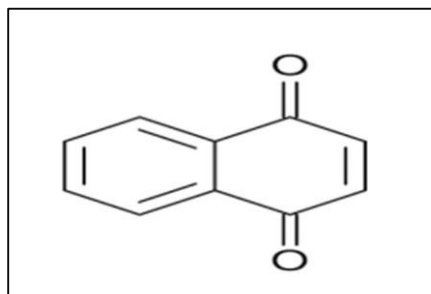


Figure 4. Structure de base des quinones.

Par exemple, les flavonoïdes végétaux peuvent agir en tant que molécules signal, filtres UV et pièges à espèces réactives de l'oxygène, et ont plusieurs rôles fonctionnels dans la tolérance à la sécheresse, à la chaleur et au gel (**Panche *et al.*, 2016**). Les flavonoïdes possèdent un squelette flavone de base de 15 atomes de carbone, C6-C3-C6, avec deux cycles benzéniques (A et B) liés par un cycle pyrane à trois atomes de carbone (C) (**Diaset *al.*, 2021**) (**Figure 5**). La position du cycle B catéchol sur le cycle C pyrane et le nombre et la position des groupes hydroxy sur le groupe catéchol du cycle B influencent la capacité antioxydante des flavonoïdes (**D'Amelia *et al.*, 2018**). Les groupes hydroxy fonctionnels dans les flavonoïdes peuvent donner des électrons par résonance pour stabiliser les radicaux libres et médier la protection antioxydante. En fonction de la structure des flavonoïdes, ils peuvent être classés en six grandes classes, les flavan-3-ols, les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanes (**Šamec *et al.*, 2021**). En raison de leurs remarquables caractéristiques antioxydantes, les flavonoïdes sont utilisés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (**Kumar & Pandey, 2013**). Par conséquent, plusieurs procédures d'extraction des flavonoïdes ont été explorées, et ces dernières années, des méthodes et des stratégies d'extraction plus respectueuses de l'environnement et permettant d'obtenir des rendements élevés ont été développées (**De Luna *et al.*, 2020**).

- **Coumarines**

Les coumarines caractérisées par un noyau (2H-1-benzopyran-2-one) constituent une grande classe de substances phénoliques présentes dans les plantes et sont composées de cycles benzéniques et de pyranes α -fusionnés (**Aoyama, 1992**). Plus de 1300 coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires chez les plantes, les bactéries et les champignons (**Iranshahi *et al.*, 2009**). Le composé prototypique est connu sous le nom de 1,2-benzopyrone ou, moins communément, sous celui d'acide -hydroxycinnamique et de lactone, et il a été largement étudié. Bien que réparties dans toutes les parties de la plante, les coumarines se trouvent à des niveaux élevés dans les fruits, les racines et les feuilles (**Booth *et al.*, 2004**).

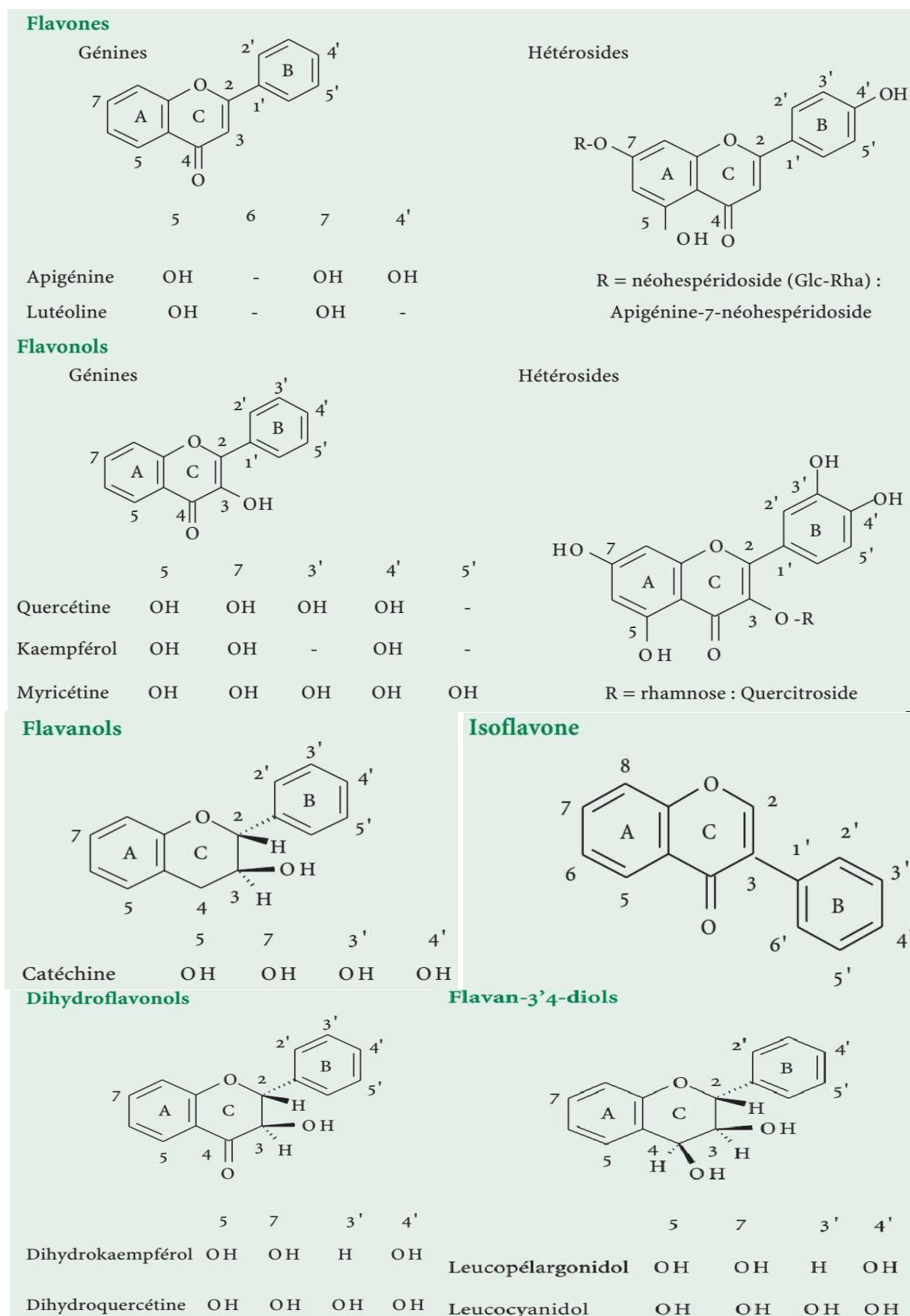


Figure 5. Différents types structuraux de flavonoïdes (Ghedira, 2005)

Elles sont également présentes à des niveaux élevés dans certaines huiles essentielles comme l'huile de cassia (**Choi et al., 2001**). Il existe différents types de coumarines trouvés dans la nature en raison de diverses permutations dues à des substitutions et des conjugaisons ; cependant, la plupart des études pharmacologiques et biochimiques ont été réalisées sur la coumarine elle-même et sur son métabolite principal, la 7-hydroxycoumarine chez l'homme (**Lake, 1999**). Une partie de ces travaux pharmacologiques antérieurs sur la coumarine a été examinée (**Egan et al., 1990**). Leurs structures sont très variées et peuvent être divisées en deux grands groupes : les coumarines simples et les coumarines complexes (**Smyth et al., 2009**).

Selon **Borges et al. (2005)**, les coumarines constituent une vaste famille de métabolites secondaires présents dans diverses espèces végétales (plus de 1300 coumarines ont été identifiées à partir de sources naturelles, y compris les plantes vertes), ainsi que dans les champignons et les micro-organismes. La biosynthèse des coumarines se fait principalement par l'acide shikimique, en passant par l'acide cinnamique et en utilisant le métabolisme de la phénylalanine. L'histoire de ces produits naturels remonte à 200 ans. Le nom de la classe provient de la plante *Coumarouna odorata* (*Dipteryx odorata*), à partir de laquelle Vogel a isolé le membre le plus simple de cette famille, la coumarine elle-même (Figure 6), en 1820 (**Pereira et al., 2018**). Selon l'IUPAC (2005), les coumarines sont des hétérocycles organiques dont le noyau est la benzo- α -pyrone (2H-1-benzopyran-2-one). La nomenclature systématique des coumarines a été établie par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC).

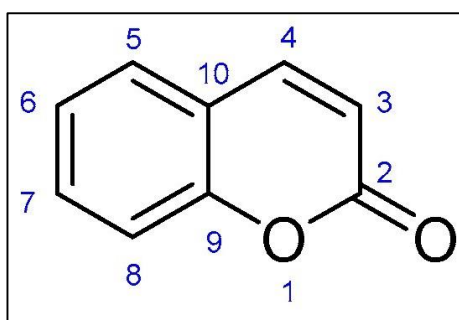


Figure 6. Structure du noyau des coumarines.

- **Anthocyanes**

Les anthocyanes, dérivées des termes grecs "anthos" (fleur) et "kuanos" (bleu violet), sont des molécules de la famille des flavonoïdes, regroupant les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés, capables d'absorber la lumière visible. Considérées par les botanistes comme des pigments anthocyaniques, elles colorent les fleurs, les fruits, et parfois les feuilles, avec des teintes allant de l'orange rougeâtre au bleu persan. Ces pigments sont similaires aux flavonoïdes en termes

d'origine, de structure et de propriétés pharmacologiques (**Castañeda Ovando et al., 2009**). Les anthocyanosides, les seuls hétérosides présents dans les racines, les tiges, les feuilles, et les graines, possèdent un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 (Figure 7). À ce jour, plus de 600 anthocyanes ont été isolées à partir de diverses espèces végétales, reposant toutes sur l'ion flavylium comme structure centrale de base. Par conséquent, l'anthocyane dérive du flavonol et possède la structure de base de l'ion flavylium, caractérisée par l'absence d'oxygène cétonique en position 4. Les anthocyanes peuvent être la pélagonidine, la cyanidine et la delphinidine sont les plus courantes dans la nature **figure 7 (Jaakola, 2013)**. Les effets pharmacologiques des anthocyanes varient, mais les cardioprotecteurs et les antioxydants semblent être les plus importants (**Khoo et al., 2017**).

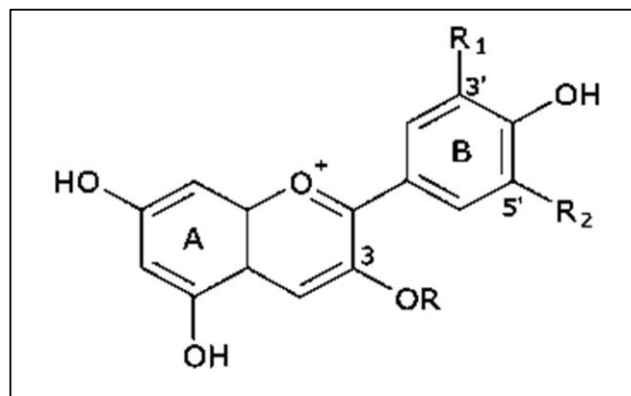


Figure 7. Structure générale des anthocyanes.

- **Tannins**

Les tannins sont des composés polyphénoliques complexes qui sont très présents chez les plantes dicotylédones (tannins hydrolysables) et les arbres à graines nues (tannins condensés). (Figure 8), En général, ces composés sont employés pour provoquer la coagulation des protéines ou pour traiter les peaux des animaux, ainsi que dans l'industrie alimentaire et le processus de clarification des boissons comme le vin, la bière et les jus de fruits (Effets biologiques) (**Pizzi, 2019**). **Haslam (1996)** a identifié la présence de tannins dans les bourgeons, les feuilles, les tiges, les fruits, les graines, les racines, et les plantes, ainsi que dans le bois des arbres. Au niveau écologique, les tanins sont emmagasinés dans l'écorce des arbres pour les protéger contre les infections provoquées par des champignons, des bactéries pathogènes et même des parasites (**Cowan, 1999**). Les plantes riches en tannins sont souvent employées en décoction dans la médecine traditionnelle indienne pour soigner la dysenterie et fortifier les gencives (**Hussain et al., 2019**).

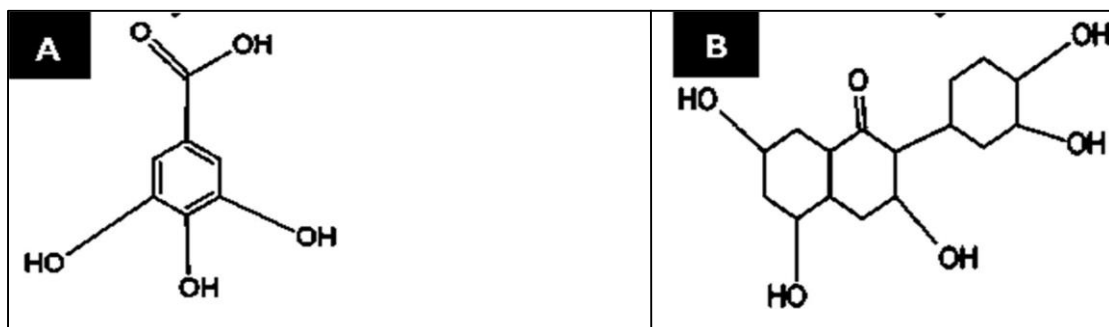


Figure 8. Structure de base des tanins (A) : acide gallique constituant principal des tanins hydrolysables ; (B) : unité constitutive de base des tanins condensés.

- **Lignane**

Les lignanes constituent un vaste groupe de composés naturels dérivés de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique (Teponno *et al.*, 2016). Sur le plan structural, les lignanes contiennent une structure de base composée de deux unités ou plus de phénylpropanoïdes (Ayres & Loike, 1990), et les monomères formant les lignanes sont l'acide cinnamique, l'alcool cinnamylique, le propénylbenzène et le benzène allylique. Lorsque la liaison moléculaire des monomères se produit entre les positions β - β' (également appelée 8-8'), On appelle ces composés les « lignanas classiques ». D'autre part, les composés sont classés en « néolignanes » si les principales unités structurales sont fusionnées de toute autre façon (liaison non β - β'). Les structures des néolignanes sont plus diversifiées que celles des lignanes classiques. Historiquement, le lignane est employé pour désigner les composés dont le squelette est le résultat de l'établissement - on verra qu'il est radicalaire - d'une liaison entre les carbones 8 des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1- phénylpropane (liaison 8-8').

I.3.2. Terpènes

Le mot terpène a été inventé par Kekulé et trouve son origine dans l'arbre de térébinthe : « Pistacia Terebinthus » (Ayad, 2008). D'après Langenheim (1994), les terpènes sont des composés odorants présents dans diverses plantes telles que la lavande, le pin et l'écorce d'orange. Les plantes, les animaux marins, les champignons et même les animaux produisent ces composés (Benaissa, 2011). Les terpènes sont des composés isopréniques formés de cinq atomes de carbone (Figure 9). Ils se différencient les uns des autres en raison de leurs groupes fonctionnels et de leurs squelettes carbonés fondamentaux (Souza *et al.*, 2014). Généralement, les terpènes ont des structures multicycliques et sont principalement composés d'isoprène, avec la formule $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (Cho *et al.*, 2017).

D'après **Yang et al. (2020)** et **Guimarães et al. (2019)**, les terpènes sont surtout connus pour leurs effets antimicrobiens contre différents types de souches pathogènes comme les bactéries, les virus et les champignons. Toutefois, ces composés paraissent également présenter une action hypotensive particulièrement notable (**Menezes et al., 2010**). Les terpènes pourraient également avoir des propriétés relaxantes et apaisantes. En Asie, de nombreuses plantes riches en terpènes sont utilisées sous forme d'infusions pour calmer la nervosité (**Koulivand et al., 2013**).

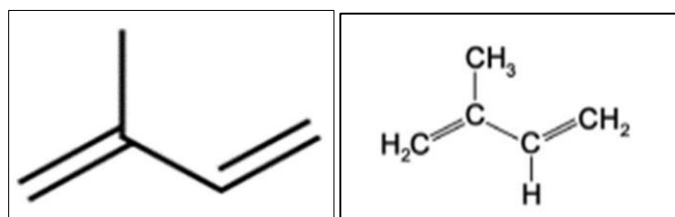


Figure 9. Structure de base du précurseur des terpènes (isoprène) (**Cho et al., 2017**)

Selon **Hernandez-ochoa (2005)**, ils sont classés en fonction du nombre d'entités isoprènes en :

- Monoterpènes sont constitués de deux isoprènes (C₁₀H₁₆).
- Les sesquiterpènes sont constitués de trois isoprènes qui se composent de C₁₅H₂₄.
- Diterpènes sont constitués de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂).
- Tétraterpènes sont constitués de huit isoprènes qui mènent aux caroténoïdes.
- Polyterpènes sont constitués de (C₅H₈)_n ou (n compris entre 9 et 30)

- **Huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés volatils à semi-volatils, lipophiles et odorants extraits de plantes par des procédés comme la distillation à la vapeur, l'extraction avec des solvants ou la pression à froid. Ces substances organiques aromatiques liquides se trouvent couramment dans diverses parties d'arbres, de plantes, d'épices, etc. (**Bahri et al., 2020**). Ils sont distillés avec de la vapeur d'eau et subissent des changements divers lors de leur préparation (**Figueredo, 2007**).

Seules les plantes de haut niveau renferment des huiles essentielles. D'après **Rakotonanahary (2012)**, ces substances sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et ont tendance à se regrouper dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent localisées à la surface des tissus végétaux et protégées par une cuticule. Toutes les plantes renferment ces huiles essentielles. Cependant, elles se trouvent fréquemment dans quelques

familles telles que les conifères, les rutacées, les ombellifères, les myrtacées, les lamiacées, Asteraceae, Apiaceae et les poacées.

I.3.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, hétérocycliques, qui ont des effets physiologiques significatifs même en quantités minimes (**Zenk et Juenger, 2007**). Parmi les nombreux systèmes de classification des alcaloïdes, on peut mentionner celui qui classe les alcaloïdes en trois groupes en fonction de leur origine biologique et de la position de l'azot, alcaloïdes vrais, Pseudo-alcaloïdes et Proto-alcaloïdes (**Dehak, 2013**).

a) Les vrais alcaloïdes

Les alcaloïdes vrais sont les plus courants parmi les alcaloïdes nocifs et ont différentes actions biologiques. Ils contiennent des acides aminés et un atome d'azote se trouve dans un cycle hétérocyclique. D'après **Tadeusz (2007)**, ils sont présents dans les végétaux, que ce soit sous forme libre, sous forme de sel ou sous forme de N-Oxyde.

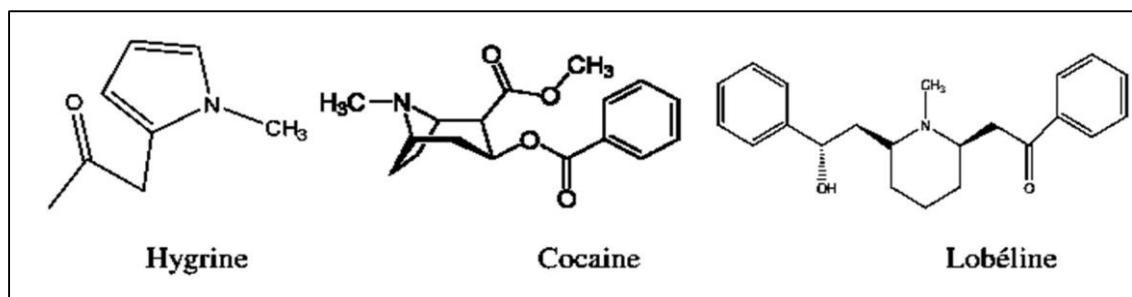


Figure 10. Structure de quelques alcaloïdes vrais.

b) Pseudo-alcaloïdes

Sont ceux dont le squelette carboné de base ne provient pas d'un acide aminé. Il s'agit d'alcaloïdes aromatiques, généralement des isoterpénoïdes tels que la capsaïcine. Les pseudoalcaloïdes sont également présents dans la caféïne et la noréphédrine (Figure 11).

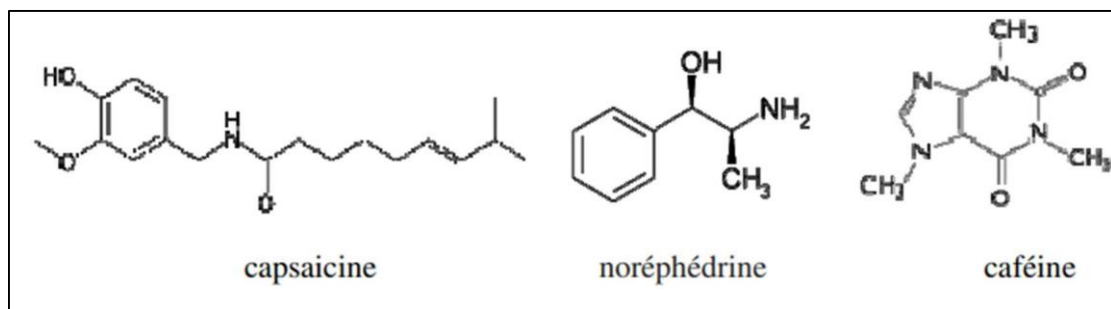


Figure 11. Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.

c) Les proto-alcaloïdes sont :

Il s'agit d'acides aminés simples dont l'azote n'est pas présent dans des structures cycliques (comme la colchicine), tandis que certains s'associent à des structures cycliques, comme la colchicine. Les alcaloïdes indoliques monoterpéniques sont des résidus terpéniques utilisés dans la lutte contre le cancer (Figure 12).

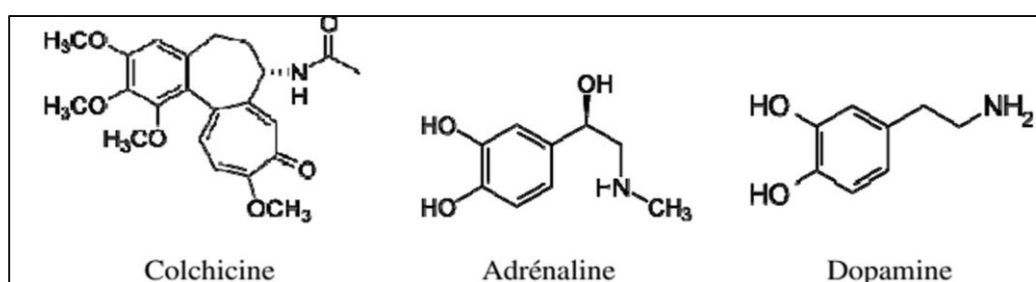


Figure 12. Exemple des proto-alcaloïdes.

I.4. Techniques d'extraction à partir de plantes

L'extraction est une procédure qui utilise des solvants sélectifs pour séparer les composants pharmaceutiquement actifs des tissus végétaux ou animaux des parties inactives ou inertes. Les solvants polaires (par exemple, l'eau, l'éthanol et le méthanol), les solvants intermédiaires-polaires (par exemple, l'acétone, le chlorure de méthylène et l'acétate d'éthyle), et les solvants non polaires (par exemple, le n-hexane, l'éther et le chloroforme) sont fréquemment utilisés dans l'extraction de produits naturels (**Abubakar & Haque, 2020**). La qualité et la quantité des constituants bioactifs trouvés dans les matériaux végétaux et animaux dépendent largement de la sélection d'une technique d'extraction appropriée. Pendant le processus d'extraction, les solvants se déplacent dans les matières premières solides et solubilisent les composés de polarité similaire selon le principe "similaire dissout le similaire". En plus d'utiliser une méthode d'extraction appropriée, le choix

d'un solvant approprié est crucial. De plus, les méthodes d'extraction sont continuellement modifiées (**Zhang et al., 2018**).

Il existe deux grandes catégories de techniques d'extraction : conventionnelles et non conventionnelles (techniques modernes). La Soxhlet, la macération, la percolation, la décoction et l'hydrodistillation sont les techniques d'extraction conventionnelles les plus couramment utilisées. Cependant, ces techniques présentent divers inconvénients, notamment des temps d'extraction prolongés, des coûts élevés, une faible sélectivité d'extraction, une faible efficacité d'extraction, une forte consommation de solvant, et une dégradation des composés bioactifs due à une exposition prolongée à des températures d'extraction élevées. Pour surmonter les limitations des méthodes d'extraction conventionnelles, de nouvelles techniques d'extraction telles que L'extraction accélérée par solvant, l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) ou par ultrasons (UAE) ont été développées. Ces techniques peuvent augmenter l'efficacité de séparation, réduire l'utilisation de matières premières, de solvants et d'énergie, et avoir un impact environnemental minimal (**Zhang et al., 2018**).

I.5. Techniques de séparation, d'analyse et de caractérisation chimique des extraits

Les extraits sont généralement des mélanges multi-composants de substances actives, partiellement actives et inertes, et leurs activités sont rarement exercées sur une seule cible. On pense généralement que plusieurs composants dans l'extrait peuvent contribuer à une réponse synergique et que la réponse thérapeutique est parfois liée à la préparation et à l'administration conventionnelles (**Ponphaiboon et al., 2023**). La composition de l'extrait varie en fonction de la technique d'extraction et des matières premières utilisées (telles que les conditions de croissance, le stade de développement et les protocoles de récolte) (**Heinrich et al., 2022**). Par conséquent, il est nécessaire d'étudier à la fois le type et la quantité de substances bioactives dans les extraits qui ont été préparés. En plus des paramètres d'extraction, une évaluation complète de la composition phytochimique est requise. Les extraits devraient idéalement être analysés qualitativement et quantitativement à l'aide d'une variété de techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Tableau 4. Différentes méthodes d'extraction de produits naturels (Zhang *et al.*, 2018).

Méthode	Solvant	Température	Pression	Temps	Volume de solvant consommé	Polarité des produits naturels extraits
Macération	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante	Atmosphérique	Long	Élevé	Dépend du solvant d'extraction
Percolation	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante, parfois chauffé	Atmosphérique	Long	Élevé	Dépend du solvant d'extraction
Décoction	Eau	Sous chauffage	Atmosphérique	Moyen	Aucun	Composés polaires
Extraction par reflux	Solvants aqueux et non aqueux	Sous chauffage	Atmosphérique	Moyen	Moyen	Dépend du solvant d'extraction
Extraction Soxhlet	Solvants organiques	Sous chauffage	Atmosphérique	Long	Moyen	Dépend du solvant d'extraction
Extraction liquide pressurisée	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Sous chauffage	Élevée	Court	Petit	Dépend du solvant d'extraction
Extraction par fluide supercritique	Fluide supercritique (généralement S-CO ₂), parfois avec modificateur	Proche de la température ambiante	Élevée	Court	Aucun ou petit	Composés non polaires à modérément polaires
Extraction assistée par ultrasons	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante, ou sous chauffage	Atmosphérique	Court	Moyen	Dépend du solvant d'extraction
Extraction assistée par micro-ondes	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante	Atmosphérique	Court	Aucun ou modéré	Dépend du solvant d'extraction
Extraction assistée par champ électrique pulsé	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante, ou sous chauffage	Atmosphérique	Court	Moyen	Dépend du solvant d'extraction
Extraction assistée par enzyme	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante, ou chauffé après traitement enzymatique	Atmosphérique	Moyen	Moyen	Dépend du solvant d'extraction
Hydrodistillation et distillation à la vapeur non polaire	Eau	Sous chauffage	Atmosphérique	Long	Aucun	Huile essentielle (généralement

I.5.1. Techniques chromatographiques

La chromatographie sur couche mince (CCM), est l'une des techniques de séparation chromatographique les plus simples utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative (**Ponphaiboon *et al.*, 2023**). Néanmoins, la CCM ne peut détecter que les substances qui fluorescent sous une lumière ultraviolette à longue longueur d'onde (360 nm) ou qui absorbent sous une lumière ultraviolette à courte longueur d'onde (254 nm). De plus, certains composés peuvent être détectés en pulvérisant des réactifs qui subissent une réaction chimique avec un composé sur la plaque de CCM (**Wilson & Poole, 2023**). Pour purifier ou isoler de grandes quantités de produits naturels, la chromatographie liquide à haute performance préparative (HPLC préparative) nécessite généralement de grandes colonnes, un chargement d'échantillon important, un volume de phase mobile élevé et des débits élevés dans un système HPLC (**Ponphaiboon *et al.*, 2023**). Pour obtenir de petites quantités de composés purs, il est parfois possible de réaliser une isolation avec des systèmes HPLC à l'échelle analytique. La chromatographie en phase normale (adaptée à la séparation des produits naturels peu polaires ou lipophiles), en phase inverse (adaptée à l'isolation de produits naturels hautement polaires ou hydrophiles), par exclusion de taille (adaptée à la séparation de composés de poids moléculaire inférieur) et par échange d'ions (adaptée à la séparation d'amines ou d'acides) figurent parmi les différents modes de HPLC actuellement disponibles pour purifier la plupart des classes de produits naturels (**Latif & Sarker, 2012**). La chromatographie en phase gazeuse (GC) est l'une des techniques les plus essentielles et répandues pour la séparation des produits naturels, notamment des terpènes et d'autres composés volatils stables à haute température (**Ponphaiboon *et al.*, 2023**). Si les produits naturels sont non volatils, ils doivent subir une silylation, une acylation, une alkylation ou d'autres réactions de dérivation appropriées pour les rendre volatils. Les techniques chromatographiques pour la GC sont catégorisées en chromatographie par adsorption (interaction entre une phase stationnaire solide et la phase gazeuse) et chromatographie par partition (interaction entre une phase stationnaire liquide et la phase gazeuse). Pour obtenir une bonne séparation en GC, la colonne doit être soigneusement choisie en fonction du type de produits naturels, du nombre d'extraits bruts et de leur complexité. Par exemple, le polyéthylène glycol utilisé comme phase stationnaire d'une colonne de GC est approprié pour séparer les composés avec des groupes fonctionnels polaires, tels que les acides organiques et les huiles volatiles (**Özek, & Demirci, 2012**).

I.5.2. Techniques spectroscopiques

Comme mentionné précédemment, les extraits bruts de produits naturels contiennent généralement de nombreux composés, et la purification de molécules spécifiques nécessite une technique de séparation particulière. Pour l'élucidation ou l'identification de la structure, la spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM) ont été utilisées (**Ponphaiboon *et al.*, 2023**). Le spectrophotomètre UV-Vis fournit des informations sur la structure des molécules conjuguées ou aromatiques. Différents groupes fonctionnels des produits naturels peuvent être identifiés à l'aide des spectres FTIR. Les expériences de RMN unidimensionnelle (1D), telles que la RMN du proton et du carbone-13, fournissent des informations sur la composition qualitative et quantitative des produits naturels. Initialement, elles sont utilisées pour déterminer la structure chimique de diverses classes de produits naturels, y compris les acides aminés, les acides organiques, les sucres, les composés phénoliques, les alcools et les esters (**Le Mao *et al.*, 2021**). En plus des expériences de RMN 1D, de nombreuses expériences de RMN 2D ont été développées pour l'élucidation de la structure en fournissant des informations sur les corrélations des noyaux via des couplages scalaire ou dipolaire, révélant les liaisons entre le proton et le proton et le proton et le carbone-13 ou l'hétéroatome au sein des structures moléculaires (**Bross-Walch *et al.*, 2015**).

Bien que les composés soient absolument identifiés par l'interprétation des expériences de RMN 2D, les expériences de RMN 1D fournissent néanmoins des informations précieuses. Par exemple, le nombre de signaux de carbone-13 aide à identifier les structures des terpènes constitués d'unités isoprénoides ; l'augmentation de l'aire sous le signal du proton et la diminution des signaux de carbone-13 aident à identifier les molécules symétriques ; et des décalages chimiques spécifiques du proton et du carbone-13 aident à confirmer la présence d'anneaux aromatiques ou de groupes carbonyle dans les structures moléculaires. De plus, les spectres RMN du proton révèlent la présence de certains groupes fonctionnels, y compris les groupes hydroxyle et amine primaire et secondaire (**Bross-Walch *et al.*, 2015**).

En raison des limitations inhérentes de chaque méthode de détection, cependant, l'utilisation d'une seule méthode peut entraîner la détection d'un sous-ensemble de composants, laissant un grand nombre de substances non détectées (**Ponphaiboon *et al.*, 2023**). Par conséquent, il peut être nécessaire dans certains cas de démontrer les structures des produits naturels en utilisant plusieurs techniques de spectroscopie. Avant la séparation chromatographique, la préparation de

l'échantillon est cruciale pour l'élimination des interférences et des substances non intentionnelles. Il existe de nombreuses techniques de préparation d'échantillons, notamment l'extraction en phase solide (SPE) et l'extraction liquide-liquide (LLE). En général, les composés d'intérêt sont extraits à l'aide de LLE afin de séparer les composés en fonction de leurs solubilités relatives dans deux liquides immiscibles distincts, généralement aqueux (polaire) et un solvant organique (non polaire) (**Tshepelevitsh et al., 2017**). La LLE améliore la concentration de la substance d'intérêt, entraînant une augmentation proportionnelle du ratio de la surface sous le signal RMN du proton (valeur d'intégration) dans la structure de la substance d'intérêt par rapport à celle des autres substances (**Teipel et al., 2020**). En plus d'utiliser la RMN du proton pour élucider les structures chimiques des produits naturels purs obtenus à partir de séparations chromatographiques, elle peut également être utilisée pour surveiller les substances d'intérêt lors de la préparation de l'échantillon. Par exemple, l'extrait aqueux de l'arbuste médicinal *Tamarix gallica* a été extrait ultérieurement à l'aide d'acétate d'éthyle et de n-butanol en LLE. Les techniques spectroscopiques couplées à la chromatographie liquide ou gazeuse, telles que HPLC avec détection ultraviolette (HPLC-UV), la HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-SM), la HPLC couplée à la résonance magnétique nucléaire (HPLC-RMN), la GC avec détection par ionisation de flamme (CG-FID) et la GC couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), sont des techniques hybrides qui ont été utilisées pour la séparation et l'identification simultanées des constituants d'un extrait (**Ponphaiboon et al., 2023**). Ces techniques permettent la détermination rapide des produits naturels connus en utilisant une quantité minimale de matériau d'échantillon. Pour détecter différentes classes de composés à l'aide de la HPLC-UV, différentes longueurs d'onde de détection sont nécessaires. Avec l'analyse HPLC-UV, seuls les composés contenant des chromophores peuvent être détectés. La HPLC-RMN est une approche viable pour l'analyse routinière d'extraits complexes. La combinaison de la RMN du carbone-13 et de la RMN du proton fournit des informations structurales détaillées sur tous les composés organiques. Cependant, la méthode est coûteuse, nécessite beaucoup d'entretien et est relativement peu sensible. Certains composés s'ionisent uniquement dans le mode ionique positif ou négatif de la HPLC-SM et de la CG-SM ; les deux modes ioniques sont nécessaires pour détecter autant que possible. Certaines substances peuvent nécessiter des sources d'ionisation uniques. En utilisant différents gradients de température et des phases stationnaires, la CG-FID et la CG-SM peuvent exclure la co-é elution de composés. Cependant, cela ne s'applique qu'aux composés volatils ou dérivés. Il est bien connu que la composition chimique des extraits naturels est complexe. L'élucidation de la structure et la quantification des composés biologiquement actifs dans les extraits nécessitent un équipement

spécialisé, en particulier la technique hybride. Comme mentionné ci-dessus, la combinaison d'une technique de séparation avec une technologie de détection spectroscopique en ligne produit la technique hybride. La partie séparation, généralement une HPLC ou une CG, et la partie détection, un ou plusieurs détecteurs spectroscopiques tels qu'UV-vis, SM et RMN, sont couplés pour la séparation, l'identification structurale et la quantification simultanées des composants présents dans un extrait complexe. Dans le cadre de l'optimisation de l'extraction, la technique hybride a été utilisée pour prouver la structure chimique et analyser le contenu des substances actives dans l'extrait (réponse expérimentale). Des exemples de la mise en œuvre de techniques hybrides pour optimiser l'extraction sont fournis dans les sous-sections suivantes.

I.6. Activités biologiques des extraits de plantes

Les plantes, les bactéries et les insectes représentent des sources de biomolécules aux activités diverses, qui sont dans de nombreux cas peu étudiées. Pour utiliser ces molécules à des fins différentes, il est essentiel de connaître leur structure, leurs concentrations et leur potentiel d'activité biologique. Des techniques *in vitro* qui évaluent l'activité biologique des molécules d'intérêt ont été développées depuis les années 1950 (**Barba-Ostria et al., 2022**).

I.6.1. Activité cytotoxique

Dans les premières étapes du développement de médicaments, un dépistage approfondi de la toxicité est essentiel. Les études sur les animaux sont coûteuses et sont souvent limitées par des réponses différentielles dues aux différences physiologiques entre les espèces et aux limitations de faisabilité des tests. En revanche, les essais de cytotoxicité *in vitro* sont avantageux dans les études précliniques en raison de leur admissibilité, de leur rentabilité et de leur reproductibilité. Les composés naturels sont devenus particulièrement pertinents pour identifier des traitements plus sûrs et plus efficaces (**Ling et al., 2019**). Pour évaluer la cytotoxicité dans les cellules mammifères, il est crucial de sélectionner la lignée cellulaire appropriée pour chaque expérience particulière, en tenant compte de l'espèce pertinente, des organes spécifiques et de la voie d'administration choisie. Plusieurs lignées cellulaires sont disponibles pour les tests *in vitro*, y compris des lignées cellulaires immortalisées, des cultures primaires et des cellules souches. Chaque lignée cellulaire a des exigences qui doivent être définies avant l'expérience pour assurer une compréhension adéquate des mécanismes potentiels de toxicité (**Sachana & Hargreaves, 2018**). Un large éventail de tests *in vitro* est actuellement disponible pour les tests de cytotoxicité. Alors que les tests de cytotoxicité directs se concentrent sur la détection d'une perte d'intégrité membranaire associée à la mort cellulaire, les tests de viabilité cellulaire sont développés pour mesurer l'activité liée au

maintien et à la survie cellulaires. De plus, d'autres tests permettent la quantification directe et indirecte des changements dans la population à des phases spécifiques du cycle cellulaire et fournissent des informations sur le mécanisme de la mort cellulaire (**Kamiloglu et al., 2020**).

I.6.2. Activité antioxydante

Le stress oxydatif est un concept relativement nouveau. Il participe activement à la physiologie de maladies très courantes, comme le diabète, l'hypertension artérielle, la prééclampsie, l'athérosclérose, l'insuffisance rénale aiguë, Alzheimer et Parkinson. Les cellules, en métabolisant l'oxygène, créent des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont potentiellement nocives. Dans des circonstances normales, le taux et l'amplitude de la formation d'oxydants sont équilibrés par le taux de leur élimination. Cependant, la perte d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants entraîne un stress oxydatif. Des niveaux élevés d'ERO dans les cellules biologiques ont un impact important sur leur fonctionnement, conduisant à un fonctionnement cellulaire déficient, au vieillissement ou à la maladie (**Munteanu & Apetrei, 2021**). L'étude des antioxydants et de leurs implications dans divers domaines, de l'ingénierie alimentaire à la médecine et à la pharmacie, présente un intérêt majeur pour la communauté scientifique. L'activité antioxydante peut être décrite comme la propriété d'un composé à inhiber ou diminuer l'oxydation de son substrat (**Munteanu & Apetrei, 2021**). Les antioxydants peuvent être créés naturellement dans le corps ou apportés de l'extérieur par l'alimentation ou les compléments alimentaires. Les enzymes antioxydantes principales produites naturellement dans l'organisme sont la SOD, la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px). La superoxyde dismutase (SOD) transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), lequel est utilisé comme substrat par la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px). La catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, tandis que la GSH-Px réduit à la fois le H₂O₂ et les hydroperoxydes organiques en réagissant avec le glutathion (GSH). Les antioxydants provenant de l'extérieur, tels que les vitamines E et C, peuvent être présents dans la membrane cellulaire, ainsi que dans les liquides intracellulaire et extracellulaire. Ils agissent en réponse aux ERO pour les éliminer ou les bloquer (**Munteanu & Apetrei, 2021**). Le rôle des antioxydants est de neutraliser les radicaux libres qui ayant un impact négatif sur les organismes vivants par le don d'électrons ou en brisant des processus. Un rôle particulier dans la neutralisation des effets du stress oxydatif lié à la présence de radicaux libres est joué par l'enzyme appelée superoxyde dismutase (SOD) (**Munteanu & Apetrei, 2021**). L'inhibition ou la neutralisation peut être mesurée in vitro par des méthodes chimiques (comme : ABTS, DPPH, FRAP, ORAC, CUPRAC) et biochimiques

(par exemple, dosage de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)). Néanmoins, les premières sont préférées aux secondes en raison de leur simplicité, de leur rapidité et de leurs faibles coûts (Tableau 6). Plusieurs métabolites ont montré des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres ; ceux-ci comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, et autres... Les dosages chimiques se divisent en deux catégories : ceux basés sur les réactions de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) et ceux basés sur les réactions de transfert d'électrons simples (ET). Cependant, certains combinent les deux mécanismes (comme ABTS, DPPH). Notamment, plusieurs méthodes ont une pertinence biologique limitée car elles mesurent l'inhibition de radicaux qui n'existent pas dans les systèmes biologiques (DPPH•, ABTS•+) ou la capacité de réduction basée sur un ion spécifique (Fe³⁺). L'exception à cela est le test de capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC), qui surveille l'inhibition du radical peroxyde biologiquement pertinent (ROO•), et la chimioluminescence, qui peut détecter la capacité d'extinction de différentes espèces d'oxygène et d'azote réactifs (**Barba-Ostria et al., 2022**). (Tableau 5 & 6).

I.6.3. Activité antibactérienne

L'utilité des extraits de plantes pour la thérapie antimicrobienne est prometteuse depuis l'Antiquité. Cependant, au cours des dernières années, environ 250 000 espèces végétales supérieures ont été décrites, dont 17 % ont été évaluées selon des aspects biologiques et seulement 10 % ont été évaluées pour leur activité antimicrobienne et plusieurs classes de métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, etc) (**Apak et al., 2004**). En 2019, environ 4,95 millions de décès étaient liés à la résistance aux médicaments, avec 1,95 millions attribués à des infections fongiques telles que *Candida*, *Aspergillus* et *Cryptococcus*. Dans le cas des bactéries, les agents pathogènes principaux qui provoquent des décès liés à la résistance aux antibiotiques sont *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*. La combinaison des antibiotiques et des extraits de plantes pourrait offrir de nouvelles solutions pour traiter les maladies infectieuses causées par des bactéries résistantes, quand les antibiotiques se révèlent inefficaces (**Özyürek et al., 2011**). Bien que de nouvelles technologies aient émergé pour évaluer l'activité antimicrobienne, les technologies traditionnelles sont les plus largement utilisées pour les bactéries et les champignons (**Barba-Ostria et al., 2022**) (Tableau 7).

Tableau 5. Méthodes chimiques courantes pour déterminer l'activité antioxydante des molécules naturelles (Barba-Ostria *et al.*, 2022).

Nom de la méthode	Description et principe	Methode de Detection	Avantages	Inconvenients
Tests de piégeage basés sur les radicaux/ROS				
2,2'-azinobis (3-éthylbenzo-thiazoline 6-sulfonate) (ABTS)/capacité antioxydante équivalente Trolox (TEAC)	- HAT/ET -Réaction antioxydante avec un radical cationique organique -ABTS est converti en son cation radical par addition de persulfate de sodium ou de potassium -Le radical ABTS•+ perd son absorption à 734 nm s'il est réduit par un antioxydant	Spectrophotométrie (A734) Colorimétrie	-Rapide, bon marché, Simple, Peut être utilisé sur une large gamme de valeurs de pH, Peut être couplé avec HPLC en ligne, Utilisé pour les antioxydants hydrophiles et lipophiles.	Limitée pour les systèmes biologiques, Difficultés avec la formation et la stabilité des radicaux colorés, Les composés phénoliques à faible potentiel redox peuvent réagir avec ABTS•+.
Radical libre N, N-diphényl-N'-picrylhydrazyl (DPPH)	-Réaction antioxydante avec un radical organique -Le radical libre DPPH• perd son absorption à 515-517 nm s'il est réduit par un antioxydant ou une espèce de radical libre.	Spectrophotométrie (A515) -EPR -Détection ampérométrique - Colorimétrie	-Rapide, Bon marché, Simple, Stable à température ambiante, Utilisé pour les antioxydants hydrophobes, Peut être couplé avec HPLC en ligne.	Limitée pour les systèmes biologiques, Difficultés avec la formation et la stabilité des radicaux colorés, Non recommandé pour les échantillons contenant des sondes anthocyaniques, Pourrait être interféré par la présence de borate
TRAP	Capacité antioxydante à piéger les radicaux dérivés du luminol, générés par la décomposition de l'AAPH.	Spectrophotométrie Trempe par chimiluminescence		
Capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC)	-Surveille l'inhibition de l'oxydation induite par les radicaux peroxydes -Nécessite des générateurs de radicaux peroxydes -Le radical peroxyde réagit avec une sonde fluorescente entraînant une perte de fluorescence. -Réaction antioxydante avec les radicaux peroxydes, induite par le 2,2'-azobis-2-amidino-propane (AAPH) -HORAC : Capacité antioxydante à éteindre les radicaux OH générés par un système de type Fenton à base de Co (II)	Spectrophotométrie Perte de fluorescence de la fluorescéine	Considéré comme étant d'importance biologique -Test à haut débit possible	La formation de radicaux peroxyde est thermosensible -Pourrait être interféré par les piègeurs de radicaux hydroxydes et les ions métalliques -B-phycoérythrine (sonde fluorescente), peut présenter une incohérence d'un lot à l'autre et une photo-instabilité

Chimiluminescence	- Se compose d'une espèce chimiluminescente, d'un oxydant (peroxyde d'hydrogène) en présence ou en l'absence d'un catalyseur métallique ou enzymatique, et d'un antioxydant ou d'un extrait -Diminution de l'intensité de la chimiluminescence grâce à l'antioxydant	Fluorométrie	Rapide, Bon marché, Sensible, Robuste, Écurie, Il a été automatisé, Peut être couplé à la HPLC en ligne.	Limitations des tests d'antioxydants à base de luminol -Nécessite un pH > 8,5
Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) PFRAP:	-Mesure la réduction du complexe (Fe ³⁺)-ligand en (Fe ²⁺)-complexe par les antioxydants -Ligand utilisé pour faciliter la détection : TPTZ -L'activité antioxydante est déterminée par une augmentation de l'absorbance à 593 nm PFRAP : éduction du ferricyanure de potassium par des antioxydants et réaction ultérieure du ferrocyanure de potassium avec Fe ³⁺	Spectrophotométrie (A593) Électrochimique (titrants colométriques)	Rapide, Bon marché Simple, Modifié pour permettre la mesure de divers types d'échantillons, Utilisé pour les antioxydants hydrophiles, Le test FRAP par titrage colométrique est extrêmement sensible et fiable, Peut être couplé avec HPLC en ligne.	Pertinence limitée pour les systèmes biologiques, La chimie redox des ions ferriques implique une cinétique plus lente que celle du cuivre, Non sensible aux oxydants de type thiol, Nécessite un pH acide (pH 3,6).
Cupric reducing antioxydant capacity CUPRAC	-Réduction du Cu (II) en Cu (I) par antioxydants -Ligand used to facilitate detection: neocuproïne -Reduction in Cu ²⁺ –neocuproïne complex to Cu ⁺ –neocuproïne has an absorption peak at 450 nm	Spectrophotometry (A450) Colorimétrie	Potentiel redox simple, stable, sensible et favorable, utilisé pour les antioxydants hydrophiles et lipophiles, peut être couplé à la HPLC en ligne, utilisation à haut débit possible	Prend plus de temps pour mesurer des mélanges complexes que d'autres méthodes -Le produit résultant est plus instable que dans les autres méthodes -Interférence possible des spectres d'absorption entre l'agent oxydant et le composé étudié
Analyse fluorimétrique	Émission de lumière par un composé qui a absorbé de la lumière ou un autre rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde différente	Enregistrement des spectres d'excitation/émission de fluorescence	-	-

HAT (transfert d'atome d'hydrogène), ET (transfert d'électrons unique), EPR (résonance paramagnétique électronique), HPLC (chromatographie liquide à haute performance), TPTZ (tripyridyltriazine).

ORAC - Capacité d'Absorption des Radicaux Libres d'Oxygène ; HORAC - Capacité Antioxydante du Radical Hydroxyle ; TRAP - Paramètre Antioxydant de Piégeage Total des Radicaux Peroxydes ; CUPRAC - Pouvoir Antioxydant Réducteur du Cuivre ; FRAP - Pouvoir Antioxydant Réducteur du Fer ; PFRAP - pouvoir réducteur du ferricyanure de potassium ; ABTS - Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ; DPPH - [2,2-di(4-tert-octylphényl)-1-picrylhydrazyl].

Tableau 6. Techniques non spectrophotométriques utilisées pour mesurer l'activité antioxydante (Munteanu & Apetrei, 2021).

Techniques	Dosage de la capacité antioxydante	Principe de la méthode	Détermination du produit final
Electrochemical Techniques	Voltamétrie	La réduction ou l'oxydation d'un composé à la surface d'une électrode de travail, au potentiel appliqué approprié, entraînant le transport massif d'un nouveau matériau vers la surface de l'électrode et la génération d'un courant.	Mesure du courant de l'électrode. pic cathodique/anodique
	Ampérométrie	Le potentiel de l'électrode de travail est fixé à une valeur fixe par rapport à une électrode de référence	Mesure de la courant généré par l'oxydation/ réduction d'un analyte électroactif
	Biampérométrie	La réaction de l'analyte (antioxydant) Avec la forme oxydée d'un réversible Indicateur de couple redox	Mesure du courant circulant entre deux électrodes de travail identiques, à faible différence de potentiel et immergées dans une solution contenant l'échantillon analysé et un couple redox réversible
Chromatographie	Chromatographie des gaz	La séparation des composés dans un mélange repose sur la répartition entre une phase liquide stationnaire et une phase gazeuse mobile.	Ionisation de flamme ou conductivité thermique. détection
	Chromatographie en phase liquide à haute performance	La séparation des composés dans un mélange est basée sur la répartition entre une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide de polarités différentes, à débit et pression élevés de la phase mobile,	Détection UV-Vis (par exemple barrette de diodes), Détection fluorimétrique, spectrométrie de masse ou détection électrochimique

Tableau 7. Méthodologies traditionnelles et émergentes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des produits naturels (Barba-Ostria *et al.*, 2022).

	Methode	Description	Avantages	Disadvantages
Méthodes de diffusion	Méthode de diffusion sur gélose	L'agent antimicrobien se diffuse à partir de disques ou de bandelettes dans le milieu de culture solide qui a étéensemencé avec une culture pure.	-Faible coût -Rapide et gain de temps -Capacité de tester un grand nombre de micro-organismes et d'agents antimicrobiens -Facilité d'interprétation des résultats obtenus	-Ne fonctionne pas sur les bactéries fastidieuses -Qualitatif, -Ne distingue pas l'activité bactéricide/fongicide et bactériostatique/fongistatique -La préparation du disque/puits prend du temps, -Aucune automatisation disponible
	Méthode de diffusion par puits	Diffusion d'un agent antimicrobien liquide placé dans un puits perforé dans un milieu de culture solideensemencé avec une culture pure		
	Méthode de diffusion sur bouchon de gélose	La première bactérie ou champignon est cultivé sur des plaques de gélose, ici elle va sécréter des molécules qui diffusent dans la gélose qui est ensuite coupée et placée sur une autre plaque de gélose inoculée avec un micro-organisme différent	Faible coût -Simple -Mette en évidence l'antagonisme entre les micro-organismes	-Aucune automatisation disponible
	Méthode du gradient antimicrobien (Etest)	Basée sur la création d'un gradient de concentration de l'agent antimicrobien testé dans le milieu gélose où il est exposé au micro-organisme sélectionné	-Quantitatif -Utilisé pour la détermination de la CMI, -Simple	Cher par rapport aux autres méthodes de diffusion
	Méthode des stries croisées	La première souche microbienne est striée au centre de la plaque de gélose et incubée puis dans la même plaque estensemencé le deuxième micro-organisme par une seule strie perpendiculaire à la strie centrale	-Simple -Dépistage rapide -Identifie l'antagonisme entre micro-organismes	-Aucun quantitatif -Les marges de la zone d'inhibition sont généralement très floues
	Chromatographie sur couche mince (CCM) – méthodes de bioautographie	Méthode bioautographique directe	L'activité antimicrobienne est évaluée directement sur les plaques CCM où les extraits sont séparés par chromatographie sur plaque CCM, puis les micro-organismes sont également appliqués par pulvérisation en identifiant la localisation de la fraction à potentiel antimicrobien.	Fonctionne contre les champignons et les bactéries Compatible avec les champignons producteurs de spores Rapide et pas cher Simple
Essai biologique sur gélose		La plaque CCM est recouverte de géloseensemencée avec le microbe à tester et les composés antimicrobiens sont diffusés sur le milieu gélose.	Fournit des zones d'inhibition de croissance bien définies Insensible à la contamination Rapide et pas cher, Simple	Time-consuming Low sensitivity

	Diffusion sur gélose	L'agent antimicrobien est transféré d'une CCM vers une plaque de gélose préalablement inoculée avec le microorganisme à tester	Rapide et pas cher Sensible	Fonctionne avec les bactéries et les champignons. La gélose a tendance à adhérer au gel de silice en raison de l'adsorption importante entre eux. Les composés seront perdus lors du transfert de la plaque en couche mince vers le milieu de culture
Méthodes de dilution	Méthode de dilution en bouillon Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	Utilise des tubes ou des plaques de microdilution pour Mesure la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance des bactéries/champignons	Quantitatif Bonne reproductibilité	Tâche manuelle de préparation des solutions antibiotiques pour chaque test
	Méthode de dilution sur gélose	De la même manière que la procédure utilisée dans la méthode de diffusion sur disque, une concentration souhaitée de l'agent antimicrobien est placée dans un milieu gélosé.	Convient aux tests de sensibilité aux antibactériens et aux antifongiques	Si ce n'est pas automatisé, très laborieux
	Test de mise à mort (courbe de mise à mort)	Basé sur une analyse des effets antimicrobiens en fonction du temps et de la concentration. Plusieurs tubes contenant différentes concentrations de l'agent antimicrobien sont ensemencés avec les bactéries/champignons et le pourcentage de cellules mortes est déterminé en même temps que le test.	Peut être utilisé pour déterminer la synergie ou l'antagonisme entre des médicaments Convient pour identifier les effets bactériostatiques/fongostatiques et bactéricides/fongicides	Prend du temps
Test de bioluminescence ATP	Bioluminescence à base d'ATP	Basé sur la capacité de mesurer l'adénosine triphosphate (ATP) produite par des bactéries ou des champignons	Rapide et facile Quantitatif -Évaluation in situ	Cher -Difficile de différencier l'ATP microbien des autres débris organiques -Adapté uniquement aux surfaces solides
Méthode cytofluorométrique en flux	Cytofluorométrie en flux	Basé sur la capacité des cellules endommagées à émettre un signal positif détecté par analyse par cytométrie en flux. Le micro-organisme est exposé à des agents antimicrobiens puis coloré avec l'agent intercalant iodure de propidium.	Trois sous-populations (cellules mortes, viables et blessées) peuvent être clairement discriminées Criblage à haut débit -	-Plus cher -Un équipement de cytométrie en flux est requis

Inhibition du biofilm	Test de production de biofilm sur plaque de microtitrage	Basé sur le potentiel des extraits à empêcher la fixation initiale des cellules aux plaques de microtitrage. La formation/inhibition du biofilm est observée grâce à la (DO) du cristal violet présent dans la solution décolorante mesurée à 595 nm.	Rapide -Pas cher -Criblage à haut débit	-Qualitatif -Faible sensibilité
Inhibition de la détection du quorum	Dosage de la violacéine	L'activité inhibitrice est mesurée en quantifiant la production de violacéine dans un lecteur de microplaques utilisant un spectrophotomètre à 585 nm où le micro-organisme et les extraits sont cultivés à différentes concentrations.	-Simple -Rapide -Peu coûteux -	La couleur des extraits peut interférer avec la mesure de la DO.

II. Monographie de plantes étudiées

II.1. La famille des Asteraceae

- **Description, systématique, distribution, utilisation et intérêt**

La famille des Asteraceae est également connue sous le nom de famille de l'Aster ou Composées, car le mot grec Aster signifie étoile, en référence à la forme de la fleur (Figure 13). Cette famille est connue sous le nom scientifique d'Asteraceae Martinov (1820) ou Compositae Giseke (1972). La catégorie des dicotylédones est la plus étendue, avec plus de 1600 genres et 25 000 espèces dans le monde entier (**Rolnik & Olas, 2021**). D'après **Quezel et Santa (1963)**, l'Algérie compte environ 109 genres et 408 espèces. Sa distribution mondiale lui confère une grande diversité, se distinguant par sa capacité à s'adapter à différents climats et types de sol, malgré la présence de diverses formes biologiques comme les arbres, les lianes, les buissons, les plantes succulentes, les épiphytes et les plantes aquatiques. Selon Bremer et al. (1994), Bohm et Stuessy (2001), la plupart des espèces sont des plantes herbacées vivaces ou annuelles. Les genres les plus importants en termes de nombre d'espèces sont *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). En Algérie, il y a 109 genres et 408 espèces selon **Quezel et Santa en 1963**.

De nombreuses espèces de la famille des Asteraceae démontrent diverses activités pharmacologiques, attribuées à leurs composants phytochimiques, comprenant les huiles essentielles, les lignanes, les saponines, les composés polyphénoliques, les acides phénoliques, les stérols et les polysaccharides (**Amorim et al., 2013**). On trouve une large gamme de composés phénoliques, incluant l'acide chicorique, le kaempférol et ses dérivés, la lutéoline et ses dérivés, la quercétine, et l'apigénine et ses dérivés, par exemple, la racine de chicorée est une source de nombreux acides tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide isovanillique (**Petropoulos et al., 2019**). Les plantes de la famille des Asteraceae sont des sources riches en acide chlorogénique qui ont été trouvés à posséder des activités antivirales, antioxydantes, antimutagéniques, anti-inflammatoires et de capture de radicaux (**Jaiswal et al., 2011**). Un des groupes de composés les plus importants dans la famille des Asteraceae est celui des lactones de sesquiterpène, ce sont des terpénoïdes, représentant la moitié de tous les sesquiterpènes du groupe des terpénoïdes, leur structure chimique est basée sur un squelette de 15 atomes de carbone formé

autour de trois unités d'isoprène (Alves *et al.*, 2018). Les Asteraceae sont communément divisées en deux grandes sous-familles, les Cichorioideae et les Asteroideae (Bremer *et al.*, 1992).



Figure 13. Quelques types des fleurs des plantes d'Astéraceae.

II. 2. Le genre *Centaurea*

II.2.1. Description, systématique et distribution du genre *Centaurea*

Les centaurées, plantes herbacées, présentent des feuilles alternes qui peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces. Les fleurs, appelées également fleurons, sont regroupées en capitules comprenant plusieurs fleurs et présentant une forme homomorphe ou dimorphe, entourées d'une enveloppe ovoïde ou globuleuse avec des bractées superposées sur plusieurs niveaux. Concernant les centaurées, toutes les fleurs ont une forme tubulaire, avec des multiples fleurs ayant la même apparence ou une apparence différente, avec les bords (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur teinte va habituellement du rose au pourpre en passant par le violet, cependant certaines espèces sont également dotées de fleurs jaunes. Entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux, ces fleurs ont des bractées imbriquées et inégales disposées en plusieurs rangs, semblables à celles des artichauts.

Ces bractées peuvent être soit ciliées (le scénario le plus fréquent) soit épineuses. Ils sont essentiels pour reconnaître les spécimens. Le plan ou sous-plan du réceptacle est plein de nombreuses soies. D'après les affirmations de Quezel et Santa. En 1963, les akènes des fruits sont longs ou ovoïdes, sans aspérités, et comportent un hile sur le côté, profond, poilu ou non, avec une aigrette courte, simple ou double, qui peut être persistante ou tombée. Les centaurées se multiplient en touffes ou par semis au printemps sans contenir de latex, de résine ou d'essence. Elles se rencontrent dans différentes sortes d'habitats. D'après Hellwig (2004), certaines régions comprennent les déserts et les semi-déserts, les pentes abruptes, les montagnes élevées, les terres

cultivables, les zones sujettes aux inondations, les zones partiellement exposées au soleil et les zones arides.

Centaurea est classé comme le quatrième plus grand genre parmi les Asteraceae, comprenant plus de 600 espèces réparties mondialement, notamment en Asie occidentale et en Méditerranée (Heywood, 1978 ; Garcia-Jacas *et al.*, 2000). Il y a environ 17 espèces de *Centaurea* qui se trouvent dans les régions côtières de la mer Méditerranée, de la mer Rouge et du Nil en Égypte (Reda *et al.*, 2021). En Algérie, il y a 45 espèces de ce genre, dont 7 se trouvent au Sahara.

La systématique des *Centaurea* est la suivante :

Embranchement :	Angiospermeae
Classe :	Dicotyledoneae
Ordre :	Asterales
Famille :	Astéraceae
Sous-Famille :	Cynareae
Genre :	<i>Centaurea</i> (Quezel et Santa, 1963)

II.2.2. Phytochimie du genre *Centaurea*

Des recherches chimiques ont été menées sur plusieurs espèces de *Centaurea* qui vivent en Algérie, et de nouvelles sources de produits naturels ont été identifiées (Benayache *et al.*, 1992 ; Akkal *et al.*, 1999 ; Medjroubi *et al.*, 1997 Bentamene *et al.*, 2005). De 1977 à nos jours, 23 espèces du genre *Centaurea* ont été examinées. Ces travaux ont abouti à la séparation et à l'identification de plus de 155 métabolites secondaires, comprenant 14 acides phénoliques, 65 flavonoïdes, 59 lactones sesquiterpéniques, 6 triterpénoïdes, 14 autres composés et des huiles essentielles (Ayad et Akkal, 2019). Les composés chimiques non essentiels les plus présents dans les plantes se retrouvent largement répandus dans les espèces végétales d'Algérie (Alu'datt *et al.*, 2017 ; Cong-Cong *et al.*, 2017). Les espèces algériennes de *Centaurea* contiennent une grande quantité de composés phénoliques. Les flavonoïdes, parmi les composés phénoliques, sont les plus présents avec 65 structures différentes, suivis des acides phénoliques et des phénols simples dans certaines espèces (Ayad et Akkal, 2019). Acides phénoliques ; font partie d'une importante catégorie de composés phénoliques présents dans les plantes, se trouvant à la fois sous forme libre et liée (Cong-Cong *et al.*, 2017). Les profils phénoliques de deux espèces algériennes de *Centaurea*, *C. choulettiana* et *C. fragilis*, ont été analysés, avec l'identification de sept acides hydroxybenzoïques (1-7) et de sept acides hydroxycinnamiques (8-14). En effet, la paridole (3), l'acide protocatéchique

(4) et l'acide 5-hydroxyferulique (12) ont été extraits de *C. diluta* subsp. *algeriensis*, *C. melitensis* et de *Rhaponticoides africana* (également appelée *C. africana*) (Ayad et Akkal, 2019).

Les flavonoïdes sont le groupe le plus important de composés phénoliques trouvés dans les plantes. D'après Ayad et Akkal (2019), on a rapporté la présence de flavonoïdes dans la plupart des espèces de *Centaurea* en Algérie. En réalité, on a identifié 65 flavonoïdes de diverses classes, dont 33 aglycones flavonoïdes (15-47) et 32 glycosides flavonoïdes (48-79). Les espèces algériennes de *Centaurea* ont un profil flavonoïde qui inclut des flavones (15-35), des flavonols (36-46), un flavanone unique (47), des flavone O-glycosides (48-58), des flavonol glycosides (59-71), deux glycosides flavanones (72, 73) et des flavone C-glycosides (74-79). La plupart des flavonoïdes présentent une diversité de substitutions polyhydroxylées, de motifs de O-méthylation et de glycosylations (glucopyranosyl, galactosyl, néohespéridosyl, gentiobiosyl, sophorosyl et rutinosyl). 33 flavonoïdes présentent en commun la présence de groupes dihydroxy 5,7 liés au cycle A. Le groupe hydroxy 40 est retrouvé dans la plupart des structures, alors que les autres montrent un substituant méthoxy 40 au lieu du groupe hydroxyle. En outre, 23 flavonoïdes possèdent un groupe méthoxy en position 6. Le groupe méthoxy de remplacement aux positions C-7, C-8, C-30 et C-50 est aussi mentionné. Une autre découverte intéressante concerne la présence de flavonoïdes tétraméthoxylés chez les plantes *Centaurea* et *Rhaponticoides* en Algérie. D'autre part, la glycosylation en C-7 est la position la plus répandue dans la majorité des hétérosides (glycosides flavonoïdes). Les flavones représentent le sous-groupe le plus nombreux, contenant 21 composés, parmi lesquels deux (15, 19) sont dépourvus de substituants dans le cycle B, deux (16, 22) montrent la présence du groupe hydroxy en position 20 et un (20) contient un groupe méthoxy en position 5 ; cinq cas rares détectés dans les espèces algériennes de *Centaurea* (*C. omphalotricha* et *C. parviflora*).

En outre, 13 glycosides de flavonols ont été trouvés dans les *Centaurea* algériens, la plupart d'entre eux étant substitués par un groupe glycosyle en C-7 (à l'exception de l'Algérienne (69), qui présente un glucopyranosyle acylé en C-7). Cependant, les hétérosides (60, 70 et 71) étaient substitués en position 3. En fait, les hétérosides (70) et (71) étaient attachés avec un groupe rutinosyle. En ce qui concerne les flavonols, un total de 11 structures chimiques différentes ont été découvertes. Cinq flavonols polyhydroxy et polyméthoxy (42-46) ont été extraits des parties florales et aériennes de *Rhaponticoides africana* (¼ *C. africana*). Jusqu'à présent, 17 glycosides de flavones ont été isolés, dont 11 sont des flavones O-glycosylés et 6 sont des C-glycosides. Le groupe glucopyranosyle et ses dérivés sont les motifs de sucre les plus présents. L'ester méthyl

glucuronopyranoside a été rapporté en position 40 et 7 dans les composés (51) et (56), respectivement. De plus, les esters méthyl galactopyranoside et les groupes rutinosyle ont été décrits uniquement dans les hétérosides (52) et (58), respectivement. Des 6 C-glycosylflavones ont été détectés dans certains *Centaurea* algériens qui sont liés principalement à des sucres glucopyranosyle, en position 6 et/ou 8. Parmi ceux-ci, (74) est dépourvu de substituants dans le noyau B. Enfin, le sous-groupe des flavanones était représenté par trois structures : une aglycone (47) et deux glycosides (72, 73), tous ces composés ayant été détectés dans *C. fragilis* (Ayad et Akkal, 2019).

II.2.3. Activités biologiques et usage du genre *Centaurea*

Les espèces de *Centaurea* algériennes ont fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques (Khammar & Djeddi, 2012). Les investigations pharmacologiques sur les extraits et les composés purs de *Centaurea* algériens et de genres apparentés (*Cheirolophus*, *Rhaponticoides* et *Volutaria*) couvrent un large éventail d'activités biologiques ; ils ont été rapportés comme possédant des activités antioxydantes, antimicrobiennes et analgésiques, ainsi que des effets cytotoxiques et antiplasmodiques. Ces différentes propriétés sont discutées ci-dessous (Ayad et Akkal, 2019).

Les espèces de *Centaurea* sont connues pour leurs effets antidiabétiques, antidiarrhéiques, antirhumatismaux, anti-inflammatoires, cholérétiques, cholagogues, digestifs, stomachiques, diurétiques, menstruels, astringents, hypotenseurs, antipyrétiques, cytotoxiques et antibactériens selon les médecins publics, et sont utilisées seules ou en mélange (Reyhan *et al.*, 2004).

Selon Reyhan *et al.* (2004), les médecins traditionnels chinois ont utilisé *C. uniflora* pour traiter la fièvre et l'intoxication. L'extrait de *C. uniflora* avec de l'acétate d'éthyle inhibe la peroxydation lipidique membranaire et montre des effets anti-athéroscléreux. L'extrait de *C. chilensis* avec de l'eau a été utilisé comme médicament antipyrétique et antirhumatisme. L'infusion de nombreuses espèces de *Centaurea*, telles que *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima* et *C. melitensis*, est utilisée pour l'hypoglycémie en Espagne. *C. melitensis* a été utilisé comme tonique digestif en raison de son goût amer. De plus, il a des effets diurétiques et hypoglycémifiants. *C. ornato* a été choisi dans la région de Baros en Espagne pour ses effets dépuratifs, cholagogues et antirhumatismaux. Les parties aériennes de la plante sont utilisées pour traiter l'hypoglycémie, et les parties sous le sol sont utilisées pour leurs propriétés antispasmodiques. *C. pallscens* a été utilisé comme agent stomachique, digestif et diurétique en Égypte en raison de son goût amer. *C. sinaica*, une autre plante de la famille des *Centaurea*, est connue pour ses propriétés cytostatiques,

diurétiques, antipyrétiques, antipaludiques, astringentes, fitotoxiques, antinéoplasiques, allergènes, stomachiques, toniques et emménagogiques.

Il est également connu que le genre *Centaurea* a des effets antioxydants, immunomodulateurs, anti-inflammatoires, antidiabétiques et antimicrobiens selon plusieurs études (**Chuclá et al., 1988 ; Koca et al., 2009 ; Csupor et al., 2011 ; Naeim et al., 2020**). Selon de récentes études (**Dimkić et al., 2020 ; Nasr et al., 2020**), il a été prouvé que les types de *Centaurea* peuvent inhiber la croissance de différentes lignées de cellules cancéreuses, offrant ainsi de multiples options thérapeutiques. Il a été également noté que les différentes sortes de *Centaurea* pourraient avoir des effets positifs en tant qu'agents insecticides (**Khanavi et al., 2011**). De nos jours, la tendance en recherche est de trouver des antioxydants naturels qui sont moins toxiques et plus puissants que les antioxydants synthétiques traditionnellement utilisés pour combattre les effets néfastes du "stress oxydatif" sur la santé. Plusieurs chercheurs ont noté l'activité antioxydante des extraits de centaurée, que ce soit en laboratoire ou chez des sujets vivants (**Ayad et al., 2012 ; Bicha et al., 2013 ; Trabsa et al., 2020 ; Chemsal et al., 2018**). L'efficacité d'un agent antimicrobien en solution est mesurée par son activité antimicrobienne *in vitro*. Il montre comment les micro-organismes réagissent à des quantités connues de médicaments (**Jawetz et al., 1973**). Il a été démontré que le *Centaurea* possède des propriétés antimicrobiennes dans plusieurs études, avec 10 espèces étudiées pour évaluer leurs activités antibactériennes et antifongiques, comme le montre le Tableau 11. La recherche sur les propriétés antimicrobiennes de *C. pullata* a révélé des effets antibactériens et antifongiques encourageants dans les extraits (**Djeddi et al., 2008**).

Dans de nombreux pays, les espèces de *Centaurea* sont préparées sous forme d'infusion en raison de leur propriété relaxante, aidant les gens à réduire le stress et l'anxiété (**Yeung et al., 2012**). Ces plantes peuvent également améliorer le processus de digestion et potentiellement soutenir les réactions enzymatiques dans le foie (**Köse et al., 2016**).

D'après **Khammar & Djeddi (2012)**, les *Centaurea* sont utilisées traditionnellement en médecine pour divers usages tels que les diurétiques, les traitements de la fièvre et du diabète, et sont réputées pour leurs multiples effets bénéfiques sur la santé. Ces plantes sont consommées seules ou mélangées à d'autres plantes, et certaines espèces sont même appréciées comme boisson en Asie de l'Est, en Europe et en Afrique de l'Ouest. En Inde, les fleurs de *C. cyanus* sont connues pour leurs propriétés toniques, emménagogues et stimulantes.

Les fleurs ont une légère astringence. Pour illustrer, un remède fait à base de ces plantes était bénéfique pour apaiser la conjonctivite et était nommé en France "eau de Casse-Lunettes". Les propriétés apaisantes et stimulantes des racines de la plante persane *C. Behen* sont utilisées pour soigner les calculs rénaux et les problèmes de foie. La plante *C. picris* est utilisée écrasée dans l'eau pour traiter les vers et les blessures des moutons. Les praticiens de la médecine chinoise traditionnelle ont aussi employé *C. uniflora* pour soigner la fièvre et l'empoisonnement.

L'extrait de *C. uniflora* avec de l'acétate d'éthyle inhibe la peroxydation lipidique membranaire et montre des effets anti-athéroscléreux, dans la médecine populaire turque, plusieurs espèces de *Centaurea* étaient particulièrement recommandées contre les affections inflammatoires telles que les abcès (*C. iberica*), l'asthme (*C. iberica*) et pour réduire la fièvre (*C. calcitrapa* et *C. jacea*), *C. pulchella*, *C. drabifolia*, *C. solstitialis* ssp. *solstitialis*, *C. iberica* et *C. virgata* sont utilisées pour le traitement de l'ulcère peptique, du paludisme, du rhume, des maux d'estomac, des douleurs abdominales et des infections herpétiques autour des lèvres. Dans la région de Jakabszállás (Hongrie), on utilisait en application locale la décoction des parties aériennes de *C. sadleriana* pour traiter les blessures du bétail (notamment des moutons).

On consomme les feuilles basales de *C. triumfettii* et de *C. urvillei* ssp. *stepposa* en tant qu'aliment et en les consommant fraîches. En Algérie, *C. pullata* est employée pour préparer, avec d'autres plantes, un plat traditionnel local nommé "El Hammama". En Espagne, l'hypoglycémie est traitée par l'infusion de *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima* et *C. melitensis*. *C. ornata* est principalement utilisé dans le traitement des ulcères gastriques et des plaies. On la donne aussi sur place en bains, lavages, en cataplasme de racine fraîche, séchée ou torréfiée, et en huile d'olive où les morceaux de racine ont été frits. Elle est prise par voie orale en cas de douleurs d'estomac ou de problèmes de circulation.

En outre, elle est employée à Badajoz (Estrémadure, Espagne) pour les taches, les douleurs aux jambes, l'inflammation, les hémorroïdes, les piqûres d'insectes, les frottements, le rhumatisme, l'ostéoarthrite, les douleurs générales, la circulation, les maux d'estomac, le cancer de la peau, la gangrène, pour tout, le remède universel. Dans d'autres parties de l'Espagne et du Portugal, *C. ornata* est également employée pour traiter les ecchymoses, les entorses, l'arthrite, le rhumatisme ou comme purifiant sanguin. *C. ornata* est également un vétérinaire apprécié : calvitie, taches, escarre, hématomes, blessures, frottements, douleurs antérieures.

De plus, *C. maroccana* a une action protectrice contre la toxicité hépatique (**Schauenberg, 2006**). Le thé de centaurée peut être utilisé pour traiter la dyspepsie (difficulté

de digestion) et comme diurétique. Nous fabriquons également des compresses apaisantes pour les yeux. Il lutte également contre la fonte des eaux (**Schauenberg, 2006**). Selon Nyman, *C. pullata* et *C. grisebachu* sont : Elles sont efficaces pour soulager les douleurs abdominales causées par l'acide acétique. Étant donné qu'elles peuvent avoir des avantages thérapeutiques pour réduire la douleur inflammatoire (**Djeddi et al., 2008**). L'extrait aqueux de *C. chlensis* et *C. orné* a été employé pour atténuer la fièvre et la douleur rhumatismale, tandis que *C. uniflora* est utilisée contre la fièvre et la désintoxication (**Belkassam et al., 2019**).

Les espèces de *Centaurea* ont démontré au fil des ans une capacité remarquable à traiter plusieurs maladies liées à l'inflammation, au stress oxydatif et même au cancer (**Dassamiour et al., 2022**).

II.3. Description des plantes étudiées

II.3.1. La plante médicinale : *C. parviflora*

II.3.1.1. Généralités, discription habitat et distribution et taxonomie de *C. parviflora*

C. parviflora est une plante qui appartient à la famille des Asteraceae et qui est endémique. Les bractées montrent une portion blanchâtre ou peu distincte de texture scarieuse, ainsi que 8 à 12 lobes latéraux. Plantes mesurant entre 40 et 60 cm, à base suffrutescente, hautement ramifiées. Les buissons sont densément entremêlés. Les feuilles supérieures de la tige ne sont pas décurrentes. Petites têtes individuelles mesurant 5mm de large et 15mm de long. Appendices avec une courbure prononcée et une épine au centre. Les fleurs du haut, les akènes velus, gonflés, noirs, ont 4 stries distinctes, avec l'aigrette occupant aussi 1/3 de l'akène (Figure 14). Elle est peu fréquente en Algérie, à Oran et Tlemcen, Constantine et sur les Hauts plateaux, cependant elle est présente en Algérie et en Tunisie (**Boubekri, 2005**).



Figure 14. Aspects morphologiques de *C. parviflora*

La systématique de l'espèce *Centaurea parviflora* est la suivante :

Embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Astérales
Famille : Compositae
Sous-famille : Tubiflores
Tribu : Cynarées
Genre : *Centaurea*
Espèce : *Parviflora*

II.3.1.2. Phytochimie de *Centaurea parviflora*

L'étude de la composition chimique des parties aériennes de *C. parviflora* Desf. Dans l'étude de Belkacem et al. (2014), 13 métabolites secondaires ont été isolés, dont la 5-hydroxy-6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone (1), l'eupatiline (2), l'eupatorine (3), le cirsilineol (4), la jaceosidine (5), le 5H α ,6H β ,7H α -15-hydroxy-8 α -(1',2'-dihydroxyéthyl-acryloxy)-éléma-1(2),3(4),11(13)-triène-6,12-olide (6), la genkwanine (7), la thévetiaflavone (8), le cnicine (9), l'éthyl-O-a-L-arabinofuranoside (10), la cornicinine (11), la syringine (12) et la nicotiflorine (13). Les données spectroscopiques, y compris les spectres UV, RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT, HSQC, NOESY, HMBC et HRESI-MS, ont été utilisées pour établir les structures. Toutes ces substances ont été identifiées pour la première fois dans ce spécimen. Le composé (11) est nouvel pour l'ensemble du règne végétal, alors que le composé (10) est récent pour l'espèce *Centaurea*.

II.3.1.3. Activité biologique et usage traditionnel de *Centaurea parviflora*

La *C. parviflora* est traditionnellement utilisée dans la médecine populaire algérienne pour traiter divers maux (Koca et al., 2009). Des études ont montré que *C. parviflora* présente des activités biologiques telles que cytotoxiques, antifongiques et antimicrobiennes (Zater et al., 2016). Les extraits de la plante ont également démontré une activité antimicrobienne, les rendant potentiellement utiles pour lutter contre les pathogènes résistants aux antibiotiques (Ismail et al., 2024).

La famille des Asteraceae, à laquelle appartient *C. parviflora*, est reconnue pour ses propriétés médicinales en médecine traditionnelle. D'autres espèces de la famille des Asteraceae, telles que *C. benedicta* et *Galinsoga parviflora*, ont également été étudiées pour leurs utilisations

traditionnelles et leurs activités biologiques. Cela souligne le potentiel de *C. parviflora* en tant que plante précieuse en médecine traditionnelle en raison de ses composés bioactifs et de ses propriétés pharmacologiques. Dans l'ensemble, la littérature suggère que *C. parviflora* possède une activité biologique significative et a une histoire d'utilisation traditionnelle dans le traitement de diverses conditions.

II.3.2. La plante médicinale *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut.

II.3.2.1. Généralités, description, habitat, distribution et taxonomie de *C. tougourensis*

D'après **Quezel et Santa (1963)**, *C. tougourensis* Boiss. & Reut. (Asteraceae) est une espèce endémique qui pousse dans le nord-est de l'Algérie. Les parties scariées-blanchâtres des bractées ont des appendices très prononcés avec 10-14 laciniures. Au départ, les plantes ont une structure ligneuse, avec une hauteur variant de 30 à 40 cm. Leur forme est cendrée et pubescente. Les branches sont très divisées. Les tiges sont résistantes. Feuilles avec des lobes linéaires, partiellement lobées, ne s'étendant pas le long de la tige. Les capitules sont petits, mesurant entre 5 et 10 mm de largeur et 15 mm de longueur. Les fleurs sont purpurines. Les veines des bractées sont très apparentes. D'après Quézel et Santa. En 1963, la longueur de l'Aigrette est trois fois plus courte que celle de l'akène, et son intérieur ressemble à son extérieur (**Figure 15**).

C. tougourensis Boiss. & Reut. (Asteraceae) est une espèce endémique poussant dans le nord-est algérien, C'est une espèce qui se rencontre dans les rocailles, aux Aurès, à Djebel Toumour, Djebel Guethiane, Guadoust. Elle est endémique Algérienne (**Quezel et Santa, 1963**).



Figure 15. Aspects morphologiques de *C. tougourensis* Boiss. & Reut. (Photos K. Rebbas, <https://www.gbif.org/fr/occurrence/4414217885>).



Figure 16. *C. tougourensis*, photos de spécimen de la plante pour herbier (Photos : K. Rebbas).

La classification taxonomique de l'espèce *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut est la suivante :

Embranchement : Angiospermeae

Classe : Dicotyledoneae

Ordre : Asterales

Famille : Astéraceae

Sous-Famille : Cynareae

Genre : *Centaurea*

Espèce : *tougourensis* Boiss. & Reut. (Quezel et Santa, 1963)

II.3.2.2. Phytochimie de *Centaurea tougourensis*

Jusqu'à présent, aucune approche phytochimique n'a été entreprise sur *C. tougourensis*, et seules quelques études phytochimiques ont été réalisées sur cette espèce, au cours desquelles les chercheurs ont identifié au total dix composés des extraits d'acétate d'éthyle et de dichlorométhane. Ainsi, six d'entre eux étaient des flavonoïdes aglycones, tandis que les quatre autres étaient des lactones sesquiterpéniques (Nacer *et al.*, 2006 ; 2012).

Les composés isolés comprenaient respectivement : 3'-O-méthyléupatorine, jaceosidine, népétine, eupatiline, apigénine, kaempférol, cnicine, 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -déhydromélitensine, (6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -15-acétoxy-hélianga 1 (10), 4 (5), 11 (13) trién-6-olide et enfin (6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -15-oxohélianga 1 (10), 4 (5), 11 (13) trién-6-olide. Nous

avons sélectionné cette espèce pour notre étude, dans le but d'explorer pleinement son potentiel pharmacologique. L'analyse chimique de *C. tougourensis* a montré la présence de nombreux types de composés secondaires, tels que les tanins, les flavonoïdes, les triterpènes, les alcaloïdes, les saponines, les mucilages, les quinones et les anthocyanines.

Bensaad et al. (2021) ont mesuré 85,44 µg d'équivalent acide gallique/mg d'extrait de n-BuOH des parties aériennes de *C. tougourensis* Boiss. & Reut. de Batna, Algérie, pour les polyphénols, tanins et flavonoïdes totaux. Les tanins représentaient la majorité (51,87 µg équivalent acide tanique/mg d'extrait), tandis que les flavonoïdes étaient la deuxième fraction la plus présente (25,55 µg équivalent quercétine/mg d'extrait).

Dans une autre étude menée par **Bensaad et al., (2022)**, la GC-MS a identifié 45 composés dans l'extrait de n-butanol (nBuOH), dont 12 étaient majoritaires, tels que : 2H-Furo [2,3-b] indole (16,12 %), Benz [c] pyran-1,3-dione (14,87 %), Acide octadécanoïque (9,69 %), Hydromorphe (7,94 %), Acétamide (6,14 %), 2,6-Di-n-propyl-4-(2-furyl)pyridine (6,11 %), Norhydrocodone(5,98 %), Anthracène (4,72 %), 2,4,6-Triméthylbenzotrile (4,47 %), 3-O-Méthyl-D-glucose (2,94 %), 3,5-Diéthyl-4-(2-furyl)pyridine (2,75 %) et 3H-Pyrrolo [3,2-f] quinoline (2,30 %). En ce qui concerne l'extrait d'acétate d'éthyle (EA), 23 composés ont été identifiés, dont 13 étaient principaux : [Bi-1,4-cyclohexadién-1-yl]-3,3,6,6-tétrone, 4,4-dihydroxy-2,2,5,5-tétraméthyl- (27,31 %), Acide thiosulfurique, ester S-(2-aminoéthyl) (15,07 %), 2-Pentadécane, 6,10,14- triméthyl- (8,91 %), 3-Méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde (7,12 %), Tétrapentacontane, 1,54-dibromo- (5,74 %), Heptacos-1-ène (5,03 %), Acide propionique, 3-iodo-, ester tétradécyl (4,92 %), 2-Méthyl-E-7-octadécène (4,68 %), 7,8- Époxylostan-11-ol, 3-acétoxy- (3,65 %), Acide 4-fluoro-1-méthyl-5-carboxylique, éthyl (ester) (3,15 %), Tétrapentacontane, 1,54-dibromo- (2,79 %), Acide undéc-10-ynoïque, ester tétradécyl (2,77 %), 3,7,11,15-Tétraméthyl-2-hexadécén-1-ol (2,72 %).

II.3.2.3. Activité biologique et usages thérapeutiques de *Centaurea tougourensis*

Dans une étude récente, Bensaad et son équipe (2021) ont analysé les effets antioxydants, anti-inflammatoires, neuroprotecteurs et antimicrobiens des extraits de n-butanol (nBuOH) et d'acétate d'éthyle (EA) issus de la partie aérienne de *C. tougourensis* pour la première fois. Les effets anti-inflammatoires ont été évalués à l'aide de tests d'hémolyse induite par la chaleur et de dénaturation de l'albumine d'œuf, tandis que l'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de tests ABTS, de radical galvinoxyl, de phénantroline et de pouvoir réducteur.

On a utilisé la méthode de diffusion en gélose avec disque pour tester l'effet neuroprotecteur contre AChE, BchE et l'activité antimicrobienne. D'après les résultats obtenus, les deux extraits ont montré une forte capacité antioxydante, cependant celle de l'extrait de n-butanol était plus élevée. L'extrait de n-butanol a montré une forte activité anti-inflammatoire lors des tests de dénaturation de l'albumine d'œuf et d'hémolyse induite par la chaleur. Le n-butanol extrait présentait une activité neuroprotectrice très forte dans les deux tests d'inhibition de l'AchE et de la BchE.

Une autre étude (**Bensaad et al., 2021**) visait à évaluer pour la première fois certaines activités in vivo de l'extrait de n-butanol (n-BuOH) de la partie aérienne de *C. tougourensis* d'Algérie, notamment les activités antidiabétique (diabète induit par la streptozotocine), hépatoprotectrice (hépatotoxicité induite par le paracétamol), anti-inflammatoire (essai d'œdème auriculaire induit par l'huile de croton) et antipyrétique des extraits d'EtOH-H₂O (70 :30), hexane, acétate d'éthyle et n-butanol.

Les résultats pharmacologiques suggèrent que *C. tougourensis* à un effet anti-inflammatoire non négligeable. Cependant, l'activité antipyrétique de la plante était remarquable pour les deux concentrations testées. *C. tougourensis* a également présenté un bon effet antihyperglycémique. L'extrait de n-BuOH a également montré un effet hépatoprotecteur remarquable, confirmé par des approches biochimiques et histologiques. Ces résultats encourageants ont une fois de plus démontré le potentiel pharmacologique des espèces de *Centaurea*.

De plus, **Dassamiour & Hambaba (2021)** ont validé que le traitement préalable des souris par une quantité de (400 ml/kg, p.o) d'un extrait de plante (EtOH-H₂O (70 : 30), Hexane, ethyl acetate et n-butanol) a provoqué une baisse significative de l'hyperglycémie après 60 minutes d'induction d'un diabète temporaire, avec une inhibition maximale de (37 %), comparé au groupe traité avec du Glibenclamide (10 mg/kg, i.p.) qui n'était que de (31 %) à ce même moment. Cela indique que *C. tougourensis* maintient le niveau de glucose dans le sang et peut également être efficace pour traiter d'autres maladies. Dans une autre étude, **Bensaad et al. (2022)**, ont évalué l'effet anti-inflammatoire des extraits n-butanol (n-BuOH) et d'acétate d'éthyle (EA) de *C. tougourensis*. Ils ont également analysé les propriétés physico-chimiques et biologiques de certains composés de cette plante en utilisant une approche bioinformatique in silico pour prédire **d i v e r s e s c a r a c t é r i s t i q u e s**. Deux composés provenant de l'extrait de n-BuOH, Silanediamine et Méthanone, ont été testés, tandis que deux composés provenant de l'extrait d'acétate d'éthyle, Acide 4-fluoro-1-méthyl-5- carboxylique et Acide propionique, ont également

été examinés. Les extraits ont également été examinés pour leur propriété anti-inflammatoire en utilisant la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA). L'analyse *in silico* a montré que les quatre composés examinés pourraient être des options prometteuses pour contrôler la transcription des gènes importants et pourraient aussi avoir des effets cytotoxiques marqués sur diverses lignées de cellules cancéreuses.

De plus, ces composés pourraient également être efficaces dans le traitement des troubles métaboliques liés au diabète et à l'obésité, mais aussi du stress oxydatif, des dysfonctionnements du système immunitaire et des pathologies cutanées. Le test de la BSA a révélé que les deux extraits avaient presque le même effet d'inhibition modérée sur la dénaturation des protéines. Ces résultats préliminaires indiquent que les biocomposés actuels contenus dans *C. tougourensis* pourraient être de bons candidats pour l'élaboration de médicaments plus efficaces et naturels.

Dassamiour *et al.* (2022) ont visé à évaluer la capacité de cicatrisation des plaies de l'extrait de n-butanol (n-BuOH) de *C. tougourensis* en utilisant une approche de formulation, pendant une période de 18 jours. Des souris mâles albinos suisses ont été utilisées à cette fin. L'étude a révélé un processus de cicatrisation considérable pour les deux concentrations testées (200 et 400 mg/kg) de l'extrait de plante, atteignant à la fin du traitement une réduction de la surface de la plaie de (91,82 %) et (99,80 %) respectivement, en notant qu'aucun signe d'inflammation n'a été détecté dans le groupe de souris traitées par l'extrait de plante. Cette étude a une fois de plus démontré les propriétés pharmacologiques de cette espèce.

II.3.3. La plante médicinale *Centaurea dimorpha* Viv.

II.3.3.1. Généralités, description, habitat, distribution et taxonomie de *Centaurea dimorpha*

C'est une plante désertique. Les bractées de taille moyenne ont une épine centrale de 15 mm de long, ainsi que 4 à 6 épines à la base. Les épines sont moins foncées que le corps de la bractée. Plante velue, ressemblant à *C. sphaerocephala*. Les tiges ont des ailes peu épineuses, mesurant entre 20 et 30 cm de long, souvent horizontales et poussant en bas d'un capitule central presque sans tige au milieu d'une rosette de feuilles. Graines mouchetées, mesurant 4 mm sur 2, avec une aigrette plus courte ou de même longueur et un hile très épais. **D'après Quezel et Santa (1963)**, on l'appelle communément « Belala » (Figure 17).

- Lieu de vie : Dépressions de rochers, plateaux rocheux et lits de rivières avec des fonds rocheux.

- Habitat : Dépressions rocailleuses, hamada et lits d'oueds à fond rocailleux.
- Répartition : Sahara septentrional.
- Période de végétation : Floraison en avril – mai.
- Nom arabe : (Belala) **Quezel-Santa (1963), Lebrun (1998)**

Embranchement : Angiospermeae
Classe : Dicotyledoneae
Ordre : Asterales
Famille : Astéraceae
Sous-Famille : Cynareae
Genre : *Centaurea*
Espèce : *Centaurea dimorpha* Viv. (**Quezel et santa, 1963**)
Centaurea polyacantha Coss. non Willd.
C. eriocephala Boiss (**Azzouzi, 2016**)



Figure 17. Aspects morphologiques de *C. dimorpha* Viv. (Photos K. Rebbas)

II.3.3.2. Phytochimie de *Centaurea dimorpha*

Belkassam et al. (2019) ont examiné pour la première fois les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des parties aériennes de *C. dimorpha* Viv. Collectées près de Bousaada M'sila (pré-Sahara) au sud-est d'Alger, en Algérie. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a révélé une grande variété de composants dans les huiles essentielles. La composition de l'huile essentielle comprenait 99 composés identifiés, représentant environ 79,21 % de l'ensemble de l'huile avec un rendement de 0,02, p/p. Les huiles sont principalement constituées de sesquiterpènes oxygénés (27,49 %), l'oxyde de caryophyllène étant le constituant principal (09,88 %). Les dérivés de monoterpènes représentaient 17,29 % des produits chimiques, suivis par les hydrocarbures de monoterpènes à

10,65 %, les monoterpènes oxygénés à 08,42 %, les apocaroténoïdes à 6,98 %, les hydrocarbures de sesquiterpènes à 6,08 % et les composés phénylpropanoïdes à 2,30 %.

II.3.3.3. Activité biologique et usages thérapeutiques de *Centaurea dimorpha*

Belkassam *et al.* (2019) ont évalué pour la première fois l'huile essentielle et l'extrait méthanolique pour leur éventuelle activité antioxydante *in vitro* par le test de piégeage des radicaux libres DPPH, les résultats ont montré que le pourcentage d'inhibition est de 10,67 et 77,01 respectivement à une concentration de 1 mole/L.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Pour sélectionner nos plantes, nous avons pris en considération divers critères, tels que la consultation de la littérature existante. Dans cette étude, nous avons choisi trois plantes médicinales de la flore de M'sila en Algérie qui ont un fort potentiel d'activité en raison de leur utilisation traditionnelle répandue. De plus, il y a une absence d'analyses se concentrant particulièrement sur ces espèces. Ces critères sont principalement basés sur le fait que nos plantes font partie du genre *Centaurea* de la famille des Astéracées. Nos travaux sont réalisés au niveau de plusieurs laboratoires : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques, CRAPC à Bou Ismaïl, Tipaza, Algérie. Centre de recherche en biotechnologie de Constantine CRBT à Constantine, Algérie et Universités de Muğla, Turquie.

1. Etude phytochimique et activités biologiques de *C. parviflora*

1.1. Matériel végétal

C. parviflora Desf. a été récolté en juin 2021 à Djebel Djedoug (forêt de Dréat, M'sila, au nord de l'Algérie) (altitude 1179 m, coordonnées géographiques 35.8838° N, 4.3284° E). Le Professeur M. D. Miara de la Faculté de Biologie à l'Université de Tiaret a validé l'identification taxonomique en se référant à la Flore d'Algérie (Quezel et Santa, 1963) et a archivé un spécimen d'herbier dans l'Herbier de l'Université de Tiaret, Tiaret, Algérie.



Figure 18. Aspect morphologique de *C. parviflora* Desf.

1.2. Préparation des extraits

Après la récolte du matériel végétal, les parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs) des trois espèces ont été séchées à l'ombre à température ambiante pendant une semaine à l'air libre et réduites en poudre dans un broyeur, jusqu'à ce que leur poids soit stabilisé pour protéger les

polyphénols de l'oxydation et préserver les molécules. Ensuite, les échantillons ont été placés dans des sacs propres et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité.

La poudre de *C. parviflora* a été extraite en suivant les méthodes décrites par **Zaak et al. (2022)** et **Mammeri et al. (2022)**. La phase initiale consistait en une extraction solide-liquide, pendant laquelle 50 g de poudre de parties aériennes ont été macérées à température ambiante trois fois avec 300 mL de méthanol-eau (80%). Les liquides combinés ont été séchés sous faible pression en utilisant un évaporateur rotatif à 40 °C afin de produire l'extrait méthanolique brut (EM). Après cela, l'échantillon brut a été traité avec une extraction liquide-liquide en employant des solvants organiques de plus en plus polaires : le chloroforme pour produire un extrait chloroformique (EC), l'acétate d'éthyle pour obtenir un extrait acétique d'éthyle et le n-butanol pour produire un extrait butanolique. Tous les solvants ont été éliminés en se servant d'un appareil d'évaporation rotatif.

Le taux de performance de rendement est indiqué en pourcentage par rapport au poids initial de la plante utilisée dans le processus d'extraction. Et calculé en utilisant cette formule :

$R (\%) = (M / M_0) \times 100$, où M est le poids en gramme de l'extrait sec produit, et M₀ est le poids en gramme de la plante extraite.

1.3. Analyse chromatographique et spectrophotométrique

1.3.1. Analyse qualitative avec la chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM permet d'analyser et de séparer rapidement les composés. Elle s'applique aux molécules pures ainsi qu'aux extraits. C'est une méthode physico-chimique rapide basée sur l'adsorption, l'interaction et la polarité. Les composés peuvent être identifiés en se référant à leur facteur de rétention (R_f). Cela nous permet d'avoir une vue d'ensemble des métabolites disponibles et de contrôler rapidement la pureté d'un composé lorsque les conditions de fonctionnement sont clairement établies. Le CCM a servi à examiner l'extrait méthanolique sur des plaques analytiques en gel de silice. Des plaques d'aluminium enduites de gel de silice Merck 60F254 ont été utilisées. Différents systèmes de solvants avec des polarités variées ont été préparés. L'extrait méthanolique a été appliqué sur des plaques de CCM pré-enduites à l'aide de tubes capillaires et développé dans une chambre de CCM en utilisant des phases mobiles. Les plaques de CCM développées ont été séchées à l'air et observées sous lumière visible et lumière ultraviolette (UV, 254 et 366 nm). Le déplacement de l'analyte a été exprimé sous forme de facteur de rétention (R_f) :

$R_f = \text{Distance parcourue par le soluté} / \text{Distance parcourue par le solvant}$ (R_f ; Facteur de rétention).

1.3.2. Analyse LC-MS

Les composants phénoliques de la fraction butanolique de *C. parviflora* ont été examinés à l'aide d'une analyse LC-MS et identifiés provisoirement en le comparant avec des références bibliographiques. La chromatographie LC-MS a été effectuée en utilisant l'appareil double-MS triple quadropole Agilent 6420 avec la chromatographie liquide à haute performance HPLC 1260 infinity LC, incluant un dégazeur sous vide, un injecteur automatique Infinity 1260, une pompe à double piston en série et un détecteur UV. La Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 150 mm × 4,6 mm) d'Agilent Technologies à Palo Alto, CA, USA, était employée pour la chromatographie. Afin de fractionner les composés de la fraction butanolique de *C. parviflora*, une vitesse de flux de 0,80 mL/min a été employée et l'analyse s'est déroulée à température ambiante. On a réalisé une chromatographie en phase liquide avec un gradient en utilisant de l'eau avec 0,1% d'acide formique comme éluant A et de l'acétonitrile comme éluant B. La méthode de gradient linéaire multistade a été utilisée : 0 min à 15% B; 35 min à 95% B; 40 min à 95% B; 55 min à 15% B, suivi d'un cycle de conditionnement de 5 min, pour l'analyse suivante. 10 microlitres ont été injectés. Le débit de la phase mobile était de 0,4 mL/min, et la température de la colonne a été maintenue à 40 °C. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode ion négatif avec une tension de capillaire de 4000 V et l'azote a été utilisé comme gaz de séchage.

1.3.3. Teneur totale en composés phénoliques

La méthode de Müller (2010) a été employée pour estimer la quantité globale de polyphénols présente dans les extraits. Un mélange de 200 µL d'échantillon a été incubé pendant 4 minutes avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 %, suivi de l'ajout de 800 µL de carbonate de sodium (7,5 %). Ensuite, les réactifs ont été laissés à incuber pendant 2 heures et l'absorbance a été mesurée à 765 nm par rapport au blanc. De l'acide gallique a été employé comme référence et une courbe de calibration a été établie dans des conditions similaires ($y = 0,0034 x + 0,1044$; $R^2 = 0,9972$). Les résultats ont été exprimés en microgrammes de GAE par milligramme d'extrait sec.

1.3.4. Teneur totale en flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés en utilisant la méthode au chlorure d'aluminium de Topçu (2007) avec quelques ajustements. 300 µL de l'extrait a été mélangée avec une quantité égale de chlorure d'aluminium (2 %) et a été incubée pendant 15 minutes. On a mesuré l'absorbance à une longueur d'onde de 430 nm. Dans cette expérience, de la quercétine a été employée pour

créer une courbe d'étalonnage avec les mêmes paramètres ($Y = 0,0071 x + 0,0274$; $R2 = 0,9985$). Les mesures ont été exprimées en quantité d'équivalent/milligramme.

1.3.5. Contenu total en flavonols

Afin de mesurer la teneur en flavonoïdes de nos échantillons, il a été combiné 1 mL d'échantillon avec 1 mL de chlorure d'aluminium (2 %) et 1,5 mL d'acétate de sodium aqueux (5 %), puis nous les avons laissé incubé à 25 °C pendant 2,5 heures. Ensuite, il a été lu l'absorbance à 440 nm et exprimé les résultats en RE/mg d'extrait sec en utilisant une courbe d'étalonnage faite avec de la rutine ($y = 0,0122 x + 0,0179$; $R2 = 0,9991$) (**Kumaran & Karunakaran, 2007**).

1.4. Activités antioxydantes

1.4.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

L'efficacité de piégeage des radicaux libres DPPH a été évaluée en se fondant sur la méthode de **Blois (1958)**. Pour conclure, 40 µL de l'échantillon à diverses concentrations ont été mélangés avec 160 µL de DPPH fraîchement préparé (0,1 mM) dans une microplaque à 96 puits (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire, Waltham, MA, USA). Après avoir laissé le mélange réactionnel reposer pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité, son absorption a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm par spectrophotométrie. Le taux d'inhibition a été déterminé en utilisant l'équation suivante :

$\% \text{ Inhibition} = (A_c - A_t/A_c) \times 100$ où A_c est l'absorbance du témoin et A_t est l'absorbance de l'échantillon.

Les inhibitions obtenues ont été tracées en fonction des concentrations de l'échantillon et les courbes résultantes ont été utilisées pour calculer la CI50 (la concentration de l'échantillon réduisant de 50 % le DPPH).

1.4.2. Activité de piégeage des radicaux libres de galvinoxyl

La technique de **Shi (2001)** a été utilisée pour évaluer l'efficacité du piégeage des radicaux libres de galvinoxyl. 40 µL d'échantillon préparé à diverses concentrations ont été mélangés avec 160 µL de galvinoxyl (0,1 mM) dans une microplaque de 96 puits. Après deux heures, la mesure de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 428 nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en se basant sur cette formule : $\% \text{ Inhibition} = (A_c - A_t/A_c) \times 100$, où A_c représente l'absorbance du témoin et A_t l'absorbance du test.

Les concentrations des échantillons ont été utilisées pour dessiner les courbes d'inhibition, puis pour calculer l'IC50 (la concentration qui diminue de 50 % l'activité du calvinoxyl).

1.4.3. Test de piégeage de l'ABTS

D'après **Re et al. (1999)**, l'activité de capture des radicaux a été mesurée en utilisant le radical cation stable ABTS. En combinant l'ABTS (7 mM) avec 13,24 mg de persulfate de potassium pendant 16 heures, on a formé le radical ABTS. Après avoir été refroidie, la solution a été diluée pour atteindre une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. 100 μ L ont été combinés avec 1,9 mL de solution ABTS•+ et ensuite mis en incubation. Après 7 minutes, on a mesuré l'absorbance à 734 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme ingrédients principaux. En utilisant la formule suivante, l'inhibition de l'ABTS a été calculée.

% Inhibition = $(Ac - At/Ac) \times 100$ où Ac est l'absorbance du témoin et At est l'absorbance du test.

Les inhibitions obtenues ont été tracées en fonction des concentrations des échantillons et les graphiques résultants ont été utilisés pour calculer l'IC50 (la concentration de l'échantillon qui a réduit de 50 % l'ABTS).

1.4.4. Activité de piégeage des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$)

L'activité a été établie en appliquant la méthode de **Kunchandy et Rao (1989)**. On incorpore dans chaque puits d'une plaque de 96 puits, contenant 200 μ L, 40 μ L de solution d'échantillon à diverses concentrations (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 et 200 μ g/mL), ainsi que 130 μ L de DMSO alcalin (20 mg de NaOH dans 100 mL de DMSO) et 30 μ L de NBT (10 mg NBT dans 10 mL d'eau distillée). Les absorbances sont mesurées instantanément à 560 nm à température ambiante (les données présentées sont la moyenne de trois mesures distinctes \pm l'écart-type). Chaque concentration a son propre verre blanc qui lui est réservé. Le tannique et l'ascorbique acides ont été employés comme composés de référence. Le calcul du pourcentage d'inhibition du superoxyde a été effectué en utilisant l'équation suivante :

% Inhibition = $(Ac - At/Ac) \times 100$ où ; Ac représente l'absorbance du témoin et At l'absorbance du test.

Les concentrations des échantillons ont été utilisées pour construire les courbes d'inhibition, qui ont ensuite permis de calculer l'IC50 (la concentration de l'échantillon qui a réduit de 50 % le superoxyde).

1.4.5. Capacité Antioxydante de Réduction de Cuivre (CUPRAC)

Cette activité a été évaluée en suivant la méthode d'**Apak et al. (2004)**. 60 µL de tampon d'acétate d'ammonium (1 M, pH = 7), 50 µL de néocuproïne (7,5 mM) et 50 µL de CuCl₂ (10 mM) ont été mélangés avec 40 µL d'échantillon dans une plaque de 96 puits. Après une heure, la mesure de l'absorbance à 450 nm a été effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque. Les résultats de l'activité antioxydante ont été évalués en se basant sur une valeur d'A0.5 (µg/mL).

1.4.6. Pouvoir Réducteur Ferrique

Les extraits ont été évalués pour leur capacité de réduction en utilisant les méthodes de **Bouratoua et al. (2017)**. À diverses concentrations, 10 µL de l'extrait ont été combinés avec 40 µL de solution tampon phosphate (0,2 M, pH = 6,6) et 50 µL de solution de potassium ferricyanide [K₃Fe (CN)₆] (1%). Le mélange a été placé en incubation à 50 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 50 µL d'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés pour arrêter la réaction, avant de centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes. En conclusion, nous avons combiné 50 µL de la solution en suspension avec 50 µL d'eau distillée et 10 µL de FeCl₃ (0,1 %) et avons mesuré l'absorbance à 700 nm après 10 minutes d'incubation. Une hausse de l'absorbance indique une augmentation de la capacité de réduction des extraits examinés.

1.4.7. Test de Phénantroline

La technique utilisée par **Szydłowska-Czerniak (2008)** et **Aissani et al. (2022)** a été utilisée pour évaluer l'activité de réduction liée à la formation du complexe Fe⁺²-phénantroline des extraits. On a ajouté 10 µL d'extraits ou de standards à différentes concentrations dans le mélange de réaction contenant du désoxyribose, suivi de l'incorporation de 50 µL de FeCl₃ (0,2%), 30 µL de phénantroline (0,5%) et 110 µL de méthanol. On a vigoureusement remué le mélange et placé au congélateur pendant 20 minutes à 30 °C. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 510 nm. Les résultats ont été calculés en se basant sur la formule A0.5 (µg/mL), qui représente la concentration associée à une absorbance de 0,50.

1.5. Examen de l'activité antimicrobienne

Un total de 8 cultures microbiennes appartenant à des espèces de bactéries, et de champignons ont été utilisées dans cette étude.

On a testé *in vitro* l'effet antimicrobien de l'extrait méthanolique de *C. parviflora* sur la croissance de diverses souches bactériennes, fongiques et de levures, telles que *P. aeruginosa*, *S.*

aureus, *B.subtilis*, *E. coli*, *Salmonella*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Le laboratoire du Département de Microbiologie de l'Université de M'sila, situé en Algérie, a donné les microorganismes. Le concentré méthanolique a été dilué à 30 mg/mL avant d'être stérilisé par filtration (0,45 µm) à l'aide de filtres Millipore. Les tests de sensibilité aux antimicrobiens ont été menés en appliquant la méthode de diffusion sur disque, avec l'utilisation de 100 µL de suspension contenant 10⁸ UFC/mL de bactéries ou 10⁶ UFC/mL de levures réparties sur agar nutritif (NA) et agar de dextrose de Sabouraud (SDA), respectivement. Les disques, composés de papier filtre Whatman N° 1 et mesurant 6 mm de diamètre, ont été imprégnés de 10 µL d'extraits méthanoliques et déposés sur l'agar. Les mêmes solvants ont été utilisés pour préparer des contrôles négatifs. Les échantillons ont été exposés à une température basse (+4 °C) pendant 15 à 30 minutes afin de favoriser la diffusion des extraits dans l'agar avant la prolifération bactérienne. Après un jour de culture à 37 °C pour les souches bactériennes et deux jours pour les isolats de levures et de champignons, on a mesuré le diamètre d'inhibition (mm) autour du disque à l'aide d'une règle graduée. La taille du diamètre varie en fonction de la sensibilité du microbe examiné. Chaque tentative dans cette expérience a été effectuée deux fois.

1.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont présentés sous la forme de la moyenne ± SD des trois analyses réalisées. Les CI₅₀ et A_{0,5} sont déterminés en utilisant la méthode de régression linéaire sur les courbes [% d'inhibition = f (concentration)] pour le CI₅₀ et [Absorbance = f (concentration)] pour A_{0,5}. Après avoir effectué des tests de Kolmogorov-Smirnov pour vérifier la normalité des données et des tests de Bartlett pour vérifier l'égalité des variances, des transformations logarithmiques ont été utilisées si nécessaire pour répondre aux critères des analyses paramétriques. Une ANOVA à un facteur et le test de Tukey pour les différences significatives ont été réalisés à l'aide du logiciel STATISTICA v.8 afin d'évaluer les comparaisons globales et par paires respectivement.

2. Etude phytochimique et activité biologique de *C. tougourensis* et *C. dimorpha*

2.1. Matériel végétal

Les plantes de *C. tougourensis* et de *C. dimorpha* ont été collectées en mai 2021 en pleine floraison, la plante *C. tougourensis* a été collecté dans les frontières de la province de Batna et m'sila (longitude : 5.89E-6.32E, latitude : 35.51N-35.70N) la plante et *C. dimorpha* a été collectée à Bousaada dans la province de M'sila (Longitude: 4.19234, Latitude: 35.1864666

Elevation : 646m).

Les espèces ont été identifiées par Dr. N. Souilah, enseignant au Département des Sciences Agronomiques de l'Université 20 août 1955 de Skikda, un spécimen témoin a été déposé dans l'herbier de l'Université de Constantine 1 pour les deux espèces de *C. tougourensis* et *C. dimorpha* (CTlabo025 et CDlabo026, respectivement).



Figure 19. *C. tougourensis* et *C. dimorpha* (Photos K. Rebbas).

2.2. Préparation des extraits :

Les procédures d'extraction pour les échantillons de *C. tougourensis* et *C. dimorpha* sont similaires à celles utilisées pour la plante *C. parviflora*.

200 grammes de poudre de chaque plante ont été complètement extraits en les laissant macérer dans un mélange de méthanol/eau (80/20, v/v) à un ratio de 1:10 (p/v) (200 g/2000ml de solvant) pendant 24 heures en les agitant continuellement à une vitesse de 200 tours par minute, à température ambiante. Les solvants ont été évaporés à l'aide d'un Rotavapor (Büchi R-200, Allemagne) à une température de 40 °C pour obtenir respectivement 4,67 mg d'extrait pour *C. tougourensis* et 5,26 mg pour *C. dimorpha*. Les échantillons non traités ont été gardés à une température de 4 °C en vue de leur examen ultérieur. Le taux d'extraction est évalué de la même manière que pour la plante *C. parviflora*.

2.3. Analyse chromatographique et spectrophotométrique

2.3.1. Analyse qualitative avec LC-MS/MS

1. Préparation des standards

À l'exception de l'hespéridine et de l'isoquercitrine, qui ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (50 g/ml), des solutions mères de standards ont été préparées dans du méthanol (50 g/ml). La dilution dans du méthanol a été utilisée pour préparer des solutions de travail à partir des solutions mères. Toutes les solutions préparées ont été stockées dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse.

2. Préparation des échantillons pour la LC-MS/MS

L'échantillon de chaque fraction a été dilué à 1 000 mg/L et purifié à l'aide d'un filtre seringue de 0,2 µm avant d'être soumis à une analyse LC-MS/MS.

3. Instruments chromatographiques et conditions pour la LC-MS/MS

Les chercheurs ont utilisé le modèle Nexera Shimadzu UHPLC couplé à un instrument MS en tandem pour déterminer le profil quantitatif de 37 phytochimiques (Yulmaz *et al.*, 2018). Le chromatographe possédait des pompes LC-30AD, un four CTO-10ASvp, un dégazeur DGU-20A3R et un échantillonneur SIL-30AC. A RP-C18 Inertil ODS-4 analytical column (100 mm x 2.1 mm, 2 µm) a été utilisée pour la séparation chromatographique. La température de la colonne était réglée à 35 °C. L'éluant A (eau, formiate d'ammonium à 10 mM et acide formique à 0,1 %) et l'éluant B (acétonitrile) ont été utilisés dans le gradient d'élution. Les proportions de solvant B utilisées dans l'application du programme de gradient sont les suivantes : 5-20 % B (0-10 min), 20 % B (10-22 min), 20-50 % B (22-36 min), 95 % B (36-40 min), 5 % B (40-50 min). La quantité d'injection a été augmentée à 4 µl tandis que la vitesse d'écoulement du solvant est restée à 0,25 mL/min. Un spectromètre de masse en tandem Shimadzu LC-MS de modèle 8040 avec une source ESI en mode ion négatif a été utilisé pour détecter les échantillons. Les données LC-ESI-MS/MS ont été collectées et traitées à l'aide du logiciel LabSolutions de Shimadzu. Les quantités des composés ont été mesurées en utilisant la méthode de monitoring des réactions multiples (MRM). Les paramètres de fonctionnement du spectromètre de masse étaient les suivants : température de l'interface à 350 °C ; température du DL à 250 °C ; température du bloc thermique à 400 °C ; débit de gaz de nébulisation à 3 L/min ; et flux de gaz de séchage à 15 L/min.

2.3.2. Contenu phénolique

1. Quantification du contenu phénolique total

Les auteurs ont mesuré la concentration des composés phénoliques totaux en utilisant la méthode colorimétrique avec le réactif phénolique de Folin-Ciocalteu, selon **Djeridane *et al.*, (2006)**, à l'aide de la spectrophotométrie. On a employé cette méthode pour mesurer la quantité de phénol dans les échantillons, en se servant de l'acide gallique comme référence. Tous les échantillons ont été mesurés pour leur absorbance à 765 nm et les résultats ont été rapportés en mg d'équivalents d'acide gallique (EAG) par gramme de poids sec de la plante.

2. Quantification du contenu total en flavonoïdes

Les extraits ont été testés pour leur teneur en flavonoïdes à l'aide de spectrophotométrie selon la méthode de Lamaison et Carnat (**Quettier-Deleu *et al.*, 2000**). Un complexe flavonoïde-aluminium a été créé en mélangeant 0,5 mL de chlorure d'aluminium à 2 % (AlCl₃) dans du méthanol et 0,5 mL d'extraits. La mesure optique a été effectuée à une longueur d'onde de 430 nm et une courbe de référence pour la rutine a été établie afin de calibrer la teneur en flavonoïdes.

3. Quantification du contenu en flavonols

La quantité de flavonols est mesurée en suivant la méthode décrite par **Adedapo *et al.*, (2008)**. Cela implique de mélanger 500 µl de solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 2 %) et 750 µl de solution d'acétate de sodium avec 250 µl de chaque extrait. Après 2 heures et 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, la mesure de l'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de 440 nm. Les niveaux de flavonols sont mesurés en fonction d'une courbe de calibration établie avec la quercétine et les données sont présentées en mg équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ g⁻¹).

2.4. Activités antioxydantes

2.4.1. Activité de piégeage des radicaux libres (essai DPPH)

Voir le protocole de l'activité de piégeage des radicaux libres (essai DPPH) pour la plante *C. parviflora*.

2.4.2. Essai de décoloration des cations radicaux ABTS

La méthode de **Re *et al.*, (1999)** a été utilisée avec quelques ajustements pour mesurer l'activité de piégeage des ABTS. ABTS⁺ est préparé à partir d'ABTS (7 mM) et de persulfate de

potassium (2,45 mM). Les deux produits ont été mélangés ensemble dans des solutions aqueuses et ensuite gardés hors de la lumière à température ambiante pendant 12 à 16 heures. Ajoutez 40 µl de chaque dilution des extraits de plantes dans chaque puits d'un lecteur de microplaques à 96 puits, ensuite versez 160 µl de solution ABTS^{•+} dans les échantillons. Calculez le pourcentage d'inhibition de chaque concentration par rapport à l'absorbance du blanc à 734 nm après 10 minutes. Préparez les valeurs de blanc de façon similaire en substituant l'extrait au solvant utilisé (méthanol). On a déterminé la capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} en utilisant cette formule, et les résultats ont été rapportés en IC50 (µg/mL).

$$\text{Activité de piégeage de l'ABTS}^{\bullet+} (\%) = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

2.4.3. Pouvoir réducteur (essai FRAP)

On a utilisé la méthode décrite par **Oyaizu (1986)** avec quelques ajustements pour évaluer la capacité réductrice de chaque extrait. Pour résumer, des extraits (ou des antioxydants standards) de 10 µl à différentes concentrations (12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL) ont été mélangés avec 40 µl de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium à 1% [K₃Fe(CN)₆]. Ensuite, le mélange a été mis en incubation à une température de 50°C pendant une durée de 20 minutes. Après cela, on a ajouté 50 µl d'acide chloroacétique à une concentration de 10% à la réaction, puis on a centrifugé le mélange à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Après cela, on a ajouté 40 µl d'eau pure et 10 µl de solution de FeCl₃ à 0,1%, puis on a mesuré l'absorbance à 700 nm.

Un contrôle négatif a été préparé en ajoutant 10 µL de méthanol à un échantillon sans l'extrait, pour obtenir un volume total de 200 µL. Le tannin, la vitamine E et la vitamine C ont été utilisés comme contrôles positifs, avec des mesures effectuées en trois exemplaires pour chaque extrait.

2.4.4. Test de phénanthroline

La technique mentionnée par Szydłowska-Czerniak (**Zydłowska-Czerniak et al., 2008**) a été appliquée avec quelques ajustements pour stabiliser l'activité de la phénanthroline. Le BHT a servi de référence dans cette expérience. Ce procédé se base sur la conversion des ions Fe³⁺ en ions Fe²⁺ grâce à un antioxydant. Les ions Fe²⁺ générés réagissent ensuite avec l'orthophénanthroline pour donner naissance à un complexe orange-rouge. Pendant cette expérience, on a combiné 10 µl de diverses concentrations d'extraits de plantes avec 50 µl de FeCl₃ et 30 µl de 1,10-phénanthroline dans une fiole jaugée, puis on a ajouté de l'acétone ou du

méthanol pour atteindre un volume total de 110 μ l. La solution mélangée a été laissée à température ambiante dans l'obscurité. Après un laps de temps de vingt minutes, la mesure de l'absorbance de la substance orange-rouge a été effectuée à une longueur d'onde de 510 nm. Un échantillon de contrôle a été préparé de la même façon, mais en utilisant le solvant (méthanol) à la place de l'extrait.

2.5. Analyse statistique

Les moyennes \pm (SD) sont utilisées pour présenter les résultats de l'étude. Les données ont été analysées et traitées statistiquement à l'aide de GraphPad Prism 7.0, un logiciel de GraphPad Software Inc. basé à San Diego, CA. L'analyse des différences de traitement entre les groupes a été effectuée en utilisant un test ANOVA à un facteur, suivi du test post-hoc de Tukey pour évaluer les comparaisons. Les niveaux de signification étaient marqués par différents symboles : * pour $P < 0,05$, ** pour $P < 0,01$, *** pour $P < 0,001$, **** pour $P < 0,0001$, et "ns" pour $P \geq 0,05$. En outre, les valeurs de CI50 ont été calculées en employant le logiciel GraphPad Prism.

Chapitre III : Resultats et discussion

III.1. Etude pytochimique et activité biologique de la plante *C. parviflora*

III.1.1. Rendement d'extraction

L'étape cruciale consiste à extraire et à isoler les composées phytochimiques des plantes lors de la récupération. La performance de l'extraction peut être influencée par la nature chimique, la méthode, le solvant et la présence de substances interférentes (Do et al., 2014 ; Altemimi et al., 2017 ; Bui et al., 2021). Le meilleur rendement a été observé avec le butanol (1.45 %), tandis que le plus faible a été obtenu avec le chloromforme (0.83 %), considéré comme le plus faible dans cette étude. Il a été prouvé que la majorité des ingrédients actifs se trouvent principalement dans les extraits les plus polaires, ce qui justifie notre décision de principalement tester les extraits de butanol et d'acétate d'éthyle dans notre étude (Wrona et al., 2019). En outre, les plus grandes performances ont été réalisées grâce à ces deux extraits. Les résultats sont présents dans le tableau 8.

Tableau 8. Rendement d'extraction

Extrait	Rendement d'extraction (%)
Extrait brut	2.36
Extrait de chloromforme	0.83
Extrait d'acétate éthyle	0.95
Extrait de butanol	1.45

III.1.2. Analyse qualitative

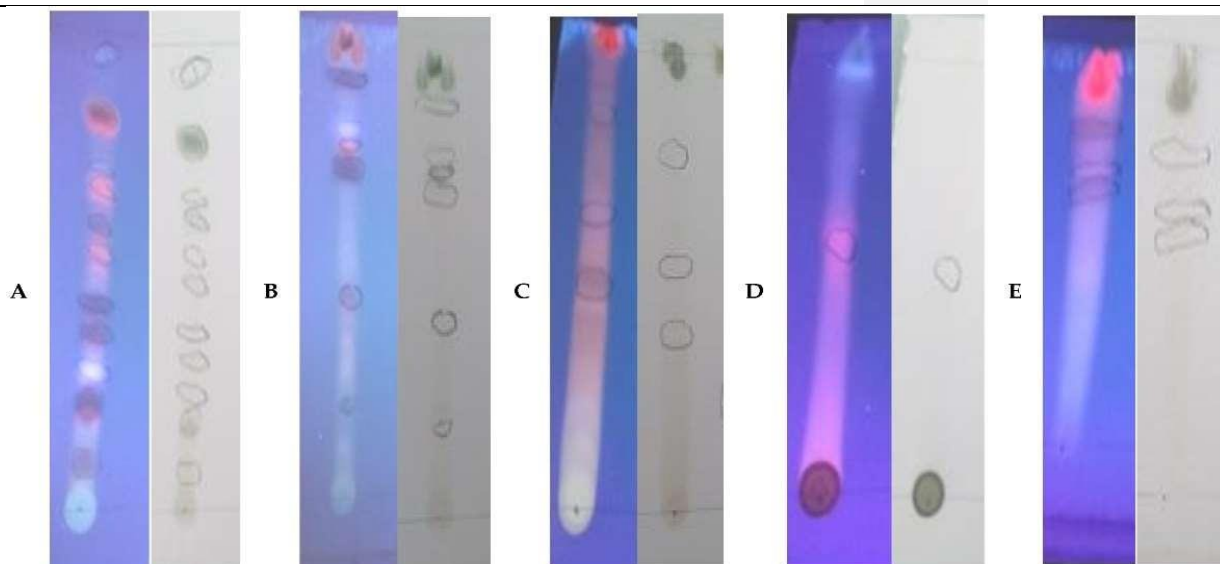
III.1.2.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Une fois que le chromatogramme est développé, une fois que le solvant a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et analysée sous la lampe UV pour détecter les composants présents (Bougandoura et al., 2011). Selon le profilage CCM des extraits de plantes dans divers systèmes de solvants, il est confirmé que différents groupes phytochimiques sont présents.

Grâce à l'analyse qualitative, de nombreux spots ont été identifiés, notamment ceux avec des teintes bleu, mauve, jaune et rose. La présence de composés phénoliques est confirmée par ces trois taches (Markham, 1982). D'après les résultats (Tableau 9 et Figure 20), il est possible de faire les observations suivantes :

Tableau 9. Analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de *C. parviflora* avec CCM

N	Chemical name	Solvent system	Rf values	Spots color	References
1	Flvonoids	Toluene/Chloroform/Methanol (4/4/1) (v/v/v)	0.12	Pale pink	Aslam et al., 2016
			0.18	Light blue	
			0.56	Pink	
			0.6	Pink	
			0.65	Blue	
2	FlavonoidS	Chloroform / Methanol (10/1) (v/v)	0.29	Mauve	Wang et al., 1999
			0.73	Pale pink	
			0.12	Yellowish blue	
			0.24	Grey	
3	Polyphenols / Flvonoids	Ethyl Acetate/Methanol/Water (8/1/1) (v/v/v)	0.34	Grey	Mbaihougadobé et al., 2017
			0.39	Grey	
			0.6	Yellow	
			0.44	Fluorescent White Blue	
			0.74	Gray	
4	Polyphenols	Methanol/ Water (7/3) (v/v)	0.88	dark gray	Fernando, 2009
5	Flvonoids	Butanol/Acetic acid/Water (40/10/50) (v/v/v)	0.31	Grey	Fernando, 2009
			0.4	dark gray	
			0.52	Fluorescent white blue	



(A) Toluène/Chloroforme/Méthanol ; (B) Chloroforme/Méthanol ; (C) Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau ; (D) Méthanol/Eau ; (E) Butanol/Acide acétique/Eau.

Figure 20. Résultats de CCM de l'extrait méthanolique de *C. parviflora*.

Il y a plus de taches dans le système 1 et le système 3 que dans les systèmes 2, 4 et 5, ce qui indique que la plante *C. parviflora* contient une grande quantité de composés phénoliques. En conclusion, les résultats de la CCM confirment la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes dans les extraits de la plante *C. parviflora*, renforçant nos découvertes concernant son activité biologique.

Un plus grand nombre de taches indique une hausse de la concentration de composés phénoliques dans *C. parviflora*. Cela confirme la signification des composés phénoliques dans cette plante, et ces résultats sont soutenus par nos résultats antérieurs (Tableau 9), montrant que la plante est apparemment riche en polyphénols totaux (Test de Tukey HSD : valeurs de $p < 0,01$). De plus, l'examen par LC-MS de la fraction butanolique de *C. parviflora* a identifié six acides phénoliques et 2 flavonoïdes, incluant l'acide quinique, cinq dérivés de l'acide chlorogénique, ainsi que la rutine et le quercétine 3-O-glucoside, validant la présence de composés phénoliques dans cette plante.

III.1.2.2. Résultats d'analyses LC-MS

Une concentration de 1000 parties par million a été préparée en utilisant du méthanol et introduite dans l'appareil LC-ESI-MS. Les résultats des chromatogrammes en ionisation positive et négative indiquent une forte concentration des composés principaux entre 0,5 et 11 minutes (Figure 21).

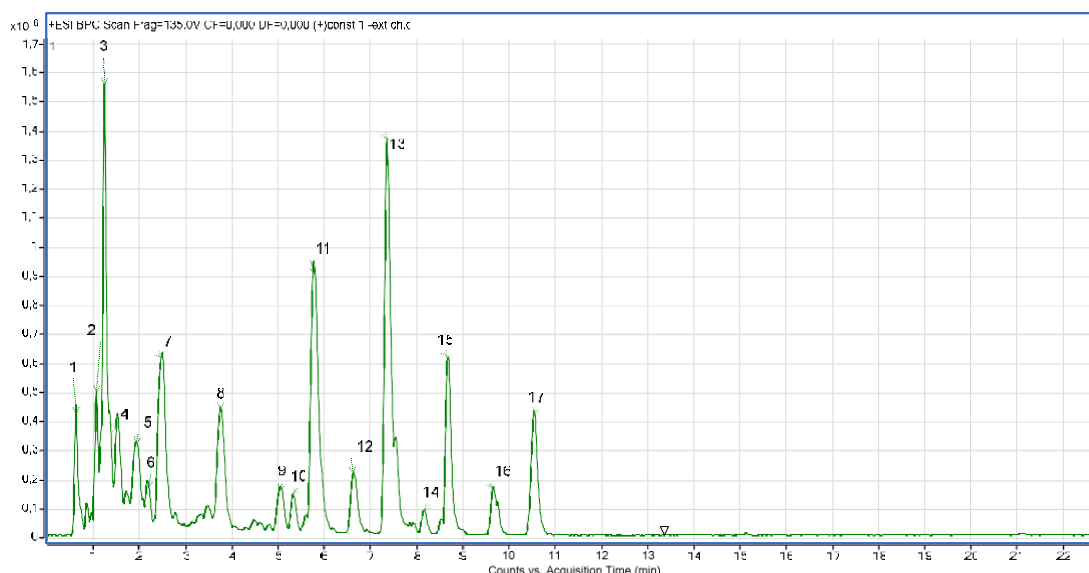


Figure 21. Chromatogramme de l'ionisation positive de l'extrait butanolique de *C. parviflora*

- **Le composé 1** : Le pic à un temps de rétention de 0.68 mn avec $m/z = 191.00$ et une formule brute de $C_7H_{12}O_6$ a été identifié comme de l'acide quinique (Figure 22).

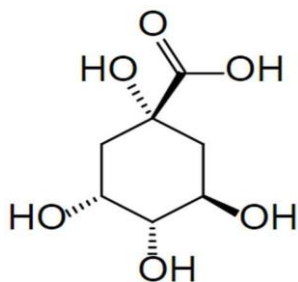


Figure 22. Acide quinique ($C_7H_{12}O_6$)

- **Les composés 2, 3, 4 et 5** : Le point culminant observé aux moments de rétention de 0.72, 1.00, 1.22, 1.62 minutes avec un m/z de 353.00 et la formule brute $C_{16}H_{18}O_9$ a été identifié comme étant l'acide chlorogénique (Figures 23).

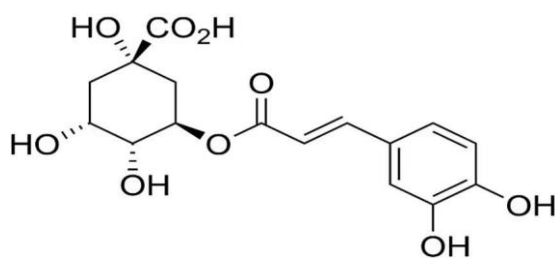


Figure 23. Acide chlorogénique ($C_{16}H_{18}O_9$)

- **Le composé 6** : Le pic correspondant à un temps de rétention de 3.58 mn, avec $m/z = 609.00$ et une formule brute de $C_{27}H_{30}O_{16}$, a été identifié comme étant la rutine (figures 24).

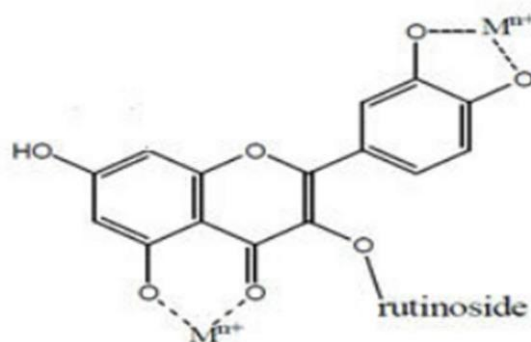


Figure 24. La rutine ($C_{27}H_{30}O_{16}$)

- Le composé 7, identifié comme la quercétine 3-O-glucoside, se caractérise par un pic à 4.26 mn de rétention, avec $m/z = 463.00$ et la formule brute $C_{21}H_{20}O_{12}$ (Annexe 8).

- Le composé 8, avec un pic à 5.46 mn de temps de rétention et $m/z = 463.00$, ainsi qu'une formule brute de $C_{30}H_{10}O_{14}$, a été reconnu comme un dérivé de l'acide chlorogénique (Annexe 10).

Les composés phénoliques de la fraction butanolique ont été identifiés en comparant les masses précises $[M-H]$ des ions pseudo-moléculaires à celles rapportées dans la littérature. Dans l'analyse LC-MS de l'extrait butanique de *C. parviflora*, huit composés ont été identifiés : six acides phénoliques et deux flavonoïdes, dont l'acide quinique, cinq dérivés de l'acide chlorogénique, la rutine et le quercétin 3-o-glucoside (Tableau 10).

Tableau 10. Composés tentatifs de l'extrait butanolique de *C. parviflora* identifiés avec LC-MS.

N	Composés	Temps de rétention (min)	Formule moléculaire	m/z expérimental	m/z calculé	mode d'ionisation
1	Acide quinique	0.68	$C_7H_{12}O_6$	191.00	191.05	Neg
2	Acide Chlorogénique	0.72	$C_{16}H_{18}O_9$	353.00	353.08	Neg
3	Acide Chlorogénique derivatives	1.03	$C_{16}H_{18}O_9$	353.00	353.08	Neg
4	Acide Chlorogénique derivatives	1.20	$C_{16}H_{18}O_9$	353.00	353.08	Neg
5	Acide Chlorogénique derivatives	1.60	$C_{16}H_{18}O_9$	353.00	353.08	Neg
6	Rutine	3.60	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.00	609.14	Neg
7	Quercétine 3-o-glucoside	4.26	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.00	463.08	Neg
8	Acide Chlorogénique derivatives	5.73	$C_{30}H_{10}O_{14}$	593.00	593.00	Neg

III.1.2.3. Le contenu phénolique

Les informations sur le contenu phénolique total, le contenu total de flavonoïdes et le contenu total de flavonol des divers extraits et fractions de *C. parviflora* sont présentées dans le Tableau 11. La variabilité des polyphénols et flavonoïdes dans les extraits bruts est due aux divers facteurs tels que la polarité des solvants, le temps d'extraction, la température, le rapport solide-liquide et les propriétés des échantillons (Dai *et al.*, 2010). En examinant les données recueillies, les niveaux de polyphénols totaux et de flavonoïdes des divers extraits ont été étudiés et affichés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11. Contenu des composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols des extraits de *C. parviflora*. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($n = 3$, données transformées logarithmiquement, test HSD de Tukey: valeur de $p < 0,01$ (a,b et b,c); valeur de $p < 0,001$ (a,c)).

Extrait	Rendement d'extraction (%)	Composés phénoliques ($\mu\text{g GAE/mgE}$)*	Flavonoïdes ($\mu\text{g QE/mg E}$)*	Flavonols ($\mu\text{g RE/mg E}$)*
Extrait brut	2.36	113.51 \pm 2.95	24.49 \pm 0.49	20.03 \pm 0.63
Extrait de chloroforme	1.45	105.47 \pm 1.35	17.78 \pm 0.21	22.89 \pm 1.33
Extrait acetate ethyle	0.95	136.94 \pm 2.94	20.83 \pm 0.21	27.86 \pm 1.45
Extrait de butanol	0.83	175.27 \pm 2.79	59.89 \pm 0.91	47.30 \pm 0.51

*Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes \pm SD de trois mesures parallèles, GAE : équivalent acide gallique, QE : Quercétine équivalente, RE : Rutine équivalente.

On a utilisé l'absorbance des extraits sur la courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour estimer les composés phénoliques totaux. D'après les résultats, l'extrait de butanol contient le plus de composés phénoliques, avec une quantité de $175.27 \pm 2.79 \mu\text{g GAE/mg}$ d'extrait, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ($136,94 \pm 2.94 \mu\text{g GAE/mg}$ d'extrait, test HSD de Tukey : valeur $p < 0,01$). En fait, les extraits bruts et chloroformiques présentent des concentrations de phénols les plus faibles, soit 113.51 ± 2.95 et $105.47 \pm 1.35 \mu\text{g GAE/mg}$ d'extrait respectivement.

Selon les données du Tableau 11, l'extrait de butanol contient la plus forte concentration de flavonoïdes, avec $59,89 \pm 0,91 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait, suivi du CE avec $24,49 \pm 0,49 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait. La méthode colorimétrique à l'aluminium trichlorure (AlCl_3) à une longueur d'onde de 440 nm a été utilisée pour mesurer la concentration en flavonols des extraits. Les résultats du Tableau 11 montrent que l'extrait butanolique a une concentration plus élevée de flavonols ($47,30 \pm 0,51$), tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle en contient moins ($27,86 \pm 1,45 \mu\text{g QE/mg}$). La quantité totale de polyphénols dans les extraits de plantes dépend du type d'extrait, c'est-à-dire de la polarité du solvant utilisé pour l'analyse. Les phénols peuvent être facilement dissous dans des solvants polaires, ce qui permet une concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant ces solvants. D'après Gao et al. (2005), les niveaux de flavonoïdes contenus dans les extraits de plantes fluctuent selon la polarité des solvants employés pour leur extraction.

Ainsi, de nombreuses recherches ont prouvé que les solvants polaires offrent des rendements supérieurs aux solvants non polaires, car ils ont la capacité de se disperser dans la poudre de plante, atteignant ainsi la matrice végétale et récupérant ainsi les métabolites potentiels.

En revanche, les solvants non polaires, qui sont immiscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le nombre maximum de molécules bioactives en raison de l'eau contenue dans le tissu végétal.

III.1.3. Activité antioxydante

Diverses techniques ont été utilisées pour mesurer l'efficacité antioxydante des extraits et des fractions de *C. parviflora*, et les résultats sont répertoriés dans le Tableau 12. On a employé la spectrophotométrie à 517 nm pour mesurer l'effet anti-radical des extraits sur le radical DPPH•, basé sur sa diminution et le changement de la couleur de violet à jaune. Les résultats de ce test ont été comparés aux standards de référence établis par le BHA et le BHT. La puissance anti-radicalaire de l'extrait butanolique était meilleure que celle des autres extraits ($IC_{50} = 59,38 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$), deux fois moins efficace que le BHT ($IC_{50} = 22,32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$) et onze fois moins efficace que le BHA ($IC_{50} = 5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$).

On a utilisé la spectrophotométrie à 428 nm pour mesurer l'action piégeage du radical galvinoxyle en relation avec l'activité anti-radicalaire, provoquant un changement de couleur de la solution de jaune foncé à jaune clair. Les normes de référence (BHA et BHT) ont été utilisées pour comparer les résultats de ce test. D'après les valeurs de l' IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) extraites des courbes d'inhibition, l'extrait butanolique a présenté la plus forte activité de piégeage avec un IC_{50} de $36,25 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 97,72 \pm 3.07 \mu\text{g/mL}$), l'extrait brut ($IC_{50} = 88,87 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$) et l'extrait chloroformique ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$). Le butanolique extrait montrait une activité dix fois moindre que celle du BHT ($IC_{50} = 3.32 \pm 0.18 \mu\text{g}$) et six fois inférieure à celle du BHA ($IC_{50} = 5.38 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 12. Activité antioxydante in vitro utilisant différentes analyses des extraits de *C. parviflora* (n = 3, données transformées en logarithme, test de HSD de Tukey : valeur p < 0,01 (a,b et b,c) ; valeur p < 0.0001 (a,c)).

Extraits	IC ₅₀ µg/mL				A _{0.5} , µg/mL		
	DPPH	Galvinoxyl	ABTS	Piégeage des radicaux superoxydes	CUPRAC	Phenanthroline	FRAP
Extrait brut	160.92 ± 5.11 ^(a)	88.87 ± 1.86 ^(a)	162.39 ± 0.15 ^(a)	21.91 ± 0.70 ^(a)	128.44 ± 4.14 ^(a)	46.56 ± 1.54 ^(a)	>200
Extrait chloroformique	>200	>200	>200	64.77 ± 2.37 ^(b)	188.33 ± 4.62 ^(b)	75.67 ± 0.29 ^(a)	>200
Extrait d'acétate d'éthyle	144.75 ± 1.17 ^(a)	97.72 ± 3.07 ^(a)	124.22 ± 0.61 ^(a)	14.36 ± 0.90 ^(a)	92.00 ± 4.85 ^(a)	56.56 ± 3.34 ^(a)	193.67 ± 1.44 ^(a)
Extrait butanolique	59.38 ± 0.72 ^(b)	36.25 ± 0.42 ^(b)	49.52 ± 1.54 ^(b)	13.61 ± 0.38 ^(a)	71.80 ± 1.22 ^(a)	20.29 ± 1.16 ^(b)	119.17 ± 0.29 ^(b)
BHT	22.32 ± 1.19 ^(b)	3.32 ± 0.18 ^(c)	1.29 ± 0.30 ^(c)	nd	9.62 ± 0.87 ^(c)	2.24 ± 0.17 ^(c)	nd
BHA	5.73 ± 0.41 ^(c)	5.38 ± 0.06 ^(c)	1.81 ± 0.10 ^(c)	nd	3.64 ± 0.19 ^(c)	0.93 ± 0.07 ^(c)	nd
Acide tannique	nd	nd	nd	<3.125	nd	nd	5.39 ± 0.91 ^(c)
Acide ascorbique	nd	nd	nd	<3.125	nd	nd	6.77 ± 1.15

BHT : Butylhydroxytoluène, BHA : Butylhydroxyanisole, n.d. : non détecté.

La méthode CUPRAC utilise la mesure de l'absorbance à 450 nm pour évaluer l'activité antioxydante, montrant une diminution de la couleur bleue à l'orange en présence de l'antioxydant dans le complexe néocuproïne-cuivre (II) et néocuproïne-cuivre (I). Selon les données du Tableau 12, l'extrait butanolique montre la plus forte activité inhibitrice parmi les échantillons analysés, avec une A0.5 de $71.80 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$, suivi de près par l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait brut et l'extrait chloroformique ayant des A0.5 de 92.00 ± 4.85 , 128.44 ± 4.14 et $188.33 \pm 4.62 \mu\text{g/mL}$ respectivement (Tukey HSD test : $p < 0,01$). Le BUE montre une activité sept fois inférieure à celle du BHT (A0.5 = $9.62 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$) et vingt fois inférieure à celle du BHT (A0.5 = $3.64 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$) (test de HSD de Tukey : $p < 0,01$).

Sans antioxydant, le potassium ferricyanure se transforme en potassium ferrocyanure, qui réagit avec le chlorure de fer pour créer un complexe de fer bleu-vert avec une absorbance maximale à 700 nm. Les résultats sont disponibles dans le Tableau 12. Les résultats du test de potentiel réducteur confirment les trois premiers tests : L'extrait butanolique de la même plante a montré une valeur de A0.5 = $119.17 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ supérieure à celle des autres extraits (test de HSD de Tukey : valeur $p < 0,01$). Cette activité est bien en dessous des normes, l'acide ascorbique ($6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$) et l'acide tannique ($5.39 \pm 0.91 \mu\text{g/mL}$), mais elle est trois fois plus faible que le standard α -tocophérol (A0.5 = $34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/mL}$). Cela peut être expliqué par la présence de composés qui donnent des électrons, car la méthode du pouvoir réducteur suit le mécanisme de transfert d'électrons (ET).

Les antioxydants transforment le fer ferrique en fer ferreux, qui réagit avec la phénantroline orange-rouge pour former un complexe stable avec une absorbance maximale à 510 nm. L'UEB a montré la plus haute activité de réduction du fer parmi les échantillons, avec une valeur de A0.5 = $20,29 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, vingt fois moindre que celle du BHA (A0.5 = $0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) et neuf fois moindre que celle du BHT (A0.5 = $2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$). Les cinq méthodes antérieures concordent avec les conclusions de cette tâche.

L'ABTS, un composé organique stable, est utilisé pour mesurer l'activité anti-radicalaire, avec une absorbance maximale à 734 nm. Quand il y a un donneur d'antioxydant à hydrogène, le cation ABTS^{•+} passe de l'état bleu-vert à un état neutre incolore. D'après le test ABTS, on a observé que l'UEB affiche une activité antiradicalaire supérieure (IC50 = $49,52 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux autres extraits de la même plante. Son activité est intermédiaire par rapport à BHT et BHA, avec des valeurs d'IC50 de $1,29 \pm 0,30$ et $1,81 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ respectivement. Les résultats du sixième test confirment les tests précédents.

On a mesuré l'activité de piégeage des radicaux superoxydes des extraits. Selon le tableau 13, tous les échantillons ont montré une activité de piégeage contre le radical superoxyde, avec la plus grande efficacité observée pour l'UEB ($IC_{50} = 13.61 \pm 0.384 \mu\text{g/mL}$), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 14.36 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$), l'extrait brut ($IC_{50} = 21.91 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$) et enfin l'extrait chloroformique ($IC_{50} = 64.77 \pm 2.37 \mu\text{g/mL}$) (Test HSD de Tukey : valeur $p < 0.01$). En raison des taux élevés d'inhibition observés à diverses concentrations, ces résultats sont quasiment équivalents aux normes traditionnelles telles que l'acide tannique et l'alpha-tocophérol ($IC_{50} = 3.125 \mu\text{g/mL}$).

Les divers extraits végétaux renferment des composés chimiques naturels qui peuvent être à l'origine des propriétés antioxydantes. Le butanol de *C. parviflora* a une forte activité antioxydante contre divers radicaux libres et montre également un pouvoir réducteur dans différents tests. Il est important de souligner que les extraits étudiés ont montré une efficacité similaire dans toutes les méthodes utilisées, ainsi qu'une teneur élevée en polyphénols, ce qui confirme que l'effet des extraits est en accord avec leur richesse en polyphénols totaux.

Diverses recherches ont indiqué que le stress oxydatif est lié à des affections chroniques comme le cancer, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et neurodégénératives, provoquant ainsi la détérioration des cellules. Les substances antioxydantes trouvées dans les fruits et légumes semblent avoir un impact important dans la lutte contre le stress oxydatif. En plus des fruits et légumes, les boissons végétales comme le café fournissent des antioxydants dans notre alimentation (Uttara *et al.*, 2009). Des recherches épidémiologiques ont trouvé des connexions entre la consommation d'aliments contenant des polyphénols et la protection contre diverses maladies comme le cancer, les maladies cardiaques et l'ostéoporose, ce qui a suscité un intérêt pour ces composés (Grgić *et al.*, 2020).

Les polyphénols interviennent dans de nombreux processus physiologiques liés à la qualité des aliments qui se produisent lorsqu'une plante est endommagée mécaniquement. Souvent, la résistance d'une plante aux insectes et aux microorganismes est liée à sa quantité de composés phénoliques (Tomás-Barberán & Espín, 2001).

En raison de la structure en anneau conjugué et de la présence de groupes hydroxyle, de nombreux composés phénoliques ont le potentiel d'agir en tant qu'antioxydants par hydrogénation ou complexation avec des espèces oxydantes pour piéger ou stabiliser les radicaux libres impliqués dans le processus d'oxydation (Pietta, 2000). L'acide chlorogénique (ACG) est un composé

polyphénolique important qui se trouve naturellement dans divers produits agricoles tels que le café, les haricots, les pommes de terre et les pommes (**Escarpa & González, 1998**).

Il a été suggéré que ce composé présente une propriété antioxydante, et il a été rapporté que le CGA inhibe l'oxydation de la vitamine A et protège contre l'oxydation de l'épinéphrine in vitro. Récemment, les résultats d'études in vivo ont suggéré que le CGA procure des effets bénéfiques pendant les lésions d'ischémie-reperfusion du foie de rat et le stress oxydatif induit par le paraquat chez les rats (**Zhang et al., 2003**).

Les acides chlorogéniques sont des composés phénoliques formés par l'estérification des acides cinnamiques. Ils présentent diverses propriétés pharmacologiques. Leurs propriétés antioxydantes, anti-obésité, antivirales, anti-hypertension, antipyrétiques et anti-inflammatoires sont étudiées par différents chercheurs. L'acide chlorogénique est un polyphénol biologiquement actif soluble dans l'éthanol et l'acétone (**Mariadoss et al., 2021**).

Les acides chlorogéniques sont présents en abondance dans les grains de café verts. Ils se trouvent également dans les pommes de terre, les prunes et le bambou. Leur large disponibilité les rend économiques et facilite leur application. De plus, il a été découvert que les acides chlorogéniques ont la capacité de moduler le métabolisme des lipides et du glucose dans les troubles métaboliques génétiques et liés au mode de vie (**Upadhyay & Mohan Rao, 2013**).

L'acide chlorogénique et l'acide caféique sont des groupes hydroxyle vicinaux sur un résidu aromatique, et ils présentent des activités antimutagènes, anticancéreuses et antioxydantes in vitro, qui sont attribuées à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Sato et al., 2011**). L'acide chlorogénique est un composé phénolique principal dans la pulpe de fruit de nectarine et a une forte activité antioxydante, qui est positivement corrélée à la capacité de neutralisation des ROS dans les fruits de pêche et de nectarine. Cependant, on sait peu de choses sur les effets des polyphénols sur les protéines des fruits. Dans des études antérieures, les chercheurs ont démontré que l'apport exogène d'acide chlorogénique peut significativement retarder le vieillissement des fruits de nectarine (**Xi et al., 2017**).

Au total, dix flavonoïdes représentant quatre grandes catégories ont été testés pour évaluer leur activité antioxydante. La rutine a montré le plus haut niveau de capacité de capture des radicaux libres, suivie par la kaempférol, la lutéoline, la quercétine, l'apigénine, l'hespéridine, la sinensétine, la naringénine, la naringine et la 3,5,6,7,8,3',4'-heptaméthoxyflavone (**Wang et al., 2021**). Cependant, la quercétine et la quercétine 3-O-glucoside ont montré des activités

antioxydantes cohérentes avec les activités rapportées de ces flavonoïdes dans la littérature (**Babiaka et al., 2020**). Les résultats obtenus par **Razavi (2009)** ont montré que la quercétine 3-O-glucoside présente un effet antioxydant élevé avec un RC50 de 22 µg/mL, a une faible cytotoxicité et n'a pas d'effets antibactériens. La quercétine 3-O-glucoside présente également un fort effet phytotoxique, avec une valeur IC50 de 282.7 µg/mL.

III.1.4. Activité antimicrobienne

Les effets antibactériens de l'extrait de *C. parviflora* ont été testés avec la méthode de diffusion en puits, et les données sont affichées dans le Tableau 13 et la Figure 25. L'efficacité antimicrobienne de l'extrait de méthanol a été testée contre des bactéries de référence et des champignons pathogènes (Tableau 13). D'après les données recueillies, l'action des extraits de plantes dissous dans le DMSO sur les diverses souches a été déterminée grâce à la méthode des disques. Les résultats des tests ont montré que l'extrait méthanolique a montré une efficacité antimicrobienne satisfaisante contre la plupart des micro-organismes testés, à l'exception d'*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* et de *Candida albicans*. En règle générale, les mesures de la zone d'inhibition ont varié de 7,00 à 12,12 mm et de 8,03 à 15,23 mm pour les concentrations de 20 et 30 mg/mL d'extrait, respectivement. Les extraits contenant 30 mg/mL sont efficaces et ont une action antimicrobienne en stoppant la croissance in vitro de différentes souches microbiennes : *S. aureus* ATCC6538 (DIZ, 8.64 et 7.00 mm), *S. aureus* ATCC25923 (DIZ, 13.22 et 12.00 mm), *Salmonella* (DIZ, 8.03 et 7.00 mm), *A. niger* (DIZ, 8.22 et 7.00 mm) et *Pseudomonas* sp. (DIZ, 15.23 and 12.12 millimeters).

Tableau 13. Activités antimicrobiennes et antifongiques de l'extrait méthanolique de *C. parviflora*.

Microorganismes testés		Diamètre de la zone d'inhibition (IZD, mm)	
		20 mg/ml	30 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	Gram+	7.00	8.64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Gram+	12.00	13.22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	Gram+	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	Gram-	NA	NA
<i>Salmonella</i> sp. ATCC14028	Gram-	7.00	8.03
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC27853	Gram-	12.12	15.23
<i>Candida albicans</i> ATCC10234	Fungus	NA	NA
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	Fungus	7.00	8.22

NA: non actif

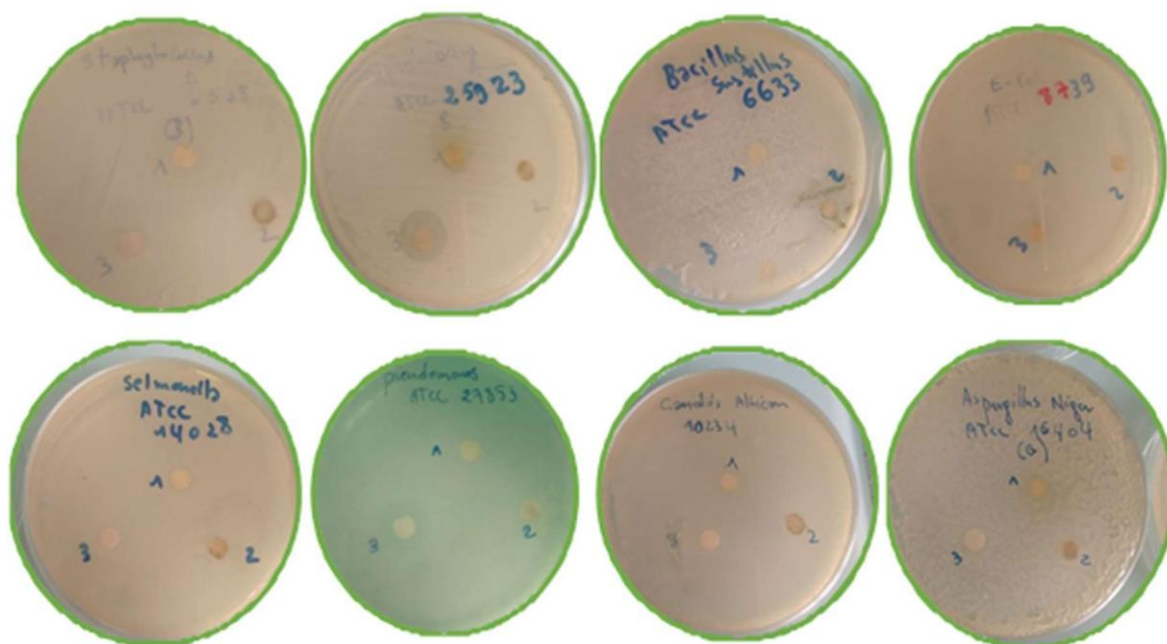


Figure 25. Photographies des résultats de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion sur disque d'agar de *C. parviflora*. 1. témoin (solvant), 2. (20 mg/mL), 3. (30 mg/mL).

L'observation marquante qui ressort de la comparaison des données était l'effet inhibiteur potentiel de l'extrait de *C. parviflora* contre *Staphylococcus aureus*, une cause majeure d'infections cutanées et des tissus mous, et de *Pseudomonas sp.*, qui provoque particulièrement des infections dans le sang, les poumons (pneumonie) ou d'autres parties du corps après une chirurgie. Ceci est en accord avec les résultats de **Naeim et al. (2020)**, qui ont rapporté une forte activité antibactérienne de l'extrait de méthanol des racines et parties aériennes de *C. pumilio* contre *Staphylococcus aureus* et les souches d'*Acinetobacter baumannii* (CMI, 62.50 µg/mL et 250 µg/mL, respectivement).

De plus, **Karamenderes et al. (2006)** ont démontré des activités antiprotozoaires élevées (*Plasmodium falciparum* et *Leishmania donovani*) et antimicrobiennes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, *Aspergillus fumigatus* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) de dix espèces de *Centaurea L.* cultivées en Turquie. Les données obtenues sont largement cohérentes avec les tendances majeures rapportées dans la littérature (**Jafari-Sales et al., 2019**).

De nouveaux médicaments antimicrobiens sont nécessaires pour traiter les maladies provoquées par des micro-organismes résistants aux médicaments chez les humains et les animaux. En outre, les consommateurs continuent de rechercher des aliments et des cosmétiques qualifiés

de "naturels" ou "sans conservateurs" tout en étant sûrs d'un point de vue microbiologique (Zink *et al.*, 1997). Les plantes contiennent de nombreux composés bioactifs, tels que des phénols, des terpénoïdes, des alcaloïdes et des anthocyanes, qui sont essentiels pour traiter diverses maladies (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Les extraits de méthanol pourraient servir de moyens naturels pour lutter contre les maladies infectieuses et pour la préservation des aliments, en tant qu'agents antimicrobiens et antioxydants. La création de ces agents naturels contribuera aussi à trouver des solutions aux défis environnementaux provoqués par les produits et médicaments artificiels, comme la pollution et la résistance de certains micro-organismes. Les acides phénoliques ont récemment suscité une attention substantielle en raison de leurs divers effets pratiques, biologiques et pharmacologiques. La liste étendue des acides chlorogéniques contient environ 400 composés. L'acide chlorogénique est un polyphénol diététique important et biologiquement actif, jouant plusieurs rôles importants et thérapeutiques tels que l'activité antioxydante, antibactérienne, hépatoprotectrice, antivirale et antimicrobienne (Valanciene & Malys, 2022).

III.2. Etude de la plante *Centaurea tougourensis* et *Centaurea dimorpha*

III.2.1. Rendement d'extraction

La récupération et l'isolement des composés phytochimiques des matières végétales dépendent principalement de l'étape d'extraction. La performance de l'extraction peut être influencée par la composition chimique, la technique, le solvant et la présence de substances perturbatrices. Les résultats d'extraction méthanolique des espèces *C. tougourensis* et *C. dimorpha* sont affichées dans le **tableau** ci-dessous :

Tableau 14. Rendement d'extraction méthanolique des espèces : *C. tougourensis* et *C. dimorpha*

Extrait	Rendement d'extraction (%)
<i>C. tougourensis</i>	1.32
<i>C. dimorpha</i>	3.47

III.2.2. Analyse chromatographique et spectrophotométrique

III.2.2.1. Analyse chromatographique par LC-MS/MS

III.2.2.1.1. Optimisation des conditions chromatographiques LC-MS/MS

Afin de reconnaître les composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, l'analyse HPLC-MS/MS en utilisant 37 composés phénoliques comme standards (Tableau 15 et Figure 26) a été réalisée en mode ionisation électrospray (ESI) avec surveillance des réactions multiples (MRM), qui suit les transitions des ions parents aux ions filles de tous les standards pour une identification précise des composés.

Tableau 15. Conditions optimales utilisées pour l'analyse des 37 composés phénoliques

No	Composés	Temps de rétention (min)	Type de Scan	Mode d'ionisation	Ion parent [M-H] ⁻ (m/z)	MS2 fragments ou ions produits (m/z)
1	Acide quinique	1.13	MRM	Negatif	190.95	85.3-93.3
2	Acide malique	1.23	MRM	Negatif	133.00	115.2-71.3
3	Acide fumarique	1.48	MRM	Negatif	115.00	71.4
4	Acide gallique	3.00	MRM	Negatif	168.85	125.2-79.2
5	Acide protocatéchique	4.93	MRM	Negatif	152.95	108.3
6	Pyrocatecholé	6.48	MRM	Negatif	109.00	108.35-91.3
7	Acide chlorogénique	7.13	MRM	Negatif	353.15	191.2
8	Acide 4-OH-benzoïque	7.39	MRM	Negatif	136.95	93.3-65.3
9	Acide vanillique	8.57	MRM	Negatif	166.90	152.3-108.3
10	Acide caféique	8.80	MRM	Negatif	178.95	135.2-134.3
11	Acide syringique	9.02	MRM	Negatif	196.95	182.2-167.3
12	Vanilline	10.87	MRM	Negatif	151.00	136.3-92.2
13	Acide salicylique	11.16	MRM	Negatif	136.95	93.3-65.3
14	Acide p-coumarique	11.53	MRM	Negatif	162.95	119.3-93.3
15	Rutine	12.61	MRM	Negatif	609.05	300.1-271.1
16	Acide tr-féruilique	12.62	MRM	Negatif	192.95	178.3
17	Acide sinapique	12.66	MRM	Negatif	222.95	208.3-149.2
18	Hespéridine	12.67	MRM	Negatif	609	301.1
19	Isoquercitrine	13.42	MRM	Negatif	463.00	300.1-271.1
20	Acide rosmarinique	14.54	MRM	Negatif	359.00	161.2-197.2
21	Nicotiflorine	14.68	MRM	Negatif	593.05	285.1-255.2
22	Acide α -coumarique	15.45	MRM	Negatif	162.95	119.4-93.3
23	Rhoifoline	16.11	MRM	Negatif	577.05	269.2-211.1
24	Quercitrine	16.41	MRM	Negatif	447.15	301.1-255.1
25	Apigétrine	16.59	MRM	Negatif	431.00	268.2-239.2
26	Coumarine	17.40	MRM	Negatif	147.05	91.0-103.2
27	Myricétine	18.72	MRM	Negatif	317.00	179.2-151.3
28	Fisétine	19.30	MRM	Negatif	284.95	135.2-121.3
29	Acide cinnamique	25.61	MRM	Negatif	147.00	103.15-77.3
30	Liquiritigénine	25.62	MRM	Negatif	254.95	119.3-135.1
31	Quercétine	28.17	MRM	Negatif	300.90	151.2-179.2
32	Lutéoline	28.27	MRM	Negatif	284.75	133.2-151.2
33	Naringénine	30.68	MRM	Negatif	270.95	151.2-119.3
34	Apigénine	31.43	MRM	Negatif	268.95	117.3-151.2
35	Hespéretine	31.76	MRM	Negatif	300.95	164.2-136.2
36	Kaempférol	31.88	MRM	Negatif	284.75	255.1-117.3
37	Chrysine	36.65	MRM	Negatif	252.95	143.3-119.4

Le temps de rétention et les spectres MS/MS des analytes ont été utilisés pour les caractériser. Pour des résultats MS optimaux, l'ionisation a été réalisée en mode ESI négatif, et les ions précurseurs correspondaient aux adduits déprotonés [M-H⁻]. Après optimisation des paramètres d'acquisition, nous avons pu quantifier les composés cibles (**Tableau 15**).

III.2.2.1.2. Validation de la méthode

La méthode de quantification a été validée en termes de linéarité, précision, étude de récupération, limites de détection (LODs), limites de quantification (LOQs) et spécificité (**Tableau 16**). Cette méthode a montré une bonne linéarité ($r \geq 0.989$), précision (écart-type relatif en pourcentage ; RSDs % 0.058–3.209 pour l'intra-journée, 0.076–2.605 pour l'inter-journée), et reproductibilité (le pourcentage de récupération était compris entre 98.47 et 104.09%).

Les LODs et LOQs étaient respectivement de 0.003-0.821 et 0.004-0.859 mg/L, ce qui indique de bonnes limites de performance (**Tableau 16**). Les incertitudes standard relatives étaient égales ou inférieures à 2.82 % pour tous les composés analysés, ce qui signifie que la valeur vraie inconnue se situe à un maximum de ± 2.82 % autour du résultat calculé.

III.2.2.3. Application de l'LC-MS/MS aux fractions de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) est une méthode analytique cruciale appliquée pour identifier la composition phytochimique des extraits de plantes. Dans cette étude, une numérisation de masse complète a été réalisée sur deux fractions méthanoliques provenant de *C. tougourensis* et *C. dimorpha*. Au total, 37 composés phytochimiques ont été identifiés de manière tentatives, comprenant 14 acides phénoliques (dont l'acide chlorogénique, l'acide protocatéchique, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide syringique, l'acide salicylique, l'acide tr-ferulique, l'acide sinapique, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique, et l'acide α -coumarique), 3 acides organiques non-phénoliques (acide quinique, acide malique, acide fumarique), 17 flavonoïdes (tels que la rutine, l'héspéridine, l'isoquercitrine, la nicotiflorine, la rhoifoline, la quercitrine, la cosmosiine, la myricétine, la fisétine, la liquiritigénine, la quercétine, la lutéoline, la naringénine, l'apigénine, l'héspéritine, la kaempférol, et la chryisine), ainsi qu'un aldéhyde phénolique (vanilline), un benzopyrone (coumarine) et un catéchol (pyrocatechol) (**Tableau 16**).

Les résultats de l'analyse LC-MS/MS ont montré que la fraction de *C. dimorpha* (**Tableau 17** et **Figure 27**) contenait un total plus élevé (16 composés) d'acides phénoliques et de flavonoïdes

par rapport à la fraction de *C. tougourensis* (10 composés) (**Tableau 17 et Figure 28**). Plus spécifiquement, 8 acides phénoliques ont été détectés dans la fraction de *C. dimorpha*, tandis que 7 ont été trouvés dans la fraction de *C. tougourensis*. Les acides phénoliques fréquemment reconnus dans les deux fractions incluaient l'acide p-coumarique, l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide salicylique, l'acide 4-OH-benzoïque, l'acide chlorogénique, et l'acide protocatéchique, bien que à des concentrations variables.

Tableau 16. Plage de concentration, linéarité (R2), limites de détection (LODs), limites de quantification (LOQs) et pourcentages de récupération des composés testés.

No	Composes	Conc. range (linearity range) (µg/ml)	R2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Inter-day (n=3) RSD (%)	Intra-day (n=3) RSD (%)	Recovery% (n = 3)		U (%)
								Inter-day	Intra-day	
1	Acide quinique	0.250-10	0.996	0.075	0.079	0.259	0.274	100.28	98.77	0.0082
2	Acide malique	0.250-10	0.999	0.055	0.067	0.477	0.527	101.26	99.83	0.0113
3	Acide fumarique	0.10-5	0.997	0.028	0.034	0.536	0.460	99.74	99.86	0.0124
4	Acide gallique	0.250-10	0.998	0.095	0.106	1.601	01.443	100.00	100.45	0.0282
5	Acide protocatéchique	0.100-5	0.995	0.028	0.031	1.236	1.296	99.40	101.07	0.0411
6	Pyrocatechole	1-20	0.996	0.261	0.278	1.313	1.339	99.98	99.93	0.0235
7	Acide chlorogénique	0.025-1	0.998	0.006	0.008	0.058	0.076	100.80	99.96	0.0069
8	Acide 4-OH-benzoïque	0.250-10	0.998	0.033	0.038	1.284	1.538	99.66	100.05	0.0289
9	Acide vanillique	0.1-20	0.999	0.122	0.139	0.528	0.619	100.09	104.09	0.0508
10	Acide caféique	0.025-1	0.998	0.018	0.022	1.454	1.469	100.91	98.82	0.0354
11	Acide syringique	0.1-20	0.996	0.021	0.233	1.049	1.345	99.92	99.97	0.0238
12	Vanilline	0.250-10	0.998	0.044	0.053	0.696	0.793	99.67	99.61	0.0280
13	Acide salicylique	0.025-1	0.989	0.005	0.006	1.016	1.242	100.98	99.01	0.0329
14	Acide p-coumarique	0.025-1	0.992	0.007	0.009	1.820	1.727	100.61	101.22	0.0516
15	Rutine	0.025-1	0.997	0.005	0.006	0.473	0.624	100.99	98.01	0.0159
16	Acide tr-férulique	0.250-10	0.997	0.036	0.042	0.708	0.619	99.98	100.28	0.0494
17	Acide sinapique	0.250-10	0.992	0.078	0.086	1.446	1.517	100.16	99.96	0.0281
18	Hespéridine	0.025-1	0.998	0.003	0.004	0.945	1.126	101.73	101.26	0.0262
19	Isoquercitrine	0.025-1	0.999	0.005	0.006	0.682	0.515	100.59	100.72	0.0133
20	Acide rosmarinique	0.100-5	0.994	0.006	0.008	2.014	1.751	99.20	103.43	0.0713
21	Nicotiflorine	0.100-5	0.991	0.022	0.025	0.737	0.875	102.55	100.97	0.0276
22	Acide α -coumarique	0.025-1	0.999	0.024	0.031	2.730	2.566	98.34	99.06	0.0513
23	Rhoifoline	0.100-5	0.999	0.023	0.027	0.747	1.528	101.04	101.73	0.0941

24	Quercitrine	0.100-5	0.999	0.022	0.025	1.528	2.320	99.72	100.62	2.0079
25	Apigétrine	0.025-1	0.993	0.005	0.006	1.797	1.607	101.39	100.41	0.0597
26	Coumarine	1-20	0.994	0.208	0.228	1.306	1.239	99.94	100.08	0.0237
27	Myricétine	0.250-10	0.999	0.053	0.057	0.652	0.711	99.98	100.04	0.0126
28	Fisétine	0.250-10	0.991	0.054	0.051	0.557	0.820	99.87	100.03	0.0148
29	Acide cinnamique	5-20	0.996	0.821	0.859	0.648	0.816	100.05	99.92	0.0143
30	Liquiritigénine	0.025-1	0.996	0.005	0.006	1.849	1.738	100.33	99.95	0.0341
31	Quercétine	0.100-5	0.990	0.023	0.028	1.589	1.360	98.47	100.10	0.0543
32	Lutéoline	0.025-1	0.997	0.005	0.006	0.575	0.696	100.77	99.52	0.0174
33	Naringénine	0.025-1	0.995	0.005	0.006	2.054	2.019	99.88	101.00	0.0521
34	Apigénine	0.025-1	0.990	0.005	0.006	2.304	2.204	101.44	101.33	0.0650
35	Hespérétine	0.025-1	0.997	0.005	0.006	3.209	2.605	98.85	99.43	0.0562
36	Kaempférol	1-20	0.992	0.206	0.214	1.436	1.070	99.97	99.85	0.0209
37	Chrysine	0.025-1	0.993	0.005	0.006	0.490	0.630	100.33	100.43	2.0083

RSD %: déviation standard relative. U (%): Incertitude en pourcentage au niveau de confiance de 95% (k = 2).

L'acide chlorogénique était le plus prévalent, avec des concentrations de 2689.66 µg/g et 3147.35 µg/g dans les fractions de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, respectivement. De plus, l'acide 4-OH-benzoïque (168.11 et 397.12 µg/g pour *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, respectivement) et l'acide protocatéchuique (82.2 et 137.49 µg/g pour *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, respectivement) ont été également observés.

L'acide sinapique a été exclusivement trouvé dans la fraction de *C. dimorpha*, bien qu'en faible quantité. De plus, la fraction de *C. dimorpha* contenait 7 flavonoïdes (hespéridine, rutine, isoquercitrine, apigétrine, apigénine, rhoifoline, et nicotiflorine), avec la nicotiflorine étant le composé principal (5556.34 µg/g), suivi de la rutine (3319.17 µg/g).

En revanche, un seul flavonoïde, l'hespéridine, a été détecté dans la fraction de *C. tougourensis*, avec une concentration relativement faible de 79.35 µg/g. De plus, deux acides organiques non-phénoliques ont été identifiés, avec l'acide quinique étant le composé le plus abondant à 20533.796 µg/g et 57164.13 µg/g dans *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, respectivement, suivi de l'acide malique (2452.56 et 8402.23 pour *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, respectivement). L'acide fumarique n'a été détecté dans aucune des fractions étudiées.

Jusqu'à présent, aucune approche phytochimique n'a été entreprise sur *C. tougourensis*, et seules quelques études phytochimiques ont été menées sur cette espèce, au cours desquelles les chercheurs ont identifié un total de dix composés à partir des extraits d'éthyle acétate et de dichlorométhane. Ainsi, six d'entre eux étaient des aglycones flavonoïdes, tandis que les quatre autres étaient des lactones sesquiterpéniques (Nacer *et al.*, 2006 ; 2012).

Les composés isolés étaient respectivement : 3'-O-méthyléupatorine, jaceosidine, népétine, eupatiline, apigénine, kaempférol, cnicine, 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -déhydromelitensine, (6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -15-acétoxy-héliang 1 (10), 4 (5), 11 (13) triène-6-olide, et enfin (6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) -15-oxohéliang 1 (10), 4 (5), 11 (13) triène-6-olide. Pour toutes ces raisons, nous avons ciblé cette espèce dans notre étude pour découvrir son plein potentiel pharmacologique. L'examen phytochimique de *C. tougourensis* a révélé la richesse de cette espèce en différentes classes de composés phénoliques.

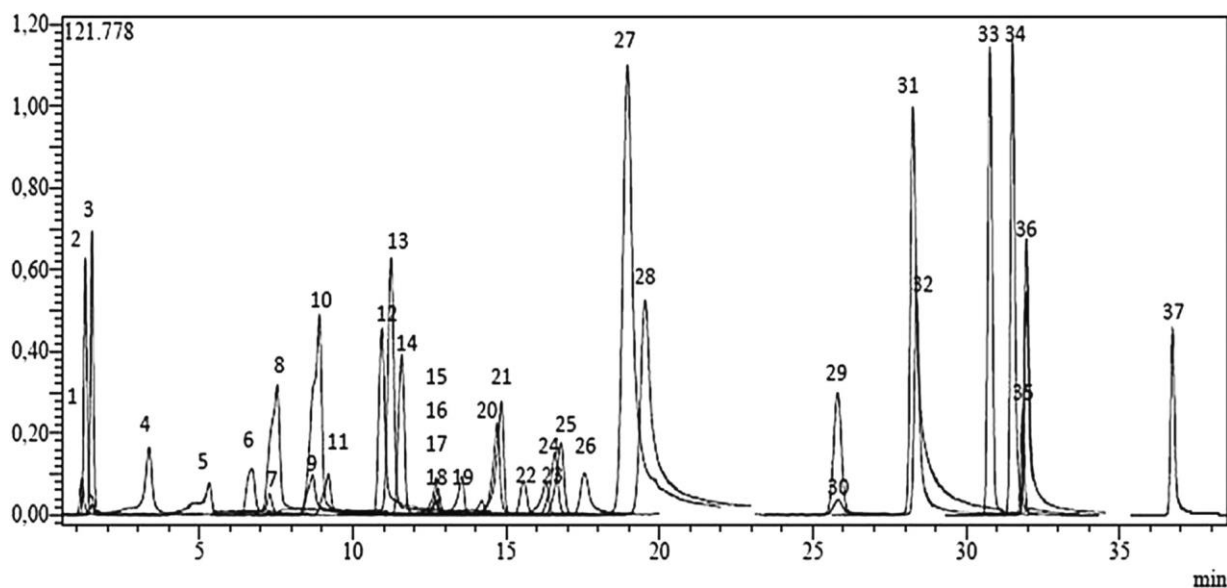
Tableau 17. Détermination quantitative de 37 composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis* ($\mu\text{g/g}$ d'extrait) par LC-MS/MS, les écarts-types relatifs (RSDs %) étaient compris entre 0.90 et 3.15 %.

N°	Composés	Extrait méthanolique 80% ($\mu\text{g/g}$ extrait)	
		<i>C. dimorpha</i>	<i>C. tougourensis</i>
1.	Acide quinique	20533.796	57164.13
2.	Acide malique	2452.56	8402.23
3.	Acide gallique	64.75	52.09
4.	Acide protocatéchique	82.2	137.49
5.	Acide chlorogénique	2689.66	3147.35
6.	Acide 4-OH-benzoïque	168.11	397.12
7.	Acide caféique	60.37	5.11
8.	Acide salicylique	6.6	26.88
9.	Acide p-coumarique	57.2	17.38
10.	Rutine	3319.17	NI
11.	Acide sinapique	7.09	NI
12.	Hespéridine	61.06	79.35
13.	Isoquercitrine	301.18	NI
14.	Nicotiflorine	5556.34	NI
15.	Rhoifoline	206.24	NI
16.	Apigétrine	131.77	NI
Total des composés		16	10

NI : non identifié

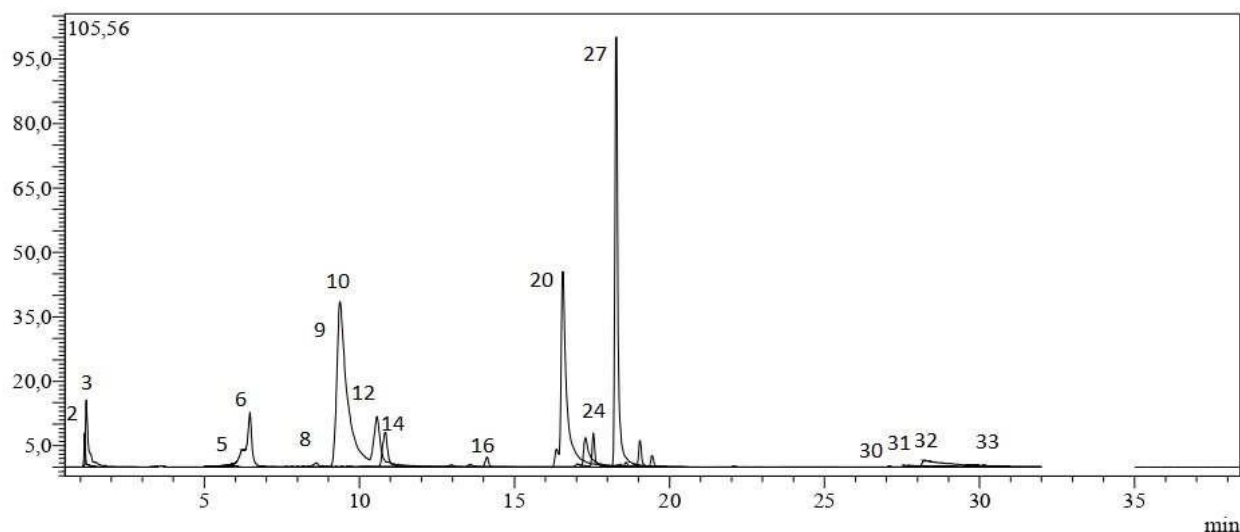
Selon **Sokovic et al. (2017)**, les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques sont principalement responsables des activités biologiques des espèces de *Centaurea*. Parmi les principaux composés trouvés dans nos extraits, la nicotiflorine est l'un des flavonoïdes les plus importants en raison de ses effets antioxydants (**Vergallo et al., 2019**), hépatoprotecteurs (**Zhao et al., 2017**), neuroprotecteurs (**Li et al., 2006**) et anti-inflammatoires (**Wang et al., 2018**).

L'acide quinique s'est avéré être le composé phénolique le plus abondant dans nos extraits. De même, **Boğa et al. (2016)** ont rapporté que 10 % de l'extrait de méthanol de *C. lycopifolia* était de l'acide quinique.



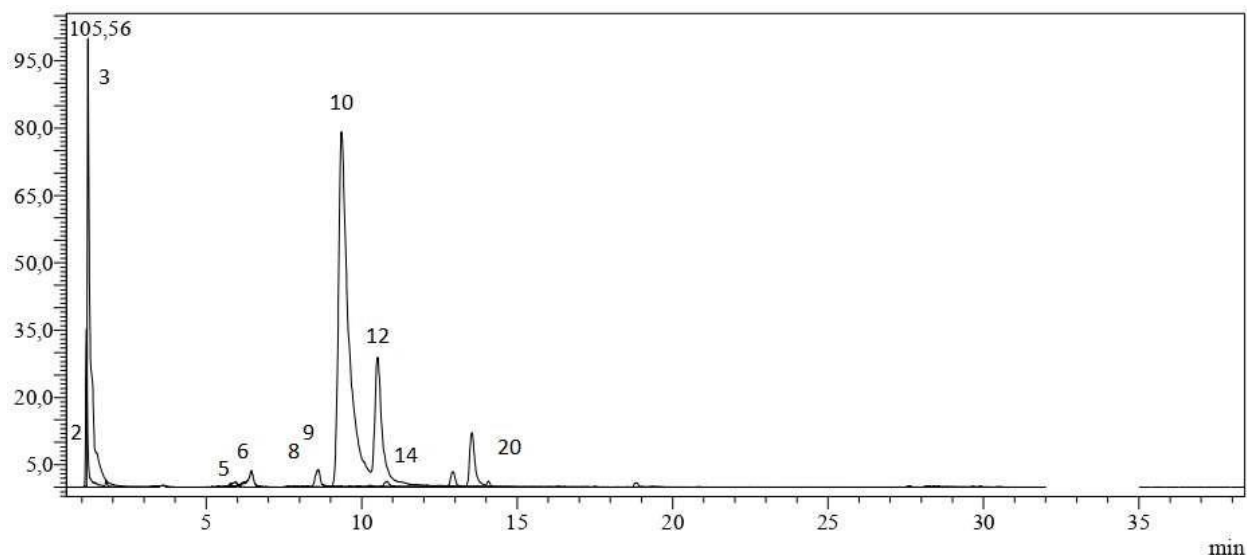
Légende : (1) acide quinique, (2) acide malique, (3) acide fumarique, (4) acide gallique, (5) acide protocatéchique, (6) pyrocatechol, (7) acide chlorogénique, (8) acide 4-OH-benzoïque, (9) acide vanillique, (10) acide caféique, (11) acide syringique, (12) vanilline, (13) acide salicylique, (14) acide p-coumarique, (15) rutine, (16) acide tr-ferulique, (17) acide sinapique, (18) hespéridine, (19) isoquercitrine, (20) acide rosmarinique, (21) nicotiflorine, (22) α -coumarique, (23) rhoifoline, (24) quercitrine, (25) apigétrine, (26) coumarine, (27) myricétine, (28) fisétine, (29) acide cinnamique, (30) liquiritigénine, (31) quercétine, (32) lutéoline, (33) naringénine, (34) apigénine, (35) hespéretine, (36) kaempférol et (37) chryisine

Figure 26. Chromatogramme LC-MS/MS des mélanges de standards (1 µg/ml)



Légende : (1) acide quinique, (2) acide malique, (3) acide fumarique, (5) acide protocatéchique, (6) pyrocatechol, (8) acide 4-OH-benzoïque, (9) acide vanillique, (10) acide caféique, (12) vanilline, (14) acide p-coumarique, (16) acide tr-ferulique, (20) acide rosmarinique, (24) quercitrine, (27) myricétine, (30) liquiritigénine, (31) quercétine, (32) lutéoline, (33) naringénine,

Figure 27. Chromatogramme LC-MS/MS d'extraits méthanoliques de *C. dimorpha* (µg/g d'extrait)



Légende : (2) acide malique, (3) acide fumarique, (5) acide protocatéchique, (6) pyrocatechol, (8) acide 4-OH-benzoïque, (9) acide vanillique, (10) acide caféique, (12) vanilline, (14) acide p-coumarique, (20) acide rosmarinique

Figure 28. Chromatogramme LC-MS/MS d'extraits méthanoliques de *C. tougourensis* ($\mu\text{g/g}$ d'extrait)

Plusieurs chercheurs ont exposées que les principaux composants phytochimiques des taxons de *Centaurea* étaient des lactones sesquiterpéniques, des terpénoïdes, des flavonoïdes et des acétylènes (Gurbuz et Yesilada, 2007). Des recherches biochimiques précédentes ont révélé que les différentes espèces de *Centaurea* contenaient des flavonoïdes comme la quercétine, la lutéoline, le kaempférol, la salvigénine, l'apigénine, l'hispiduline, la cirsimaritrine, l'apigénine 7-O-glucoside et l'isokaempferide (Melikoglu *et al.*, 2018). D'après Mawahib *et al.* (2018), le distillat de *Centaurea papposa* renferme 9 composés phénoliques, tandis que les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol en possèdent chacun 20.

Les résultats sur la composition chimique de *C. solstitialis* ont confirmé à nouveau la valeur du genre *Centaurea* en tant que source de composés phénoliques. Nos résultats étaient conformes au profil phytochimique des espèces de *Centaurea* de Turquie (Uysal *et al.*, 2014 ; Zengin *et al.*, 2018). Le profil phénolique de l'extrait méthanolique de *C. urvillei* subsp. *stepposa* a été obtenu en utilisant l'analyse RP-HPLC (Uysal *et al.*, 2014), et a montré une forte teneur phénolique.

III.2.2.4. Quantification des contenus totaux de phénols, de flavonoïdes et de flavonols

Les contenus totaux en phénols, en flavonoïdes et en flavonols de l'extrait méthanolique de *C. tougourensis* et de *C. dimorpha* ont été examinés par des méthodes spectrophotométriques, et les résultats sont présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Teneurs totales en phénols, flavonoïdes et flavonols des extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*

Especies	Teneurs en Phenols ^a (mg GAE/g)	Teneurs en Flavonoïds ^b (mg EQ/g)	Teneurs en Flavonol (mg EQ/g)
<i>C. tougourensis</i>	191.9 ± 0.29	50.5 ± 0.06	46.3 ± 0.116
<i>C. dimorpha</i>	219.8 ± 0.47	82.83 ± 0.9	29.01 ± 0.245

*Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes ± SD de trois mesures parallèles, GAE : équivalent acide gallique, QE : Quercétine équivalente.

Selon les données obtenues, le contenu total en phénols le plus élevé (219.8 ± 0.47 mg GAE/g) et le contenu total en flavonoïdes (82.83 ± 0.9 mg EQ/g d'extrait) ont été détectés dans l'extrait méthanolique de *C. dimorpha*. Ainsi, le contenu en flavonol de l'extrait de *C. tougourensis* (46.3 ± 0.116 mg QE/g) était supérieur à celui de l'extrait de *C. dimorpha* (29.01 ± 0.245 mg QE/g). Il n'y avait pas de différences significatives entre les deux plantes en termes de contenus totaux en phénols, flavonoïdes et flavonol ($P > 0.05$), mais une différence significative a été trouvée en termes de leurs contenus phénoliques ($P < 0.05$). Ces valeurs sont plus élevées par rapport à celles rapportées dans la littérature pour d'autres espèces de *Centaurea*. **Albayrak et al. (2017)** ont examiné les concentrations totales en phénols et en flavonoïdes des extractions par macération, soxhlet et ultrasonication de deux espèces de *Centaurea* (*C. aksoyi* et *C. amaena*). Ils ont rapporté que pour les deux espèces étudiées, les quantités les plus élevées de phénols totaux et de flavonoïdes ont été déterminées dans les extraits obtenus par extraction ultrasonique (12.92 mg GAE/g de poids sec, 7.69 ± 0.05 mg QE/g de poids sec et 5.65 ± 0.29 mg GAE/g de poids sec, 7.37 ± 0.02 mg QE/g de poids sec) et la quantité la plus faible a été trouvée par macération (3.62 ± 0.77 mg GAE/g de poids sec, 5.83 ± 0.02 mg QE/g de poids sec). De même, de nombreuses autres études ont rapporté une teneur élevée en phénoliques dans les espèces de *Centaurea* telles que *C. castriferrei* (**Kubik et al., 2022**), *C. cyanus* (**Escher et al., 2018**), *C. kroumirensis* et *C. sicula* (**Dhouibi et al., 2020**). **El-Amier et al. (2016)** ont détecté les contenus totaux en phénols et en flavonoïdes d'un extrait aqueux d'*U. picroides*, collecté en Égypte, à 9.31 et 4.24 mg/g de

poids sec, respectivement. **Koc et al. (2015)** ont rapporté que les contenus totaux en phénols des extraits éthanoliques des fleurs et des feuilles de *C. solstitialis* ont été déterminés à 18,43 et 13,66 mg/L, respectivement. Il a été rapporté des différences dans les contenus phénoliques des espèces végétales appartenant au même genre en fonction de plusieurs facteurs, notamment la température, la teneur en sol et l'altitude (conditions de croissance) (**Giorgi et al., 2010**). Selon ces résultats, l'extrait éthanolique de *C. dimorpha* et de *C. tougourensis*, collecté en Algérie, présentent une activité antioxydante plus importante et des composés bioactifs totaux plus abondants.

III.2.2.5. Capacité antioxydante *in vitro*

Bien que de nombreuses études aient été menées sur l'évaluation de la capacité antioxydante des plantes, aucune méthode unique n'a été déterminée pour refléter pleinement la capacité antioxydante. Par conséquent, il est nécessaire d'interpréter pleinement la capacité antioxydante au moyen de différentes analyses chimiques. De ce point de vue, différentes évaluations des antioxydants (tests DPPH, FRAP, ABTS et phénanthroline) ont été utilisés dans notre étude.

Le potentiel antioxydant des extraits de *C. dimorpha* et de *C. tougourensis* a été évalué et les résultats sont présentés dans le **Tableau 19**.

Tableau 19. Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*

	°IC ₅₀ (µg/mL)		A0.5 (µg/mL)	
	DPPH	ABTS	FRAP	Phenanthroline
<i>C. dimorpha</i>	8.79±0.19	1.92±0.03	2.44±0.06	8.85±0.15
<i>C. tougourensis</i>	27.77±0.60	7.75±0.36	6.87±0.08	35.02±0.29
BHA ^a	15,74 ±0,47	7.54±0.67	°NT	0,93±0,07
BHT ^b	12.99±0.41	1.29±0.30	NT	2,24±0,17
α-tocopherol	13.02±5,17	NT	34.93±2.38	NT

^aButylhydroxyanisole ; ^bButylhydroxytoluène; °Les valeurs IC₅₀ et A0.5 représentent les moyennes ±SD de trois mesures parallèles (p<0.05); dNon testé; *Les valeurs ont été exprimées en Moyennes±SD de trois mesures parallèles.

Les résultats de l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits de *C. dimorpha* et de *C. tougourensis* sont présentés dans le Tableau 19. Il existe une différence notable entre les deux plantes en ce qui concerne tous les tests antioxydants effectués (P > 0,05). Néanmoins, les résultats montrent que toutes les propriétés antioxydantes de l'extrait de *C. dimorpha* étaient plus importantes que celles de l'extrait de *C. tougourensis*. Les résultats montrent que l'extrait de *C. dimorpha* a montré une activité plus élevée que les standards BHA et BHT dans les dosages DPPH

et ABTS, avec des valeurs de IC₅₀ de 8.79±0.19 et 1.92±0.03 µg/mL respectivement. En outre, la valeur A0.5 dans le test FRAP pour *C. dimorpha* et *C. tougourensis* (2.44±0.06 et 6.87±0.08 µg/mL, respectivement) était plus élevée que les deux standards α-tocophérol (34,93±2.38 µg/mL) et acide ascorbique (6.77±1.15 µg/mL). Alors que le test avec la phénanthroline a révélé une faible concentration de 8.85±0.15 µg/mL pour *C. dimorpha* et une concentration très faible de 35.02±0.29 µg/mL pour *C. tougourensis* par rapport aux valeurs de référence d'α-tocophérol (1.81±0.10 µg/mL) et d'acide ascorbique (1.29±0.30 µg/mL). En outre, **Bensaad et al. (2021)** ont évalué les propriétés antioxydantes des extraits de n-butanol (nBuOH) et d'acétate d'éthyle (EA) des parties aériennes de *C. tougourensis* pour la première fois en utilisant des tests ABTS, du radical galvinoxyl, de phénanthroline et de pouvoir réducteur. Leurs découvertes ont montré que les deux extraits avaient une forte capacité antioxydante, même si l'extrait de n-butanol était plus actif. Parmi les espèces de *Centaurea* en Algérie, l'extrait méthanolique des parties aériennes de *C. dimorpha* a été étudié pour son potentiel antioxydant in vitro en utilisant le test DPPH, montrant une importante inhibition de 77,01% à 1 mole/L (**Belkassam et al., 2019**). Lorsqu'ils ont étudié d'autres espèces de *Centaurea*, **Marian et al. (2017)** ont observé que le taux d'inhibition du DPPH du *C. cyanus*, découvert en Roumanie, était de 83,42 %. Selon **El-Amier et al. (2016)**, l'activité antioxydante d'*U. Picroides* d'Égypte contre le DPPH était de 4.14% à une concentration de 500 µg mL⁻¹. De plus, des études sur *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. spicata* et *C. ptosimopappa* ont montré un potentiel antioxydant chez les trois espèces, en particulier, l'activité de piégeage du DPPH était plus élevée dans les extraits aqueux de *C. calcitrapa* et *C. spicata*, tandis qu'elle était plus marquée dans l'extrait méthanolique de *C. ptosimopappa*. Cette faculté de capturer a été observée en augmentation avec l'accroissement des doses d'extrait dans toutes les espèces (**Öa et al., 2011**). Les résultats de cette étude ont révélé que la quantité totale de composés phénoliques suivait une tendance parallèle à celle des capacités antioxydantes. Ainsi, la présence élevée de composés phénoliques dans les extraits pourrait être responsable des propriétés antioxydantes observées. Ces conclusions concordaient avec d'autres études précédentes montrant une corrélation significative entre les activités antioxydantes et les niveaux totaux de composés phénoliques (**Ozay et Mammadov, 2017**). En outre, **Davies et al. (1990)** ont constaté que l'extrait de méthanol de *Centaurea pulchella* était le plus antioxydant parmi *C. pulchella*, *C. patula* et *C. tchihatcheffii*, avec *C. pulchella* ayant également les composés phénoliques les plus élevés. Les niveaux d'activité antioxydante étaient en ordre décroissant : *C. pulchella* était le plus élevé, suivi de *C. patula* et enfin de *C. tchihatcheffii*.

Conclusion

En conclusion, cette recherche visait à étudier trois espèces de centaurees pour identifier des substances actives et évaluer la biodiversité de leurs extraits. Pour la première plante, *C. parviflora*, l'extraction des parties aériennes avec différents solvants a donné quatre extraits avec des niveaux variés en composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols. L'extrait méthanolique a montré un bon effet antimicrobien, ce qui en fait un produit présentant un intérêt potentiel pour les industries pharmaceutiques. En outre, on a examiné in vitro l'effet antioxydant des divers extraits en utilisant sept méthodes différentes. L'extrait butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle ont montré la plus grande capacité antioxydante. Il a été observé une relation opposée entre la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits et leur efficacité en tant qu'antioxydant et antimicrobien. Après l'analyse phytochimique, la relation est devenue plus évidente en révélant des composés avec des effets spécialisés. La CCM a vérifié la présence de composés bioactifs comme des flavonoïdes et des polyphénols dans l'extrait brut. De plus, l'analyse LC-MS de l'extrait butanolique de *C. parviflora* a révélé huit composés, comprenant six acides phénoliques et deux flavonoïdes : l'acide quinique, cinq dérivés d'acide chlorogénique, la rutine et la quercétine-3-O-glucoside. Cette enquête préliminaire révèle que les extraits de *C. parviflora* présentent une bonne activité biopharmaceutique. L'extrait butanolique présente un potentiel intéressant pour des applications pharmaceutiques/nutraceutiques. La seconde partie de cette recherche vise à analyser la composition phénolique des extraits méthanoliques de *C. dimorpha* et *C. tougourensis*, en quantifiant les composés phénoliques par LC-MS/MS et en mesurant le contenu total en phénols, flavonoïdes et flavonols, ainsi que leurs effets antioxydants potentiels. Nos résultats ont révélé que les deux extraits contenaient une gamme de composés, avec *C. dimorpha* présentant 16 composés et *C. tougourensis* en contenant 10. Notamment, l'acide quinique a été trouvé en plus grande quantité dans les deux extraits selon l'analyse par LC-MS/MS, l'extrait de *C. dimorpha* se révélant particulièrement riche en composés phénoliques. De plus, les deux extraits ont démontré un potentiel antioxydant prometteur à travers divers dosages, *C. dimorpha* affichant des teneurs plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes totaux, tandis que l'extrait de *C. tougourensis* montrait une richesse en flavonols. Ces résultats suggèrent que *C. dimorpha* et *C. tougourensis* pourraient servir de sources originales et alternatives d'antioxydants naturels. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces activités biologiques potentielles, et les futures recherches devraient viser à élucider les substances spécifiques responsables des effets antioxydants observés dans les extraits. De plus, des enquêtes in vivo complètes pourraient aider au développement de nouvelles formulations de médicaments ou d'additifs alimentaires.

Référence bibliographique

1. Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
2. Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Afolayan, A.J. and Masika, P.J., 2008. Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adeniagummifera*. *BMC complement. Altern. Med.*, 8:54.
3. Aissani, F., Grara, N., Bensouici, C., Bousbia, A., Ayed, H., Idris, M. H. M., & Teh, L. K. (2022). Algerian *Sonchus oleraceus* L.: A comparison of different extraction solvent on phytochemical composition, antioxidant properties and anti-cholinesterase activity. *Advances in Traditional Medicine*, 1-12.
4. Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K. and Tillequin, F., 2007. Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(3), 319-320.
5. Ali, Ş. E. N. (2023). Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Five *Centaurea* Species. *European Journal of Biology*, 82(2), 311-316.
6. Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D.G.; Lightfoot, D.A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 2017, 6, 42.
7. Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Al-Mahasneh, M. A., Almajwal, A., Gammoh, S., ... & Alli, I. (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food chemistry*, 218, 99-106.
8. Alves, M. F., Scotti, L., Da Costa, F. B., & Scotti, M. T. (2018). Chemotaxonomic Study of Sesquiterpene Lactones of Asteraceae: Classical and Modern Methods. *Sesquiterpene Lactones: Advances in their Chemistry and Biological Aspects*, 31-45.
9. Amorim, M. H. R., Gil da Costa, R. M., Lopes, C., & Bastos, M. M. (2013). Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical reviews in toxicology*, 43(7), 559-579.
10. Aoyama, M. (1992). Accumulated organic matter and its nitrogen mineralization in soil particle size fractions with long-term application of farmyard manure or compost.
11. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970- 7981.
12. Arfaoui, L. (2021). Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. *Molecules*, 26(10), 2959.
13. Asadipour, A.; Mehrabani, M.; Najafi, M.L. Volatile oil composition of *Centaurea aucheri* (DC.) Wagenitz. *Daru J. Pharm. Sci.* 2005, 13, 160–164. [Google Scholar]

-
14. Askari, F., Sefidkon, F., & Mirza, M. (2023). Composition of the *Centaurea hyracanica* Bornm. essential oils in different parts of Iran. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 4423-4431.
 15. Aslam, M. S., Ahmad, M. S., & Mamat, A. S. (2016). Phytochemical evaluation of polyherbal formulation of *Clinacanthus nutans* and *Elephantopus scaber* to identify flavonoids. *Pharmacognosy Journal*, 8(6).
 16. Ayad R, Akkal S. (2019). Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. *Studies in Natural Products Chemistry*. 63(29): 357-414.
 17. Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine.p35-39, 40, 47.
 18. Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). Lignans: chemical, biological and clinical properties. Cambridge university press.
 19. Azadi, B., & Mojab, F. (2017). Volatile Components of *Centaurea imperialis* Hausskn. ex Bornm. Flowering Aerial Parts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(1), 259-263.
 20. Babiaka, S.B.; Nia, R.; Abuga, K.O.; Mbah, J.A.; Vincent de Paul, N.N.; Paper, D.H.; Ntie-Kang, F. Antioxidant potential of flavonoid glycosides from *Manniophyton fulvum* Müll.(Euphorbiaceae): Identification and molecular modeling. *Sci. Afr.* 2020,8, e00423. [CrossRef].
 21. Badalamenti, N., Fontana, G., Bruno, M., & Ilardi, V. (2023). *Centaurea polyacantha* and *C. maroccana*: the chemical composition of the aerial parts essential oils of these *Centaurea* species (Asteraceae) collected in Morocco. *Natural Product Research*, 1-10.
 22. Bahmani, F., Esmaeili, S., Bashash, D., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P., & Gharehbaghian, A. (2018). *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 598-607.
 23. Bahri, M., Boukalkoul, N., & Zellagui, A. (2020). *Centaurea melitensis* L.
 24. Bancheva, S., Badalamenti, N., & Bruno, M. (2023). The essential oil composition of the endemic plant species *Centaurea vandasii* and chemotaxonomy of section *Phalolepis* (Asteraceae). *Natural Product Research*, 37(7), 1122-1129.
 25. Barba-Ostria, C., Carrera-Pacheco, S. E., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Mayorga-Ramos, A., Rodríguez-Pólit, C., ... & Guamán, L. P. (2022). Evaluation of biological activity of natural compounds: Current trends and methods. *Molecules*, 27(14), 4490.
 26. Battandier JA. (1989). Flore de l'Algerie (Dicotyledones). Alger, Algeria.
 27. Belkacem, S., Belbache, H., Boubekri, C., Mosset, P., Rached-Mosbah, O., Marchioni, E., ... & Benayache, F. (2014). Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 1275-1279.
 28. Belkassam, A., Zellagui, A., Gherraf, N., Flamini, G., Cioni, P., Rebbas, Kh., Smaili, T. (2019). Assessment of antioxidant effect of the essential oil and methanol extract of *Centaurea dimorpha* Viv. aerial parts from Algeria. *Acta Scientifica Naturalis*, 6(1), 54-62
 29. Benaissa, O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine.63p
 30. Benayache, F. (2014). Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 1275-127

-
31. Bendif, H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae. *Ajuga iva*, 4-67.
 32. Bensaad, M. S. (2021)a. HPLC-DAD phenolics screening and in vitro investigation of haemostatic, antidiabetic, antioxidant and photoprotective properties of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *Herba Polonica*, 67(4), 16–31.
 33. Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Bensouici, C., & Haba, H. (2021). In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *J. Pharm. Pharmacogn. Res*, 9(6), 790-802.
 34. Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Kahoul, M. A., & Benhoula, M. (2021). Evidence of anti-inflammatory and anti-ulcer properties of aerial parts of *Centaurea tougourensis* Boiss. and Reut. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 20(8), 1647-1654.
 35. Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Kahoul, M. A., Sami, R., Al Masoudi, L. M., ... & Benajiba, N. (2022). Chemical profile by gas chromatography/mass spectrometry of ethyl acetate and N-butanol extracts of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 16(1), 140-149.
 36. Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Melakhessou, M. A., Sami, R., Al-Mushhin, A. A., ... & Al-Masoudi, L. M. (2022). In silico investigation and BSA denaturation inhibitory activity of ethyl acetate and N-butanol extracts of *Centaurea tougourensis* Boiss. and Reut.
 37. Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Saidi, A., Melakhsou, M. A., Nouicer, F., ... & Kadrine, N. (2021). In vivo investigation of antidiabetic, hepatoprotective, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *J. Physiol. Pharmacol*, 72, 439-449.
 38. Berrin, O., Ilhan, G., Taner, K., Erdem, Y., (2007), antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L., *Microbiol. Res*, 1-8.
 39. Bibi, H., Iqbal, J., Abbasi, B. A., Kanwal, S., Tavafoghi, M., Ahmed, M. Z., & Mahmood, T. (2024). Evaluation and chemical profiling of different *Centaurea iberica* extracts and investigation of different in vitro biological activities. *Journal of King Saud University-Science*, 36(1), 102992.
 40. Bicha S, Amrani A, Benaissa O, León F, Zama D, Brouard I, Benayache S, Bentamene A, Benayache F. A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L. *Der Pharmacia Lettre*, 2013; 5(6): 24-30.
 41. Boğa, M., Alkan, H., Ertaş, A., Oral, E. V., Yılmaz, M. A., Yeşil, Y., ... & Kolak, U. (2016). Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9), 1865-1875.
 42. Bohm, B. A., & Stuessy, T. F. (2001). *Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)*. Springer Science & Business Media.
 43. Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro spécial, 79-82.

-
44. Bonnier., 1934. Flore complete de France, Suisse et Belgique. Edition 10. p-118.
 45. Booth, D.B., J.R. Karr, S. Schauman, C.P. Konrad, S.A. Morley, M.G. Larson, and S.J. Burges, (2004). Reviving urban streams: land use, hydrology, biology, and human behavior. Journal of the American Water Resource Association, October 1351-1364 55.
 46. Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. Current medicinal chemistry, 12(8), 887-916.
 47. Bouafia, M., Colak, N., Ayaz, F. A., Gourine, N., & Yousfi, M. (2023). The chemical profile and seasonal variation of the composition of the phenolic acids in different plant parts of *Centaurea* sp. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 236, 115686.
 48. Boubekri ; Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine, 2005.
 49. Bougandoura, N. Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja Calamintha Ssp Nepeta* (nabta) et *Ajugaiwa L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie; Mémoire du Master en biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen: Tlemcen, Algeria, 2011; p. 52.
 50. Bouratoua, A.; Khalfallah, A.; Bensouici, C.; Kabouche, Z.; Alabdul Magid, A.; Harakat, D.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Kabouche, A. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. Nat. Prod. Res. 2017, 32, 1873–1880
 51. Bremer K., Gordon P., Dewolf JR. (1994). Asteraceae cladistics and classification, Portland,
 52. Bremer, K., Jansen, R. K., Karis, P. O., Källersjö, M., Keeley, S. C., Kim, K. J., ... & Wallace, R. S. (1992). A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. Nordic Journal of Botany, 12(2), 141-148.
 53. Bross-Walch, N., Kühn, T., Moskau, D., & Zerbe, O. (2005). Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. Chemistry & biodiversity, 2(2), 147-177.
 54. Bruneton J, (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4ème Ed.), p.1268.
 55. Bui, N.T.; Pham, T.L.T.; Nguyen, K.T.; Le, P.H.; Kim, K.H. Effect of extraction solvent on total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity of *Avicennia officinalis*. Res. Appl. Chem. 2021, 12, 2678–2690. [Google Scholar].
 56. Carev, I., Gelemanović, A., Glumac, M., Tutek, K., Dželalija, M., Paiardini, A., & Prosseda, G. (2023). *Centaurea triumfettii* essential oil chemical composition, comparative analysis, and antimicrobial activity of selected compounds. Scientific Reports, 13(1), 7475.
 57. Carev, I., Ruščić, M., Glumac, M., Politeo, O., & Siljak-Yakovlev, S. (2023). Phytochemical and cytogenetic study of two *Centaurea* species from Croatia: the particular case of diploid and tetraploid *C. salonitana*. Chemistry & Biodiversity, 20(5), e202300092.
 58. Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández E. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. Food chemistry. 113(4): 859–871.
 59. Cho KS, Lim YR, Lee K, Lee J, Lee JH, Lee IS. (2017). Terpenes from Forests and Human Health. Toxicological research. 33(2): 97-106.
 60. Chuclá, M.T.; Lamela, M.; Gato, A.; Cadavid, I. *Centaurea corcubionensis*: A study of its hypoglycemic activity in rats. Planta Med. 1988, 54, 107–109. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
 61. Cowan, M.M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol Re, 12 (4): 564- 582.
 62. Csupor, D.; Peták, Z.; Hohmann, J. Medicinal perspective of Hungarian *Centaurea* species in the light of scientific evidence. Acta Pharm. Hung. 2011, 81, 63–75. [Google Scholar]

-
63. D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, 17, 611-625.
 64. Da O, Coulibaly MT, Ouédraogo J, Yaro B, Yerbanga R, Kini F, Koama B, Dakuyo Z, Nikiema J, Ouédraogo G. 2015. Phytochemical screening of Saye, a traditional herbal remedy for malaria. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(6): 2940-2946. DOI: 10.4314/ijbcs.v9i6.33
 65. Da Silva, A. C. N., do Nascimento, R. M. C., do Nascimento Rodrigues, D. C., Ferreira, P. M. P., Pessoa, C., Lima, D. J. B., ... & do Nascimento, A. M. (2019). In vitro activity evaluation of seven Brazilian Asteraceae against cancer cells and *Leishmania amazonensis*. *South African Journal of Botany*, 121, 267-273.
 66. Daayf F. et Lattanzid V. (2008). *Recent Advances in Poly phenol Research 1*. Ed: Wiley-Blackwell. P: 1- 24.
 67. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010, 15, 7313–7352. [Google Scholar].
 68. Dassamiour, S., & Hambaba, L. 2021. Anti-Hyperglycemic activity of *Centaurea Tougourensis*. *International Journal of Human Settlements*. 5. 2.
 69. Dassamiour, S., Bensaad, M. S., Hambaba, L., Haba, H., Nouicer, F., Kadrine, N., ... & Aljahani, A. H. (2022). Wound Healing Capacity of the n-Butanolic Extract of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *Science of Advanced Materials*, 14(3), 430-439.
 70. Dassamiour, S., Bensaad, M. S., Hambaba, L., Melakhessou, M. A., Sami, R., Al-Mushhin, A. A., ... & Al Masoudi, L. M. (2022). In Silico Investigation of Some Compounds from the N-Butanol Extract of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *Crystals*, 12(3), 355.
 71. Davies., N.W., Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases, *Journal of Chromatography*, 1990, 50, 1-24..
 72. De Luna, S. R., & Ramírez-Garza, R. E. SO Serna Saldívar Environmentally friendly methods for flavonoid extraction from plant material: Impact of their operating conditions on yield and antioxidant properties., 2020, DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/6792069>, 6792069.
 73. Dehak K., (2013). Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université KASDI Merbah Ouargla.
 74. Dhouibi N, Manuguerra S, Arena R, Mahdhi A, Messina CM, Santulli A, Dhaouadi H (2020) Screening of antioxidant potentials and bioactive properties of the extracts obtained from two *Centaurea L.* species (*C. kroumirensis* Coss. and *C. sicula L. subsp sicula*). *Appl Sci* 10: 2267.
 75. Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
 76. Dimkić, I.; Petrović, M.; Gavrilović, M.; Gašić, U.; Ristivojević, P.; Stanković, S.; Janačković, P. New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: Phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express* 2020, 10, 1–21. [Google Scholar] [CrossRef]
 77. Dittrich, M, Heywood VH, Harborne JB, Turner BL. (1977). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. 7th Edition, vol 2. Academic Press, London.
 78. Djeddi, S., Argyropoulou, C., & Skaltsa, H. (2008). Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. *Biochemical systematics and ecology*, 36(5-6), 336-339.
 79. Djeridane, A; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants fractions containing phenolic compounds. *Food Chem.*,2006, 97, 654-660.

-
80. Do, Q.D.; Angkawijaya, A.E.; Tran-Nguyen, P.L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F.E.; Ismadji, S.; Ju, Y.H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* 2014, 22, 296–302. [Google Scholar].
 81. Dongock DN, Bonyo AL, Mapongmestem PM, Bayegone E. 2018. Etude ethnobotanique et phytochimique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires à Moundou (Tchad). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(1): 203-216. DOI: 10.4314/ijbcs.v12i1.16
 82. Dural, H.; Bagci, Y.; Ertugrul, K.; Demirelma, H.; Flamini, G.; Cioni, P.L.; Morelli, I. Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. *Biochem. Syst. Ecol.* 2003, 31, 1417–1425. [Google Scholar] [CrossRef]
 83. Egan, D., O'kenedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., & Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 22(5), 503-529.
 84. El-Amier YA, Al-hadithy ON, Abdullah TJ. Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts obtained from aerial parts of *Urospermum picroides* (L.) F.W. from Egypt. *J Adv Chem Sci.* 2016 Jun;2(3):299-301.
 85. Erdogan, T.; Tastan, P.; Çakılcıoğlu, U.; Demirci, B.; Baser, K.H.C.; Kivçak, B.; Fafal, T.; Sümer, B.; Özçınar, Ö.; Uğur, Ç.; et al. Essential Oil Composition of Three *Centaurea* Species from Turkey: *Centaurea aggregata* Fisch & Mey. ex. DC. subsp *aggregata*, *C. balsamita* Lam. and *C. behen* L. *Rec. Nat. Prod.* 2017, 11, 69–73. [Google Scholar]
 86. Erel, S.B.; Demirci, B.; Demir, S.; Karaalp, C.; HüsnuCan Baser, K. Composition of the essential oils of *Centaurea aphrodisea*, *C. polyclada*, *C. athoa*, *C. hyalolepis* and *C. iberica*. *J. Essent. Oil Res.* 2013, 25, 79–84. [Google Scholar] [CrossRef]
 87. Ertugrul, K.; Dura, H.; Tugay, O.; Flamini, G.; Cioni, P.L.; Morelli, I. Essential oils from flowers of *Centaurea kotschyi* var. *kotschyi* and *C. kotschyi* var. *decumbens* from Turkey. *Flavour Fragr. J.* 2003, 18, 95–97. [Google Scholar] [CrossRef]
 88. Escarpa, A.; González, M.C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J. Chromatogr. A* 1998, 823, 331–337. [CrossRef]
 89. Escher, G. B., Santos, J. S., Rosso, N. D., Marques, M. B., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., ... & Granato, D. (2018). Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. *Food and chemical toxicology*, 118, 439-453.
 90. Esmaeili, A.; Rustaiyan, A.; Nadimi, M.; Masoudi, S.; Tadayon, F.; Sedaghat, S.; Ebrahimpur, N.; Hajyzadeh, E. Volatile constituents of *Centaurea depressa* MB and *Carduus pycnocephalus* L. two compositae herbs growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2005, 17, 539–541. [Google Scholar] [CrossRef]
 91. Fernando, L. Purification of fresh cassava root polyphenols by solidphase extraction with Amberlite XAD-8 resin. *J. Chromatogr. A* 2009, 657, 445–449
 92. Fettah, A. (2019). Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce *Thymoides* de la région Beni Souik, Biskra (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).p7.
 93. Figueredo G., (2007). Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, École Doctorale Des Sciences Fondamentales. P13.

-
94. Flamini, G.; Ertuğrul, K.; Cioni, P.L.; Morelli, I.; Dural, H.; Bagci, Y. Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2002, 30, 953–959. [Google Scholar] [CrossRef]
 95. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Maggio, A., Rosselli, S., & Bruno, M. (2012). Flavonoids in Subtribe *Centaureinae* (Cass.) Dumort. (Tribe *Cardueae*, *Asteraceae*): Distribution and ¹³C-NMR Spectral Data. *Chemistry and Biodiversity*, 9(10), 2096.
 96. Formisano, C.; Rigano, D.; Senatore, F.; Celik, S.; Bruno, M.; Rosselli, S. Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities. *Nat. Prod. Res.* 2008, 22, 833–839. [Google Scholar] [CrossRef]
 97. Gao, M.; Liu, C.Z. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 21, 1461–1463. [Google Scholar]
 98. Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffarian, V., & Ilarslan, R. (2000). The natural delimitation of *Centaurea* (*Asteraceae*: *Cardueae*): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. *Plant systematics and evolution*, 223, 185-199.
 99. Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
 100. Giorgi A, Madeo M, Speranza G, Cocucci M. Influence of Environmental Factors on Composition of Phenolic Antioxidants of *Achillea collina* Becker ex Rchb. *Nat Prod Res.* 2010 Oct;24(16):1546-59.
 101. Grafakou, M. E., Djeddi, S., Tarek, H., & Skaltsa, H. (2018). Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Biochemical Systematics and Ecology*, 76, 15-22.
 102. Grgić, J.; Šelo, G.; Planinić, M.; Tišma, M.; Bucić-Kojić, A. Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *J. Antioxid.* 2020, 9, 923. [Google Scholar].
 103. Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M, Scherer R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules.* 24(13): 2471.
 104. Gurbuz I, Yesilada E. Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jun;112(2):284-91.
 105. Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products.* 59(2): 205-215.
 106. Haworth RD. *Ann Rep Prog Chem*1936; 33: 266.
 107. Heinrich, M., Jalil, B., Abdel-Tawab, M., Echeverria, J., Kulić, Ž., McGaw, L. J., ... & Wang, J. B. (2022). Best practice in the chemical characterisation of extracts used in pharmacological and toxicological research—the ConPhyMP—Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 953205.
 108. Hellwig, F. H. (2004). *Centaureinae* (*Asteraceae*) in the Mediterranean—history of ecogeographical radiation. *Plant Systematics and Evolution*, 246(3-4), 137-162.

-
109. Hernandez-Ochoa L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combine «Solvant/ Actif». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse.
 110. Heywood, V. H. (Ed.). (1978). Flowering plants of the world (pp. 336-pp).
 111. Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635-642.
 112. Hussain G, Huang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Maqbool J, Razzaq A, Aziz N, Makhdoom EUH, Konuk M, Sun T. (2019). Putative Roles of Plant-Derived Tannins in Neurodegenerative and Neuropsychiatry Disorders: An Updated Review. *Molecules*. 24(12): 2213.
 113. Institut Européen des Substances Végétales (page consultée le 15/10/2008). Phytothérapie clinique individualisée : pour une médecine des substances végétales.
 114. Iranshahi, M. E. H. R. D. A. D., Askari, M., Sahebkar, A., & Hadjipavlou, L. D. (2009). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin.
 115. Ismail, S., Masi, M., Gaglione, R., Arciello, A., & Cimmino, A. (2024). Antimicrobial and antibiofilm activity of specialized metabolites isolated from *Centaurea hyalolepis*. *PeerJ*, 12, e16973.
 116. IUPAC, T. (2005). Nomenclature of Organic Chemistry. *Chemické listy*, 99(3).
 117. Jaakola L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science*. 18(9): 477-483.
 118. Jafari-Sales, A.; Mobaiyen, H.; Jafari, B.; Sayyahi, J. Assessment of Antibacterial Effect of Alcoholic Extract of *Centaurea depressa* M.B., *Reseda lutea* L. and *Fumaria asepsala* on Selected Standard Strains in vitro. *Sci. J. Nurs. Midwifery* 2019, 5, 63–73.
 119. Jaiswal, R., Kiprotich, J., & Kuhnert, N. (2011). Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, 72(8), 781-790.
 120. K. Bremer. *Asteraceae cladistics and classification*. Timber Press; Portland, Oregon; 1994; 752 p.
 121. Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., & Benlabed, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3), 129-133.
 122. Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
 123. Karamenderes, C.; Khan, S.; Tekwani, B.L.; Jacob, M.R.; Khan, I.A. Antiprotozoal and Antimicrobial Activities of *Centaurea*. Species Growing in Turkey. *Pharm. Biol.* 2006, 44, 534–539. [CrossRef].
 124. Khammar, A., & Djeddi, S. (2012). Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *Eur J Sci Res*, 84(3), 398-416.
 125. Khanavi, M., Rajabi, A., Behzad, M., Hadjiakhoondi, A., Vatandoost, H., & Abaee, M. R. (2011). Larvicidal activity of *Centaurea bruguierana* ssp. *Belangerana* against *Anopheles stephensi* Larvae. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 829.
 126. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*. 61(1): 1361779.
 127. Kilic, O. Essential oil compounds of three *Centaurea* L. taxa from Turkey and their chemotaxonomy. *J. Med. Plants Res.* 2013, 7, 1344–1350. [Google Scholar]

-
128. Kiokias S, Proestos C, Oreopoulou V. (2020). Phenolic Acids of Plant Origin-A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods*. 9(4): 534.
 129. K1sa, D., Imamoglu, R., Genc, N., Taslimi, P., Kaya, Z., & Taskin-Tok, T. (2023). HPLC analysis, Phytochemical Content, and Biological Effects of *Centaurea kilae* Against Some Metabolic Enzymes: In Vitro and In Silico Studies. *ChemistrySelect*, 8(6), e202204196.
 130. Koc S, Isgor BS, Isgor YG, Shomali Moghaddam, N, Yildirim O. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharm Biol*. 2015 May;53(5):746-51.
 131. Koca, U., Süntar, I. P., Keles, H., Yesilada, E., & Akkol, E. K. (2009). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 551-556.
 132. Koca, U.; Süntar, I.P.; Keles, H.; Yesilada, E.; Akkol, E.K. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *J. Ethnopharmacol*. 2009, 126, 551–556. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
 133. Köse, Y. B., İşcan, G., Göger, F., Akalın, G., Demirci, B., & Başer, K. H. C. (2016). Chemical composition and biological activity of *Centaurea baseri*: new species from Turkey. *Chemistry & biodiversity*, 13(10), 1369-1379.
 134. Koulivand PH, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A. (2013). Lavender and the nervous system. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013: 681304.
 135. Kubik, J., Waszak, Ł., Adamczuk, G., Humeniuk, E., Iwan, M., Adamczuk, K., ... & Józefczyk, A. (2022). Phytochemical analysis and anti-cancer properties of extracts of *Centaurea castriferrei* Borbás & Waisb Genus of *Centaurea* L. *Molecules*, 27(21), 7537.
 136. Kumar N, Goel N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 24: e00370.
 137. Kumar S, Pandey AK. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013: 162750.
 138. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
 139. Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344-352.
 140. Kunchandy, E., & Rao, M. N. A. (1989). Effect of curcumin on hydroxyl radical generation through Fenton reaction. *International journal of pharmaceutics*, 57(2), 173-176.
 141. Labeled, F., Masullo, M., Mirra, V., Nazzaro, F., Benayache, F., Benayache, S., & Piacente, S. (2019). Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 133, 51-55.
 142. Lakhdar L. (2015). Evaluation de l'activite antibacterienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : etude in vitro. Thèse de Doctorat de la faculte de medecine dentaire de rabat, centre d'etudes doctorales des sciences de la vie et de la sante. Rabat, Maroc.
 143. Langenheim JH. (1994). Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of chemical ecology*. 20(6): 1223-1280.
 144. Latif, Z., & Sarker, S. D. (2012). Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC). *Natural products isolation*, 255-274.
 145. Lawrence, G.H.M. *Taxonomy of Vascular Plants*; Rakes Press; Oxford and IBM Publishing Co.: New Delhi, India, 1973.

-
146. Lazari, D.M.; Skaltsa, H.D.; Constantinidis, T. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. *Flavour Fragr. J.* 2000, 15, 7–11. [Google Scholar]
 147. Lazli, A., Beldi, M., Ghouri, L., & Nouri, N. E. H. (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala,- Nord-est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
 148. Le Mao, I., Martin-Pernier, J., Bautista, C., Lacampagne, S., Richard, T., & Da Costa, G. (2021). 1H-NMR Metabolomics as a tool for winemaking monitoring. *Molecules*, 26(22), 6771.
 149. Li, R.P.; Guo, M.L.; Zhang, G.; Xu, X.F.; Li, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 107, 143–150.
 150. Lincoln, T. A. I. Z., & Zeiger, E. D. U. A. R. D. O. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo, 13, 125.
 151. Ling, T., Lang, W. H., Maier, J., Quintana Centurion, M., & Rivas, F. (2019). Cytostatic and cytotoxic natural products against cancer cell models. *Molecules*, 24(10), 2012.
 152. M.S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical," *Nature*, vol. 4617 (181), pp. 1119–1200, 1958.
 153. Mabberley, D. J. (1987). *The plant book*.– Cambridge.
 154. Mammeri, A.; Bendif, H.; Bensouici, C.; Benslama, A.; Rebas, K.; Bouasla, A.; Rebaia, I.; Souilah, N.; Miara, M.D. Total phenolic contents, in vitro antioxidant activity, enzymes inhibition and antiinflammatory effect of the selective extracts from the Algerian *Lavandula multifida*. *ACTA Pharm. Sci.* 2022, 60, 1. [Google Scholar].
 155. Mariadoss, A.V.A.; Park, S.; Saravanakumar, K.; Sathiyaseelan, A.; Wang, M.H. Ethyl acetate fraction of *Helianthus tuberosus* L. induces anti-diabetic, and wound-healing activities in insulin-resistant human liver cancer and mouse fibroblast cells. *J. Antioxid.* 2021, 10, 99. [CrossRef].
 156. Marian, E.; Vicas, L. G.; Tunde, J.; Muresan, M.; Stan, R. L.; Sevastere, B. Z.; Diaconeasa, C.; Ionescu, A.; Hangan, C., Comparative Study on the biologic activity of *Centaurea cyanus* versus, *Calendula officinalis*, *Farmacia*, 2017, 65, 6.
 157. Markham, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*; Academic Press: New York, NY, USA, 1982.
 158. Mawahib, C., Nabila, Z., Nabila, S., Chawki, B., & Salah, A. (2019). LC-MS analysis, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Centaurea papposa* extracts. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 14(4), 159-165.
 159. Mbaihougadobé, S.; Ngakegni-Limbili, A.C.; Gouollaly, T.; Koane, J.N.; Ngaissona, P.; Loumpangou, C.N.; Mahmout, Y.; Ouamba, J.M. Evaluation de l'activité anti-oxydante de trois espèces de plantes utilisées dans le traitement de la goutte au Tchad. *Méd. Tradit. Pharmacop.* 2017, 18, 28–35.
 160. Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., & Aclinou, P. (1997). Guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry*, 45(7), 1449-1451.
 161. Melikoglu G, Ozsoy N, Yilmaz Ozden T, et al. Flavonoids and biological activities of *Centaurea nerimaniae* S. *Kultur. Farmacia.* 2018;66(6):1070-5.
 162. Menezes IA, Barreto CM, Antonioli AR, Santos MR, de Sousa DP. (2010). Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *Journal of biosciences.* 65(9-10): 562-566.

-
163. Merghem, R. (2009). *Eléments de biochimie végétale*. Bahaeddine éditions, 95-121.
 164. Mezache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S., & Benayache, F. (2010). Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chemistry of natural compounds*, 46, 801-802.
 165. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
 166. Milošević Ifantis T, Solujić S, Pavlović-Muratspahić D, Skaltsa H. (2013). Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry*. 94: 159-170.
 167. Mishio, T., Honma, T., & Iwashina, T. (2006). Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. *Biochemical systematics and Ecology*, 34(2), 180-184.
 168. Mukherjee, P. K. (2002). Quality control of herbal drugs: an approach to evaluation of botanicals. *Business horizons*.
 169. Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT—Food Sci. Technol.* 2010, 43, 992–999. [CrossRef]
 170. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
 171. Nacer, A., Bernard, A., Boustie, J., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2006). Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 230-231.
 172. Nacer, A., Merza, J., Kabouche, Z., Rhouati, S., Boustie, J., & Richomme, P. (2012). Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 163-165.
 173. Naeim H, El-Hawiet A, Abdel Rahman RA, Hussein A, El Demellawy MA, Embaby AM. (2020). Antibacterial activity of *Centaurea pumilio* L. root and aerial part extracts against some multidrug resistant bacteria. *BMC complementary medicine and therapies*. 20(1): 79.
 174. Nasr, F.A.; Shahat, A.A.; Alqahtani, A.S.; Ahmed, M.Z.; Qamar, W.; Al-Mishari, A.A.; Almoqbil, A.N. *Centaurea bruguierana* inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest, and induces apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 6043–6051. [Google Scholar] [CrossRef]
 175. Öa, E.-D.; Pekmez, M.B.; Bona, M.C.; Aras-Perk, A.C.; Arda, N., Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Three *Centaurea* Species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptosimopappa* and *C. spicata*, *Free Radicals and Antioxidants*, 2011, 1, (2), 31-36.
 176. Ouedraogo, S., Yoda, J., Traore, T. K., Nitiema, M., Sombie, B. C., Diawara, H. Z., ... & Semde, R. (2021). Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(2), 750-772.
 177. Oussala M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M, (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-Meat Science, Vol. 73; pp 236-244.
 178. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr.* 1986 ;44 :307-15.

-
179. Ozay C, Mammadov R. Screening of some biological activities of *Alyssum fulvescens* var. *fulvescens* known as Ege madwort. *Acta Biol Hung.* 2017 Sep;68(3):310-20.
 180. Özek, T., & Demirci, F. (2012). Isolation of natural products by preparative gas chromatography. *Natural Products Isolation*, 275-300.
 181. Ozenda, P. (1977). *Flore du Sahara*: Editions CNRS.
 182. Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Çelik, S. E., ... & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
 183. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
 184. Pereira, T. M., Franco, D. P., Vitorio, F., & Kummerle, A. E. (2018). Coumarin compounds in medicinal chemistry: some important examples from the last years. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(2), 124-148.
 185. Peters K, Treutler H, Döll S, Kindt ASD, Hankemeier T, Neumann S. (2019). Chemical Diversity and Classification of Secondary Metabolites in Nine Bryophyte Species. *Metabolites*. 9(10): 222.
 186. Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Tzortzakis, N., Sokovic, M., Ciric, A., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Bioactive compounds content and antimicrobial activities of wild edible Asteraceae species of the Mediterranean flora under commercial cultivation conditions. *Food Research International*, 119, 859-868.
 187. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1035–1042. [CrossRef]
 188. Pizzi A. (2019). Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. *Biomolecules*. 9(8): 344.
 189. Polatoglu, K.; Sen, A.; Bulut, G.; Bitis, L.; Gören, N. Essential Oil Composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2014, 17, 1268–1278. [Google Scholar] [CrossRef]
 190. Polatoğlu, K.; Şen, A.; Bulut, G.; Bitiş, L.; Gören, N. Essential Oil Composition of *Centaurea kilaea* Boiss. and *C. cuneifolia* Sm. from Turkey. *Nat. Volatiles Essent. Oils* 2014, 1, 55–59. [Google Scholar]
 191. Ponphaiboon, J., Krongrwa, W., Aung, W. W., Chinatangkul, N., Limmatvapirat, S., & Limmatvapirat, C. (2023). Advances in natural product extraction techniques, electrospun fiber fabrication, and the integration of experimental design: a comprehensive review. *Molecules*, 28(13), 5163.
 192. Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R. (2021). Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ*, 6(1), 293-301.
 193. Quettier-Deleu, C. et al. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35–42.
 194. Quezel, P. and Santa, S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris.
 195. Rakotonanahary, M., (2012). Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28

-
196. Razavi, S.M.; Zahri, S.; Zarrini, G.; Nazemiyeh, H.; Mohammadi, S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2009, 35, 376–378. [CrossRef].
 197. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
 198. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
 199. Reda, E. H., Shakour, Z. T. A., El-Halawany, A. M., El-Kashoury, E. S. A., Shams, K. A., Mohamed, T. A., ... & Hegazy, M. E. F. (2021). Comparative study on the essential oils from five wild Egyptian *Centaurea* species: Effective extraction techniques, antimicrobial activity and in-silico analyses. *Antibiotics*, 10(3), 252.
 200. Reguieg, L. (2011). Using medicinal plants in Algeria. *Am J Food Nutr*, 1(3), 126-127.
 201. Reyhan, A. R. İ. F., Küpeli, E., & Ergun, F. (2004). The biological activity of *Centaurea* L. species. *Gazi University Journal of Science*, 17(4), 149-164.
 202. Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009.
 203. Rosselli, S.; Bruno, M.; Maggio, A.; Raccuglia, R.A.; Bancheva, S.; Senatore, F.; Formisano, C. Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochem. Syst. Ecol.* 2009, 37, 426–431. [Google Scholar]
 204. Sachana, M., & Hargreaves, A. J. (2018). Toxicological testing: in vivo and in vitro models. In *Veterinary Toxicology* (pp. 145-161). Academic Press.
 205. Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118.
 206. Sánchez-Chávez, E., Rodríguez, A., Castro-Castro, A., Pérez-Farrera, M. A., & Sosa, V. (2019). Spatio-temporal evolution of climbing habit in the *Dahlia-Hidalgoa* group (Coreopsidae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 166-176.
 207. Sarembaud, A.; Poitevin, B. *Médicament à usage homéopathique*; Ed. Masson: Paris, France, 1996; p. 256.
 208. Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11
 209. Sato, Y.; Itagaki, S.; Kurokawa, T.; Ogura, J.; Kobayashi, M.; Hirano, T.; Sugawara, M.; Iseki, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 2011, 403, 136–138. [CrossRef].
 210. Schauenberg et Paris., 2006. « *Centaurea maroccana* Ball. Endémique d’Afrique du Nord ».
 211. Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., ... & Benayache, F. (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*, 2(3), 114-118.
 212. Senatore, F.; Rigano, D.; De Fusco, R.; Bruno, M. Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L.(Asteraceae), two species growing wild in Sicily. *Flavour Fragr. J.* 2003, 2003, 248–251. [Google Scholar] [CrossRef]

-
213. Sgadari, F., Vaglica, A., Porrello, A., Geraci, A., Schicchi, R., & Bruno, M. (2024). The chemical composition of the aerial parts essential oils of *Centaurea erycina* (Asteraceae), an endemic species of Sicily (Italy). *Natural Product Research*, 1-5.
 214. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
 215. Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S., & Iranshahi, M. (2018). Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. *Natural product research*, 32(12), 1436-1440.
 216. Sharifi-Rad, M.; Epifano, F.; Fiorito, S.; Álvarez-Suarez, J.M. Phytochemical analysis and biological investigation of *Nepeta juncea* Benth. different extracts. *Plants* 2020, 9, 646.[CrossRef].
 217. Sharonova, N., Nikitin, E., Terenzhev, D., Lyubina, A., Amerhanova, S., Bushmeleva, K., ... & Sinyashin, K. (2021). Comparative assessment of the phytochemical composition and biological activity of extracts of flowering plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. *Plants*, 10(7), 1279.
 218. Shen Y, Chen BL, Zhang QX, Zheng YZ, Fu Q. (2019). Traditional uses, secondary metabolites, and pharmacology of *Celastrus* species - a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 241: 111934.
 219. Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. In *Methods in enzymology* (Vol. 335, pp. 157-166). Academic Press.
 220. Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., ... & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400.
 221. Smyth, T., Ramachandran, V. N., et Smyth, W. F., (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(5); pp: 421-426.
 222. Sokovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., & Skaltsa, H. (2017). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L. (Asteraceae). *Current pharmaceutical design*, 23(19), 2767-2786.
 223. Souza MT, Almeida JR, Araujo AA, Duarte MC, Gelain DP, Moreira JC, dos Santos MR, Quintans-Júnior LJ. (2014). Structure–activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile – a systematic review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 115(3): 244-256.
 224. Susanna, A, Garcia-Jacas, N. (2007). in: K. Kubitzki, *The Families and Genera of Vascular Plants*. 2nd Edition, vol. VIII, Springer, Berlin. 8: 123–146.
 225. Szydłowskaczerniak, A.; Dianoczki, C.; Recseg, K.; Karlovits, G.; Szlyk, E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008, 76, 899–905
 226. Tadeusz Aniszewski, (2007). *Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier

-
227. Teipel, J. C., Hausler, T., Sommerfeld, K., Scharinger, A., Walch, S. G., Lachenmeier, D. W., & Kuballa, T. (2020). Application of ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as spirit drinks screener for quality and authenticity control. *Foods*, 9(10), 1355.
228. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international*, 2013.
229. Teponno, R. B., Kusari, S., & Spittler, M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural product reports*, 33(9), 1044-1092.
230. Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food. Agric.* 2001, 81, 853–876. [CrossRef]
231. Topçu, G.; Ay, A.; Bilici, A.; Sarıkürkcü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food.Chem.* 2007, 103, 816–822.
232. Toribio, M.S., Oriani, D.S., Skliar, M.I., (2004), actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis*, *Ars. Pharm*, 45(4), 335-341.
233. Trendafilova A, Jadranin M, Gorgorov R, Stanilova M. (2015). Bioactive Compounds in Wild, In vitro Obtained, Ex vitro Adapted, and Acclimated Plants of *Centaurea davidovii* (Asteraceae). *Natural product communications*. 10(6): 839-841.
234. Tshepelevitsh, S., Hernits, K., Jenčo, J., Hawkins, J. M., Muteki, K., Solich, P., & Leito, I. (2017). Systematic optimization of liquid–liquid extraction for isolation of unidentified components. *ACS omega*, 2(11), 7772-7776.
235. Tüfekçi, A. R., Demirtaş, İ., Akşit, H., Arslan, Ş., Kocabıyık, K., Zeybek, S., ... & Köksal, E. (2024). Two new compounds from endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz and their cytotoxic activities. *Chemical Biology & Drug Design*, 103(1), e14409.
236. Upadhyay, R.; Mohan Rao, L.J. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Crit.Rev. Food. Sci. Nutr.* 2013, 53, 968–984. [CrossRef].
237. Uttara, B.; Singh, A.V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 2009, 7, 65–74. [Google Scholar].
238. Uysal S, Ceylan R, Zengin G, Aktumsek A, Zengin N, Guler GO. Phytochemical characterization of an endemic plant used as foodstuff in Turkey: *Centaurea urvillei* subsp. *stepposa* and its antioxidant properties. *Int Res J Pharmacy.* 2014 Aug;5(8):646-52.
239. Valanciene, E.; Malys, N. Advances in Production of Hydroxycinnamoyl-Quinic Acids: From Natural Sources to Biotechnology. *Antioxidants* 2022, 11, 2427.
240. Vergallo, C., Panzarini, E., & Dini, L. (2019). High performance liquid chromatographic profiling of antioxidant and antidiabetic flavonoids purified from *Azadirachta indica* (neem) leaf ethanolic extract. *Pure and Applied Chemistry*, 91(10), 1631-1640.
241. Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Booren, A.M.; Gray, J.I. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J.Agric. Food Chem.* 1999, 47, 840–844. [CrossRef]
242. Wang, J., Fang, X., Ge, L., Cao, F., Zhao, L., Wang, Z., & Xiao, W. (2018). Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS One*, 13(5), e0197563.
243. Wang, Z.; Ding, Z.; Li, Z.; Ding, Y.; Jiang, F.; Liu, J. Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential antibiofilm agent in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients. *Microb. Pathog.* 2021, 159, 105121.[CrossRef].
244. Wichtl M., Anton R. *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 2ème édition, Ed. TEC & DOC, 2003.
245. Wilson, I. D., & Poole, C. F. (2023). Planar chromatography—Current practice and future prospects. *Journal of Chromatography B*, 1214, 123553.
-

-
246. Wrona, O., Rafińska, K., Walczak-Skierska, J., Możeński, C., & Buszewski, B. (2019). Extraction and determination of polar bioactive compounds from alfalfa (*Medicago sativa* L.) using supercritical techniques. *Molecules*, 24(24), 4608.
247. X. Cong-Cong, W. Bing, P. Yi-Qiong, T. Jian-Sheng, Z. Tong, *Chin. J. Nat. Med.* 15 (2017) 0721–0731.
248. Xi, Y.; Jiao, W.; Cao, J.; Jiang, W. Effects of chlorogenic acid on capacity of free radicals scavenging and proteomic changes in postharvest fruit of nectarine. *PLoS ONE* 2017, 2, e0182494. [CrossRef].
249. Yang W, Chen X, Li Y, Guo S, Wang Z, Yu X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3): 1934578X2090355.
250. Yaylı, N.; Yaşar, A.; Kahriman, N.; Albay, C.; Aşamaz, Y.; Coskuncelebi, K.; Alpay Karaoğlu, Ş. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*. *Pharm. Biol.* 2009, 47, 7–12. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
251. Yeşilada, E. (2002). Biodiversity in Turkish folk medicine. In *Biodiversity: biomolecular aspects of biodiversity and innovative utilization* (pp. 119-135). Boston, MA: Springer US.
252. Yeung, W. F., Chung, K. F., Poon, M. M. K., Ho, F. Y. Y., Zhang, S. P., Zhang, Z. J., ... & Wong, V. T. (2012). Chinese herbal medicine for insomnia: a systematic review of randomized controlled trials. *Sleep medicine reviews*, 16(6), 497-507.
253. Yırtıcı, Ü., Ergene, A., Adem, Ş., Atalar, M. N., Eyüpoğlu, V., Rawat, R., ... & Hamzaoğlu, E. (2023). *Centaurea mersinensis* phytochemical composition and multi-dimensional bioactivity properties supported by molecular modeling. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-17.
254. Zaak, H.; Bendif, H.; Rebbas, K.; Aouati, L.; Abdenmour, A.; Hamza, A.; Wandjou, J.G.N.; Maggi, F. Essential oil composition and biological activities of *Ononis alba* Poir (Fabaceae). *Nat. Prod. Res.* 2022, 36, 2418–2423. [Google Scholar].
255. Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, Stévigny C, Duez P, Benayache F. (2016). Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 9(6): 554-561
256. Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stévigny, C., Duez, P., & Benayache, F. (2016). Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(6), 554-561.
257. Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R, et al. Identification of phenolic components via LC-MS analysis and biological activities of two *Centaurea* species: *C. drabifolia* subsp. *drabifolia* and *C. lycopifolia*. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Feb;149:436-41.
258. Zengin, G., Bulut, G., Mollica, A., Picot-Allain, C. M. N., & Mahomoodally, M. F. (2018). In vitro and in silico evaluation of *Centaurea saligna* (K. Koch) Wagenitz—An endemic folk medicinal plant. *Computational biology and chemistry*, 73, 120-126.
259. Zenk, M. H., & Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2757-2772.
260. Zhang, L.Y.; Cosma, G.; Gardner, H.; Vallyathan, V.; Castranova, V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol. Cell.Biochem.* 2003, 247, 205–210. [CrossRef]
261. Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 1-26.
262. Zhao, J., Zhang, S., You, S., Liu, T., Xu, F., Ji, T., & Gu, Z. (2017). Hepatoprotective effects of nicotiflorin from *nymphaea candida* against concanavalin a-induced and d-galactosamine-induced liver injury in mice. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 587.

-
263. Zink, D.L. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerging Infect Dis.* 1997, 3, 467–469. [CrossRef].
264. Zorrilla, J. G., Innangi, M., Cala Peralta, A., Soriano, G., Russo, M. T., Masi, M., ... & Cimmino, A. (2024). Sesquiterpene Lactones Isolated from *Centaurea cineraria* L. subsp. *cineraria* Inhibit the Radicle Growth of Broomrape Weeds. *Plants*, 13(2), 178.

ANNEXES

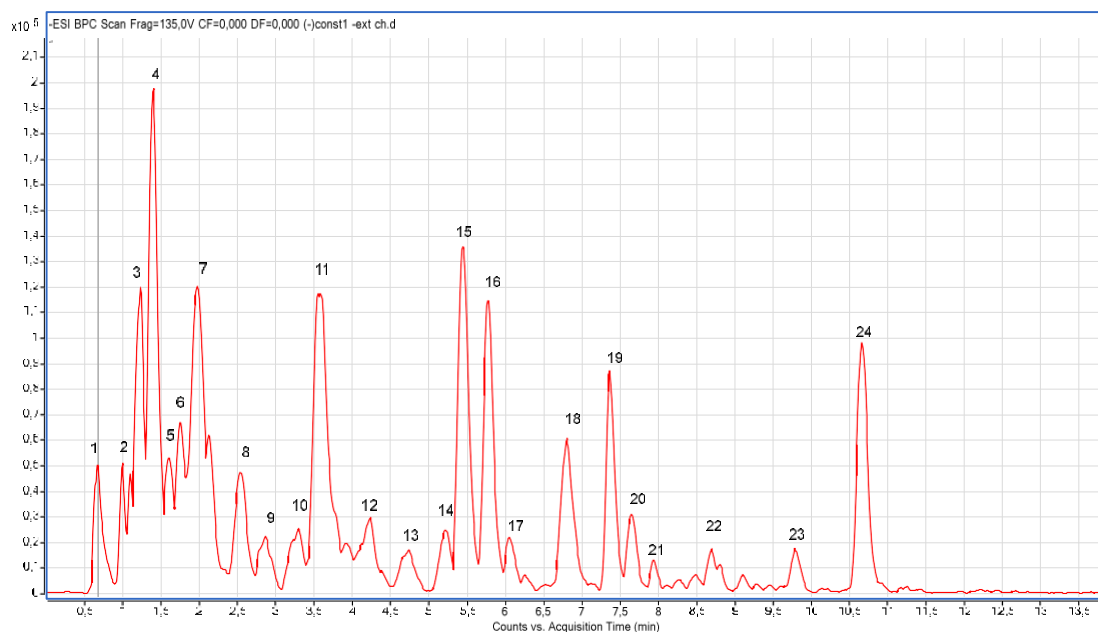


Figure 1. Chromatogramme de l'ionisation négative de l'extrait butanolique de *C. parviflora*.

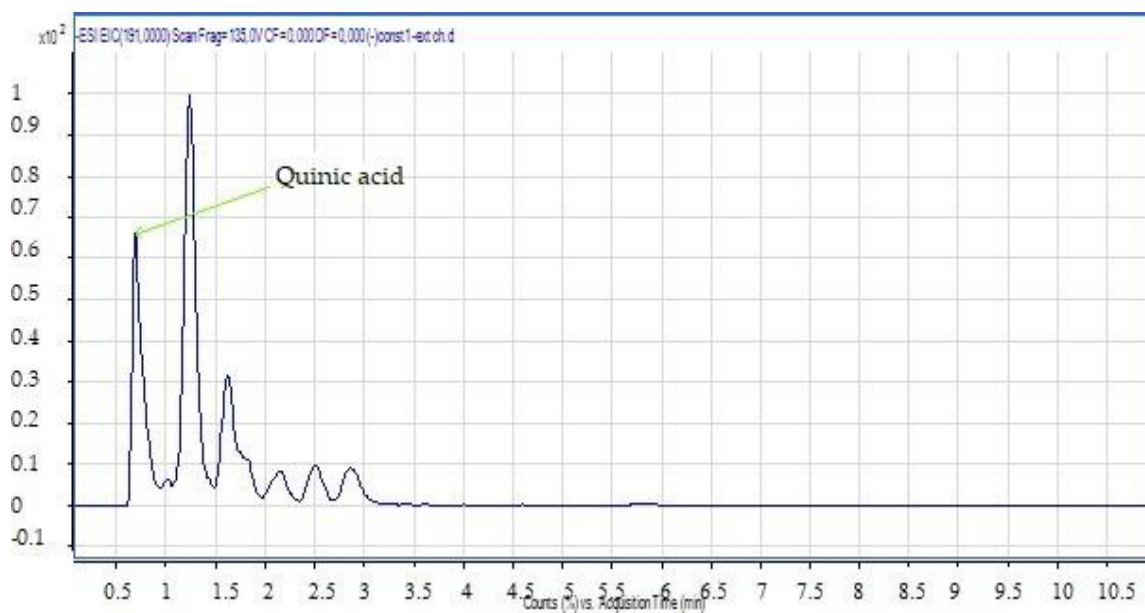


Figure 2. Chromatogramme de l'acide quinique (composé 1).

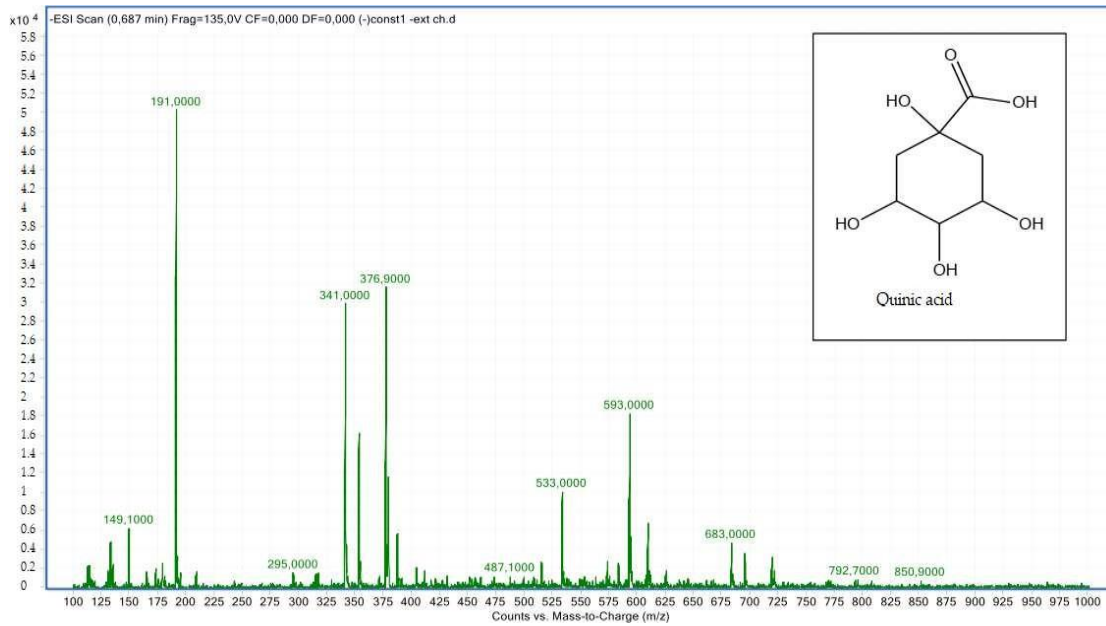


Figure 3. Spectre de masse de l'acide quinique (composé 1).

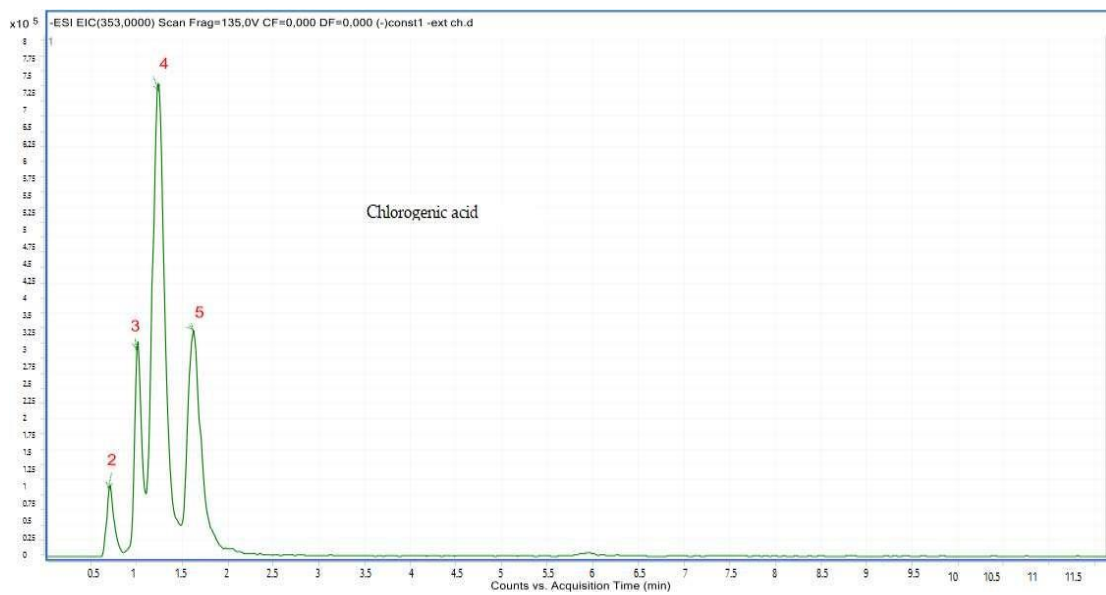


Figure 4. Chromatogramme de l'acide chlorogénique (composés 2, 3, 4 et 5).

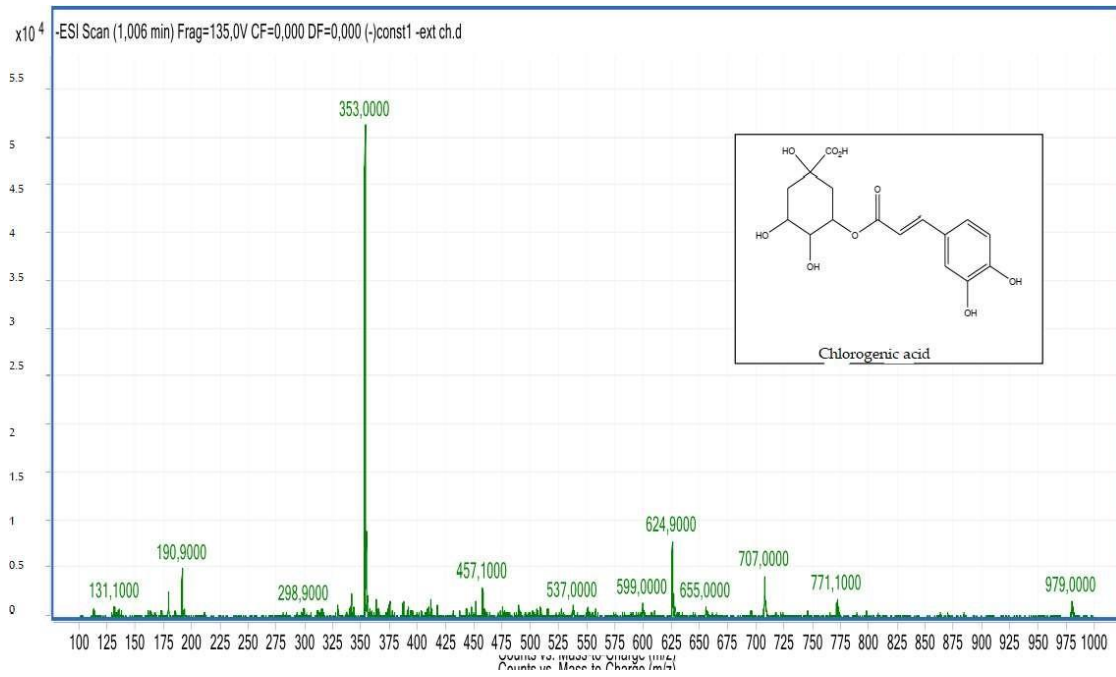


Figure 5. Spectre de masse de l'acide chlorogénique (composés 2, 3, 4 et 5).

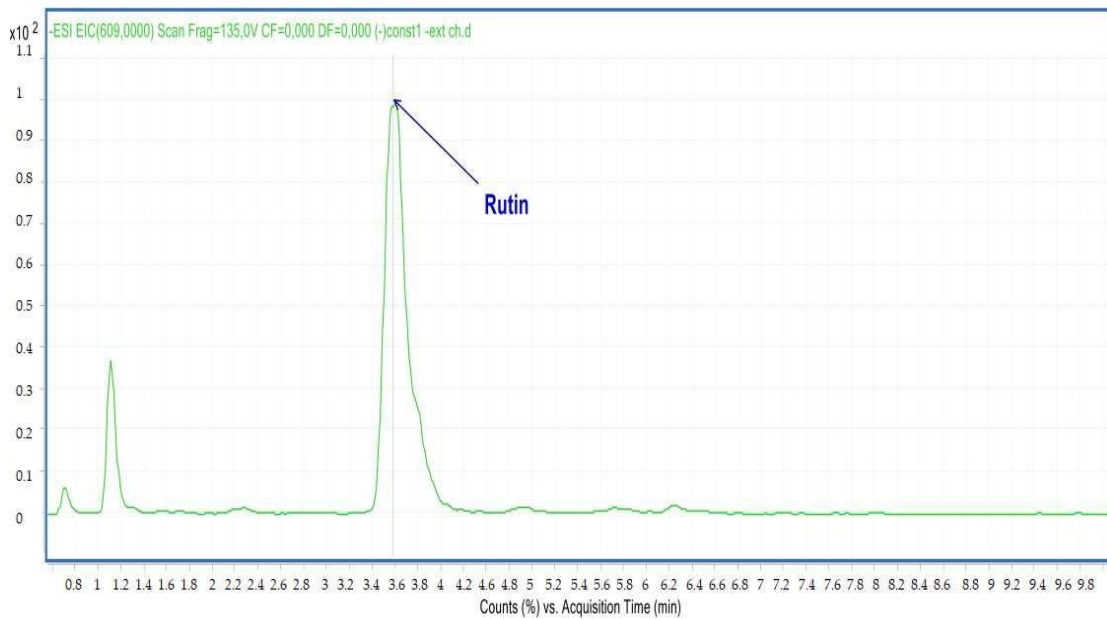


Figure 6. Chromatogramme de la rutine (composé 6).

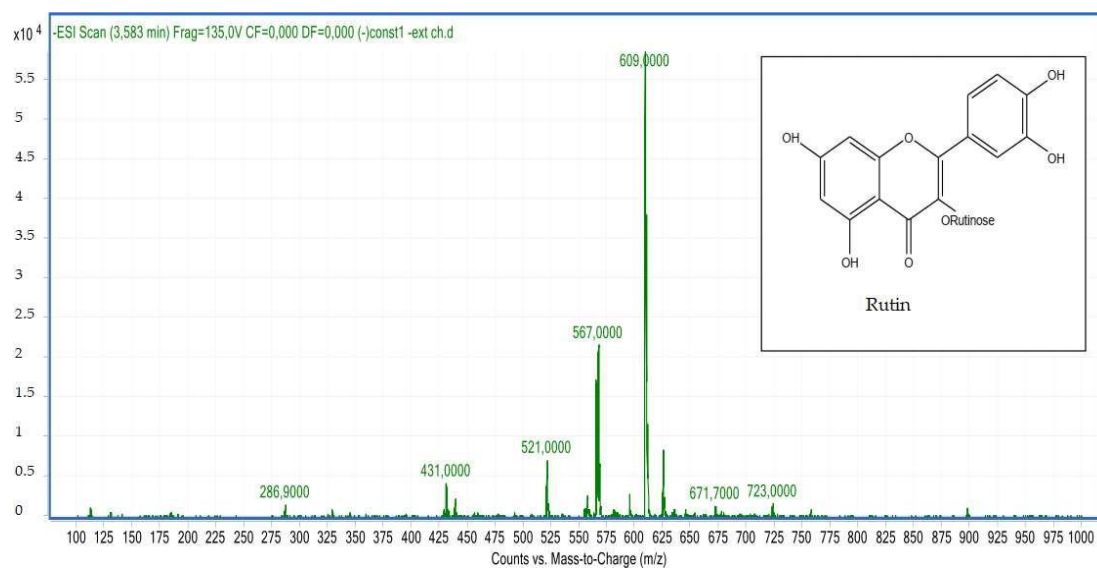


Figure 7. Spectre de masse de la rutine (composé 6).

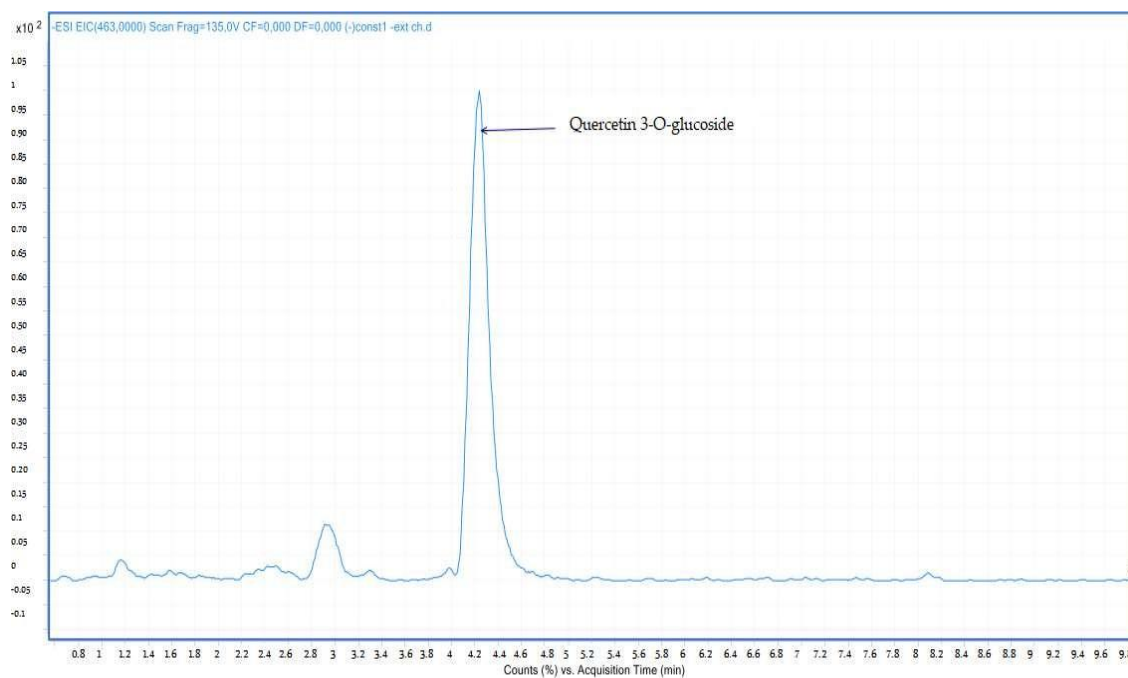


Figure 8. Chromatogramme de la quercétine 3-O-glucoside (composé 7).

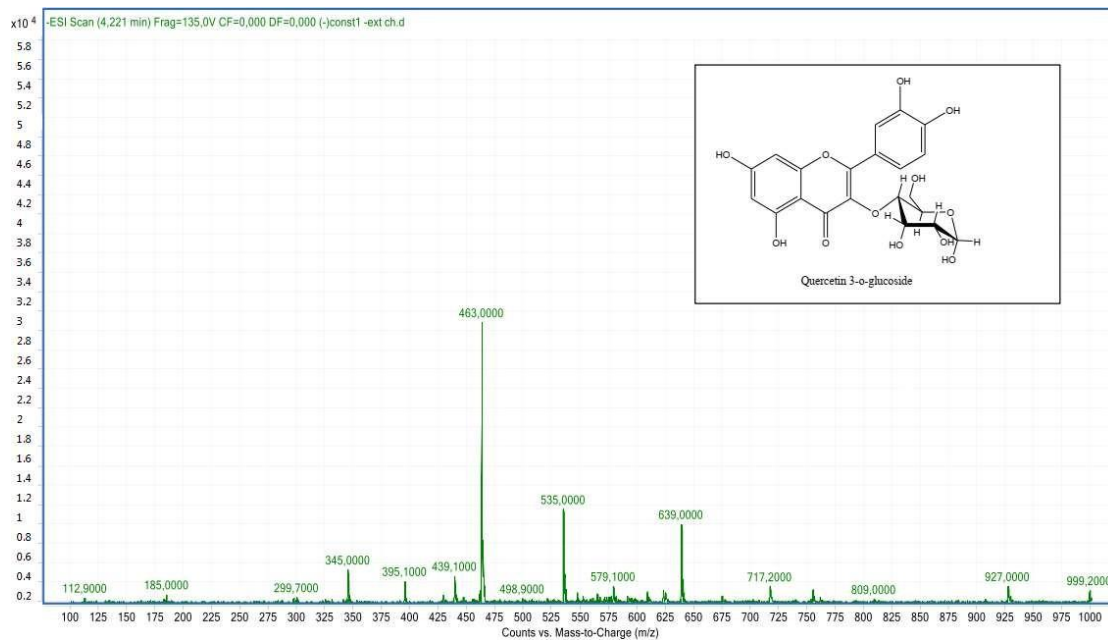


Figure 9. Spectre de masse de la quercétine 3-O-glucoside (composé 7).

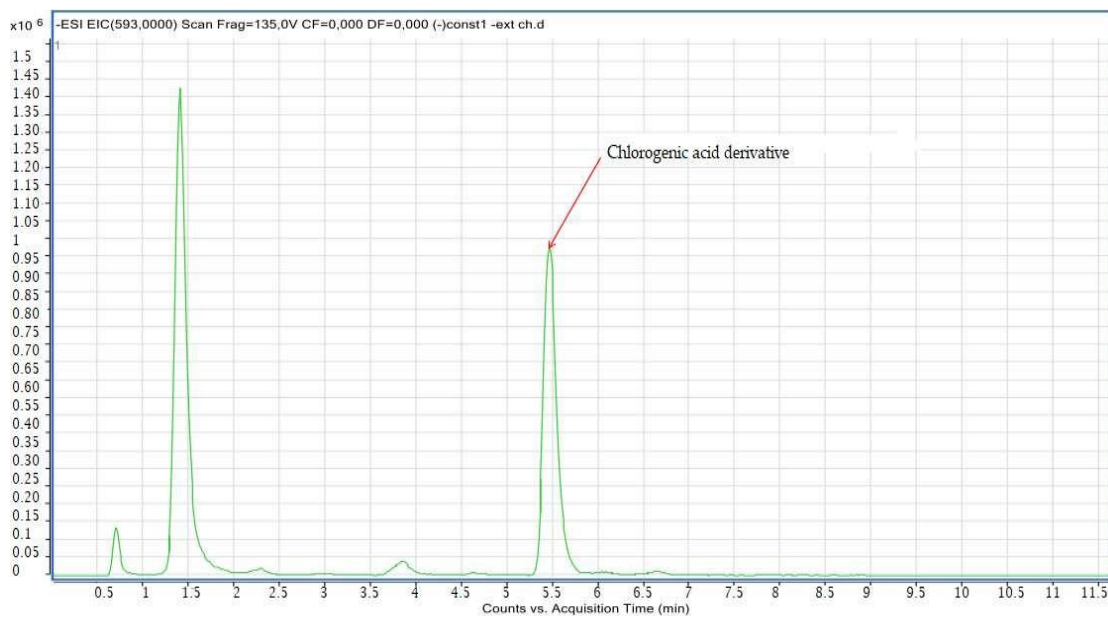


Figure10. Chromatogramme du dérivé de l'acide chlorogénique (composé 8).

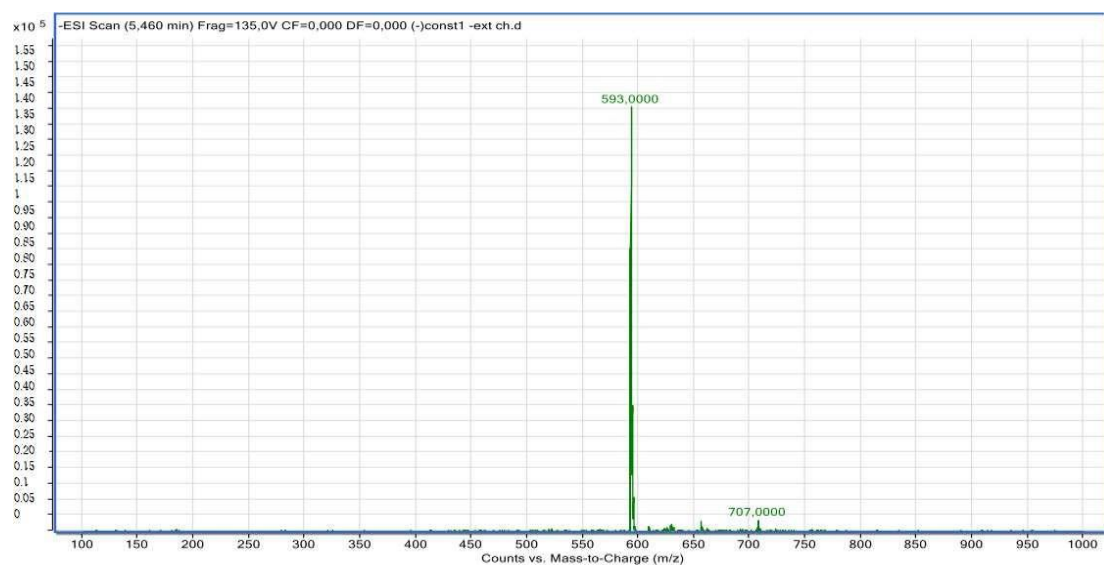


Figure 11. Spectre de masse du dérivé de l'acide chlorogénique (composé 8).