

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

Laboratoire de Physio-Toxicologie, Pathologie Cellulaires et Moléculaires-Biomolécules

N°...../SNV/2022

THÈSE

Présentée par

BENSAAD Mohamed Sabri

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: PHYSIOLOGIE ANIMALE

THÈME

**ETUDE CHIMIQUE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE LA PLANTE
CENTAUREA TOUGOURENSIS BOISS. & REUT. DE LA RÉGION
DES AURÈS**

Soutenue publiquement le 29/03/2022

DEVANT LE JURY

Président	SENATOR Abderrahmane	Pr. Université Batna 2
Rapporteur	HAMBABA Leila	Pr. Université Batna 2
Co-rapporteur	DASSAMIOUR Saliha	MCA. Université Batna 2
Examineurs	BENNOUNE Omar	Pr. Université Batna 1
	BAGHIANI Abderrahmane	Pr. Université Sétif 1
	BENBIA Souheyla	MCA. Université Batna 2
Invitée	BELAALOUI Ghania	Pr. Université Batna 2

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Allah** tout puissant de m'avoir guidé et éclairé dans cette noble voie et de m'avoir donné la force et la sagesse nécessaires afin d'accomplir ce modeste travail.

J'exprimé mes remerciements les plus chaleureux et distingués à ma directrice de thèse, le professeur **Hambaba Leila** pour avoir accepté à diriger ma thèse et pour m'avoir pris sous son aile, votre disponibilité, votre expérience, vos encouragements et votre gentillesse à mon égard m'ont permis beaucoup d'évoluer et de donner le meilleur de moi-même. Vous avez ma reconnaissance et mon respect éternel.

Un immense merci à ma co-directrice de thèse, le docteur **Dassamiour Saliha**, qui a accepté sans hésiter à co-diriger ma thèse, à m'encourager, à me transmettre son expérience et à apporter à mon travail, une vraie innovation et une bouffée d'air fraîche de par son expérience, sa sagesse et ses conseils qui m'ont beaucoup forgés et permis ainsi de faire un pas de plus vers la recherche. Vous êtes un modèle pour les générations à venir !

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux au professeur **Senator Abderrahmane** pour avoir veillé au bon déroulement de notre formation doctorale ainsi que pour tous les bons conseils qu'il nous a donnés durant ma formation doctorale. Merci de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, votre présence nous a honoré avant tout.

J'adresse également mes remerciements les plus distingués au professeur **Bennoune Omar**, au professeur **Baghiani Abderrahmane** et au docteur **Benbia Souheyla** pour avoir accepté d'examiner mon modeste travail, ceci témoigne du réel intérêt que vous portez à mon travail et constitue pour moi un réel honneur et privilège.

Je remercie également le professeur **Belaaloui Ghania** d'avoir accepté d'être notre invitée. Vous nous honorez de votre présence.

Je tiens à présenter mes remerciements les plus respectueux et distingués au professeur **Djamel Fahloul** et à mon frère **Amine Kahoul** de l'institut des Sciences Agronomiques et des Sciences Vétérinaires de l'université Batna 1, pour m'avoir constamment encouragé et ouvert les portes de son laboratoire, c'est en partie grâce à lui que la partie chimique et biologique de ma thèse a pu voir le jour.

J'exprime mes remerciements les plus chaleureux au professeur **Haba Hamada** de la faculté des Sciences de la Matière Université Batna 1, pour m'avoir aussi ouvert les portes de son laboratoire et fournit l'équipement et les réactifs nécessaires au bon déroulement de mes travaux de recherche.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux au docteur **Bensouici Chawki** Maître de conférences A au centre de recherche et de biotechnologie (Constantine) pour m'avoir accueilli et formé au sein de son laboratoire et pour tous les bons moments partagés

durant ma période de stage. Un très grand merci aussi à mesdames **Bellara Salwa** et **Ouffroukh Karima** et à monsieur **Mhamdi Mehdi** pour m'avoir aussi beaucoup aidé et donné de très bons conseils.

J'exprime mes remerciements et ma gratitude les plus distingués au professeur **Bennoune Omar** mais également au docteur **Ferhat Nouicer** de l'institut des Sciences Agronomiques et des Sciences Vétérinaires, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et permis d'avancer dans mes travaux *in vivo*, mais également pour m'avoir formé et transmis leur expérience. Sans oublier madame **Naima Kadrine** qui m'a beaucoup aidé dans la préparation des coupes histologiques et donné une atmosphère de travail très agréable !

Je tiens également à remercier docteur **Soumia Mouffouk** et docteur **Chaima Mouffouk** pour leurs aides et leur collaboration qui ont apporté un plus à ma thèse, merci encore.

Sans oublier mes chers enseignants, amis et collègues de travail au sein de l'université de Batna 2 et en dehors de l'université, qui m'ont soutenu jusqu'au bout, votre soutien moral était très important pour moi.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents, qui n'ont jamais cessé de croire en moi et m'ont toujours encouragé, tout ceci est le résultat de vos sacrifices que je n'oublierai jamais, je vous exprime ma gratitude et mes remerciements les plus sincères et chaleureux.

A mon adorable petite sœur, qui m'a toujours cuisiné de bons petits plats, merci pour ta gentillesse et pour ton soutien permanent.

A tous les membres de la famille **Bensaad** et **Nait Dahmane** pour leur dévouement inépuisable, pour leur soutien permanent et qui ont toujours su trouver les mots qu'il faut et au bon moment.

A mon frère l'ingénieur **Kahoul Mohamed Amine**, tu es l'une des rares personnes qui m'a marqué dans la vie, ta gentillesse sans égale et ton soutien permanent m'ont permis de briller et d'atteindre mes objectifs.

A madame **Taguig Assia** et mademoiselle **Nouri Lilya**, vous n'avez cessé de m'encourager et de croire en moi, vous m'avez toujours donné de bons conseils au bon moment et je n'oublierai jamais votre soutien moral à mon égard surtout durant les durs moments.

A mon très cher ami **Mohamed Akram Melakhessou**, pour m'avoir accompagné et transmis ton expérience durant la réalisation de mon travail, tu as toujours répondu présent lorsque j'ai eu besoin de toi, et c'est en partie grâce à toi que j'ai pu clôturer ma thèse dans les délais, reçois mon ami ma gratitude éternelle.

A mademoiselle **Hayat Djaara**, qui est pour moi une sœur spirituelle, les mots ne suffissent pas pour vous exprimer ma profonde gratitude pour votre gentillesse, vos conseils et votre professionnalisme sans égale.

A madame **Saidi Asma**, votre collaboration a apporté un plus à ma thèse, recevez mes remerciements les plus distingués.

Sans oublier mes amis et collègues qui ont toujours répondu présents lorsque j'ai eu besoin d'eux, recevez ainsi ma sincère gratitude.

الملخص

من أجل المساهمة في تحسين ميراث الأدوية الجزائرية، وكذلك للحفاظ على التراث المرتبط باستخدام النباتات العفوية في الطب التقليدي. تهتم هذه الدراسة بدراسة الخصائص الكيميائية والصيدلانية لأنواع نباتية من منطقة الأوراس المسماة *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut.

من الناحية الكيميائية النباتية، أظهرت هذه الأنواع ثراءً في فئات مختلفة من المستقلبات الثانوية، مع محتوى عالي من البوليفينول لمستخلص EA و n-BuOH والتي كانت على التوالي (1.57 ± 124.02 ميكروغرام EAG / ملغ / مستخلص) و (3.89 ± 85.44 ميكروغرام EAG / ملغ / مستخلص). أظهر تحليل HPLC-DAD وجود 13 مركبًا والتي كانت أساسًا الفلافونويد والأحماض الفينولية. أظهر تحليل GC-MS وجود 45 مركبًا في مستخلص n-BuOH و 23 مركبًا في مستخلص EA لنبتة *Centaurea tougourensis*.

من الناحية البيولوجية، أظهر مستخلص n-BuOH للنبات نتائج أفضل مقارنة بمستخلص EA من الناحية الدوائية، وتطورت النتائج بطريقة تعتمد على الجرعة. أظهرت اختبارات مضادات الأكسدة المختلفة قيم جيدة، كانت هذه القيم 0.07 ± 0.72 ميكروغرام / مل لاختبار DPPH، 0.21 ± 8.04 ميكروغرام / مل لاختبار ABTS، 0.55 ± 4.46 ميكروغرام / مل لاختبار الفينانثرولين، 0.6 ± 4.25 ميكروغرام / مل لاختبار GOR، 0.64 ± 11.16 ميكروغرام / مل لاختبار FRAP وأدى من 3.125 ميكروغرام / مل لاختبار CUPRAC. أدى هذا المستخلص إلى تسريع وقت التخرنر بنسبة أقصاها (86.71%) للتركيز المختبر 4 مجم / مل. كان النشاط الوقائي لمستخلص n-BuOH كبيرًا مع قيم IC_{50} البالغة 0.62 ± 9.8 ميكروغرام / مل لاختبار تثبيط أستيل كولينستراز و 0.04 ± 173.53 ميكروغرام / مل لاختبار تثبيط بوتيريل كولينستراز. تم اختبار النشاط للالتهابات في المختبر من خلال اختبارين، اختبار تثبيط غشاء خلايا الدم الحمراء، وكشف عن قيمة EC_{50} لمستخلص المضاد n-BuOH البالغة 0.14 ± 154.15 ميكروغرام / مل واختبار التمسخ للبروتينات، وكشف عن قيم EC_{50} لنفس المستخلص، والتي كانت 0.03 ± 335 ميكروغرام / مل BSA و 0.2 ± 120.81 ميكروغرام / مل لتمسخ اختبار الألبومين بيضة الدجاج تم أيضًا تقييم تثبيط نشاط ألفا أميليز ويبدو أن المستخلصين لهما تأثير مثبط مماثل على هذا الإنزيم. كانت قيم IC_{50} 0.03 ± 711.03 ميكروغرام / مل لمستخلص n-BuOH 0.02 ± 962 ميكروغرام / مل لمستخلص EA. أظهر مستخلص n-BuOH عامل حماية أقصى من أشعة الشمس (56.035). فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات، كان مستخلص EA أكثر نشاطًا وأظهر تركيزات مثبطة دنيا (MIC) 0.00625 ملغ / مل ضد المكورات العنقودية الذهبية (ATCC 25923) و 0.0125 ملغ / مل ضد الإشريكية القولونية المسببة للأمراض. ولم يكشف اختبار السمية الحادة عن أي علامات سمية للنبات، حتى بالنسبة للجرعة المختبرة البالغة 2000 ملغ / كغ. تشير النتائج المختلفة التي تم الحصول عليها إلى أن هذا النبات سيكون له تأثير جيد في المسكنات، ومضاد للالتهابات، وخافض للحرارة، ومضاد للقرحة، وقائي للكبد، ونشاط شفائي، وهذا بالنسبة للتركيزات التي تم اختبارها (200 و 400 ملغ / كغ)، ولكن النتائج اعتبرت أفضل. بتركيز 400 ملغ / كغ. أظهر هذا النبات أيضًا نشاطًا جيدًا مضادًا لمرض السكر، سواء بالنسبة لمرض السكري الناجم عن الستربتوزوتوسين أو لاختبار تحمل الجلوكوز (OGTT). دعمت الفحوصات النسيجية المختلفة النتائج التي تم الحصول عليها، وكذلك التحاليل الدموية والبيوكيميائية، وتشير إلى أن سنتوريا يمكن أن يكون لها تأثيرات علاجية واعدة في علاج الأمراض المزمنة المرتبطة بالالتهاب والسكري. تظهر هذه النتائج المشجعة مرة أخرى الإمكانيات العلاجية لأنواع سنتوريا.

الكلمات الدالة: الكيميائية النباتية، الأنشطة البيولوجية، التحاليل الدموية، التحاليل البيوكيميائية، علم الانسجة، *Centaurea tougourensis*.

Résumé

Afin de contribuer à l'élaboration d'une pharmacopée algérienne, ainsi qu'à la sauvegarde du patrimoine lié à l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle, ce travail s'est intéressé à l'étude des propriétés chimiques et pharmacologiques d'une espèce de plante de la région des Aurès nommée *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. Sur le plan phytochimique, cette espèce a montré une richesse en diverses classes de métabolites secondaires, avec une teneur en polyphénols élevé pour l'extrait n-BuOH et EA qui était de $(85.44 \pm 3.89 \mu\text{g EAG mg/ d'extrait})$ et $(124.02 \pm 1.57 \mu\text{g EAG mg/ d'extrait})$ respectivement. L'analyse par HPLC-DAD a révélé au niveau de ces deux extraits la présence de 13 composés qui étaient principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques. L'analyse par GC-MS a permis d'identifier 45 composés dans l'extrait n-BuOH et 23 composés dans l'extrait EA de *C. tougourensis*.

Sur le plan pharmacologique, l'extrait n-BuOH a montré de meilleurs résultats par rapport à l'extrait EA et les résultats ont évolué d'une manière dose-dépendante. Les différents tests antioxydants ont montré de bonnes valeurs d'IC₅₀ et d'A_{0.5} pour l'extrait n-BuOH, qui se rapprochaient pour certains tests des valeurs des standards. Ces valeurs étaient de $0.72 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ pour le test DPPH, $8.04 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ pour le test ABTS, $4.46 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ pour le test de la phénanthroline, $4.25 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ pour le test GOR, $11.16 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$ pour le test FRAP et inférieur à $3.125 \mu\text{g/mL}$ pour le test CUPRAC. Cet extrait a accéléré le temps de coagulation avec un pourcentage maximal de (86.71%) pour la concentration testée de 4 mg/mL. L'activité neuroprotectrice de l'extrait n-BuOH était également considérable avec des valeurs IC₅₀ de $9.8 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$ pour le test d'inhibition de l'acétylcholinestérase et de $173.53 \pm 0.04 \mu\text{g/Ml}$ pour le test d'inhibition de la butyrylcholinestérase. L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* a été testée par deux tests, le test de stabilisation des membranes des globules rouges, qui a révélé une valeur EC₅₀ de l'extrait n-BuOH de $154.15 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ et le test de dénaturation des protéines ayant révélé des valeurs EC₅₀ pour le même extrait, qui était de $335 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ pour le test BSA et $120.81 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ pour celui de l'œuf de poule. L'inhibition de l'activité de l'alpha amylase a également été évaluée et les deux extraits n-BuOH et EA semblent avoir un effet d'inhibition comparable sur cette enzyme. Les valeurs IC₅₀ étaient de $711.5 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait n-BuOH et 962 ± 0.02 pour EA. L'extrait n-BuOH a montré un facteur de protection solaire maximal de (56.035). Concernant l'activité antimicrobienne, l'extrait EA a été plus actif et a montré des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 0.00625 mg/mL contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et 0.0125 mg/mL contre *Escherichia coli* pathogène.

La partie *in-vivo* a été réalisée avec l'extrait n-BuOH, le test de toxicité aiguë n'a révélé aucun signe de toxicité de la plante et ceci même pour la dose testée de 2000 mg/kg. Les divers résultats obtenus suggèrent que *C. tougourensis* posséderait une bonne activité analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique, antiulcéreuse, hépatoprotectrice et cicatrisante et ceci pour les deux concentrations testées (200 et 400 mg/kg) mais les résultats ont été considérés meilleurs avec la concentration de 400 mg/kg. Cette plante a également montré une bonne activité antidiabétique, que ce soit pour le test de tolérance au glucose (OGTT) ou bien du diabète induit par la streptozotocine. Les divers examens histologiques ont appuyé les résultats obtenus, ainsi que l'analyse des paramètres biochimiques et hématologiques.

Ces résultats encourageants montrent le potentiel pharmacologique des espèces *Centaurea* et indiquent que *C. tougourensis* pourrait avoir des effets thérapeutiques prometteurs dans le traitement de plusieurs maladies chroniques associées à l'inflammation et au diabète.

Mots clés : *Centaurea tougourensis*, phytochimie, activités biologiques, paramètres biochimiques, paramètres hématologiques, histologie.

Abstract

In order to contribute to the elaboration of an Algerian pharmacopoeia, as well as to the preservation of the heritage linked to the use of spontaneous plants in traditional medicine, this work was interested in the study of the chemical and pharmacological properties of a plant species from the Aures region named *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut.

Phytochemically, this species showed a richness in various classes of secondary metabolites, with a high polyphenol content for the n-BuOH and EA extracts, which were ($85.44 \pm 3.89 \mu\text{g}$ EAG mg / extract) and ($124.02 \pm 1.57 \mu\text{g}$ EAG mg / extract) respectively. HPLC-DAD analysis revealed in these two extracts the presence of 13 compounds which were mainly flavonoids and phenolic acids. The GC-MS approach revealed the presence of 45 compounds in the n-BuOH extract and 23 compounds in the EA extract of *C. tougourensis*.

Pharmacologically, the n-BuOH extract of the plant showed better results compared to the EA extract, and the results evolved in a dose-dependent manner. The various antioxidant tests revealed good IC_{50} and $\text{A}_{0.5}$ values for the n-BuOH extract which for some tests approximated the values of the standards. These values were $0.72 \pm 0.07 \mu\text{g} / \text{mL}$ For the DPPH test, $8.04 \pm 0.21 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the ABTS test, $4.46 \pm 0.55 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the phenanthroline test, $4.25 \pm 0.6 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the GOR test, $11.16 \pm 0.64 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the FRAP test, and less than $3.125 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the CUPRAC test. This extract accelerated the clotting time with a maximum percentage of (86.71%) for the tested concentration of 4 mg / mL. The neuroprotective activity of the n-BuOH extract was also considerable, with IC_{50} values of $9.8 \pm 0.62 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the acetylcholinesterase inhibition test and $173.53 \pm 0.04 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the inhibition test of butyrylcholinesterase. The anti-inflammatory activity in vitro was tested via two tests, the red blood cell membrane stabilization test, which revealed an EC_{50} value of the n-BuOH extract of $154.15 \pm 0.14 \mu\text{g} / \text{mL}$, and the test denaturation of proteins, which revealed EC_{50} values for the same extract of $335 \pm 0.03 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the BSA test, and $120.81 \pm 0.2 \mu\text{g} / \text{mL}$ for those of hen's egg. Inhibition of alpha amylase activity was also evaluated, and both n-BuOH and EA extracts from *C. tougourensis* appear to have a comparable inhibitory effect on this enzyme. The IC_{50} values were $711.5 \pm 0.03 \mu\text{g} / \text{mL}$ for n-BuOH and 962 ± 0.02 for EA. The n-BuOH extract showed a maximum sun protection factor of (56.035). However, regarding antimicrobial activity, EA extract was more active, and showed minimum inhibitory concentrations (MIC) of 0.00625 mg / mL against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and 0.0125 mg / mL against pathogenic *Escherichia coli*.

The *in-vivo* axis was investigated with the n-BuOH extract, the acute toxicity test revealed no signs of plant toxicity, even for the tested dose of 2000 mg / kg. The various results obtained suggest that *C. tougourensis* will have good analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, antiulcer, hepatoprotective and healing activity, and this for the two concentrations tested (200 and 400 mg / kg), but the results were considered better using the concentration of 400 mg / kg. This plant has also shown good antidiabetic activity, whether for the glucose tolerance test (OGTT) or for diabetes induced by streptozotocin. The various histological examinations supported the results obtained, as well as the analysis of the biochemical and hematological parameters of the blood.

These encouraging results once again show the pharmacological potential of *Centaurea* species, and indicate that *C. tougourensis* may have promising therapeutic effects in the treatment of several chronic diseases associated with inflammation and diabetes.

Keywords : *Centaurea tougourensis*, phytochemistry, biological activities, biochemical parameters, hematological parameters, histology.

Production scientifique

Articles

Notre travail a fait l'objet de cinq (5) publications :

1. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L, Kahoul MA, 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 doi: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v20i8.14>
2. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L, C Bensouici, Haba H.** (2021). *In vitro* assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research.** 9(6): 790-802.
3. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L.** (2021). Antihyperglycemic activity of *Centaurea tougourensis*. **International Journal of Human Settlements.** 2021; 5: 93-98.
4. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L, Saidi A, Melakhsou MA, Nouicer F, Baghiani A, Khennouf S, Kahoul MA, Kadrine N.** (2021). In vivo investigation of antidiabetic, hepatoprotective, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. **Journal of Physiology and Pharmacology.** 72(3). DOI: 10.26402/jpp.2021.3.xx
5. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L, Bensouici C, Karima O, Kahoul MA.** (2021). HPLC-DAD phenolics screening and *in vitro* investigation of haemostatic, antidiabetic, antioxidant and photoprotective properties of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. **Herba Polonica.** 67(4). DOI: 10.2478/hepo-2021-0023

Communications

1. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L.** **Annual Conference on Applied Pharmacology and Toxicology (webinar).** 09-10 July 2021. at: United Kingdom, entitled «*In vitro* assessment of antioxidant, anti inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut.».
2. **Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L.** **Séminaire international sur les sciences naturelles et de la vie,** organisé par International Journal of Human Settlements (IJHS) en coopération avec le ministère algérien de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique, 19-20 février 2021. Séminaire de type webinaire. Intitulée «Anti-hyperglycemic activity of *Centaurea tougourensis*».

Table des matières

Liste des abréviations.....	XI
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des figures.....	XVI
Introduction générale.....	1

Première partie Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Données actuelles sur l'espèce *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut

1. Famille des Astéracées	4
1.1. Position systématique	4
1.2. Caractéristiques botaniques	4
1.3. Répartition géographique.....	4
2. Espèces du genre <i>Centaurea</i>	5
2.1. Caractéristiques botaniques	5
2.2. Caractéristiques génétiques.....	5
2.3. Répartition géographique.....	6
2.4. Caractéristiques phytochimiques.....	7
2.5. Usages traditionnels.....	7
3. <i>Centaurea tougourensis</i>	16
3.1. Classification taxonomique.....	16
3.2. Description botanique.....	16
3.3. Répartition géographique.....	16
3.4. Travaux chimiques antérieurs réalisés sur cette espèce.....	17

Chapitre 2 : Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires des plantes

1. Activités biologiques des plus importantes classes de polyphénols	18
1.1. Acides phénols	18
1.2. Flavonoïdes	20
1.3. Tanins	23
2. Activités biologiques des quinones	26
3. Activités biologiques des terpénoïdes	27
3.1. Mono, diterpènes et sesquiterpènes.....	27
3.2. Saponines.....	28
3.3. Tetraterpènes (caroténoïdes).....	31
4. Activités biologiques des alcaloïdes	33
5. Activités biologiques des hétérosides cardiotoniques	34
6. Activités biologiques des glucosinolates	36

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	37:
2. Extraction et fractionnement.....	37:
3. Etude phytochimique.....	39:
3.1. Analyse qualitative.....	39
3.2. Analyse quantitative.....	40
3.2.1. Estimation de la teneur en polyphénols totaux (TTP).....	40
3.2.2. Estimation de la teneur en flavonoïdes (TF).....	41
3.2.3. Estimation de la teneur en tanins (TT).....	41
3.3. Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	41
3.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-DAD).....	42
3.5. Criblage qualitatif de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH par CCM.....	42
4. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	43
4.1. Activité antioxydante.....	43
4.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH.....	43
4.1.2. Test de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR).....	43
4.1.3. Activité du piégeage de l'ABTS.....	44
4.1.4. Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	44
4.1.5. Test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline.....	44
4.1.6. Pouvoir réducteur (FRAP).....	45
4.2. Activité photoprotéctrice.....	45
4.3. Activité hémostatique.....	46
4.4. Activité anti-inflammatoire.....	47
4.4.1. Test de stabilisation des membranes des globules rouges.....	47
4.4.2. Tests de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA).....	47
4.4.3. Tests de dénaturation de l'albumine de l'œuf de la poule.....	48
4.5. Activité antidiabétique (Test d'inhibition de l'alpha amylase).....	48
4.6. Activité neuroprotéctrice.....	49
4.7. Activité antimicrobienne.....	49
5. Evaluation des activités biologiques <i>in vivo</i>	50
5.1. Matériel animal.....	50
5.2. Evaluation de la toxicité aiguë.....	50
5.3. Activité analgésique.....	51
5.4. Activité anti-inflammatoire.....	51
5.4.1. Œdème de la patte induit par la carraghénane.....	51
5.4.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton.....	52
5.5. Activité antipyrétique.....	53
5.6. Activité antiulcéreuse.....	54
5.7. Activité cicatrisante.....	55
5.8. Activité hépatoprotéctrice.....	56
5.9. Activité antihyperglycémiant.....	57
5.9.1. Test de tolérance au glucose (OGTT).....	57
5.9.2. Diabète induit par la streptozotocine.....	58
5.10. Analyses statistiques.....	59

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Etude phytochimique.....	60
1.1. Rendement d'extraction.....	60
1.2. Analyse qualitative.....	61
1.3. Résultats de la quantification des composés phénoliques par..... spectrophotométrie.....	63
1.4. Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	65
1.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-DAD)	71
1.6. Criblage qualitative de l'activité anti-radicalaire du DPPH par (CCM)	76
2. Résultats d'évaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	77
2.1. Activité antioxydante.....	77
2.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH	77
2.1.2. Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	80
2.1.3. Activité du piégeage de l'ABTS	83
2.1.4. Test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline	85
2.1.5. Test de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR).....	87
2.1.6. Pouvoir réducteur (FRAP).....	89
2.2. Activité photoprotectrice	92
2.3. Activité hémostatique	94
2.4. Activité anti-inflammatoire.....	96
2.4.1. Test de stabilisation des membranes des globules rouges.....	96
2.4.2. Tests de dénaturation de l'albumine sérique bovine et de de l'albumine de l'œuf de la poule	98
2.5. Activité antidiabétique (Test d'inhibition de l'alpha amylase).....	102
2.6. Activité neuroprotéctrice	105
2.7. Activité antimicrobienne.....	109
3. Résultats d'évaluation des activités biologiques <i>in vivo</i>	112
3.1. Evaluation de la toxicité aiguë	112
3.2. Activité analgésique	113
3.3. Activité anti-inflammatoire.....	117
3.3.1. Œdème de la patte induit par la carraghénane	117
3.3.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton	122
3.4. Activité antipyrétique	124
3.5. Activité antiulcéreuse	126
3.6. Activité cicatrisante	128
3.7. Activité hépatoprotectrice.....	134
3.8. Activité antihyperglycémiant	139
3.8.1. Test de tolérance au glucose (OGTT)	139
3.8.2. Diabète induit par la streptozotocine.....	141
Conclusion générale et perspectives.....	147
Références bibliographiques	150
Annexes	189
Publication	

LISTE DES ABREVIATIONS

A_{0.50}	Absorbance de l'échantillon pouvant inhiber la moitié des radicaux présents dans une solution
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADNmt	ADN mitochondrial
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALAT (TGP)	Alanine aminotransférase
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ASAT (TGO)	Aspartateaminotransférase
BAX	Protéine X associée à Bcl-2
BChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Hydroxyanisolebutylé
BHT	Hydroxytoluènebutylé
BSA	Albumine de sérum bovin
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cdk2	Kinase dépendante des cyclines 2
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COX-1	Cyclooxygénase classe 1
COX-2	Cyclooxygénase classe 2
CRP	Protéine C-réactive
CT	<i>Centaurea tougourensis</i>
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
EEP	Extraction électrique pulsée
EFS	Extraction par fluide supercritique
FCN	Facteur de croissance nerveuse
FPS	Facteur de protection solaire
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GOR	Radical galvinoxyl
HDL-C	Cholestérol à lipoprotéines de haute densité
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HT	Hématocrite
IC₅₀	Concentration médiane inhibitrice

IFNγ	Interféron Gamma
IN	Infiltration de neutrophiles
Kv	Canaux potassiques voltage-dépendants
LDL-C	Cholestérol à lipoprotéines de basse densité
LPS	lipopolysaccharide
MDA	Malondialdéhyde
MrkA	Gène respectif de <i>Klebsiellapneumoniae</i>
MPO	Myéloperoxydase
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle de type 9
MPK3	Protéines kinases de type 3 activées par un mitogène
MS	Matière sèche Muscle strié
mtERO	Espèces réactives de l'oxygène produites par les mitochondries
Nc	Néocuproïne
NF-κB	Facteur nucléaire-kappa B
NOX2	NADPH oxydase de type 2
NOX4	NADPH oxydase de type 4
Nrf2	Facteur nucléaire érythroïde de type 2
OGTT	Test de tolérance au glucose orale
p38α MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes p38
PI3K	Tyrosine phosphatidylinositol-3-kinase
PPAR γ	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RCH	Rectocolite hémorragique
RLM	Radicaux libres mitochondriaux
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SSTP	Solution saline tamponnée au phosphate
STAT3	Signal de transduction et d'activation de transcription 3
STZ	Streptozotocine
TCA	Acide trichloracétique
TFC	Teneur totale en flavonoïdes
TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha

TLR4	Toll Like Receptor de type 4
TPS	Tampon phosphate salin
TRPA1	Potentiel de récepteur transitoire ankyrine 1
TRPV1	Potentiel de récepteur transitoire vanilloïde de type 1
VCAM-1	Protéine d'adhésion aux cellules vasculaires de type 1
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire

LISTE DES TABLEAUX		
N°	Titre	Page
Tableau 1	Récapitulatif des composés identifiés de quelques espèces du genre <i>Centaurea</i> avec leurs propriétés pharmacologiques.	8
Tableau 2	Classification taxonomique de <i>Centaurea tougourensis</i> .	16
Tableau 3	Catégories de protection solaire selon la commission européenne des énergies.	46
Tableau 4	Rendement des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	60
Tableau 5	Résultats du criblage qualitatif de <i>C. tougourensis</i> .	62
Tableau 6	Résultats de l'analyse quantitative des extraits n-BuOH et EA de <i>C. tougourensis</i> .	63
Tableau 7	Constituants phytochimiques identifiés dans l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> par GC-MS.	67
Tableau 8	Constituants phytochimiques identifiés dans l'extrait EA de <i>C. tougourensis</i> par GC-MS.	69
Tableau 9	Composés phénoliques détectés dans les extraits de <i>C. tougourensis</i> par HPLC-DAD à différentes longueurs d'onde (280, 320 et 350 nm).	75
Tableau 10	Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	81
Tableau 11	Capacité antioxydante (IC ₅₀ et A _{0.50} µg/mL) pour les tests DPPH et CUPRAC.	82
Tableau 12	Capacité antioxydante des extraits de <i>C. tougourensis</i> par le test ABTS.	84
Tableau 13	Test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline.	86
Tableau 14	Capacité antioxydante des extraits de <i>C. tougourensis</i> par le test GOR.	88
Tableau 15	Capacité antioxydante des extraits de <i>C. tougourensis</i> par le test FRAP.	90
Tableau 16	Capacité antioxydante (IC ₅₀ et A _{0.50} µg/mL) pour les tests ABTS, FRAP, GOR et phénanthroline.	90
Tableau 17	Calcul du facteur de protection solaire (FPS) à partir des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	92
Tableau 18	Effet des extraits de <i>C. tougourensis</i> sur le temps de coagulation du plasma.	94
Tableau 19	Activité anti-inflammatoire (valeurs EC ₅₀) du standard et extraits de <i>C. tougourensis</i> .	100
Tableau 20	Détermination des valeurs IC ₅₀ du standard et des extraits de <i>C. tougourensis</i> dans le test d'inhibition de l'α-amylase.	103
Tableau 21	Activités neuroprotectrices (IC ₅₀ µg/ml) du standard et des extraits et de <i>C. tougourensis</i> .	107
Tableau 22	Sensibilité de certaines souches microbiennes aux extraits de <i>C. tougourensis</i> .	110
Tableau 23	Calcul des diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (MIC) des souches microbiennes testées.	110
Tableau 24	Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur le diamètre des pattes des souris avant et après l'administration du carraghénane.	117
Tableau 25	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur les divers paramètres hématologiques après induction de l'œdème de la patte par le carraghénane chez les souris.	119

Tableau 26	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur les divers paramètres biochimiques après induction de l'œdème de la patte par le carraghénane chez les souris.	120
Tableau 27	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris.	122
Tableau 28	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur la température rectale avant et après l'injection de la levure de bière.	125
Tableau 29	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur la superficie des plaies durant une période de 18 jours.	129
Tableau 30	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> et de deux types de silymarine sur divers paramètres biochimiques chez les souris après induction d'hépatotoxicité.	135
Tableau 31	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> et du glibenclamide sur les divers paramètres biochimiques chez les souris.	143

LISTE DES FIGURES		
N°	Titre	Page
Figure 1	Répartition géographique des Astéracées dans le monde.	5
Figure 2	Caractéristiques génétiques des espèces du genre <i>Centaurea</i> .	6
Figure 3	Principaux secteurs de distribution des espèces du genre <i>Centaurea</i> dans le monde.	6
Figure 4	Répartition géographique de l'espèce <i>Centaurea tougourensis</i> en Algérie.	17
Figure 5	Structure de base des acides phénoliques.	19
Figure 6	Structure de base des flavonoïdes.	21
Figure 7	Structure de base des tannins (A): acide phénol constituant des tanins hydrolysables après estérification (B) : unité constitutive de base des tanins condensé.	24
Figure 8	Structure de base des quinones.	26
Figure 9	Structure de base du précurseur des terpènes (isoprène).	28
Figure 10	Exemple de structure d'un composé diterpène et sesquiterpène et (A): phytol, (B) : polygodial.	28
Figure 11	Structure de base des saponines.	30
Figure 12	Structure de base de quelques caroténoïdes (A): lycopène (B) : bêta-carotène.	31
Figure 13	Structure de base des alcaloïdes.	33
Figure 14	Structure commune des hétérosides cardiotoniques.	35
Figure 15	Parties aériennes de l'espèce <i>Centaurea tougourensis</i> utilisée dans l'étude.	37
Figure 16	Schéma récapitulatif du processus d'extraction et d'analyse phytochimique de <i>Centaurea tougourensis</i> .	38
Figure 17	Récapitulatif des principales étapes de l'activité cicatrisante.	56
Figure 18	Chromatogramme (GC-MS) de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> .	66
Figure 19	Chromatogramme (GC-MS) de l'extrait EA de <i>C. tougourensis</i> .	66
Figure 20	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 280 nm.	72
Figure 21	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 320 nm.	72
Figure 22	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 350 nm.	72
Figure 23	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 280 nm.	73
Figure 24	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 320 nm.	73
Figure 25	Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de <i>C. tougourensis</i> à la longueur d'onde de 350 nm.	73
Figure 26	Révélation du test au DPPH en utilisant l'éluant (30% méthanol /70% chloroforme) pour l'extrait n-butanolique.	76
Figure 27	Révélation du test au DPPH en utilisant l'éluant (50% n-hexane /50% acétate d'éthyle) pour l'extrait acétate d'éthyle.	77
Figure 28	Capacité antiradicalaire au DPPH des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	78

Figure 29	Activité anti-inflammatoire (test d'hémolyse induite par la chaleur) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	96
Figure 30	Activité anti-inflammatoire (test de dénaturation de l'albumine bovine) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	99
Figure 31	Activité anti-inflammatoire (test de dénaturation de l'albumine de l'œuf de la poule) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	100
Figure 32	Activité inhibitrice de l' α -amylase par les extraits de <i>C. tougourensis</i> .	102
Figure 33	Activité neuroprotectrice (anti-acétylcholinestérase) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	106
Figure 34	Activité neuroprotectrice (anti-butyrylcholinestérase) des extraits de <i>C. tougourensis</i> .	106
Figure 35	Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur le temps de réaction des souris au stimulus nociceptif.	114
Figure 36	Examen histopathologique des tissus de pattes des souris après injection sous-plantaire de carraghénane.	121
Figure 37	Examen histopathologique des tissus de l'oreille des souris.	124
Figure 38	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>Centaurea tougourensis</i> sur l'aspect macroscopique de la muqueuse gastrique dans le test de l'ulcère induit par l'éthanol chez les souris.	127
Figure 39	Examen histopathologique des tissus de l'estomac des souris.	128
Figure 40	Examen macroscopique des surfaces de plaie des souris durant une période de 18 jours.	130
Figure 41	Exemple d'un traitement de la surface d'une plaie par le logiciel Image J.	131
Figure 42	Examen histopathologique des tissus de la peau des souris.	132
Figure 43	Examen histopathologique des tissus hépatiques des souris après induction d'hépatotoxicité.	137
Figure 44	Effet anti-hyperglycémiant de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> (test OGTT).	139
Figure 45	Effet de l'extrait n-BuOH de <i>C. tougourensis</i> sur la glycémie des souris (test du diabète induit par la STZ)	142
Figure 46	Examen histopathologique des tissus hépatiques des souris après induction du diabète.	145
Figure 47	Examen histopathologique des tissus du pancréas des souris après induction du diabète.	146

Introduction générale

L'homme a toujours entretenu une relation très spéciale avec les plantes et leur histoire depuis l'antiquité interconnectée, indique l'usage par l'être humain des plantes pour faire face aux contraintes quotidiennes (**Sen et Samanta, 2015**) ; par exemple soulager des maux de tête, un transit digestif ou bien soigner une plaie avant qu'elle ne s'infecte (**Jones, 1996**). Ces dernières décennies, plusieurs études ont montré le réel potentiel des plantes ayant traité efficacement plusieurs pathologies surtout celles chroniques telles que le diabète, l'arthrose, l'asthme (**Peltzer et Pengpid, 2019**) et même a freiné l'évolution des maladies neuro-dégénératives telles que la sclérose en plaque, l'alzheimer ou bien le parkinson (**Pohl et al., 2018**).

La phytothérapie a également accompagné beaucoup de civilisations très anciennes telles que la civilisation chinoise qui continue jusqu'à présent d'utiliser les plantes, par exemple comme infusion pour soigner la lithiase rénale (**Zhu et al., 1998**), et des ouvrages médicaux appartenant à des civilisations arabes très anciennes contenaient plusieurs préparations thérapeutiques à base de plantes (**Saad et al., 2005**), ce qui prouve une fois de plus les vertus médicinales des plantes.

Les plantes ont depuis très longtemps fasciné la communauté scientifique et médicale de par leurs diversités et propriétés pharmacologiques inépuisables (**Sofowora et al., 2013**), qui ne cessent de nous étonner de jour en jour. On compte aujourd'hui, pas moins de 450.000 espèces de plantes à travers le monde (**Pimm et Jopp, 2020**) et le potentiel chimique et biologique de beaucoup de plantes restent encore à être étudiées.

Les plantes doivent leurs propriétés biologiques à des molécules clés qui entrent dans leurs compositions appelées métabolites secondaires (**Shen et al., 2019**). Une multitude de classes de métabolites secondaires existe et ainsi la richesse d'une plante en tel ou tel type de ces molécules définirait en grande partie l'activité biologique probable de la plante en question (**Erb et Kliebenstein, 2020**). Parmi ces classes ; on retrouve les flavonoïdes, les terpènes, les saponines, les alcaloïdes, les iridoïdes, les tannins ainsi que d'autres classes de molécules bioactives (**Nascimento et Fett-Neto, 2010 ; Guerriero et al., 2018 ; Yang et al., 2018**).

L'industrie pharmaceutique rencontre aujourd'hui des difficultés pour subvenir aux besoins croissants de la population mondiale. En effet, l'apparition successive de plusieurs épidémies (**Ahmadiani et Nikfar, 2016**) et parfois même de pandémies telles que la Covid-19 (**Kobayashi et al., 2020**), qui a complètement bouleversé les codes de la science, a montré la nécessité de revoir notre approche pharmacologique.

L'utilisation des plantes a également attiré l'attention d'autres secteurs tels que celui de la biotechnologie dont leurs fruits de recherche ont permis d'élaborer par exemple un carburant

écologique à base de plantes appelé communément biocarburant (**Li et al., 2014**) à la fois non couteux mais surtout respectueux de l'environnement et ainsi de remplacer les combustibles fossiles classiques très nocifs (**Reid et al., 2020**).

Le secteur industriel pharmaceutique a également trouvé son compte, en effet, l'élaboration de médicaments à base de plantes, s'est révélé être plus rentable sur le plan économique mais également sur le plan pharmacologique (**Dev, 2010**). En effet, l'utilisation des médicaments actuels tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pour traiter les maladies chroniques inflammatoires a malheureusement beaucoup d'effets secondaires pouvant aller d'une simple douleur d'estomac ou diarrhée jusqu'à des conséquences parfois même irréversibles (**Harirforoosh et al., 2013**).

Des études très récentes ont même suggéré que les composés bioactifs des plantes peuvent même agir au niveau de l'ADN d'un organisme et prévenir l'apparition des mutations et même favoriser le processus de leur réparation (**Chevigny et al., 2020**) ou de recombinaison génétique (**Metje-Sprink et al., 2019**) et semble par ailleurs influencer le niveau énergétique des cellules en interagissant avec leurs mitochondries, ce qui suggère que les plantes pourraient influencer le niveau énergétique de la cellule (**Huang et al., 2019**) et ceci révèle une nouvelle fois les capacités inépuisables des plantes.

L'objectif principal de ce travail est la valorisation de la flore algérienne et plus particulièrement des espèces de la région des Aurès. Ainsi, une espèce en particulier fait l'objet de cette étude. Cette espèce endémique s'appelle *Centaurea tougourensis* 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* et *in vivo* afin de déceler les propriétés biologiques de cette espèce.

La parties bibliographique sera subdivisé en deux chapitre :

Un premier chapitre sera consacré à la description du genre *Centaurea*, sur le plan morphologique, génétique, chimique et pharmacologique et au soulignement des divers travaux et avancées scientifiques réalisés sur les espèces du genre *Centaurea*.

Le deuxième chapitre s'intéresse à l'étude des propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires des plantes, principalement des polyphénols, des quinones, des terpénoïdes, des alcaloïdes, des hétérosides cardiotoniques et des glucosinolates.

L'étude expérimentale sera subdivisée en deux volets :

Le premier volet dit matériel et méthodes, décrira la zone où la plante a été récoltée, ensuite le procédé utilisé lors de l'extraction et l'obtention des diverses fractions et également

Introduction générale

l'approche phytochimique qui servira à l'identification des divers composés bioactifs de la plante notamment la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS), ainsi qu'une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

L'évaluation du potentiel pharmacologique de *C. tougourensis* sera faite par des tests *in vitro* et *in vivo*.

Le test Anova sera utilisé lors du traitement statistique des divers résultats obtenus et ceci à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Le deuxième volet sera consacré pour les résultats et la discussion, dans lequel seront exposés tous nos résultats aux moyens de tableaux et graphiques, interprétés et discutés.

Enfin, ce travail sera clôturé par une conclusion générale avec des perspectives envisagées pour permettre de poursuivre ce travail et d'explorer de nouvelles voies.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Données actuelles sur l'espèce
Centaurea tougourensis
Boiss. & Reut.

1. Famille des Astéracées

1.1. Position systématique

Les Astéracées sont l'une des plus grandes familles des Angiospermes et tiennent une place très importante dans le règne végétal. À elle seule, regroupe plus de 23600 espèces réparties entre 1620 genres ainsi que 13 autres sous familles (**Bremer, 1994**). Les deux principales sous familles sont respectivement Asteroideae et Cichorioideae, et c'est le Botaniste allemand «Paul Dietrich Giseke» qui a été le premier à avoir décrit les Astéracées en 1792.

D'après les botanistes, le genre *Senecio* est le plus prédominant en qualité de nombre d'espèces dans cette famille avec plus de 1500 espèces, suivi de *Vernonia* (1000 espèces) puis *Cousinia* (600 espèces) et enfin *Centaurea* (600 espèces). Et, en Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (**Harbone et Swain, 1969**).

1.2. Caractéristiques botaniques

Les membres de cette famille se caractérisent par des tiges de forme cylindrique et velue, pouvant être épineuses ou sans. Leurs feuilles peuvent être alternes ou opposées, leur capitule peut être homogame ou bien hétérogame. Leur ligulée tubulaire comprend cinq lobes. Enfin, les racines sont pivotantes et fibreuses (**Crouse et al., 1980**).

1.3. Répartition géographique

Comme représentée dans la **Figure 1**, la distribution des Astéracées s'étend des régions subpolaires jusqu'aux régions tropicales et subtropicales du globe (**Barreda et al., 2015**). Ce sont des plantes à majorité herbacées mais cette famille peut également comprendre des arbres, des arbustes, ou des lianes (**Fiz et al., 2002**).

La majorité des espèces de cette famille peuvent soit vivre dans les endroits humides, elles sont alors qualifiées d'hydrophytes, ou bien dans les lieux secs et désertiques d'où l'appellation xérophyte (**Rivera et al., 2017**).

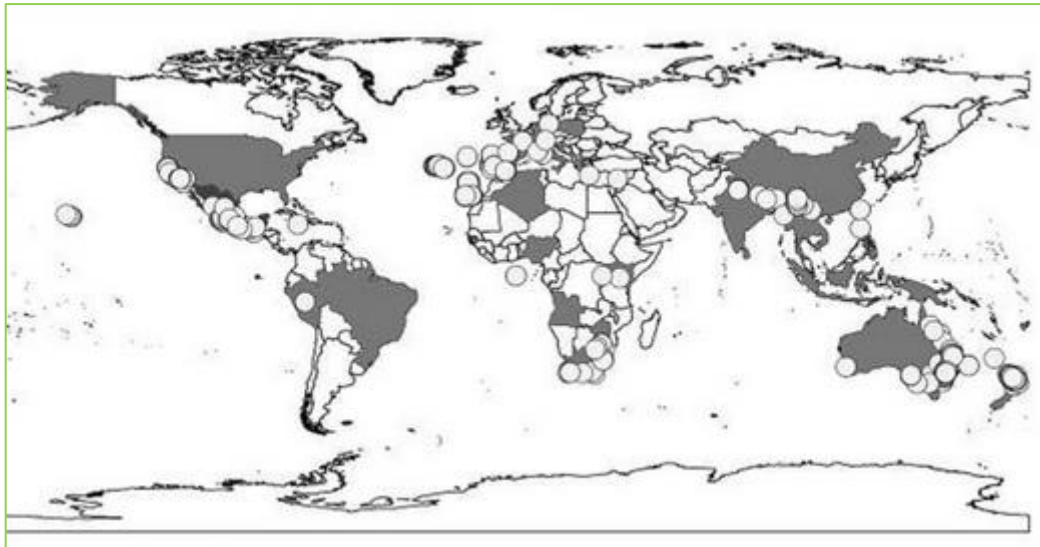


Figure 1. Répartition géographique des Astéracées dans le monde (marquée avec des cercles) (Chikov, 1983).

2. Espèces du genre *Centaurea*

2.1. Caractéristiques botaniques

Les espèces de ce genre ont beaucoup de points en commun avec les chardons et les cirses, ainsi il est très important de s'appuyer sur l'ouvrage de **Mabberley (1987)** décrivant en détail les caractéristiques botaniques des espèces du genre *Centaurea*. Ainsi d'après ce chercheur, les *Centaurea* seraient des herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces possédant des feuilles à épines faibles et peu piquantes. Leurs fleurs sont toutes des tubules, multiflores en cinq lobes et leur couleur vire le plus souvent au violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Les aigrettes de leurs fleurs centrales, peuvent être à soit lisses ou bien à dents courtes. En revanche, les bractées sont le plus souvent inégales, ou bien terminées par une formation différenciée qui porte une épine pectinée. La *centaurée* est une plante qui demande peu d'entretien, elle pousse dans des sols pauvres, secs, voire rocailloux.

2.2. Caractéristiques génétiques

Il est très intéressant de constater que le nombre de chromosomes de base des espèces du genre *Centaurea* est de $x=9$ et que la plupart des populations dénombrées sont soit diploïdes ($2n=18$) ou bien tétraploïdes ($2n=36$) (**Mráz et al., 2012**). Cependant, dans quelques exceptions, certaines espèces du genre *Centaurea* ont un nombre hexaploïdes ($2n=54$) telles que *C. Carystea* et *C. Cithaeronea* (**Trigas et al., 2008 ; Martin et al., 2009**) et d'autres travaux ont même montré un nombre divergent de chromosomes ($x=11$) chez d'autres espèces de *Centaurea* telles que *C. Subtilis* et *C. Exarata* (**Garcia-Jacas et al., 2006 ; Hilpold et al., 2009**) (**Figure 02**).

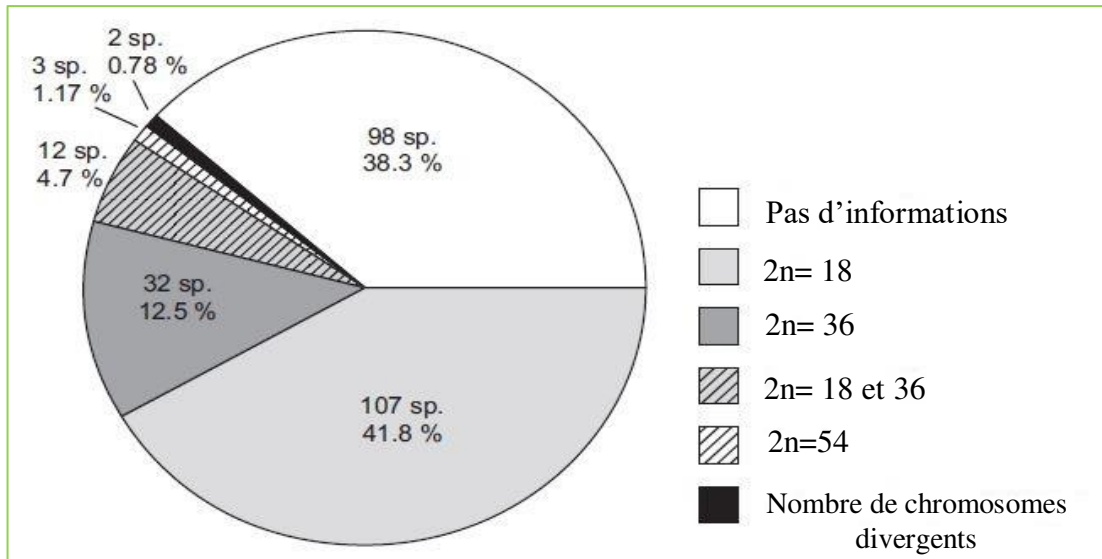


Figure 2. Caractéristiques génétiques des espèces du genre *Centaurea* (Requena *et al.*, 2020).

2.3. Répartition géographique

Plus de 600 espèces de plantes herbacées composent le genre *Centaurea* et leur distribution est principalement centrée au niveau de la région méditerranéenne et l'Asie de l'ouest. Et comme le montre la **Figure 3**, beaucoup d'espèces de ce genre sont rencontrées en Espagne, Italie, Turquie, Roumanie et quelques unes en Algérie et au Maroc (Hilpold *et al.*, 2014). A noter également que le nom et le nombre d'espèces rencontrées sont également indiqués dans la **Figure 3**.

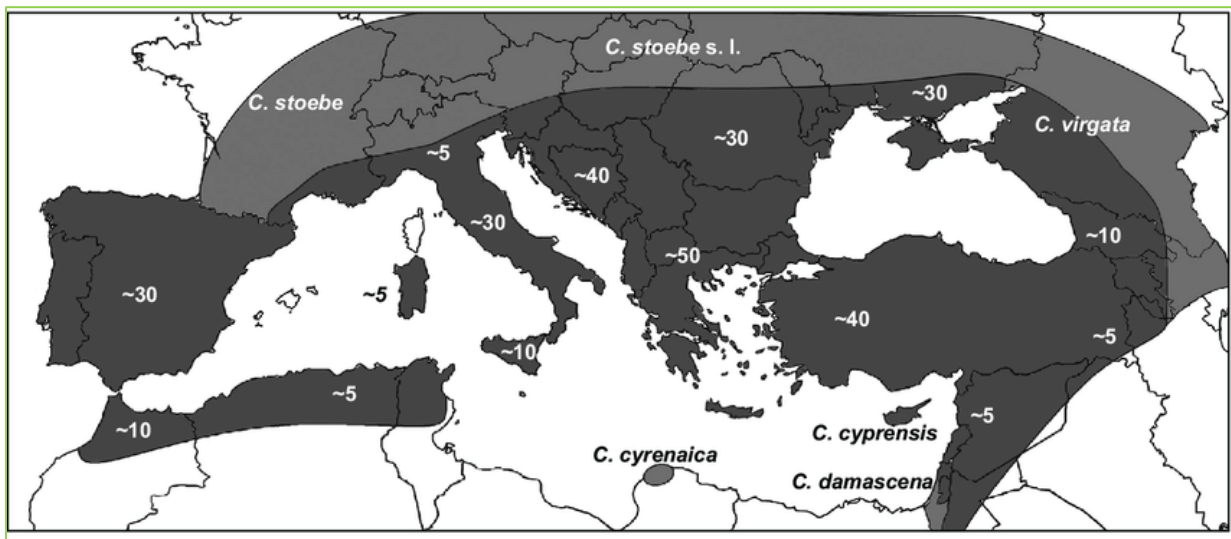


Figure 3. Principaux secteurs de distribution des espèces du genre *Centaurea* dans le monde (Hilpold *et al.*, 2014). Les zones en gris foncé représentent les zones avec plus d'une espèce présente, celles en gris clair une seule espèce est présente.

2.4. Caractéristiques phytochimiques

Les espèces du genre *Centaurea* sont très riches en tannins, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes, saponines et stéroïdes et ceci sur les divers extraits évalués (**Milošević et al., 2013 ; Trendafilova et al., 2015 ; Zater et al., 2016 ; Baatouche et al., 2019**). Ainsi, plusieurs études ont été menées sur des espèces *Centaurea* endémiques de l'Algérie.

Depuis 1977 jusqu'à 2018, ces études ont montré qu'elle était constituée de 41% de flavonoïdes, suivie de 38% de sesquiterpènes lactones, de 9% d'acides phénoliques, de 4% de triterpénoïdes et de 9% d'autres constituants (**Dittrich et al., 1977 ; Battandier, 1989 ; Susanna et Garcia-Jacas, 2007 ; Ayad et Akkal, 2019**).

2.5. Usages traditionnels

D'après les historiens, la première apparition du terme *Centaurea* remonte à l'antiquité et plus précisément à la Grèce antique où cette plante avait guéri un soldat qui avait reçu une flèche empoisonnée (**Gledhill, 2008**).

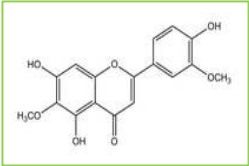
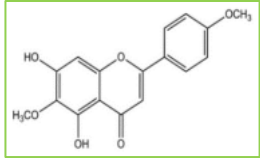
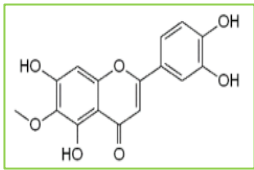
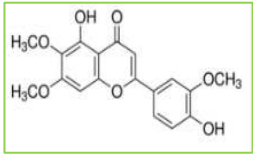
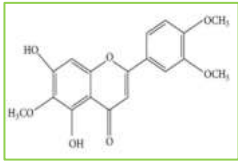
Ainsi, au cours des années, de nombreuses études menées sur les espèces du genre *Centaurea* ont démontré leurs potentiels pharmacologiques, et ceci serait du en partie à la richesse de ces espèces en composés bioactifs naturels. Ainsi les *Centaurea* sont très utilisées en médecine traditionnelle pour soigner les hémorroïdes, la constipation, les abcès, les plaies, les saignements des gencives, le rhume, le traitement de la jaunisse et les calculs rénaux et posséderaient même des propriétés diurétiques (**Benarba et al., 2015 ; Carvalho et al., 2018 ; Michel et al., 2020**).

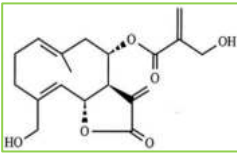
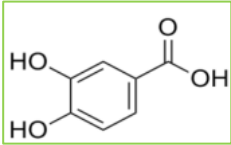
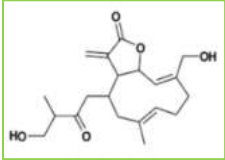
Dans les pays asiatiques, les *Centaurea* sont préparées comme infusion afin d'aider à se relaxer, et à diminuer le stress et l'anxiété (**Yeung et al., 2012**). Ces plantes améliorent même la digestion et éventuellement soutenant les réactions enzymatiques au niveau du foie (**Köse et al., 2016**) et aident à la résistance contre les infections (**Rusak et al., 1991**). Les *Centaurea* ont également prouvé leurs potentiels antioxydant, immunomodulateur, anti-inflammatoire, antidiabétique et antimicrobien (**Chuclá et al., 1988 ; Koca et al., 2009 ; Csupor et al., 2011 ; Naeim et al., 2020**).

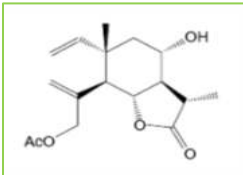
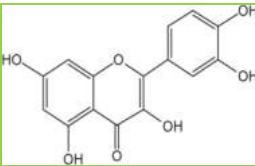
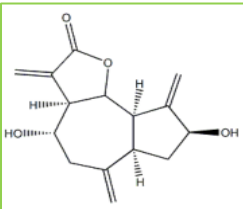
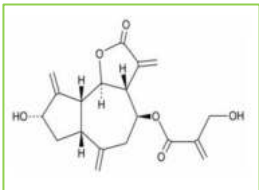
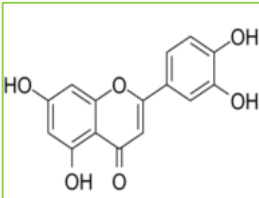
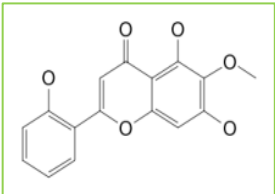
Des études récentes (**Dimkić et al., 2020 ; Nasr et al., 2020**) ont montré que le *Centaurea* serait capable d'inhiber la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses, ce qui ouvre la porte à de nombreuses voies thérapeutiques. Une autre étude récente a même montré qu'elles pourraient être utilisées comme insecticides (**Khanavi et al., 2011**).

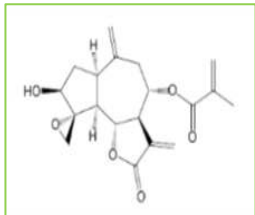
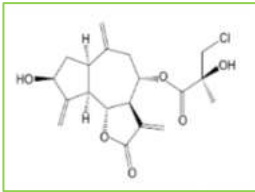
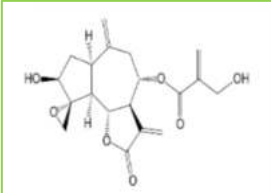
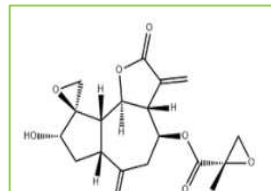
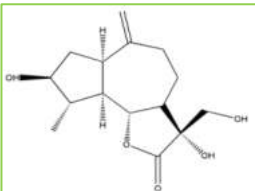
Le **Tableau 1** récapitule les composés bioactifs identifiés de quelques espèces du genre *Centaurea tougourensis* au cours de ces dernières années ainsi que leurs effets pharmacologiques résultants.

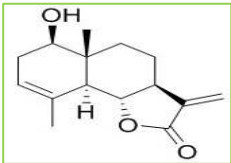
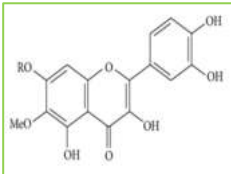
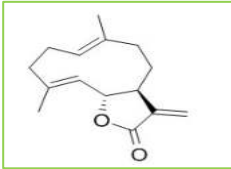
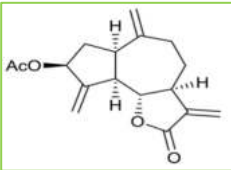
Tableau 1. Récapitulatif des composés identifiés de quelques espèces du genre *Centaurea* avec leurs propriétés pharmacologiques.

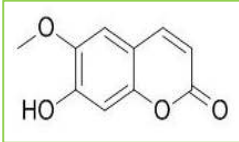
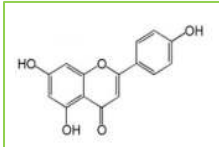
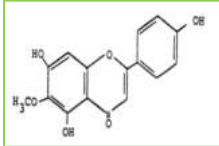
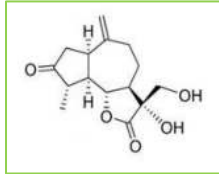
Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. sulphurea</i>	Pectolarigenine		➤ Activité anti-inflammatoire	Belcacem <i>et al.</i>, 2014
	Népétine		➤ Activité anti-ulcéreuse	Kabouche <i>et al.</i>, 2011
	Jaceosidine		➤ Activité cytotoxique	Rodrigo <i>et al.</i>, 2010
	Cirsilineol		➤ Activité antioxydante	Gianguaspero <i>et al.</i>, 2009
	Eupatiline		➤ Activité antivirale	Hinderer et Seitz, 1998

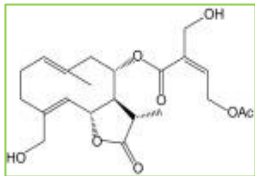
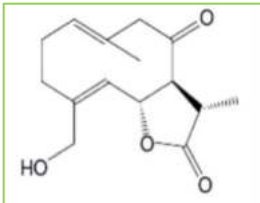
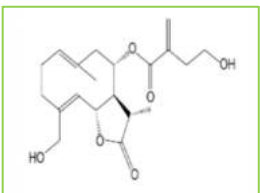
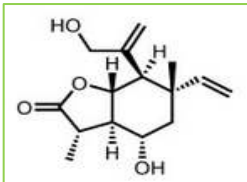
Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. melitensis</i>	Onopordopicrine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antioxydante 	<p>Monjane <i>et al.</i>, 2018</p>
	Acide Protocatéchique		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antiparasitaire ➤ Activité cytotoxique 	<p>Semaming <i>et al.</i>, 2015</p> <p>Ayad <i>et al.</i>, 2012</p>
	Arctiopicrine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité anti-hyperglycémique ➤ Activité anti-inflammatoire 	<p>Lonergan <i>et al.</i>, 1992</p>

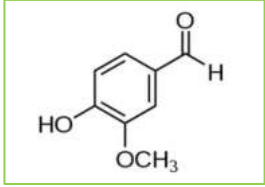
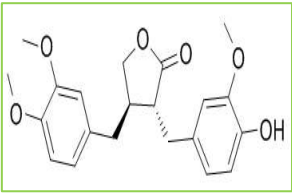
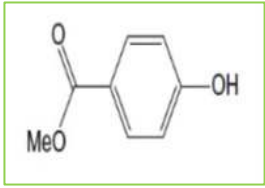
Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. omphalotricha</i>	5-Acétyl melitensine		➤ Activité neuroprotéctrice	Xu et al., 2019
	Quercétine		➤ Activité antioxydante	Anand David et al., 2016
	Desacylcynaropicrine		➤ Activité anti-inflammatoire	Ansar et al., 2016
	Sauprine		➤ Activité anti-cancéreuse	Hohmann et al., 2016
	Lutéoline		➤ Activité hépatoprotéctrice	Kolli et al., 2012
	Tenaxine II			Mouffok et al., 2012

<i>Espèces de Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. musimomum</i>	19-Deoxyrepine		➤ Activité cytotoxique	Shakeri <i>et al.</i>, 2018
	Linichlorine B		➤ Activité anti-inflammatoire	Zhao <i>et al.</i>, 2017 Saklani <i>et al.</i>, 2012
	Janerine		➤ Activité immunomodulatrice	Mouffok <i>et al.</i>, 2012 Muhammad <i>et al.</i>, 2003
	Repine		➤ Activité antidiabétique	López-Rodríguez <i>et al.</i>, 2009 Medjroubi <i>et al.</i>, 2005
	Cynaratriol			Akbar <i>et al.</i>, 1995

Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. acaulis</i>	Santamarine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activités antitumorales 	<p>Jalal <i>et al.</i>, 2020</p>
	Patulitrine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité anti-inflammatoires 	<p>Krzyzaniak <i>et al.</i>, 2017</p>
	Costunolide		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité insecticide 	<p>Coronado-Aceves <i>et al.</i>, 2016</p>
	Costunolide		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antioxydante 	<p>Bentamène <i>et al.</i>, 2005</p>

Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. maroccana</i>	Scopolétine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antioxydante 	Salehi <i>et al.</i> , 2019
	Apigénine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité photoprotectrice 	Bicha <i>et al.</i> , 2013
	Hispiduline		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Régulateur de la transcription de l'ADN et des facteurs de croissances (GH) 	Min <i>et al.</i> , 2009
	11,13-Dihydro-mélitensine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antimicrobienne 	Djeddi <i>et al.</i> , 2007 Joseph <i>et al.</i> , 2003

Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. pullata</i>	11 β ,13-Dihydro-salonitenolide		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antimicrobienne 	<p>Gyovai <i>et al.</i>, 2018</p> <p>Peng <i>et al.</i>, 2017</p>
	8-Oxo-15-hydroxygermacra-1(10), E, 4Z-dien-11 β H-12,6 α -olide		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antiproliférative ➤ Activité androgénique 	<p>Zhao <i>et al.</i>, 2014</p> <p>Storbeck <i>et al.</i>, 2013</p>
	11 β ,13-Dihydro-19-deoxycicine		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité antituberculeuse 	<p>Djeddi <i>et al.</i>, 2008</p>
	Mélitensine			<p>Benayache <i>et al.</i>, 1992</p>

Espèces de <i>Centaurea</i>	Composés identifiés	Structure	Activités biologiques	Références bibliographiques
<i>C. diluta</i>	Vanilline		➤ Activité antioxydante	Arya et al., 2021
	Arctigénine		➤ Activité anticancéreuse ➤ Activité antimicrobienne	Bezerra et al., 2016 Tai et al., 2011
	Paridole		➤ Activité neuroprotéctrice	Santosh Kumar et al., 2002

3. *Centaurea tougourensis*

3.1. Classification taxonomique

La classification taxonomique de l'espèce *C.tougourensis* est représentée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Classification taxonomique de *Centaurea tougourensis*.

Embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Astéracées
Sous famille	Tubuliflores
Tribu	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>Tougourensis</i>

3.2. Description botanique

Comme précédemment décrit par **Quezel et Santa. (1963)** ; les plantes sont ligneuses à la base, mesurant de 30 jusqu'à 40 cm. Elles sont cendrées-pubescentes. Les tiges sont rameuses. Les rameaux sont rigides, les feuilles sont pinnatilobées à lobes linéaires ; non décurrentes sur la tige. Les capitules sont petits de 5-10 mm de largeur sur 15 mm de long.

Les fleurs sont de couleur jaunâtre. Les bractées sont munies de nervures très apparentes. Les appendices des bractées ont une partie scarieuse-blanchâtre très marquée possédant 10-14 laciniures. L'Aigrette est trois fois plus courte que l'akène, l'interne est semblable à l'externe (**Barreda et al., 2012 ; Elomaa et al., 2018**).

3.3. Répartition géographique

C'est une espèce qui se rencontre dans les rocailles, aux Aurès, à Djebel Toumour, Djebel Guethiane, Guadoust. Elle est endémique Algérienne (**Figure 4**). En effet, la plupart des espèces du genre *Centaurea* se répartissent principalement dans les régions de la Méditerranée (**Hardy et al., 2014**), telles que l'Espagne, l'Italie, le Maroc, la Turquie jusqu'aux pays de l'Asie occidentale telles que l'Égypte, l'Irak, le Yémen et certains pays du Golf tels que l'Arabie saoudite et le Qatar (**Font et al., 2009**). Ce qui témoigne une fois de plus la caractéristique des espèces du genre *Centaurea* à s'adapter à différentes conditions environnementales.



Figure 4. Répartition géographique de l'espèce *Centaurea tougourensis* en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

3.4. Travaux chimiques antérieurs réalisés sur *Centaurea tougourensis*

Deux travaux réalisés sur l'espèce *C. Tougourensis* ont permis d'isoler et d'identifier certains composés, ainsi **Nacer et ses collaborateurs. (2006)** ont isolé six composés à partir des extraits d'acétate d'éthyle et de dichlorométhane en utilisant l'approche RMN (^1H et ^{13}C). Ces composés étaient : 5-hydroxy-6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone (3'-O-méthyleupatorine), 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-diméthoxyflavone (jaceosidine), 5,7,3',4'-tétrahydroxy-6-méthoxyflavone (nepetine), 5,7-dihydroxy-6,3',4'-triméthoxyflavone (eupatiline), 5,7,4'-trihydroxyflavone (apigénine), 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone (kaempferol) respectivement.

En 2012, ces mêmes chercheurs ont identifié par la suite 4 Sesquiterpènes lactones, le 1^{er} composé était : 8a-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-dehydromélitensine, le 2^{ème} composé était: cnicine, le 3^{ème} composé était:(6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3, 4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-15-acétoxy-helianga 1(10), 4(5), 11(13) trien-6-olide et enfin le 4^{ème} composé était : (6R, 7R, 8S, 30R) 8a-(3, 4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-15-oxo-helianga 1(10), 4(5), 11(13) triene-6-olide.

Chapitre 2

Chapitre 2

*Propriétés pharmacologiques
des métabolites secondaires des plantes*

Introduction

Les métabolites secondaires, sont produits par divers organismes vivants, incluant les bactéries, champignons et plantes. Ces composés présentent d'importantes variations structurelles et physiologiques (Peters *et al.*, 2019), par conséquent, présentent un large éventail d'activités biologiques et permettant ainsi aux plantes d'occuper une place importante dans notre écosystème (Shen *et al.*, 2019). Ceci explique, en partie les raisons pour lesquelles l'utilisation actuelle des métabolites secondaires est privilégiée dans diverses applications industrielles et pharmaceutiques (Vaishnav et Demain, 2011). En raison de leurs diversités structurelles, les métabolites secondaires végétaux peuvent être classés en quatre grandes familles : polyphénols, terpénoïdes, alcaloïdes et composés soufrés.

Parmi ces métabolites, certains sont dotés d'activités biologiques marquées par énormément de propriétés pharmacologiques et de vertus thérapeutiques et il s'agit de polyphénols en général et de toute une panoplie de terpénoïdes et d'alcaloïdes.

1. Propriétés pharmacologiques des plus importantes classes de polyphénols

1.1. Acides phénols

Il s'agit des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Valanciene *et al.*, 2020). Ils ont une structure de base de type C6-C3 (Figure 5). Les composés phénoliques peuvent comprendre soit un acide phénolique ou bien plusieurs, on parle alors de polyphénols (Moodley *et al.*, 2014). La plupart des composés phénoliques des plantes sont synthétisés par voie de phénylpropanoïde (Hollman, 2001). Mais, d'autres composés peuvent également être synthétisés par la voie de l'acide shikimique qui aboutit à la formation de phénylpropanoïdes et l'acide acétique (Sánchez-Moreno, 2002). L'acide hydroxybenzoïque est considéré comme l'acide phénolique le plus abondant dans la nature.

Les acides phénoliques sont très connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et ceci serait dû à leurs groupes hydroxyles et cycles phénoliques (Kumar et Goel, 2019). Parmi ces acides phénoliques, on trouve l'acide rosmarinique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide gallique et l'acide coumarique qui ont montré un effet anti-oxydatif très significatif que ce soit dans les modèles *in vitro* ou bien *in vivo* (Kiokias *et al.*, 2020), ce qui explique pourquoi ces composés entre dans la composition de beaucoup de médicaments.

De nombreux travaux (Lutz *et al.*, 2019 ; Ali *et al.*, 2020) indiquent que la prise des acides phénoliques comme compléments alimentaires pourrait entraîner une diminution significative des risques de maladies cardiovasculaires. Ainsi, une étude a montré que les personnes recevant des solutions à base d'acide phénolique avaient un niveau très bas de bio-marqueurs

du développement de l'activation plaquettaire des maladies cardiovasculaires (**Thompson et al., 2017**).

Une autre étude a même montré que ces composés avaient un effet hypolipidémique très important (**Monika et al., 2015**), ce qui explique le potentiel de ces composés en tant qu'agents anti-obésité.

Les dernières avancées scientifiques suggèrent que les acides phénoliques auraient des propriétés anticancéreuses non négligeables en régulant la balance entre la prolifération et l'apoptose cellulaire (**Kiokias et al., 2020**) et favoriseraient même les mécanismes de réparation de l'ADN (**Carranza-Torres et al., 2019**).

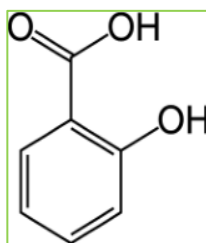


Figure 5. Structure de base des acides phénoliques (**Valanciene et al., 2020**).

D'autres études ont démontré que les acides phénoliques ont des propriétés anti-allergiques non négligeables en inhibant la synthèse de l'histamine et la sérotonine, principalement via une inhibition de la transcription de la protéine activatrice 1 (AP-1) (**Kiokias et al., 2020**), ce qui contribue grandement à la régulation du processus inflammatoire, à la différenciation cellulaire ainsi qu'à la prolifération cellulaire (**Ding et al., 2018**).

Il a également été démontré par **Kaczmarek. (2020)** que les acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide tannique sont des inhibiteurs puissants et sélectifs de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). L'effet anti-viral des acides phénoliques a également été observé contre les virus de l'hépatite B, de l'hépatite C, ainsi que celui de l'herpès simplex et de la grippe (**Wu et al., 2017**).

Plusieurs maladies chroniques ont pu être maîtrisées grâce aux acides phénoliques, surtout celles liées au diabète en favorisant la libération d'insuline par les îlots pancréatiques, en augmentant aussi l'utilisation du glucose dans les muscles et en inhibant la production de glucose par le foie (**Pieczkolan et al., 2021**). Une autre étude a montré que ces composés pourraient aussi prévenir le développement des maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer en empêchant des changements chimiques anormaux au niveau des microtubules, surtout ceux de la protéine monomérique Tau, afin de permettre une communication synaptique optimale entre les neurones (**Shahidi et Yeo, 2018**). Les acides phénoliques

pourraient également être de bons candidats pour le traitement des tumeurs cérébrales car il a été démontré qu'ils peuvent supprimer la viabilité cellulaire, la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse des cellules tumorales, surtout celles affectant de type gliales (**Szwajgier et al., 2017**).

Cette classe de composés bioactifs fournirait également une protection non négligeable aux lipoprotéines de basse densité (LDL) contre le stress oxydatif (**Horvat et al., 2020**) mais, elle protégerait également le col de l'utérus contre le cancer et ceci a été prouvé contre la lignée cellulaire tumorale utérine appelée HeLa en accélérant l'effet de l'apoptose et/ou de la nécrose sur cette lignée cancéreuse (**Khacha-ananda et al., 2013**).

1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques clés omniprésents parmi les plantes vasculaires et on compte aujourd'hui pas moins de 8000 composés flavonoïdes et beaucoup d'entre eux restent encore non étudiés (**Tsao, 2010**). Du point de vue structural, un flavonoïde se compose de 15 atomes de carbone disposés en trois anneaux (C6 – C3 – C6) (**Xu et al., 2017**) (**Figure 6**), et il est très important de noter que la plupart des flavonoïdes sont naturellement conjugués à un ou plusieurs sucres, ils peuvent être caractérisés comme monoglycosidiques, diglycosidiques ou plus (**Pretorius, 2003**).

D'après la littérature, les flavonoïdes sont en premier lieu associés aux activités antioxydantes (**Kumar et Pandey, 2013**) grâce à leur capacité à inhiber ou à limiter la formation des radicaux libres tels que les espèces réactives à l'oxygène (ROS) ou bien d'empêcher la peroxydation lipidique (**Pietta, 2000**) et la quercétine est le meilleur exemple pour illustrer le pouvoir antioxydant des flavonoïdes. Leurs capacités à moduler les fonctions enzymatiques à l'échelle cellulaire et moléculaire, leurs a permis d'acquérir des propriétés anti-inflammatoire, hépatoprotéctive et anti-mutagène remarquables (**Chen et al., 2014 ; Panche et al., 2016 ; Jucá et al., 2020**).

Grâce au progrès de la biotechnologie microbienne, les chercheurs ont également pu comprendre le mécanisme d'action de plusieurs virus, surtout à l'échelle moléculaire et ainsi pu mettre des stratégies plus concrètes afin de les contrer (**Cao et al., 2015**).

L'industrie pharmaceutique a bien compris le potentiel pharmacologique des flavonoïdes et considère cette classe comme prioritaire pour entrer dans la composition des médicaments (**Havsteen, 2002**). D'autant plus que les flavonoïdes sont facilement assimilables et absorbables par l'intestin humain et grâce à leurs propriétés physico-chimiques remarquables telles que la lipophilicité (**Végh et al., 2018**). Ces composés peuvent ainsi franchir la membrane plasmique et atteindre leurs cibles aisément.

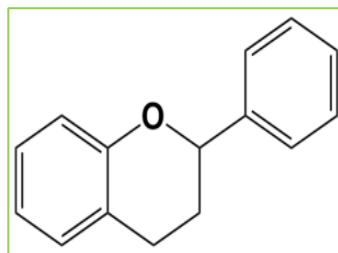


Figure 6. Structure de base des flavonoïdes (Xu *et al.*, 2017).

Cette classe de métabolites secondaires semble également agir au niveau du système nerveux central (SNC) en se liant au site de la benzodiazépine sur le récepteur GABA(A), ce qui se traduit par une inhibition de la monoamine oxydase A ou B, agissant ainsi comme antidépresseurs ou antiparkinsoniens (Rebas *et al.*, 2020), ce qui suggère que les flavonoïdes peuvent être considérés comme de bons candidats dans le traitement des maladies neurodégénératives. Cet effet neuroprotecteur se traduit également par la diminution du stress oxydatif ce qui empêcherait le développement d'autres maladies neurologiques telles que l'épilepsie (Diniz *et al.*, 2015). Ce qui explique pourquoi les flavonoïdes sont actuellement consommés en grande quantité dans l'alimentation quotidienne.

Il est également très intéressant de constater que les flavonoïdes sont la plus grande classe de polyphénols végétaux et il a été démontré dans plusieurs études que de multiples voies liées aux maladies humaines, notamment les cancers, les maladies neurologiques, le diabète et les maladies infectieuses, sont régulées de manière significative par les flavonoïdes (Jucá *et al.*, 2020).

Sur le plan immunologique, cette classe de polyphénols jouerait également un rôle majeur, ainsi, il a été démontré que le flavan-3-ols pourrait être un bon candidat dans le traitement de la régulation de l'activité des lymphocytes. Mais, il contribuerait aussi grandement dans la thérapie cellulaire afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe (Hosseinzade *et al.*, 2019), et en limitant / évitant une éventuelle situation de rejet lors de la greffe des cellules, et ceci a été démontré chez le modèle animal mais également chez l'être humain (Mendes *et al.*, 2019).

Il a également été rapporté que les flavonoïdes ont un bon effet cardioprotecteur en empêchant le développement de certaines pathologies qui touchent le cœur et les vaisseaux sanguins telles que l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et même quelques troubles multisystémiques cellulaires (Testai *et al.*, 2013). D'après les scientifiques, la relation entre le fragment de constitution chimique de cette classe de métabolites secondaires, notamment les différentes chaînes latérales qui la composent,

influenceraient les effets biologiques des flavonoïdes. Cette classe de polyphénols préviendrait même l'apparition de l'ulcère gastrique et duodéal en activant plusieurs mécanismes anti-inflammatoires (**Zahran et al., 2021**).

Parmi les flavonoïdes, on retrouve les anthocyanes qui sont des composés polyphénoliques glycosylés considérés par les botanistes comme des pigments naturels donnant ainsi aux fleurs de diverses couleurs pouvant aller d'un orange rougeâtre jusqu'au bleu persan (**Castañeda-Ovando et al., 2009**). Plus de 600 anthocyanes ont été isolées jusqu'à présent à partir de diverses espèces végétales et reposent sur une seule structure centrale de base, l'ion flavyllium. Ainsi, l'anthocyane est dérivée du flavonol et a la structure de base de l'ion flavyllium, c'est-à-dire un manque d'oxygène cétonique en position 4 (**Pervaiz et al., 2017**). Les anthocyanes les plus rencontrées dans la nature sont la pélagonidine, la cyanidine et la delphinidine (**Jaakola, 2013**).

Les anthocyanes génèrent divers effets pharmacologiques, mais les plus importants semblent être d'ordre antioxydant et cardioprotecteur (**Liobikas et al., 2016 ; Khoo et al., 2017**).

Les anthocyanes exercent également un effet anti-angiogénique important empêchant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins susceptibles d'irriguer les tumeurs cancéreuses (**Joshua et al., 2017**) et contribueraient également de manière significative à réguler la tension artérielle (**Huang et al., 2020**).

Ces composés semblent également intervenir comme agent antidiabétique via une régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline-glucose ainsi leurs transporteurs (GLUT) (**Les et al., 2021**). Les anthocyanes préviendraient même l'apparition de l'arthrose et de certains types de cancer telsque le cancer gastro-intestinal (**Wang et Stoner, 2008**). Une étude récente (**Zheng et al., 2020**) a même montré que les anthocyanes ont un effet photoprotecteur protégeant ainsi le derme contre les rayons ultraviolets (UV).

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté que les anthocyanes sont très efficaces dans le traitement des cancers qui affectent le tractus gastro-intestinal, surtout de type colorectal et intestinal en s'opposant à la croissance tumorale entre la phase S et la phase G2 du cycle cellulaire (**Kocic et al., 2011**). Ainsi, un effet de cytotoxicité très important a été exercé par ces composés sur plusieurs types de cellules tumorales, telles que celles du côlon (HT-29), du sein (MCF-7), du poumon (A549) et les cellules de la leucémie (HL-60) (**Thibado et al., 2018**).

Chez le modèle murin, les chercheurs ont expliqué cet effet cytotoxique, par la capacité des anthocyanes à activer le processus de phosphorylation d'un complexe enzymatique impliqué dans la propagation de la réponse cellulaire à l'inflammation (**Szymanowska et al., 2018**). Ce complexe est appelé I κ B kinase α (I κ B α), et son activation a pour effet de stimuler une voie de signalisation clé, appelé NF- κ B, afin de renforcer l'immunorégulation des lymphocytes (**Santamarina et al., 2021**). Les effets résultants seraient une augmentation significative de la libération de cytokines pro-inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF), ou l'interleukine-1 (IL-1), afin de reconnaître et de détruire les cellules tumorales (**Chen et al., 2021**).

Les anthocyanes semblent également protéger l'intégrité des cellules endothéliales qui tapissent les parois des vaisseaux sanguins et permettent aussi l'amélioration des fonctions cognitives et d'autres fonctions du système nerveux telles que les performances de la mémoire mais également les performances motrices (**Henriques et al., 2020**). Les anthocyanes préviendraient également le développement de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (MP) et la maladie d'Alzheimer (MA) en réduisant le stress oxydatif exercé sur les cellules nerveuses et en améliorant la fonction mitochondriale, ce qui éviterait aussi un AVC ischémique (**Wen et al., 2020**). Chez le modèle ischémique murin, une administration quotidienne d'anthocyanes a permis la réduction de la production des radicaux libres de type ROS, ce qui diminue considérablement l'apoptose induite par les plaques amyloïdes (A β) ainsi que la peroxydation lipidique et une diminution des niveaux de Ca²⁺ intracellulaires. Les chercheurs ont également noté une récupération progressive de la capacité d'apprentissage et de mémoire chez ces souris (**Cásedas et al., 2020**).

Les anthocyanes sont aussi utilisées dans le traitement de certains types d'ulcères et de d'autres troubles associés à l'inflammation tels que la colite, les maladies parodontales, la maladie de la Peyronie, le reflux laryngopharyngé, ainsi que la réponse inflammatoire postprandiale (**Kim et al., 2011**). Cet effet anti-inflammatoire des anthocyanes serait dû en partie à leurs capacités à diminuer la production des cytokines et des enzymes pro-inflammatoires ainsi que des médiateurs lipidiques et des médiateurs vasoactifs (**Valenza et al., 2018**).

1.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques complexes, solubles d'origine végétale et peuvent être soit de nature hydrolysable ou bien condensée (**Figure 7**) en polymères de

longueur variable (**Okuda et Ito, 2011**). Ces composés sont généralement utilisés pour le tannage des peaux animales ou la précipitation de protéines (**Pizzi, 2019**).

On retrouve les tannins au niveau des bourgeons, des feuilles, des tiges, des fruits, des graines, des racines et des plantes et même au niveau du bois des arbres (**Haslam, 1996**). D'un point de vue écologique, les tannins sont stockés dans l'écorce des arbres et les aident ainsi à se protéger contre les infections causées par les bactéries ou les champignons pathogènes et même contre les parasites (**Cowan, 1999**).

Les plantes riches en tannins sont très utilisées dans la médecine traditionnelle indienne comme décoction afin de guérir certains types de dysenterie (**Hussain et al., 2019**), et également pour renforcer les gencives (**Bedran-Russo et al., 2009**).

L'ayurvéda est une plante très riche en composés tannins et sans aucun doute le meilleur exemple pour illustrer les propriétés pharmacologiques remarquables des tannins. Ainsi, les tannins posséderaient des activités antioxydantes (**Hoet et al., 1999**) et anticancéreuses (**Gomes de Melo et al., 2010**) mais surtout pour leurs propriétés pro-coagulantes et les divers tests utilisant le sang humain ou bien de cobayes de laboratoire le confirment (**Deng et al., 2019 ; Chung et al., 1998**). Et d'après les archives médicales indiennes; lorsqu'on applique une solution de tannins sur une petite plaie ouverte, il se forme très rapidement une couche protectrice (**Su et al., 2016**) ralentissant ainsi le processus de saignement.

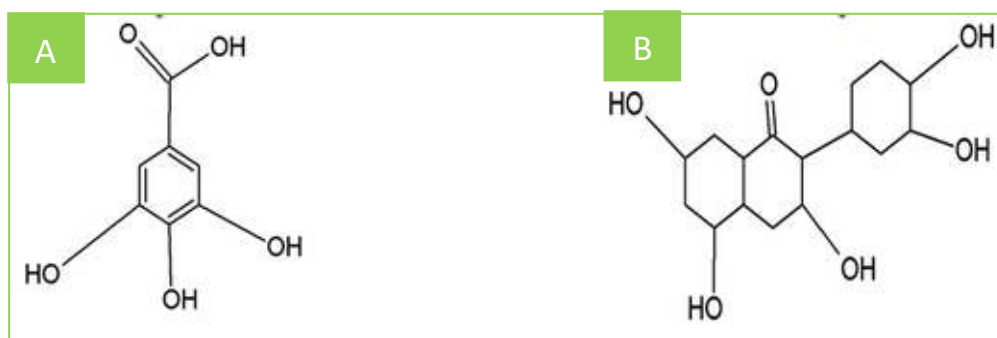


Figure 7. Structure de base des tanins (A): acide gallique constituant principal des tanins hydrolysables ; (B) : unité constitutive de base des tanins condensés (**Okuda et Ito, 2011**).

Certaines études menées sur les tannins, ont montré que la consommation régulière d'infusion à base de tannins pourrait considérablement réduire les incidences liées au cancer de l'estomac et du poumon, et ceci chez les individus des deux sexes (**Rajasekar et al., 2021**). En effet, les chercheurs ont expliqué ceci par la capacité de cette classe polyphénolique à inhiber la promotion tumorale induite par le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Des effets comparables ont été observés chez des souris soumises à des rayons ultraviolet (UV) ou

l'application de pommade à base de tannins a réduit de manière très significative le développement de tumeur cutanée (Son *et al.*, 2018).

Il est également très intéressant de constater que les tannins condensés sont très actifs contre plusieurs souches microbiennes et ceci à très faible concentration. Ainsi, il a été rapporté que les tannins inhiberaient la prolifération bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Shigella dysenteriae* et *Salmonella senftenberg* (Sieber *et al.*, 2020). Ce qui explique pourquoi les tannins sont utilisés dans l'élaboration de plusieurs bactéricides. Les tannins inhiberaient également la croissance de plusieurs champignons pathogènes, susceptibles d'endommager la production agricole des fermiers, tels que *Chaetomium cupreum*, *Colletotrichum graminicola*, *Coniophora olivacea*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes hirsuta* et *Trichoderma viride* (Ortiz *et al.*, 2019). Les levures sont également sensibles aux tannins. En effet, il a été démontré que l'acide tannique, le tanin de châtaigne, et le tanin de quebracho inhiberaient la croissance de diverses espèces de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Pill *et al.*, 2021).

Une étude a montré l'effet hépatoprotecteur des tannins, et ceci en empêchant le développement de la nécrose hépatique chez les humains et les animaux du pâturage (Zhang *et al.*, 2017). En effet, une administration d'une faible quantité de tannins empêcherait aussi la dégradation du polyribosome dans le foie des souris, et inhiberait l'incorporation d'acides aminés en protéines cellulaires hépatiques (Sobeh *et al.*, 2018). Il a également été démontré que l'acide tannique, lorsqu'il est injecté dans des hépatocytes de rat, protégerait contre les altérations nucléolaires dans le foie ainsi que d'éventuelles modifications post-traductionnelles pouvant affecter les protéines nucléolaires hépatiques (Chang *et al.*, 2021). Des niveaux normaux physiologiques de lipides sériques ont été enregistrés chez les rats mâles génétiquement modifiés ayant reçu une faible quantité de tannins et ceux-ci ont provoqué volontairement une hypercholestérolémie (Lum *et al.*, 2021).

Les tannins seraient même capables de neutraliser de façon dose-dépendante l'hémorragie induite par le venin de certaines espèces de serpents venimeux tels que *Crotalus adamanteus* et de réduire aussi de manière significative l'élévation induite par le venin de l'activité de la créatine kinase sanguine (Okonogi *et al.*, 1979), et ainsi de prolonger le temps de survie des souris.

2. Propriétés pharmacologiques des quinones

Les quinones sont des composés organiques aromatiques jouant un rôle clé dans le processus de la photosynthèse (Lu *et al.*, 2013). La majorité des quinones qu'on trouve dans les plantes sont des benzoquinones relativement simples (Figure 8). La formation des quinones suit divers mécanismes pouvant aller d'une simple oxydation de catéchols / hydroquinones à des mécanismes plus complexes impliquant des réactions d'hydroxylation initiales catalysées par les cytochromes P450 suivies d'une oxydation à deux électrons (Bianchet *et al.*, 2008).

Sur le plan pharmacologique, elles permettraient de prévenir et de traiter l'ostéoporose et certaines maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. Elles ont également une bonne activité antioxydante (Bozić *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2004).

Ces composés semblent agir très efficacement contre plusieurs germes (Lown, 1983). Ainsi, beaucoup d'antibiotiques actuels contiennent des quinones. Ce qui est surprenant, c'est que les quinones semblent atteindre leurs cibles cellulaires avec plus de précision (Lafond *et al.*, 2009), par rapport aux autres classes mais également en induisant moins d'altération au niveau moléculaire (Janda *et al.*, 2020).

Les quinones préviendraient également l'anémie et favoriseraient le mécanisme de pro-coagulation (Chairungsi *et al.*, 2006). Parmi les quinones les plus importantes, on retrouve le 1,4-naphtalènedione précurseur de la vitamine K1 dont le rôle principal est de renforcer les fonctions cardiovasculaires et d'éviter les hémorragies (Van Ballegooijen et Beulens, 2017).

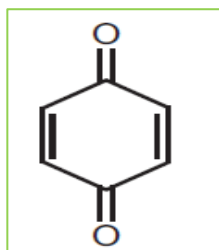


Figure 8. Structure de base des quinones (Patai et Rappoport, 1988).

Il a également été rapporté que les quinones pourraient protéger les diverses cellules du corps contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, surtout de type ROS et NOS, grâce à leurs cycles redox rapides qui leur confère le potentiel de se lier aux groupes thiol, amine et hydroxyle (Kruk *et al.*, 2016), ce qui améliore considérablement l'état de santé général et empêcherait aussi un vieillissement prématuré. Cette classe de métabolites secondaires pourrait aussi soutenir le métabolisme énergétique cérébral, ce qui a un impact très

positif sur la fonction du système nerveux (**Yamada et al., 2020**), sachant que le cerveau est l'organe nécessitant le plus d'énergie avec une consommation à lui seul de 20%.

Les quinones aideraient aussi à lutter contre le déclin cognitif, les accidents vasculaires cérébraux, l'excitotoxicité ainsi que les dommages neuronaux causés par une hypertension artérielle, l'hyperglycémie ou bien des anomalies liées à la circulation sanguine telles que l'embolie cérébrale (**da Silva Júnior et al., 2019**). Ces molécules auraient même des effets très bénéfiques dans la prévention et le traitement de maladies telles que l'ostéoporose, la clairance rénale ainsi que les maladies cardiovasculaires (**Kadela-Tomanek et al., 2021**).

Les quinones semblent exercer des effets antipsoriasiques très prometteurs en tant qu'agents antipsoriasiques efficaces en régulant l'activité du système immunitaire qui a tendance à se déclencher lors d'un psoriasis surtout au court d'une angine streptococcique et à s'attaquer par erreur aux cellules saines de la peau (**Bolton et Dunlap, 2017**). Les quinones aideraient ainsi l'organisme à combattre plus efficacement l'infection. Il a également été rapporté par **Wallace et Young, (1977)** que les quinones pouvaient servir à relier les différentes deshydrogénases avec les systèmes terminaux de transport d'électrons à l'oxygène chez *Escherichia coli*.

3. Propriétés pharmacologiques des terpénoïdes

3.1. Mono, diterpènes et sesquiterpènes

Les terpènes sont des composés aromatiques présents dans de nombreuses plantes, telles que la lavande, le pin ainsi que la peau d'orange fraîche (**Langenheim, 1994**). Les terpènes dérivent d'unités isopréniques à cinq carbones (**Figure 9**). Et c'est leurs groupes fonctionnels ainsi que leurs squelettes carbonés basiques qui permettent de les différencier les uns des autres (**Souza et al., 2014**). Les terpènes ont généralement des structures multicycliques et leur élément constitutif est l'isoprène, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (**Cho et al., 2017**).

Les terpènes sont surtout connus pour leurs activités antimicrobiennes contre de nombreuses souches pathogènes de bactéries, de virus et de champignons (**Yang et al., 2020; Guimarães et al., 2019**). Mais, ces composés semblent également posséder une activité hypotensive remarquable (**Menezes et al., 2010**). Il semblerait aussi que les terpènes sont capables d'induire des effets sédatifs et calmants. Les plantes riches en terpènes sont ainsi utilisées dans de nombreux pays asiatiques comme infusions pour traiter la nervosité (**Koulivand et al., 2013**).

Les terpènes les plus connus sont l'ocimène et le limonène dérivés de la menthe et leurs propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, antibactériennes et relaxantes sont connues depuis très longtemps (**Zachariah et Leela, 2006**).

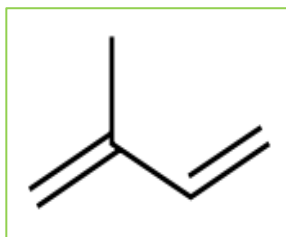


Figure 9. Structure de base du précurseur des terpènes (isoprène) (Cho *et al.*, 2017).

Les composés diterpènes proviennent du géranylgeranyl diphosphate et présentent 20 unités carbonées dans leur forme squelettique de base. L'un des diterpènes les plus simples et les plus importants est phytol, une forme réduite de géranylgeraniol, qui forme la chaîne latérale lipophile des chlorophylles (Vetter et Schröder, 2011). En revanche, Les sesquiterpènes sont une classe de terpène constituée de 3 unités isoprènes et comme formule moléculaire (C₁₅H₂₄). Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peut être acyclique ou contenir 1 à 2 cycles tels que le polygodial (Figure 10).

Plusieurs études ont conclu qu'une combinaison de monoterpènes, de diterpènes et de sesquiterpènes peut être utilisée efficacement pour traiter divers types de cancers qui surviennent au niveau du côlon, le cerveau, la prostate et les os (Chopra *et al.*, 2021). Une autre étude a aussi prouvé qu'une administration régulière de traitement à base de terpènes pouvait inhiber la croissance du cancer de la prostate et augmenterait même la sensibilisé de ces cellules tumorales vis-à-vis de la radiothérapie (Li *et al.*, 2016).

Les sesquiterpènes peuvent jouer un rôle très important dans la préservation de la santé humaine, à la fois dans le cadre d'une alimentation équilibrée et en tant qu'agents pharmaceutiques, en raison de leur potentiel pour le traitement des maladies cardiovasculaires et du cancer (Chadwick *et al.*, 2013). Ces molécules sont actuellement utilisées comme principe actif dans de nombreux traitements pour traiter la diarrhée, les brûlures, la grippe, et la neurodégénérescence (Salazar-Gómez *et al.*, 2020).

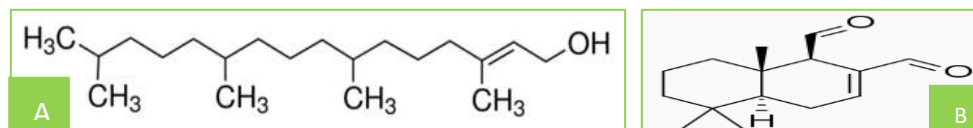


Figure 10. Exemple de structure d'un composé diterpène et sesquiterpène et (A): phytol, (B) : polygodial (Lange et Markus, 2013).

Une autre étude a aussi montré que les terpènes pouvaient exercer un effet anti-diabétique remarquable en réduisant le niveau plasmatique de glucose et ceci en augmentant sa

consommation cellulaire, surtout au niveau des muscles et ceci a été démontré chez des modèles de rats diabétiques (**Brahmachari, 2017**). Les propriétés antidiabétiques des terpènes peuvent également s'expliquer par la réduction du stress oxydatif et l'inflammation en régulant la voie des polyols, ce qui contribue également à réduire les niveaux d'hémoglobine glycosylée (**Nabavi et al., 2015**). Ceci a également pour résultat de renforcer le mécanisme de la gluconéogenèse et de normaliser les niveaux de féruine-A dans le sérum, ce qui renforce la résistance à l'insuline et à la stéatose hépatique (**Zhang et al., 2013**).

Il a été démontré que les terpènes ont une activité anti-plasmodiale non négligeable et les chercheurs ont expliqué cela par la capacité de ces composés à se lier à la partie hémine des érythrocytes infectés afin de tuer directement le parasite puisque l'hémine est constituée de fer qui est nécessaire au développement du plasmodium dans les globules rouges (**Nogueira et al., 2011**). Cette information est très importante vu l'augmentation croissante des infections paludéennes et de la résistance aux médicaments. Une autre recherche menée par **Ginsburg et Demel. (1984)**, a aussi montré que les terpènes pouvaient aussi combattre le paludisme en potentialisant l'effet anti-paludique. D'autres composés terpènes peuvent stabiliser le complexe médicament-hémine, qui va se lier aux couches des phospholipides du parasite en perturbant ainsi la structure membranaire respective et en provoquant la lyse cellulaire (**Kayembe, 2012**).

3.2. Saponines

C'est une classe de métabolites secondaires se présentant généralement sous forme d'une mousse semblable à celle du savon. Chaque saponine est constituée d'une partie aglycone liée à une chaîne de monosaccharides (**Figure 11**), ce qui suggère une très grande variabilité structurale et des combinaisons quasi infinies (**Sajjadi et al., 2016**). Les saponines ont ainsi un très grand poids moléculaire et contiennent une partie hydrophobe, composée d'un triterpénoïde (30 atomes de carbone) ou d'un squelette stéroïde (27 atomes de carbone avec un spirostane à 6 cycles ou un squelette de furostane à 5 cycles) (**Moses et al., 2014**).

Les saponines ayant une molécule de sucre attachée à la position C-3 sont appelées saponines monodesmosides tandis que celles qui ont un minimum de deux sucres, l'un attaché au C-3 et l'autre en C-22, sont appelées saponines bidesmosides (**Lasztity et al., 1998**).

Les saponines joueraient un rôle clé dans la régulation du taux de cholestérol sanguin et auraient apparemment des propriétés anti-inflammatoires remarquables (**Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 ; Barbosa et al., 2014**). Cependant, les saponines ne seraient pas bien absorbées par le tractus gastro-intestinal.

Le ginseng est l'une des plantes les plus importantes au monde en vertu de ses propriétés pharmacologiques et sa richesse en saponines avec plus de 30 types différents (**Kimura et al., 2006**), témoignant une fois de plus, de la capacité pharmacologique des saponines.

D'autres travaux ont montré que cette classe aurait des propriétés insecticides et molluscicides (**Hostettmann et al., 1982**). Mais, les saponines influenceraient également la synthèse de quelques hormones tel que le facteur natriurétique auriculaire (FNA) impliqué dans la régulation de la tension artérielle ainsi que l'homéostasie électrolytique (**Li et al., 2009**).

Elles influenceraient également la synthèse d'autres molécules impliquées dans la régulation du système nerveux central et endocrinien (**Francis et al., 2002**). Ainsi, une étude menée par **Zhao et McDaniel. (1998)** a démontré que les rats ayant subi des dommages des fonctions neuromotrices et cognitives peuvent retrouver l'usage de ces capacités via une injection intracérébroventriculaire de la saponine.

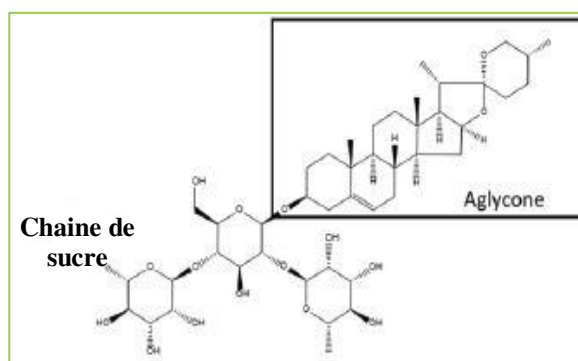


Figure 11. Structure de base des saponines (**Lasztity et al., 1998**).

Les saponines participeraient également à la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, précisément en réduisant les niveaux sanguins des lipides et du glucose (**Marrelli et al., 2016**), ce qui priverait les cellules tumorales d'une source d'énergie, en empêchant ainsi le développement d'un éventuel cancer et renforcent l'activité cytotoxique de ce composé naturel surtout contre les lignées cellulaires tumorales du sein telles que MCF-7 (**Koczurkiewicz et al., 2019**).

Il a également été démontré qu'un régime alimentaire riche en saponines pourrait inhiber l'apparition de carie dentaire mais aussi l'agrégation plaquettaire. Cette classe de métabolites secondaires serait également utilisée dans le traitement de l'hypercalcémie chez l'homme et comme antidote contre le saturnisme aigu (**Juang et Liang, 2020**), réduisant ainsi les risques de toxicité liés aux métaux lourds tels que le plomb.

L'effet antidiabétique des saponines se traduirait également par une stimulation du processus de glycogénèse et une augmentation des niveaux plasmatiques d'insuline, ce qui réduirait l'excès de glucose présent dans le sang (**Elekofehinti, 2015**). Ce composé

phytochimique exercerait aussi un très bon effet antioxydant, ce qui contribue considérablement au traitement du diabète sucré puisque c'est très connu qu'il ya un lien très important entre le processus oxydatif et le risque de développer un diabète (**Chen *et al.*, 2014**).

Les saponines protégeraient même les cellules de l'épiderme contre les rayons ultra-violet (UV), en formant une sorte de couche protectrice réfléchissant tout rayon nocif d'une longueur d'onde supérieure à 100 nm, ce qui empêcherait le vieillissement prématuré de la peau (**Oh *et al.*, 2016**) et ce qui expliquerait en partie pourquoi de nombreux écrans solaires incluent aujourd'hui les saponines dans leur composition.

Une autre étude menée par **Huang *et al.* (2020)**, a montré que les saponines pouvaient soulager les voies respiratoires et améliorer la fonction des alvéoles pulmonaires, ce qui permet d'augmenter les sécrétions bronchiques. Actuellement, plusieurs essais cliniques ont pu démontrer que cette classe de métabolites secondaires peut aider dans le traitement des affections des voies respiratoires supérieures comme la toux ou la bronchite.

3.3. Tetraterpènes (caroténoïdes)

Plus de 650 caroténoïdes (C₄₀) se trouvent dans la nature, constituant le plus grand groupe de pigments naturels liposolubles. Les caroténoïdes sont des substances aux propriétés très spéciales ; ceux-ci forment la base de nombreuses fonctions et actions variées dans toutes sortes d'organismes vivants (**Britton, 1995**). Les caroténoïdes sont biosynthétisés par les plantes, les algues, les champignons, les levures et les bactéries. Les caroténoïdes sont des composés isoprénoïdes, biosynthétisés par liaison queue à queue de deux molécules de géranylgeranyl diphosphate (**Fraser *et al.*, 2004**). Cela produit le squelette carboné parent C₄₀ à partir duquel toutes les variations individuelles sont dérivées. Les caroténoïdes les plus célèbres sont le lycopène et le bêta-carotène (**Figure 12**)

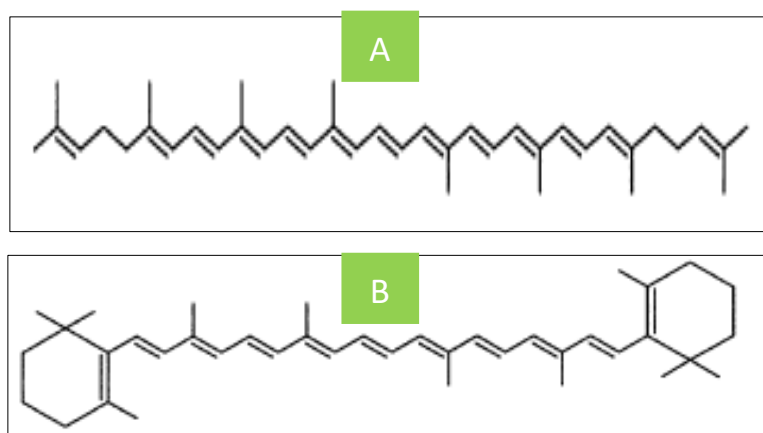


Figure 12. Structure de base de quelques caroténoïdes (A): lycopène (B) : bêta-carotène (**Rodrigues *et al.*, 2013**)

Les caroténoïdes ont plusieurs activités biologiques telles que des propriétés antioxydantes, l'inhibition de la croissance des tumeurs malignes et l'induction de l'apoptose (Milani *et al.*, 2017). La supplémentation en caroténoïdes peut réguler la croissance cellulaire et moduler l'expression des gènes ainsi que les réponses immunitaires (Williams *et al.*, 2000).

Les caroténoïdes ont été considérés depuis très longtemps comme bénéfiques dans le traitement de diverses maladies liées à l'âge, contre certaines formes de cancer, en particulier le cancer du poumon, les accidents vasculaires cérébraux, la dégénérescence maculaire et les cataractes (Bungau *et al.*, 2019). A ce jour, plus de 600 caroténoïdes sont connus et 50 d'entre eux sont consommés dans les repas pour être transformés en vitamine A, un nutriment essentiel dans le processus de vision en maintenant une cornée claire (McCusker *et al.*, 2016). Après leur absorption, ces caroténoïdes sont métabolisés par une rupture oxydative en rétinol, en acide rétinoïque et en petites quantités de produits de dégradation, transportés par les lipoprotéines plasmatiques. Afin d'éviter les dommages de la rétine (Sauer *et al.*, 2019). Les carotènes sont principalement associés aux lipoprotéines de basse densité.

Les fruits et légumes tels que les carottes et la papaye sont très riches en caroténoïdes, notamment en α -carotène, β -carotène, cryptoxanthine, lutéine, zéaxanthine et lycopène, et sont ainsi considérés comme une source naturelle d'antioxydants (Young et Lowe 2018). Les fonctions antioxydantes sont associées à une diminution des dommages d'ADN, à une diminution de la peroxydation lipidique, au maintien de la fonction immunitaire et à l'inhibition de la transformation ou de la prolifération maligne *in vitro*, censés empêcher le développement de certaines maladies (Azqueta et Collins, 2012 ; Gloria *et al.*, 2014).

De plus, il a été suggéré que les caroténoïdes influencent la résistance et la fluidité des membranes, affectant ainsi leur perméabilité à l'oxygène et à d'autres molécules, mais aussi en les protégeant contre les radicaux libres surtout de type monoxyde (NO) (Böhm *et al.*, 1995). Il a également été signalé que les caroténoïdes ont un effet remarquable dans la réponse immunitaire et dans la communication intercellulaire (Vilchez *et al.*, 2011). Le β -carotène, la canthaxanthine, le 4-hydroxy- β -carotène et le rétro-déhydro- β -carotène synthétique montrent une induction efficace de la communication par jonction lacunaire (GJC) dans les fibroblastes murins (Hughes, 1999).

Dans le processus de dégénérescence maculaire, les caroténoïdes peuvent induire une cascade de gènes permettant la phagocytose des cellules endommagées de la rétine ; ce processus est critique pour la survie des photorécepteurs (Lem *et al.*, 2021). En outre, il a été établi que les caroténoïdes affectent de nombreux processus biologiques, tels que la prolifération, la différenciation et la morphogénèse cellulaires (Sowmya *et al.*, 2015). De plus,

les caroténoïdes sont utilisés dans le traitement de certains types de cancers et de certaines activités dermatologiques (Balić et Mokos, 2019). Il a également été prouvé qu'un régime à base de caroténoïdes pourrait significativement réduire la probabilité de développer une tératogénèse, surtout durant la période de développement embryonnaire (Peterka *et al.*, 1997).

4. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques non volatiles, inodores, incolores et représentent l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires végétaux (Christen *et al.*, 1992). Ces composés sont de nature basique et contiennent des atomes d'azote hétérocyclique (Figure 13). Les alcaloïdes sont classés en fonction du type de système hétérocyclique présent. En général, dans une plante, on les trouve associés à des acides (Qiu *et al.*, 2014).

Les alcaloïdes sont subdivisés en 3 classes ; les vrais alcaloïdes et protoalcaloïdes qui sont produits à partir d'acides aminés tandis que les pseudo-alcaloïdes tels que la caféine ne dérivent pas d'acides aminés mais ils sont généralement de nature basique (Eguchi *et al.*, 2019).

Les alcaloïdes sont facilement assimilables à travers les cellules épithéliales de l'intestin via un mécanisme de diffusion passive (Liao et Yang, 2010). Cette classe est surtout connue pour ses activités neuroprotectrice, anticancéreuse, antivirale et antihistaminique (Evers *et al.*, 2005 ; Mohamed *et al.*, 2010 ; Thawabteh *et al.*, 2019) représentant ainsi une voie thérapeutique importante.

L'un des alcaloïdes qui a marqué l'histoire est sans aucun doute la morphine qui est un alcaloïde naturel de la plante *Papaver somniferum*, et qu'utilisaient les médecins pendant la 2^{ème} guerre mondiale afin de calmer la douleur et les traumatismes des soldats dus à son puissant effet narcotique (Newman *et al.*, 2003). Son usage est actuellement très limité en raison de sa propriété addictive.

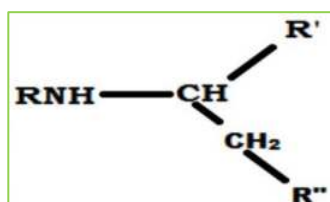


Figure 13. Structure de base des alcaloïdes (Qiu *et al.*, 2014).

Les alcaloïdes possèdent une très bonne activité analgésique et cette dernière s'avère relativement non addictive. Ces alcaloïdes agissent comme des stimulants respiratoires ou cardiaques, et comme médicament dans de nombreuses applications cliniques (Zhu *et al.*, 2020). Par ailleurs, l'atropine est très efficace pour traiter la bradycardie. La tubocurarine, qui est un autre alcaloïde, est très utilisée en tant qu'anesthésique et relaxant musculaire durant les opérations chirurgicales mais son usage est purement clinique (Turabekova *et al.*, 2014).

D'autres alcaloïdes tels que la vincristine et la vinblastine sont utilisés comme agents chimiothérapeutiques afin de traiter de nombreux types de cancer surtout celui du sein, du côlon-rectum et celui du poumon (**Bonta, 2020**). Les alcaloïdes agissent également comme constricteurs des vaisseaux sanguins afin d'augmenter le débit sanguin et permettre ainsi l'irrigation des organes clés tels que le cœur et le cerveau qui nécessitent un apport nutritionnel et d'oxygène constant. Un autre alcaloïde appelé éphédrine est également utilisé dans le traitement de l'asthme bronchique et pour soulager l'inconfort du rhume des foins et de la sinusite (**Alves de Almeida et al., 2017**).

La quinine est un autre alcaloïde ayant des effets antipaludiques puissants, et le plus souvent incorporé dans la fabrication de plusieurs médicaments dont l'application médicale permet également de traiter des arythmies cardiaques (**Qiu et al., 2014**).

Les alcaloïdes stimulent le système nerveux central en augmentant la communication neurale et en favorisant la plasticité cérébrale, mais ils permettent aussi à la personne de rester éveillée et de stimuler les fonctions cognitives et plusieurs approches bioinformatiques ont pu le prouver (**Szwajgier et al., 2017**). Parmi ces alcaloïdes, on retrouve la nicotine qui est extraite à partir de la plante du tabac. Un autre alcaloïde appelé la colchicine, présente dans les plantes de la famille des Liliacées, est très connue pour son efficacité à traiter les crises de la goutte aiguë (**Bialecka-Florjańczyk et al., 2018**).

Les vinca alcaloïdes sont une classe importante d'agents anticancéreux obtenus à partir de la pervenche de Madagascar. Ils sont naturellement extraits de la pervenche rose, *Catharanthus roseus* G. Don (**Moudi et al., 2013**) et ont des effets hypoglycémiantes et cytotoxiques très importants (**Brogan, 2010**). Ils sont utilisés pour traiter le diabète, l'hypertension artérielle et comme désinfectants (**Ahmed, 2010**). Il existe quatre principaux alcaloïdes de la vinca en usage clinique : la vinblastine (VBL), la vinorelbine (VRL), la vincristine (VCR) et la vindésine (VDS) (**Kufe et Pollock, 2003**).

5. Propriétés pharmacologiques des hétérosides cardiotoniques

Les hétérosides cardiotoniques sont une classe de composés organiques dont le rôle principal est de renforcer les fonctions cardiovasculaires (**Ambrosy et al., 2014**) en régulant la fonction de la pompe cellulaire ATPase sodium-potassium (**Kilter et Böhm, 2008**).

La structure de base d'un glycoside cardiaque consiste en une molécule stéroïde attachée à un sucre (glycoside) et à un groupe R (**Figure 14**). Ainsi, l'activité biologique d'un hétéroside cardiotonique dépend du groupe fonctionnel lié à lui qui peut être de type hydroxyle, méthyle ou aldéhyde (**Cornelius et al., 2013**).

Il existe principalement deux types d'hétérosides cardiotoniques, l'un de type aglycone stéroïdien avec 23 carbones appelé les glycosides cardénolides et le 2^{ème} type se compose de 24 carbones appelé les glycosides bufadiénolides (**Botelho et al., 2019**).

Les hétérosides cardiotoniques sont surtout utilisés pour traiter les pathologies liées au cœur telles que la fibrillation auriculaire, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension artérielle (**Prassas et Diamandis, 2008**). Ces composés auraient également un effet cytotoxique en s'opposant à la prolifération cellulaire de plusieurs lignées tumorales surtout celles de type mammaire (**Patel, 2016**).

Actuellement, la digoxine est un hétéroside cardiotonique naturel extrait de deux plantes, *digitalis lanata* et *digitalis purpurea* et est incorporé dans l'élaboration de plusieurs médicaments. Il est surtout utilisé comme agent cardioprotecteur, anticancéreux et antioxydant (**Patocka et al., 2020**).

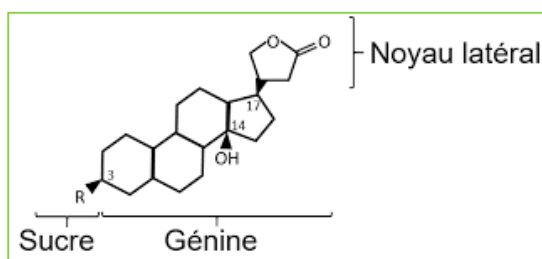


Figure 14. Structure commune des hétérosides cardiotoniques (**Cornelius et al., 2013**).

Une autre recherche a révélé qu'un autre hétéroside cardiotonique appelé bufaline pouvait exercer, en plus de son effet cardioprotecteur, un effet antiprolifératif très significatif contre plusieurs lignées cellulaires tumorales, surtout celles du pancréas et du foie tout en régulant plusieurs voies de signalisations (**Qian et al., 2020**), ce qui a pour effet de réguler le mécanisme d'apoptose.

D'autres approches bioinformatiques, notamment celle du docking moléculaire ont montré que les hétérosides cardiotoniques pouvaient considérablement stabiliser l'interaction du principe actif d'un médicament avec son récepteur en générant un flux d'énergie très faible, c'est un indicateur d'une stabilité et d'une complémentarité structurale de ces derniers (**Ren et al., 2021**). Ce qui aide considérablement les chercheurs à trouver des voies thérapeutiques plus efficaces contre certains types de cancer, tels que la leucémie.

Une autre étude a montré que les hétérosides cardiotoniques sont très efficaces pour traiter d'autres pathologies affectant le cœur, telles que les battements cardiaques irréguliers. Il est également conseillé aux personnes âgées de prendre des médicaments à base d'hétérosides cardiotoniques (**Sukoyan et Gongadze, 2011**), car cela permettrait d'éviter des complications

en rapport avec la fonction rénale, telles qu'une déshydratation rénale, surtout pendant la saison d'été ou bien la diminution de la sécrétion de rénine, ce qui peut provoquer une hypertension artérielle et augmenter ainsi les risques de développer des maladies cardiovasculaires (**Paczula *et al.*, 2016**).

Cependant, un usage abusif des médicaments à base d'hétérosides cardiotoniques pourrait causer à long terme plusieurs effets secondaires, dont les plus courants sont les étourdissements, la fatigue, les troubles de vision, les maux de tête, l'anxiété ainsi que des troubles gastro-intestinaux. Ces troubles pourraient même s'aggraver vers des convulsions, un bloc cardiaque, des arythmies auriculaires et ventriculaires conduisant à une mort cardiaque subite ou un coma (**Ho *et al.*, 2011**).

6. Propriétés pharmacologiques des glucosinolates

Les glucosinolates sont un groupe de composés soufrés très utilisées pour soulager les douleurs articulaires, la fièvre, la toux, le rhume et même pour le traitement de diverses maladies de la peau et des plaies (**Prakash et Gupta, 2012**). Ces composés participent aussi à la prévention du cancer, surtout celui du sein et la leucémie promyélocytaire humaine ainsi que les dommages à l'ADN causés par les agents cancérogènes (**Soundararajan *et al.*, 2018**).

Parmi les plus répandus glucosinolates, on trouve la sinigrine capable de réduire le taux de triglycérides plasmatiques, suggérant ainsi que les glucosinolates à groupe d'alcényle pourraient être des agents encourageant dans la prévention de l'hypertriglycéridémie post-prandiale (**Soundararajan *et al.*, 2018**).

Une étude menée par **Lee *et al.* (2006)** a montré que les glucosinolates pourraient aussi réduire la production de médiateurs inflammatoires, notamment l'oxyde de nitrite (NO), l'interleukine 6 ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires et ceci a été prouvé dans le modèle utilisant les macrophages RAW 264.7 activés par les lipopolysaccharides (LPS) (**Lee, 2017**). Ces composés sont aussi de puissants agents antimicrobiens et antifongiques, aidant ainsi à lutter contre la détérioration des aliments par les organismes pathogènes (**Melrose, 2019**). Il a également été rapporté que les glucosinolates présentent d'autres propriétés pharmacologiques, telles que des capacités cicatrisantes, antioxydantes, bio-herbicides, antimutagènes et aideraient même à renforcer le système immunitaire humain (**Vicas *et al.*, 2013 ; Mazumder *et al.*, 2016 ; Ting *et al.*, 2020**).

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

La plante *C. tougourensis* (**Figure 15**) a été récoltée au printemps 2019 pendant la période de floraison au niveau du parc national de Belezma à la commune de Fesdis (Algérie). Les coordonnées GPS de l'endroit de récolte sont : 35,621975° de latitude et 6,241327° de longitude. Cette plante a été identifiée par le professeur Bachir OUDJEHIIH et un spécimen avec le code (CT/2019/ LPTPCMB) a été déposé au niveau du laboratoire d'Amélioration des Techniques de Protection Phytosanitaire dans les Agrosystèmes de Montagne, Institut des Sciences Agronomiques et des Sciences Vétérinaires, Université de Batna 1, Batna, Algérie. Après avoir récolté la plante, les parties aériennes de *C. tougourensis* ont d'abord été séchées à l'air libre mais à l'abri de la lumière et du rayonnement solaire puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre fine obtenue a pesé 300 g.

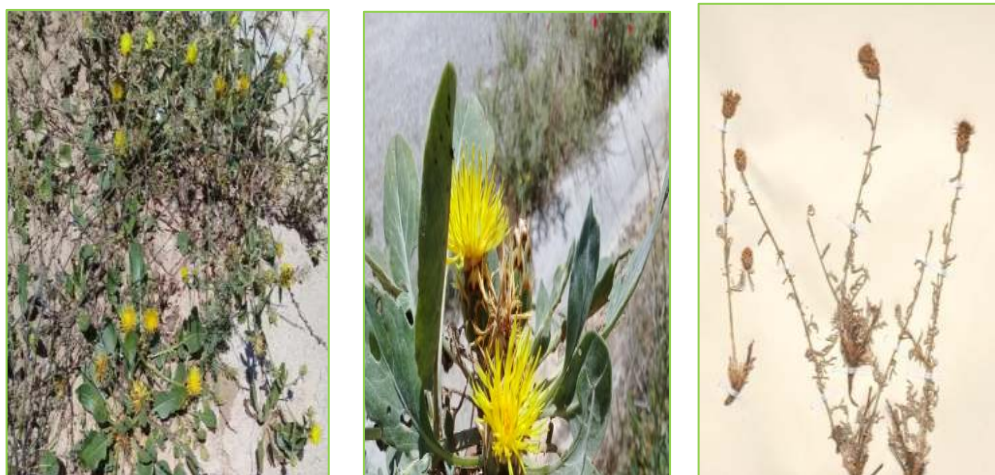


Figure 15. Parties aériennes de l'espèce *Centaurea tougourensis* utilisée dans l'étude.

2. Extraction et fractionnement

La macération a été effectuée trois fois en utilisant 3L d'un mélange d'EtOH-H₂O (70:30) pendant 72 h à 37 °C. Après évaporation de l'éthanol, une extraction liquide-liquide a été réalisée en partant du solvant le moins polaire vers le plus polaire (hexane, acétate d'éthyle et n-butanol). (**Zhang et al., 2015**). (**Figure 16**). Les rendements obtenus ont été exprimés en pourcentage, ils ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de Rendement} = [\text{Poids d'extrait} / \text{Poids de poudre}] \times 100$$

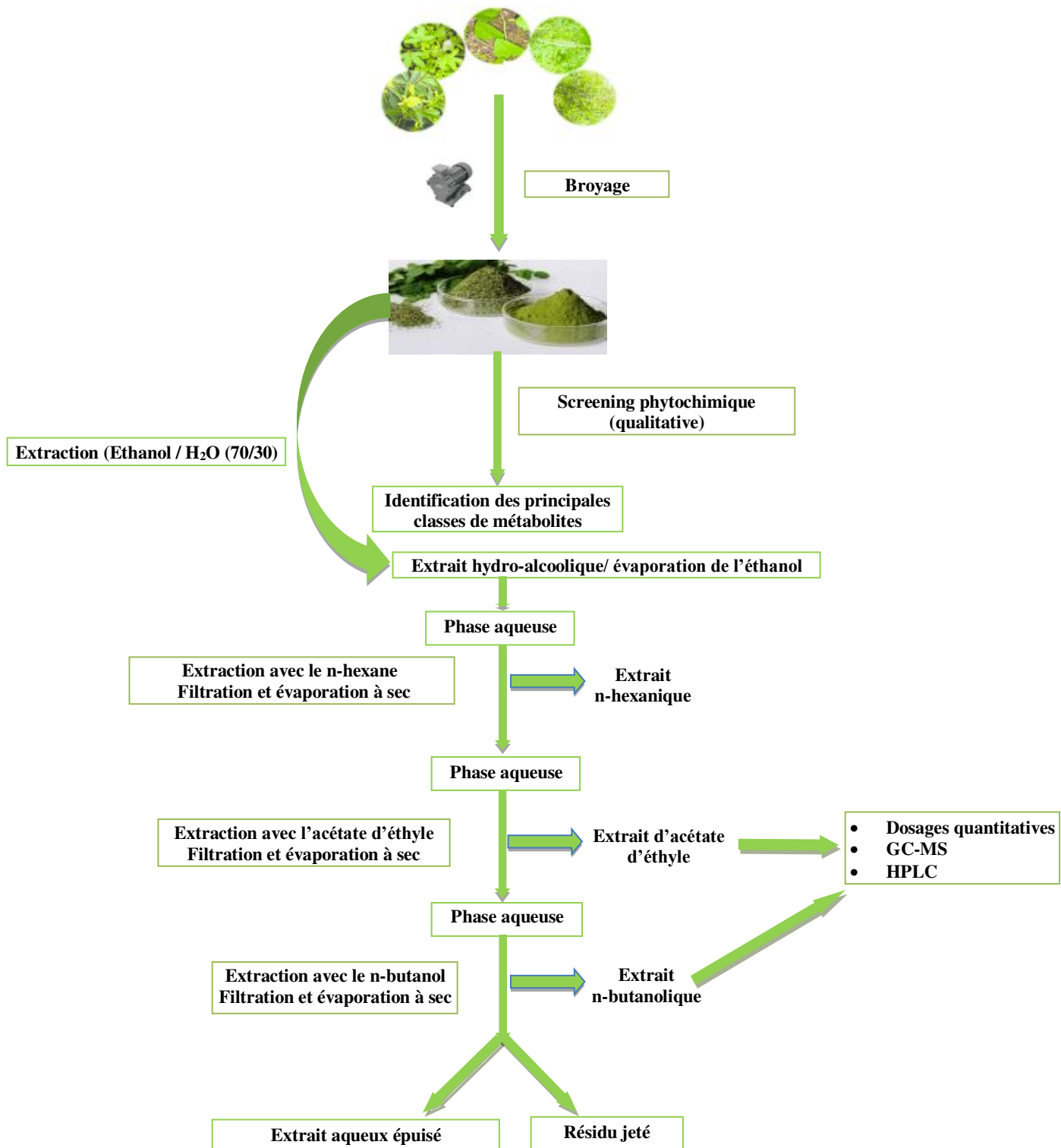


Figure 16. Schéma récapitulatif du processus d'extraction et d'analyse phytochimique de *Centaurea tougourensis*.

3. Etude phytochimique

3.1. Analyse qualitative

L'analyse qualitative dite criblage phytochimique est un test préliminaire qui repose principalement sur des réactions de coloration et/ou de précipitation afin de mettre en évidence la présence d'une classe particulière de métabolites. Ainsi les principaux phytoconstituants recherchés étaient les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpènes, les tanins, les anthocyanes, les stéroïdes, les saponines, les mucilages, les quinones, les composés cyanogéniques et les glycosides cardiotoniques. Les tests ont été effectués en s'appuyant sur les précédentes techniques analytiques décrites par **Harborne *et al.* (1973)**.

Recherche des flavonoïdes (test de Shinoda)

Afin de détecter une éventuelle présence de flavonoïdes ; à une solution constituée de 0.5 mL d'extrait végétal à tester, 0.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL d'HCL, ont été ajoutées 5 gouttes d'acide acétique et 5 gouttes d'acide isoamylique plus quelques copeaux de magnésium (Mg). Cette opération a été suivie d'agitation. L'apparition après 1 min, d'une couleur persistante rose-orange ou rouge violette permet de considérer le test comme positif.

Recherche des alcaloïdes (Test de Dragendorff)

Une prise de 3 à 4 gouttes du réactif de Dragendorff a été ajoutée à 2 mL d'extrait. L'apparition d'un précipité de couleur orange-rougeâtre témoigne de la présence des alcaloïdes.

Recherche des terpènes (Test de Liebermann-Burchard)

Un volume de 1 mL d'anhydride acétique a été mélangé à 1 mL de l'extrait végétal puis quelques gouttes d'acide sulfurique ont été additionnées au mélange. Après agitation, la formation d'un anneau bleu-vert indique la présence de triterpénoïdes.

Recherche des tanins (Test de chlorure ferrique)

Un mélange réactionnel constitué de 2 mL de l'extrait, 1 mL de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 1% a été préparé, puis agité. L'apparition d'une couleur verte donne un test positif.

Recherche des stéroïdes (Test de Liebermann Burchard)

Un volume de 2 mL de l'extrait a été additionné à 2 mL de chloroforme et 0.5 mL d'anhydride acétique. Ensuite 3 gouttes d'acide sulfurique ont été ajoutées à la solution. Le test est considéré positif si une couleur bleue apparaît après agitation.

Recherche des anthocyanes (Test de Bornträger)

A une solution constituée de 0.5 mL d'eau distillée, 0.5 mL d'HCL concentré et 0.5 mL de l'extrait végétal, ont été rajoutés à 5 gouttes d'acide acétique et d'acide isoamylique. Après

1 min d'agitation, la solution a été chauffée à ébullition dans un bain marie. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des anthocyanes.

Recherche des saponines (Test de mousse)

Pour la réalisation de ce test, une décoction de la poudre de la plante à 1%, a été préparée et mise à ébullition pendant 30 min. Le volume a été ajusté à 100 mL après une filtration sous vide puis des dilutions ont été réalisées et agitées dans le sens de la longueur pendant 15 s à raison de deux agitations par seconde. La formation d'une mousse stable à hauteur supérieure à 1 cm, persistante pendant plus de 15 min, ceci indique la présence des saponines.

Recherche des quinones (Test NaOH)

Un volume de 1 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1%) a été mélangé à 2 mL d'extrait, suivi d'agitation. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des quinones.

Recherche des mucilages (Test d'éthanol)

Un volume de 1 mL de décocté de la poudre végétale à 10% a été rajouté à 5 mL d'éthanol. Après une dizaine de minutes, le mélange a été agité. La formation d'un précipité floconneux (trouble) indique la présence des mucilages.

Recherche des hétérosides cardiotoniques (Test de Keller Killiani)

Une préparation constituée de 1g de poudre de plante, 5 mL d'acide sulfurique et 2 à 3 gouttes de Chlorure de fer (FeCl_3 , 2%) sont rajoutés ont été mélangés. La présence des glycosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, l'une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique).

Recherche des composés cyanogènes (Test de Guignard)

Une quantité de 1 g de la poudre végétale a été imbibée de chloroforme puis imprégnée d'une solution de picrate de sodium. La solution obtenue a été mise à ébullition dans un bain marie à 35°C pendant 3h. Le test est considéré positif si une coloration rouge apparaît avec production d'un gaz d'acide cyanhydrique (HCN).

3.2. Analyse quantitative

3.2.1. Estimation de la teneur en polyphénols totaux (TTP)

La méthode Folin-Ciocalteu (FC) a été utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols totaux (TTP) des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis*. Ainsi, 1 mL d'extrait ou d'acide gallique (standard) ont été mélangés avec 1.8 mL de FC (10%). Après 5 min, un volume de 1.2 mL de Na_2CO_3 (7.5%) a été ajouté au mélange réactionnel. La solution a été laissée au repos pendant 1 h à 37 °C. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm (Shui et Leong, 2006) et les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalent

d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG mg^{-1} d'extrait) et en mg également d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche.

3.2.2. Estimation de la teneur en flavonoïdes (TF)

Afin de déterminer la teneur totale en flavonoïdes de *C. tougourensis*, la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) a été utilisée comme précédemment décrite par **Zhishen et al. (1999)** avec quelques légères modifications. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. Un volume de 0.5 mL d'extrait a été ajouté à 150 μL de solution de NaNO_2 (5%). Le mélange a été vortexé et laissé au repos pendant 6 min. Un volume de 150 μL de AlCl_3 (10%) a été ajouté et puis incubé pendant 5 min, suivi de l'addition de 2 mL de NaOH (5%). Le volume final de la solution a été ajusté à 5 mL avec de l'eau distillée. Après 15 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ mg^{-1} d'extrait) et en mg également d'équivalent de quercétine par g de matière sèche.

3.2.3. Estimation de la teneur en tanins (TT)

Le protocole de **Makkar et al. (2003)** a été utilisé pour déterminer la teneur de l'extrait en tanins (TT). Le test a été effectué en 3 répliques et pour chacune d'entre elles, un volume de 500 μL d'extrait végétal a été ajouté à 100 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) puis incubé à 4 °C pour une durée de 4 h. Les tubes ont été ensuite vortexés puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant résultant contient les composés phénoliques non taniques ; ainsi 0.1 mL de ce surnageant a été transféré dans chaque tube, ensuite le volume a été ajusté à 1 mL avec de l'eau distillée.

Un volume de 500 μL du réactif Folin-Ciocalteu (1 N) a été ajouté à tous les tubes puis vortexé. Un autre volume, cette fois ci de 2.5 mL de Na_2CO_3 (5%) a été ajouté à tous les tubes puis vortexé à nouveau. Enfin, les tubes ont été incubés pendant 40 min à température ambiante et la teneur totale en tanins de l'échantillon a été exprimée en microgramme d'équivalent acide tannique (EAT) par milligramme d'extrait (μg EAT mg^{-1} d'extrait) et en mg également d'équivalent d'acide tannique par g de matière sèche.

3.3. Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

Afin d'isoler et d'identifier les composés de *Centaurea tougourensis* responsables de ces propriétés pharmacologiques. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été effectuée sur les extraits n-butanolique et acétate d'éthyle à l'aide d'un appareil modèle (GCMS-QP2010; SHIMADZU). Les conditions expérimentales du système GC-MS étaient les suivantes: colonne non polaire standard capillaire SH-Rxi-5Sil-MS, dimension: 30 m, DI: 0.25 mm, épaisseur du film: 0.25 μm . Le

débit de la phase mobile (gaz porteur: He) a été fixé à 1.7 mL / min. Dans la partie chromatographie en phase gazeuse, le profil de température (température initiale) était de 80 °C (temps de maintien 2.0 min) augmenté à 150 °C à raison de 5 °C / min (temps de maintien 5.0 min) et finalement la température a été augmentée à 280 °C à raison de 5 °C/min (temps de maintien 8.0 min). Le volume d'injection était de 5 µL. L'échantillon dissous dans l'éthanol a été exécuté à une plage de 45-350 m/z et les résultats ont été comparés en utilisant la banque de données intégrée à l'appareil (Programmes de recherche de bibliothèques NIST08s et NIST14) (**Hasan *et al.*, 2019**).

3.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-DAD)

L'analyse par l'HPLC des extraits de *C. tougourensis* a également été réalisée afin de renforcer notre étude phytochimique en utilisant l'HPLC-DAD (Technologie Agilent, modèle 2014) qui se base sur un détecteur UV avancé. Ainsi, 20 µL de chaque extrait a été injecté et l'élution en gradient a été réalisée selon la méthode de **Ozcan. (2019)**. Un gradient constitué de 5 à 95 % d'acétonitrile et d'eau ultra pure ainsi que 0.1 % d'acide formique a été utilisé avec un débit de 0.8 mL /min. La phase mobile est constituée de 3% (v/v) d'acide acétique glacial dans l'eau (solvant A) et le méthanol (solvant B). Les standards utilisés dans cette étude étaient les suivants :

- Acide tannique.
- Rutine.
- Acide caféique.
- Acide trans-ferulique.
- Acide cinnamique.
- Catéchine hydrate (+).
- Acide hydroxybenzoïque.
- Acide Trans-cinnamique.
- Quercétine.
- Acide gallique.
- Acide coumarique.
- Acide chlorogénique.
- Vanilline.

3.5. Criblage qualitative de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH par CCM

Cette technique a été utilisée lors des tests préliminaires afin de mettre en évidence cette activité biologique des composants des extraits de la plante à l'aide d'une plaque CCM.. Dans

cette étude, l'évaluation qualitative de l'activité antioxydante de *C. tougourensis* a été réalisée via une bioautographie sur une plaque de CCM. Les extraits n-butanolique et acétate d'éthyle ont été solubilisés dans leurs solvants extractifs correspondants (butanol et acétate d'éthyle respectivement). Après migration, séchage et confirmation sous l'UV (à longueur d'onde 254 et 365 nm), les plaques ont été pulvérisées par une solution de DPPH à 0.2% dans le méthanol. Les plaques ont été examinées après 30 min et après 1h à l'œil nu. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl 1 picryl-hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl 1 picryl-hydrazine de couleur jaune (Maataoui et al., 2006).

A noter que la phase mobile était un mélange d'héxane /acétate d'éthyle (50% : 50%) pour l'extrait acétate d'éthyle et méthanol/chloroforme (30% : 70%) pour l'extrait n-butanolique et que la révélation a été réalisée à l'aide de l'un de trois révélateurs, à savoir ; la vanilline, l'acide sulfurique ou bien le trichlorure d'aluminium (AlCl₃).

4. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

4.1. Activité antioxydante

4.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Cette méthode consiste à réduire le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en (2,2 diphényl-1-picrylhydrazine) qui est de couleur jaune. Ainsi afin d'évaluer cette activité, 6 mg de DPPH ont été dissouts dans un volume de 100 mL de méthanol, puis la solution obtenue contenant le radical DPPH a été conservée à -20 °C à l'abri de la lumière. Plusieurs dilutions des extraits n-BuOH et EA ont été préparées (0.048-50 µg/mL) et dans chacun des puits de la microplaque, un volume de 160 µL de la solution de DPPH plus 40 µL de l'extrait ont été ajoutés. L'absorbance a été lue à l'aide d'un lecteur microplaque à 517 nm. Le méthanol a été utilisé comme blanc et les standards utilisés étaient BHA (hydroxyanisolebutylé), BHT (hydroxytoluènebutylé) et α-tocopherol. L'IC₅₀ a également été calculée (Blois, 1958).

4.1.2. Test de piégeage des radicaux libres galvinoxyle (GOR)

Pour évaluer cette activité, le protocole précédemment décrit par (Shi et al., 2001) a été utilisé. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à inhiber l'oxydation induite par le radical libre galvinoxyle (GOR). Le mélange se compose de 40 µL d'extraits de *C. tougourensis* et de 160 µL de radical galvinoxyle (0.1 mM). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 120 mn et l'absorbance a été mesurée à 428 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards antioxydants et les résultats ont été donnés en IC₅₀ (µg / mL).

4.1.3. Activité de piégeage de l'ABTS

L'activité de piégeage du radical libre ABTS a été évaluée par spectrophotométrie selon **Re et al. (1999)**. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à inhiber le radical libre ABTS^{•+} obtenu à partir de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique). Un volume de 500 µL de *C. tougourensis* préalablement dissous dans du méthanol ou des standards à diverses concentrations a été ajouté 1 mL de solution de cations ABTS. Les absorbances des solutions testées ont été mesurées à 734 nm après 30 minutes d'incubation. Dans cette expérience, le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards antioxydants et les résultats ont été donnés sous forme d'IC₅₀ (µg/mL). L'activité de piégeage ABTS a été calculée par l'équation suivante :

Inhibition de l'ABTS (%) = $[(A_{bs} \text{ Contrôle} - A_{bs} \text{ échantillon}) / A_{bs} \text{ Contrôle}] \times 100$ où

Abs Contrôle : absorbance du blanc,

A_{bs} échantillons : absorbance de l'extrait ou du standard.

4.1.4. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Le test CUPRAC est basé sur la réduction du Cu⁺² en Cu⁺ par des antioxydants en présence de la néocuproïne. Ainsi trois solutions ont d'abord été préparées, la 1^{ère} solution est composée de 1.927 g de A_CNH₄ et 25 mL d'H₂O. La 2^{ème} solution de 0.042625 g (CuCl₂, 2H₂O) et 25 ml d'H₂O et enfin la 3^{ème} solution de 0.039 g (néocupronine) et 25 mL (EtOH). Ainsi, 40 µL d'extrait a été ajouté à 60 µL de la 1^{ère} solution puis à 50 µL de la 3^{ème} solution puis à 50 µL de la 2^{ème} solution. En présence d'un agent antioxydant, le complexe Cu⁺²/Nc est réduit en un complexe chromogène de Cu⁺/Nc. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 450 nm (**Apak et al., 2004**).

4.1.5. Test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline

Cette activité a également été étudiée sur la base de l'approche de **Szydlowska-Czerniaka et al., (2008)**. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à former un complexe avec le 1,10-phénanthroline afin de réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺. Un volume de 10 µL d'extraits de *C. tougourensis* ou standards (BHA, BHT) à différentes concentrations (3.125-200 µg/mL) ont été ajoutés à 50 µL de FeCl₃ (0.2%) puis un autre volume de 30 µL phénanthroline (0.5%) et 110 µL de méthanol ont été rajoutés au mélange. La solution obtenue a été ensuite incubée pendant 20 min à 30 °C et l'absorbance mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards et les résultats ont été exprimés en valeurs A_{0.50} (µg/mL).

4.1.6. Pouvoir réducteur (FRAP)

Le test FRAP consiste à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Ainsi, pour estimer le pouvoir réducteur possible de *C. tougourensis*, le protocole d'Oyaizu *et al.* (1986) a été utilisé. Un total de 10 μ L de chaque solution échantillon à différentes concentrations a été ajouté à 40 μ L de tampon phosphate (0.2 M ; pH 6.6) et 50 μ L de $K_3Fe(CN)_6$ (1%). La préparation a ensuite été incubée pendant 20 min à 50 °C. Un total de 50 μ L de TCA (10%) et 10 μ L de $FeCl_3$ (0.1%) a été ajouté au mélange et complété avec 40 μ L d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 700 nm et l'activité antioxydante réductrice a été exprimée en valeurs $A_{0.50}$ (ug/mL). L'acide ascorbique, l'acide tannique et l' α -tocophérol ont été utilisés comme standards.

4.2. Activité photoprotectrice

Le cancer de la peau connu plus communément « mélanome » et principalement dû à une exposition excessive aux rayons ultraviolets (UV) représente un danger pour toutes les sociétés quel que soit leur ethnicité, situation géographique ou mode de vie (Gupta *et al.*, 2016). Cette technique a pour but de tester l'éventuelle protection solaire (FPS) de *C. tougourensis* via une approche spectrophotométrique (Mansur *et al.*, 1986). Tout d'abord une concentration mère (4 mg / mL) a été préparée dans l'éthanol. Ensuite, plusieurs dilutions ont été obtenues (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg / mL). Les absorbances ont été prises à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis (entre 290-320 nm) avec 5 nm d'intervalles et en trois répétitions. L'éthanol a été utilisé comme blanc et un tableau de référence publié par la Commission Européenne en 2006 (Tableau 3) a été utilisé pour connaître la catégorie de protection solaire fournie par notre plante.

L'indice de facteur de protection solaire (FPS) a été calculé selon l'équation suivante :

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

Où :

CF: Facteur de correction (= 10);

EE: est le spectre d'efficacité érythémique;

I: spectre d'intensité du simulateur solaire;

EE x I: sont des valeurs constantes préalablement déterminées par Sayre *et al.* (1979).

Tableau 3. Catégories de protection solaire en fonction des facteurs de protection mesurés (Commission Européenne, 2006).

Catégorie indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré	Facteur de protection UVA minimal recommandé	Longueur d'onde critique minimale recommandée
Faible protection	6	6 – 9.9	1/3 du facteur de protection solaire indiqué sur l'étiquette	290-370 nm
	10	10 – 14.9		
Protection moyenne	15	15 – 19.9		
	20	20 – 24.9		
	25	25 – 29.9		
Haute protection	30	30 – 49.9		
	50	50 – 59.9		
Très haute protection	50 ⁺	60 ≤		

4.3. Activité hémostatique

L'effet hémostatique possible de l'extrait n-BuOH et EA de *C. tougourensis* a été déterminé selon la méthode de **Magnette *et al.* (2016)** avec quelques légères modifications. Le sang a été prélevé sur des sujets sains et transféré dans des tubes à citrate de sodium, ensuite centrifugé à 3000 tr /min pendant 15 min afin d'obtenir le plasma. Des volumes de 200 µl de différentes concentrations d'extraits (50, 100, 200, 400, 600 et 800 µg / mL) ont été placés dans des tubes à essai. Les tubes ont été ensuite placés dans un bain-marie à 37 °C. Après cela, un volume de 200 µL de plasma a été ajouté à chaque tube puis 200 µL de CaCl₂ (0,025 M) afin de déclencher la réaction de coagulation. À l'aide d'un chronomètre, le temps de coagulation a été enregistré et déclenché dès l'entrée du CaCl₂ dans le tube. Chaque tube a été légèrement incliné à 45 ° afin de déceler la présence éventuelle du coagulat qui est représenté par une masse visqueuse semi-solide et le chronomètre a été arrêté dès qu'un caillot a été observé. Un autre tube ne contenant que du plasma et CaCl₂ a été considéré comme témoin.

Le pourcentage de diminution du temps de coagulation a été déterminé selon l'équation :

$$S\% = [(T1 - T2) / T1]$$

Où,

S: représente le pourcentage de diminution du temps de coagulation;

T1: représente le temps de coagulation du lot témoin;

T2: représente le temps de coagulation des échantillons testés.

4.4. Activité anti-inflammatoire

4.4.1. Test de stabilisation des membranes des globules rouges

✓ Préparation de la suspension érythrocytaire

Pour préparer la suspension d'érythrocytes, la méthode décrite par **Abe *et al.* (1991)** a été utilisée avec quelques légères modifications. 5 mL de sang humain ont été prélevés sur des volontaires sains et transférés dans des tubes EDTA. Le sang a été ensuite centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 min et les cellules concentrées ont été lavées trois fois avec un volume égal de solution saline normale. Le volume de sang a été mesuré et reconstitué sous forme d'une suspension à 40% avec une solution tampon isotonique (PH = 7.4) composée de [NaCl (4.4 g), NaH₂PO₄ (1.6 g) et Na₂HPO₄ (7.6 g)].

✓ Mode opératoire

Afin de réaliser cette activité, plusieurs concentrations des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* ont été préparées (50-800 µg / mL) en trois répétitions. Le diclofénac sodique a été utilisé comme médicament de références et les mêmes concentrations ont été testées. Ainsi 50 µl de la suspension érythrocytaire ont été ajoutés à tous les tubes de chaque série puis ces tubes ont ensuite été subdivisés en 2 séries ; l'une a été incubée dans un bain-marie à 54 °C pour une durée de 20 min tandis que l'autre paire a été maintenue à 0 °C pendant 20 min. Cette étape a été suivie d'une centrifugation à 5000 tr/min pendant 5 min puis, à l'aide d'un spectrophotomètre, l'absorbance des surnageants a été mesurée à 560 nm (**Gandhidasan *et al.*, 1991**).

4.4.2. Test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA)

Le principe de cette technique consiste à évaluer le possible effet anti-inflammatoire de notre plante sur la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) induite par la chaleur (72 °C). Ainsi; un volume de 1 mL de chaque concentration d'extrait ou de médicament de référence (diclofénac sodique) a été ajouté à 1 mL de BSA (0.2%) préalablement préparé dans une solution tampon Tris Hcl (PH = 6.6). Le mélange a ensuite été incubé à 37 °C pendant 15 min suivi ensuite d'un deuxième bain-marie à 72 °C pendant 5 min. l'absorbance a été mesurée après refroidissement des tubes à 660 nm (**Kandikattu *et al.*, 2013**).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine a été calculé via cette formule:

$$\% \text{ d'inhibition de la BSA} = [V_s / V_c - 1] \times 100$$

Où,

Vs: représente l'absorbance de l'échantillon à tester,

Vc: représente l'absorbance du témoin.

4.4.3. Test de dénaturation de l'albumine de l'œuf de poule

Un second test de dénaturation des protéines a été effectué mais cette fois ci en utilisant l'albumine de l'œuf de la poule. Ainsi un mélange réactionnel (5 mL) se composant principalement de 200 µl d'albumine (prélevé à partir du blanc d'œuf frais de poule) et 2,8 mL de tampon phosphate (PBS, pH 6.4) en plus de 2 mL de l'extrait de *C. tougourensis* à différentes concentrations (50-800 µg/mL). Ensuite, le mélange a été incubé à 37 °C pendant 15 min puis immédiatement chauffées à 70 °C pendant 5 min. Enfin, les absorbances ont été mesurées à 660 nm et un volume équivalent d'eau distillée a été utilisé comme lot témoin. Le diclofénac sodique a été utilisé comme référence dans ce test qui a été répété 3 fois (**Mehta et al., 2017**).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = [V_s / V_c - 1] \times 100$$

Où,

Vs: représente l'absorbance de l'extrait ou du médicament.

Vc: représente l'absorbance du contrôle.

4.5. Activité antidiabétique

L' α -amylase est une enzyme qui joue un rôle crucial dans le métabolisme glucidique, notamment dans la conversion des polysaccharides complexes en de simples petites molécules appelées monosaccharides facilitant leur digestion et leur absorption par l'organisme qui favorise ainsi l'élévation de la glycémie (**Peyrot et al., 2016**). Cependant, dans certains cas pathologiques tels que le diabète de type 2, il y a un excès d'activité de cette enzyme entraînant ainsi une hyperglycémie anormale (**Yadav et al., 2013**).

Le but de cette expérience est de démontrer la capacité de *C. tougourensis* à inhiber l' α -amylase en se basant sur le modèle de **Agada et al. (2020)**. Tout d'abord, 500 µL d'extrait végétal ou du standard 'acarbose' ont été additionnés à 500 µL d'une solution tampon phosphate (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (0.02 M), NaCl (0.006 M) à pH neutre contenant l'enzyme alpha-amylase (1%). Après une incubation à 37 °C pendant 10 min, un volume de 500 µL d'une solution d'amidon (1%) a été ajouté à la préparation pour initier la réaction. Le mélange est incubé une seconde fois à 37 °C mais cette fois ci pendant 15 min et la réaction est arrêtée par l'addition d'un volume de 1 mL d'une solution d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) puis

placé immédiatement dans un bain marie à (100 °C) pendant 10 min. Enfin, un volume de 5 mL d'eau distillée a été ajouté à la préparation après refroidissement. À l'aide d'un spectrophotomètre, les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 540 nm.

4.6. Activité neuroprotectrice

L'objectif de cette activité est de prouver que les extraits de *C. tougourensis* ont un effet inhibiteur de l'activité de deux enzymes ; l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) respectivement afin de trouver de nouvelles alternatives dans le traitement des maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer et le parkinson (**Holzgrabe et al., 2007**).

Brièvement, 10 µL de solution d'extrait à différentes concentrations (3.125-200 µg/mL) préalablement dissous dans de l'éthanol ont été ajoutés à 150 µL de tampon phosphate de sodium (100 mM; pH= 8.0). Ensuite, 20 µL d'AChE (5.32×10^{-3} U) ou de BChE (6.85×10^{-3} U) ont été ajoutés au mélange puis incubés à 25 °C pendant 15 min.

Il est très important de suivre l'ordre chronologique des étapes de cette activité, ainsi après l'incubation, un volume de 10 µL de DTNB (0.5 mM) a été ajouté au mélange ensuite 10 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0.2 mM) ont été ajoutés au mélange précédent. A noter que la galantamine a été utilisée comme référence. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 412 nm (**Ellman et al. 1961**).

4.7. Activité antimicrobienne

4.7.1. Matériel microbien

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne, six souches de bactérie ont été utilisées dont deux étaient des Gram-positives et quatre autres des Gram-négatives. Ainsi ces souches étaient : *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* pathogène, *Escherichia coli* pathogène et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1117).

Une souche de champignon unicellulaire a été également utilisée, il s'agit de la levure *Candida albicans* (ATCC 90029).

Ces souches ont été fournies en partie par Dr Loucif (Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire) et également par le Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire -Batna- (CHU).

4.7.2. Préparation de l'inoculum (étape d'inoculation)

Tout d'abord les souches bactériennes ont été repiquées sur la gélose de Mueller-Hinton et incubées à 37 °C pendant 24 h tandis que la souche de champignon a été repiquée sur une

gélose de Sabouraud et incubées à 37 °C pendant 48 h. Le but de cet ensemencement est de favoriser la prolifération des souches microbiennes afin d'avoir des colonies bien visibles et exploitables. Les expériences ont été menées dans une zone ne dépassant pas un rayon de 20 cm autour de la flamme du bec bunsen afin d'éviter une éventuelle contamination.

Ainsi avec une anse de platine stérilisée, une colonie isolée de chaque souche de bactéries ou de champignon a été raclée et déchargée dans 5 mL de bouillon nutritif. La suspension bactérienne a été ensuite incubée pour une durée de 10-24 h à 37 °C.

4.7.3. Réalisation du test antimicrobien

La méthode de microdilution a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* (Carev *et al.*, 2018). Ainsi, des disques de papier Wathman (6 mm de diamètre) stérilisés ont été imprégnés de 10 µL de solutions d'extrait, chacun à différentes concentrations (0,00625-0,1 mg/mL) puis déposés soigneusement sur la surface de la gélose préalablement inoculée à l'aide d'un écouvillon stérile chargé de l'inoculum. Les cultures ont été ensuite incubées pendant 24 h dans le cas des souches bactériennes et pendant 48 h dans le cas de la levure. La gentamicine et la pénicilline ont été utilisées comme standards et le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme contrôle négatif. Chacune des manipulations a été répétée 3 fois et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont également été calculées.

5. Evaluations des activités biologiques *in vivo*

5.1. Matériel animal

Des souris mâles et femelles de race Swiss Albinos Wistar (souche BALB/c), pesant entre 25–30 g ont été procurées de l'Institut Pasteur (Alger), puis placées dans des cages métalliques (longueur: 100 cm, largeur: 50 cm, hauteur: 80 cm) et maintenues à une température ambiante (22 ± 1 °C), cycle lumière / obscurité de 12 h avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Avant chaque expérience, les souris ont été soumises à l'acclimatation avec les conditions de laboratoire pendant deux semaines afin de respecter l'éthique de manipulation d'animaux de laboratoire.

5.2. Evaluation de la toxicité aigue

Afin de tester la toxicité orale aigue de l'extrait n-butanol de *C. tougourensis*, un lot de souris mâles (n=6) reçoit une seule dose de 2000 mg /kg (volume de 10 mL de la solution d'extrait préalablement solubilisé dans 0.9% de NaCl) conformément à la directive de l'organisation de coopération et de développements économiques (2008). Les animaux ont

été observés individuellement pendant 14 jours afin de déceler un éventuel signe clinique de toxicité tels qu'un changement de comportement général, rythme respiratoire, yeux, peau, fourrure, activité somatomotrice ou bien une mortalité.

5.3. Activité analgésique

Test de la plaque chauffante

Il s'agit d'un test purement comportemental servant beaucoup plus à tester les réflexes des cobayes et de voir leurs réponses à une stimulation nociceptive (**Koutsoukas et al., 2011**). Le protocole de (**Xu et al., 2014**) a été utilisé pour l'évaluation de cette activité. Ainsi, les souris femelles ont été subdivisées en quatre groupes (n = 6) et prétraitées comme ceci :

Groupe 1: a servi de contrôle négatif et a reçu une solution saline isotonique à 0.9% (10 mL / kg, po).

Groupe 2: a servi de contrôle positif et a reçu de l'aspirine (10 mg / kg, poids corporelle (po)) à un volume de 10 mL/kg.

Groupes 3 et 4 ont reçu respectivement 200 et 400 mg / kg (po) d'extrait n-butanol pour un volume de 10 mL/kg.

Chaque souris testées a été placée sur une plaque chauffante maintenue à une température de 55 ± 0.5 °C ; pour cela un bûcher en verre a été placé sur la surface de la plaque chauffante pour maintenir une surface chauffée stable mais également pour éviter d'endommager les pattes de souris. Un chronomètre a été utilisé pour enregistrer le temps de réaction en secondes et arrêté immédiatement lorsque la souris commence à se lécher ou sauter.

Les souris sélectionnées dans cette étude, avaient un temps de latence de 5 à 30 s. Cependant, une limite de temps a été fixée à 30 s, pour éviter les dommages tissulaires, et le temps de réaction a été noté à 30, 60 et 120 min après les prétraitements oraux.

5.4. Activité anti-inflammatoire

5.4.1. Œdème de la patte induit par la carraghénane

Le modèle de l'œdème de la patte induit par la carraghénane est un bon test pour voir si la plante a éventuellement des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi la méthode de **Lu et al., (2007)** a été utilisée avec quelques légères modifications. Les souris femelles ont d'abord été subdivisées en quatre groupes dont 6 souris par groupe comme suit :

Groupe 1 : a été considéré comme témoin négatif non sain et a reçu uniquement par gavage gastrique une solution saline isotonique (10 mL / kg, po) puis après 30 min une injection sub-plantaire de 0.1 mL de carraghénane (1%) au niveau de la patte droite afin d'induire l'œdème.

Groupe 2 : a été considéré comme témoin positif et a reçu par gavage gastrique de l'indométacine (20 mg / kg, po) puis après 30 min une injection sub-plantaire de 0.1 mL de carraghénane (1%) au niveau de la patte droite afin d'induire l'œdème.

Groupe 3 et 4 : ont reçu respectivement par gavage gastrique une concentration de 200 et 400 mg / kg de poids corporel (po) de l'extrait n-butanolique de *C. tougourensis* puis après 30 min une injection sub-plantaire de 0.1 mL de carraghénane (1%) au niveau de la patte droite afin d'induire l'œdème.

A noter que les pattes gauches des souris sont considérées comme témoin négatif sain.

Le diamètre de l'œdème a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse numérique avant et 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h après l'injection de carraghénane.

Pour calculer le pourcentage d'inhibition de l'œdème, l'équation suivante a été utilisée:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(VC - VT) / VC]$$

Où,

VC : représente le diamètre moyen de l'œdème dans le groupe témoin à un moment donné;

VT : représente le diamètre moyen de l'œdème dans le groupe traité avec l'extrait ou le médicament.

Evaluation des paramètres biochimiques et hématologiques

Les échantillons de sang de souris anesthésiées ont été prélevés à partir de la veine jugulaire en utilisant des épicrotomiennes et transférés dans des tubes appropriés. Le sang a été analysé pour les paramètres hématologiques (globules rouges et blancs, plaquettes, réticulocytes, hématocrite, hémoglobine, lymphocytes, monocytes, neutrophiles, basophiles, éosinophiles) (automates d'hématologie Le XT-2000i) et pour les paramètres biochimiques (albumine et protéine C-réactive) (automate de biochimie COBAS C111 ROCHE).

Examen histologique

Après le sacrifice, les pattes de souris traitée (pattes droites) ainsi que les pattes témoins (pattes gauches) ont été fixées dans une solution de formaldéhyde à 10%, puis décalcifiées avec la solution de Plank-Rychlo. Après cela, elles ont été traitées avec un mélange gradué d'éthanol et de xylène puis incorporées dans de la paraffine. Les coupes de tissus ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) comme préparation pour l'évaluation histologique.

Dans cet examen, la recherche de signes d'inflammations tels que des signes de congestion vasculaire ou bien des hyperkératoses a été ciblée.

5.4.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

Dans ce deuxième test, l'œdème a été provoqué au niveau de la face interne de l'oreille droite de souris mâles via une application de 20 µl d'une solution contenant 80 µg de huile de croton préparée dans une solution acétone-eau (1:1 ,V/V) ; ce groupe a servi de témoin négatif non sain et l'oreille gauche non traité par l'huile de croton a servi de témoin négatif sain.

Un 2^{ème} groupe a servi de témoin positif ayant reçu, en plus de l'agent irritant, 0,5 mg d'indométacine considéré comme référence dans ce protocole.

Deux autres groupes ont reçu respectivement, en plus de l'agent irritant, 2 mg de l'extrait n-butanolique de *C. tougourensis* à deux concentrations (200 et 400 mg/kg).

A noter que le diamètre de chaque oreille ainsi que son poids ont été mesurés avant le traitement puis 2h et 4h après le traitement (**Manga et al., 2004**) et le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = [MPE_{\text{cont}} - MPE_{\text{treat}} / MPE_{\text{cont}}] \times 100$$

MPE_{cont} : représente le pourcentage moyen d'œdème du groupe témoin négatif.

MPE_{treat} : représente le pourcentage moyen d'œdème du groupe soumis à un traitement avec l'extrait ou le médicament.

Examen histologique

Après le sacrifice, les oreilles de souris traitées (oreilles droites) ainsi que les oreilles témoin (oreilles gauches) ont été fixées dans une solution de formaldéhyde à 10%, puis préparées comme précédemment décrit et dans cet examen aussi, la recherche de signes d'inflammation tels que des congestions vasculaires ou bien des hyperkératoses ont été recherchés.

5.5. Activité antipyrétique

Le but de cette activité était d'évaluer l'aptitude de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à diminuer la fièvre provoquée chez les souris par la levure de bière. Pour cela, le protocole de **Muhammad et al., (2021)** a été utilisé. Tout d'abord, la température corporelle normale de chaque souris mâle a été mesurée à l'aide d'un thermomètre numérique, puis la fièvre appelée également pyrexie a été induite chez toutes les souris par injection dorsolatérale d'une suspension aqueuse à 20% de levure de bière (10 mL / kg, po). Ensuite, tous les groupes ont été mis à jeun pendant la nuit avec un accès libre à l'eau pendant 16 h; la température rectale de chaque souris a été enregistrée et seuls les animaux présentant une augmentation de température d'au moins 0.5 °C ont été sélectionnés pour l'étude.

Les souris ont été ensuite divisées en quatre lots (n = 6) comme suit:

Lot 1: a servi de contrôle négatif et a reçu une solution saline isotonique à 0.9% (10 mL/kg, po).

Lot 2: a servi de contrôle positif et a reçu du paracétamol (150 mg/kg, po),

Lots 3 et 4 ont reçu respectivement 200 et 400 mg/kg, po) d'extrait de n-butanol de *Centaurea tougourensis*.

La température rectale de chaque groupe a été enregistrée à 1h, 2h, 3h, 4h et 5h après le traitement et l'équation suivante a été utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition de la pyrexie:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(B - C_n) / B - A] \times 100$$

Où,

B : représente la température rectale après injection de la levure de bière ;

C_n : représente la température rectale après 1, 2, 3, 4 et 5 h de traitement.

5.6. Activité antiulcéreuse

L'activité antiulcéreuse a également été évaluée en utilisant le modèle d'ulcères induits par l'éthanol (Li *et al.*, 2018). Notant que le but de ce test est purement préventif. Avant de lancer l'activité, les souris femelles ont d'abord été mises à jeun pendant 12 h mais avec un accès libre à l'eau. Les souris ont été réparties en 5 lots (n=6) et prétraitées comme suit :

Groupe 1 : a été considéré comme témoin négatif sain et a reçu uniquement par gavage gastrique une solution saline isotonique (10 mL / kg, po).

Groupe 2 : a été considéré comme témoin négatif non sain et a reçu par gavage gastrique une solution saline isotonique (10 mL / kg, po) puis 1 h après, une solution d'éthanol (90%) (10 mL / kg, p.o.) afin d'induire l'ulcère gastrique.

Groupe 3 : a été considéré comme témoin positif et a reçu par voie gastrique de l'oméprazole (20 mg/kg, po) puis 1h après une solution d'éthanol (90%) (10 mL/kg, po) afin d'induire l'ulcère gastrique.

Groupe 4 et 5 : ont reçu respectivement par gavage gastrique une concentration de 200 et 400 mg/kg de poids corporel (po) de l'extrait de n-butanolique de *C. tougourensis et cela* 1h après une solution d'éthanol (90%) (10 mL/kg, p.o.).

Examen histologique

Les animaux ont été sacrifiés et leur estomac a été prélevé puis fixé dans une solution de formaldéhyde à 10%, puis les coupes histologiques ont été préparées comme précédemment décrit.

Des examens à l'échelle macroscopique puis microscopique ont été réalisés afin de déceler d'éventuelles lésions de la muqueuse gastrique.

5.7. Activité cicatrisante

Cette technique a été réalisée en utilisant le procédé de formulation galénique qui consiste à créer une pommade à l'aide d'extraits de plante ainsi que d'autres produits lui donnant sa consistance de pâte (Mengie *et al.*, 2021). Pour réaliser cette activité, la démarche de Rajoo *et al.* (2021) a été suivie avec quelques légères modifications. Après avoir rasé la partie dorsale des souris mâles, elles ont été ensuite anesthésiées puis la plaie a été provoquée selon le modèle d'excision donnant une plaie à une surface de (1.5 cm). Dans ce procédé de formulation, nous avons utilisé de la paraffine bio issue de la cire d'abeilles au lieu d'utiliser la paraffine industrielle, ainsi que la glycérine, la vitamine E, l'eau distillée, ainsi que le tween 80 (employé comme agent émulsifiant). A ce mélange a été ajouté l'extrait n-BuOH (200 et 400 mg de *C. tougourensis* pour le groupe qui a reçu l'extrait ou bien la Bétadine dans le cas du groupe témoin positif. Un autre groupe a servi de placebo et un autre de témoin négatif non sain. Un 6^{ème} groupe a été considéré comme témoin- sain et la partie dorsale de ses souris a été rasée mais aucune plaie n'a été provoquée. Un coton-tige stérile a été utilisé pour appliquer les pommades sur le site de la plaie (Figure 17).

La cicatrisation des plaies des animaux a été suivie pendant 18 jours jusqu'à fermeture complète. La surface des plaies a été calculée à l'aide du logiciel Image J (version 1.8, accès publique libre) et le pourcentage de réduction de la zone de la plaie a été calculé selon la

$$\% \text{ de réduction de la plaie} = \frac{\text{Zone de la plaie au jour 0} - \text{Zone de la plaie au jour (n)}}{\text{Zone de la plaie au jour 0}} \times 100$$

formule suivante :

Examen histologique

Au 18^{ème} jour, la couche de peau recouvrant la zone de plaie a été prélevée puis fixée dans une solution de formaldéhyde à 4%, puis les coupes histologiques ont été préparées comme précédemment décrit.

Des examens à l'échelle microscopique ont été réalisés afin de déceler des éventuelles lésions tissulaires ou de signes de congestion vasculaire.

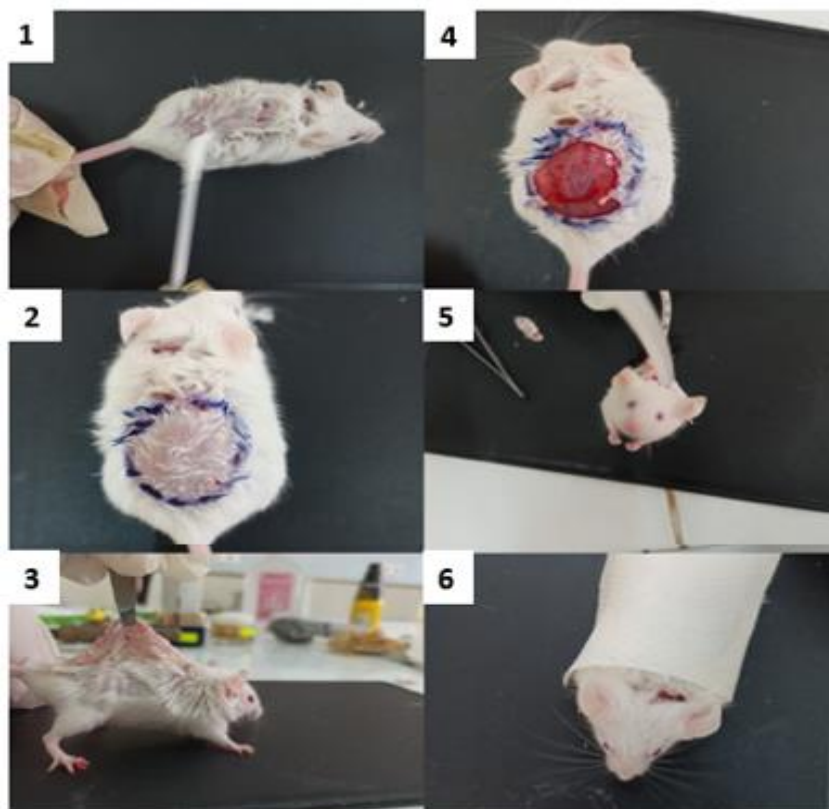


Figure 17. Recapitulatif des principales étapes de l'activité cicatrisante.

(1-2) rasage de la zone dorsale des souris et application de la crème anesthésiante, (3-4) induction de l'excision (zone de 1.5 cm), (5) nettoyage de la zone blessée avec NaCl 0,9% (400 mg / kg), (6) application des traitements respectifs.

5.8. Activité hépatoprotectrice

Cette activité a pour objectif d'évaluer l'effet hépatoprotecteur possible de *C. tougourensis* en utilisant le paracétamol comme agent hépatotoxique. Cette expérience a été réalisée par la méthode de **Hussain et al. (2014)**. a duré une semaine et deux types de silymarine ont été utilisés; l'une industrielle et l'autre naturelle obtenue après purification d'un extrait de plante. Ainsi l'un des buts de cette activité est de comparer l'effet protecteur de ces deux standards. Les souris mâles ont été répertoriées comme ceci :

Le groupe 1 a servi de témoin normal, et n'a reçu qu'une solution saline normale à 0.9% (1 mL/kg par jour, ip) pendant 7 jours consécutifs tandis que le 2^{ème} groupe a été considéré comme témoin négatif non sain et n'a reçu que du paracétamol (250 mg/kg, ip) pendant 7 jours consécutifs. Les 3^{ème} et 4^{ème} groupes ont reçu respectivement le la silymarine industrielle et naturelle comme standard à une concentration de (100 mg/kg, ip) par jour, pendant 7 jours

consécutifs ainsi que du paracétamol (250 mg/kg par jour, ip) 3 h après l'administration de silymarine.

Chez les groupes 5 et 6, les souris ont reçu respectivement deux doses différentes de l'extrait de n-butanolique de *C. tougourensis* (200 et 400 mg/kg de poids corporel, tous les jours pendant 7 jours, puis du paracétamol (250 mg/kg, intrapéritonéale) 3 h après l'administration des extraits.

Le poids corporel des souris a été suivi durant toute la période d'expérimentation.

Examen histologique

Les animaux ont été sacrifiés puis leurs foies ont été prélevés puis fixés dans une solution de formaldéhyde à 10%. Les coupes histologiques ont été préparées comme précédemment décrit.

Des examens à l'échelle microscopique ont été réalisés afin de déceler des éventuelles lésions tissulaires ou de signes de congestion vasculaire ou nécrose.

Evaluation des paramètres biochimiques

Les échantillons de sang de souris anesthésiées ont été prélevés à partir de la veine jugulaire en utilisant des épicrotomiennes et transférés dans des tubes adéquats. Le sang a été analysé au niveau de la clinique Achifa du Dr.GHASSIRI en utilisant un automate de biochimie (COBAS INTEGRA® 400 plus). Les paramètres biochimiques évalués sont : Urée, Créatine, Transaminases (TGO), Transaminases (TGP), Triglycerides, Cholestérol total, HDL, LDL (automate de biochimie COBAS C111 ROCHE)..

5.9. Activité antihyperglycémiant

5.9.1. Test de tolérance au glucose (OGTT)

Il s'agit d'un test préliminaire rapide pour évaluer l'activité hypoglycémique d'une plante et ainsi d'avoir une idée sur un éventuel effet antidiabétique de l'espèce étudiée (**Belgacem *et al.*, 2019**). Ainsi, 3 lots de souris (n=6) préalablement mis à jeun pendant 16 h, ont servi pour la réalisation de ce test et ont été répertoriés comme ceci :

Groupe 1 : a été considéré comme témoin négatif sain et les souris ont reçu par gavage gastrique uniquement une solution saline isotonique à 0.9% (10 mL/kg, po).

Groupe 2 : a été considéré comme témoin positif et les souris ont reçu par voie orale du glibenclamide (10 mg / kg, po) puis après 1h30 une solution de sérum glucosé (2 g/kg, po) afin d'induire un diabète temporaire.

Groupe 3 : a reçu une concentration de 400 mg/kg de poids corporel (po) de l'extrait de n-butanolique de *C. tougourensis* puis après 1h30 une solution de sérum glucosé (2 g/kg, po) afin d'induire un diabète temporaire.

La glycémie des souris de chacun des groupes a été enregistrée via du sang prélevé au niveau de la veine caudale (centrale) avant le traitement puis 30 min, 60 min, 90 min et 120 min après l'administration du sérum glucosé (**Joy et Kuttan, 1999**). Un glucomètre (modèle Issucare) a servi pour la détermination de la glycémie.

De plus, la formule suivante a été utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition de l'hyperglycémie:

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - W_e / W_c) \times 100$$

Où,

W_e : représente la glycémie des souris du groupe traité par l'extrait de la plante ou glibenclamide à un moment donné,

W_c : représente la glycémie des souris du groupe contrôle à un moment donné.

5.9.2. Diabète induit par la streptozotocine

Cette technique est considérée par les diabétologues comme une référence pour l'évaluation des propriétés anti-hyperglycémiantes d'une plante. Ainsi, afin d'évaluer cette activité, la démarche de **Kim et al., (2016)** a été suivie. Le diabète a été provoqué par une seule injection intrapéritonéale de streptozotocine (STZ) à une concentration de 50 mg/kg, mais précédée par une autre injection de nicotinamide (vitamine B3) à une dose de 120 mg/kg afin d'éviter une destruction totale des cellules β pancréatiques par la STZ, très connue pour son action cytotoxique sur les cellules β pancréatiques (**Masiello et al., 1998**). Après 72 h, les souris mâles présentant une glycémie supérieure à 200 mg/dL ont été considérées comme diabétiques et sélectionnées pour cette étude. Ainsi, celles-ci ont été subdivisées en quatre groupes (n=6) et ont reçu pendant 15 jours leur traitement respectif, ainsi ;

Le groupe 1 a été considéré comme témoin négatif non sain et a reçu uniquement par gavage gastrique une solution saline isotonique 0.9% (10 mL / kg, po).

Le groupe 2 a été considéré comme témoin positif et a reçu par gavage gastrique du glibenclamide (5 mg / kg, po).

Les Groupes 3 et 4 ont reçu respectivement par gavage gastrique une concentration de 200 et 400 mg / kg de poids corporel (po) de l'extrait n-butanolique de *C. tougourensis*.

Un 5^{ème} groupe non traité par la streptozotocine a été considéré comme témoin négatif sain. La glycémie des souris de chacun des groupes a été enregistrée à l'aide d'un glucomètre (modèle Issucare) via du sang prélevé au niveau de la veine caudale (centrale) et notée avant l'induction du diabète puis le 1^{er} jour, 5^{ème}, 10^{ème}, 15^{ème} jours après l'induction du diabète par la streptozotocine.

Le poids corporel des souris a été suivi durant toute la période d'expérimentation.

Examen histologique

Les animaux ont été sacrifiés puis leurs pancréas et leurs foies ont été prélevés puis fixés dans une solution de formaldéhyde à 10%, puis les coupes histologiques ont été préparées comme précédemment décrit.

Des examens à l'échelle microscopique ont été réalisés afin de déceler des éventuelles lésions tissulaires ou de signes de congestion vasculaire.

Evaluation des paramètres biochimiques

Les échantillons de sang des souris anesthésiées ont été prélevés à partir de la veine jugulaire en utilisant des épicroaniennes et transférés dans des tubes adéquats. Le sang a été analysé pour les paramètres biochimiques suivants (Urée, Créatine, Transaminases (TGO), Transaminase (TGP), Triglycerides, Cholestérol total, HDL, LDL) (automate de biochimie COBAS C111 ROCHE)..

5.10. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été exprimées pour l'étude *in-vitro* en moyenne \pm SD et pour l'étude *in-vivo* en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par le test ANOVA à un facteur suivi des tests multiples de Dunnett via le logiciel Graph Pad Prism (version 8). Les résultats ont été considérés significatifs à $p < 0.05$, hautement significatifs à $p < 0.01$ et très hautement significatif à $p < 0.001$.

Chapitre 2

Résultats et discussion

1. Etude phytochimique

1.1. Rendement d'extraction

Les différentes étapes d'extraction ont permis d'obtenir trois extraits distincts à polarité croissante qui sont respectivement : l'extrait n-héxanique, l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait n-butanolique.

Les différents rendements obtenus de chacun des extraits de *C. tougourensis* sont représentés au niveau du **Tableau 4**. Le rendement le plus important a été obtenu avec le solvant n-butanol (1.58%), tandis que le rendement le plus faible a été obtenu avec le solvant le moins polaire, qui est dans cette étude le n-héxane (0.42%). Il a également été démontré que la plupart des composés bioactifs se concentrent dans les extraits les plus polaires (**Wrona et al., 2019**), ce qui explique notre choix de tester principalement dans notre étude, les extraits n-butanolique (n-BuOH) et acétate d'éthyle (EA). De plus, les meilleurs rendements ont été obtenus avec ces deux extraits.

Tableau 4. Rendement aspect et couleur des extraits de *C. tougourensis*.

Type d'extrait	Abbréviation	Rendement	Aspect	Couleur
n-butanolique	n-BuOH	1.58 %	Pâteux	Marron
Acétate d'éthyle	EA	1.03 %	Poudreux	Vert foncé
n-héxanique	n-Hex	0.42 %	Poudreux	Vert foncé

Des rendements comparables ont été rapportés par d'autres chercheurs sur diverses espèces de *Centaurea* tels que *C. microcarpa* et *C. cyanus*. Ainsi, le rendement de l'extrait n-BuOH de *C. microcarpa* était de (2.06%) (**Bremer, 1994**) et le rendement de l'extrait méthanolique pure de cette même espèce était de (3.696%) (**Ferhat et al., 2008**). Concernant l'espèce *C. cyanus*, le rendement de l'extrait n-BuOH de *C. cyanus* était de (1.31%) et celui de l'extrait EA était de (1.12%) (**Spellenberg, 2019**), ce qui en parfait accord avec les résultats trouvés avec *C. tougourensis*. Notant également que le procédé d'extraction suivi par ces chercheurs était une extraction de type liquide-liquide, ainsi la même démarche a été suivie dans cette étude pour l'obtention des différents extraits de *C. tougourensis*.

De bons rendements ont également été rapportés chez une autre espèce de *Centaurea* nommée *C. sempervirens*, pour l'extrait n-BuOH, les rendements étaient de (2.50%) à partir des fleurs et (1.53%) à partir des feuilles. Tandis que les résultats de l'extrait EA étaient de (0.41%) à partir des fleurs et (0.81%) à partir des feuilles. Le rendement le plus faible dans leur étude a été observé chez l'extrait éther de pétrole (**Belbache, 2018**).

L'extraction de type liquide-liquide est l'une des méthodes d'extraction les plus fiables et utilisée d'ailleurs par de nombreuses équipes de recherche à travers le monde. Cette technique a été utilisée dans cette étude en raison de plusieurs avantages tels qu'une grande sélectivité lors du processus de séparation (**Silvestre et al., 2009**) outre la garantie d'avoir des extraits riches en composés si les étapes d'extraction sont bien respectées (**Canbay, 2017**).

Cependant, comme toute technique, elle présente également des inconvénients tels que l'obligation de répéter plusieurs fois les étapes d'extraction afin d'obtenir un rendement optimal. L'utilisation de gros volumes de solvants organiques qui doivent généralement être très purs, et parfois même des difficultés d'émulsion qui entravent la récupération complète de l'extrait (**Breitenbucher, 2001 ; Ötles et Kartal, 2016**).

Il ya également d'autres méthodes d'extraction et chacune d'entre elles a ces avantages et ces inconvénients, de la plus simple dite macération jusqu'aux méthodes d'extractions les plus complexes telles que l'extraction par fluide supercritique (SFE) ou bien l'extraction électrique pulsée (PEE) (**Epifano et al., 2018**).

1.2. Analyse qualitative

Comme le montre le **Tableau 5**, le criblage phytochimique de *C. tougourensis* a permis de déceler la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires, dont principalement les flavonoïdes, saponines, triterpènes, tanins, anthocyanes, quinones et mucilages comme polysaccharides. Ceci est en parfait accord avec des travaux antérieurs (**Medjroubi et al., 1998 ; Bentamene et al., 2010 ; Hammoud et al., 2012 ; Kitouni et al., 2015**) réalisés sur d'autres espèces Algériennes endémiques du genre *Centaurea* tels que *C. calcitrapa*, *C. granata*, *C. sicula* et *C. phaeocephala* et qui ont montré la richesse de ces espèces en tanins, sesquiterpènes lactones, flavonoïdes, saponines et d'autres terpènes. Il est également très important de noter que les espèces de la famille des *Astéracées* sont très convoitées en raison de leur richesse en composés bioactifs et plus de 7000 composés ont été isolés dont 5000 identifiés jusqu'à présent (**Panda et Luyten, 2018**). Ces composés sont principalement des flavonoïdes, acides phénoliques, glycosides, terpénoïdes (**Silva et al., 2011 ; Soković et al., 2019**).

Tableau 5. Résultats du criblage qualitatif de *C. tougourensis*.

Classes phytochimiques	Nom du test	Résultats d'analyse
Tanins	Test au chlorure ferrique	+++
Stéroïdes	Test de Liebermann-Burchard	-
Flavonoïdes	Test de Shinoda	+++
Anthocyanes	Test de Bornträger	++
Triterpènes	Test de Liebermann-Burchard	+++
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	+
Quinones	Test du NaOH	++
Saponines	Test de mousse	+++
Mucilage	Test d'éthanol	+++
Composés cyanogènes	Test du picrate de sodium de Guignard	-
Glycosides cardiotoniques	Test de Keller-Kiliani	-

(-) = Absent; (+) = Faible concentration; (++) = Concentration modérée; (+++) = Forte concentration.

En Algérie, plus de 65 types de flavonoïdes ont été identifiés jusqu'à présent dans diverses espèces de *Centaurea* dont 33 étaient des flavonoïdes aglycones et 32 des flavonoïdes glycosides (Ayad et Akkal, 2019). De même, près de 59 types de sesquiterpènes lactones ont été isolés et identifiés des espèces *Centaurea* algériennes (Abad Martinez et al., 2012).

Certaines études (Xu et al., 2004 ; Sandjo et Kuete, 2013) ont démontré que les *Centaurea* algériennes contiennent une très forte proportion de saponines et de triterpénoïdes, parmi ces espèces ; *C. omphalotricha* et *C. acaulis*. Cependant, dans ces deux espèces, l'analyse qualitative a révélé l'absence des stéroïdes ou leur présence en minorité par rapport aux autres classes identifiées. De même, les stéroïdes n'ont pas été détectés dans cette étude, ce qui est en accord avec les précédents travaux cités et le résultat de la présente étude.

Les *Centaurea* sont également très riches en acides phénoliques, ce qui a été démontré chez certaines espèces telles que *C. choulettiana* et *C. melitensis* (Ayad et al., 2012 ; Azzouzi et al., 2016). Il est très important de signaler que cette richesse en composés bioactifs a été décelée que ce soit au niveau des extraits ou bien des huiles essentielles des plantes (Milosević et al., 2010 ; Maggio et al., 2014 ; Albayrak et al., 2017). L'analyse a également révélé la présence des alcaloïdes mais en faible proportion, tandis que, les composés cyanogènes, glycosides cardiotoniques et stéroïdes n'ont pas été trouvés. D'autres travaux ont également révélé des niveaux très faibles d'alcaloïdes dans diverses espèces de *Centaurea* ce qui est en accord avec les résultats de cette étude.

Diverses recherches (Garcia-Jacas et al., 2006 ; Zengin et al., 2019 ; Petropoulos et al., 2020) menées sur la composition phytochimique de plusieurs espèces de *Centaurea* à travers le monde, notamment dans les pays bordant la méditerranée tels que l'Algérie, le Maroc, l'Espagne et la Turquie qui ont révélé la richesse de ces espèces en flavonoïdes, terpènes, anthocyanes, alcaloïdes et saponines. Parmi ces espèces ; *C. bornmuelleri*, *C. raphanina* et *C. diluta*, ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés avec *C. tougourensis*.

1.3. Résultats de la quantification des composés phénoliques par spectrophotométrie

Les différents rendements obtenus ainsi que la matière sèche de chacun des extraits de *C. tougourensis* sont représentés au niveau du **Tableau 6**. Les résultats indiquent une teneur en polyphénols plus élevée dans l'extrait EA (124.02 ± 1.57 μg équivalent d'acide gallique / mg d'extrait) contre (85.44 ± 3.89 EAG mg/ d'extrait) pour le n-BuOH. Cependant, la teneur en flavonoïdes de l'extrait n-BuOH était bien supérieure (25.55 ± 1.11 μg équivalent quercétine / mg d'extrait) avec (0.40 ± 0.01 mg/g poids sec). Mais il semblerait que la teneur en tanins de cette fraction végétale soit moins importante que celle de l'extrait EA qui a montré une valeur plus élevée (88.13 ± 0.17 μg équivalent acide tannique/ mg d'extrait), avec (0.90 ± 0.04 mg/g poids sec). Ces résultats sont très logiques vu la richesse des espèces du genre *Centaurea* en tanins telles que *Centaurea calcitropa* et *Centaurea stoebe* (Amna et al., 2020 ; Dixon et Sarnala, 2020).

Tableau 6. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis*.

Type d'extrait	Teneur totale en polyphénols		Teneur totale en flavonoïdes		Teneur totale en tanins	
	(μg EAG mg/ d'extrait)	mg/g MS	(μg EQ mg/ d'extrait)	mg/g MS	(μg EAT mg/ d'extrait)	mg/g MS
n-BuOH	85.44 ± 3.89^c	1.34 ± 0.06^a	25.55 ± 1.11^{ns}	0.40 ± 0.01^b	51.87 ± 0.02^c	0.81 ± 0.01^a
EA	124.02 ± 1.57	1.27 ± 0.02	21.97 ± 1.34	0.22 ± 0.03	88.13 ± 0.17	0.90 ± 0.04

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3) suivit du test de student ^aP < 0.05, ^bp < 0.01, ^cp < 0.001, ^{ns} : non significative. comparé avec l'extrait EA. EAG: Equivalent d'acide gallique, EQ: Equivalents de quercétine, EAT: Equivalent d'acide tannique, MS: Matière sèche.

Des études phytochimiques antérieures (Hosseinimehr et al., 2007 ; Kuš et al., 2014 ; Escher et al., 2018) sur les espèces *Centaurea* telles que *Centaurea cyanus*, *Centaurea depressa* et *Centaurea americana* ayant rapporté des niveaux élevés de tanins, de flavonoïdes,

de polyphénols et de terpènes dans ces espèces. Ce constat est en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

D'autres chercheurs ont corrélé le potentiel pharmacologique de huit espèces de *Centaurea* avec leurs teneurs élevées en polyphénols, flavonoïdes et tanins, en particulier chez *C. triumfettii*, *C. patula* et *C. pulchella* (Zengin *et al.*, 2016). Des analyses qualitatives et quantitatives des fractions n-BuOH et EA de *Centaurea choulettiana*, ont révélé des niveaux élevés de composés phénoliques et de flavonoïdes (Azzouzi *et al.*, 2016) mais des valeurs plus élevées ont été trouvés pour l'extrait EA, ainsi les teneurs en phénols et flavonoïdes de l'extrait EA de feuilles étaient de $(325.81 \pm 0.038 \text{ mg EAG et } 263.73 \pm 0.004 \text{ mg EQ /g d'extrait})$ respectivement.

Une étude utilisant l'approche RMN (^1H et ^{13}C) a permis de révéler la présence de beaucoup de composés de nature phénolique dont les tanins, flavonoïdes et acides phénoliques dans l'espèce *Centaurea calolepis* tels que vicénine-2, vitexine, isovitexine, homoorientine, rutine, orientine, lutéoline-7-O-glycoside et acide chlorogénique. Cette richesse en composés bioactifs pourrait expliquer, selon les auteurs, les effets antioxydant, anti-inflammatoire et cytotoxique non négligeables de leurs extraits chloroformique et méthanolique (Erel *et al.*, 2011).

Il est également très intéressant de souligner la teneur élevée en polyphénols de l'extrait EA (119.23 mg EGA/g d'extrait) de l'espèce *C. pulchella* (Zengin *et al.*, 2016), ce qui est en parfait accord avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*, témoignant de la richesse des espèces du genre *centaurea* en métabolites secondaires qui la placent ainsi parmi les espèces les plus convoitées de la famille des Astéracées. Notant également que dans cette même étude, *C. pulchella* a exhibé une très bonne activité anti-enzymatique contre la cholinestérase, tyrosinase, amylase et glucosidase, ce qui est très important pour aider à prévenir et/ou traiter les maladies associées aux maladies neurodégénératives ainsi que le diabète.

Une autre étude menée par (Albayrak *et al.*, 2007) a comparé le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de deux espèces de *Centaurea* ; à savoir *C. amaena* et *C. aksoyi*. Les résultats obtenus à partir de l'extrait de *C. aksoyi* étaient de 3.28 mg EGA/g tandis que pour *C. amaena*, il était de 3.62 mg EGA/g. Les teneurs en flavonoïdes de l'extrait de *C. aksoyi* étaient de 6.96 mg EQ/g d'extrait et 5.83 mg EQ/g d'extrait pour *C. amaena*. Les chercheurs de cette étude ont corrélé la richesse de ces deux espèces en polyphénols avec leur activité antioxydante très importante décelée lors du test DPPH et β -

carotène mais également un effet antibactérien contre de nombreuses souches pathogènes, ce qui en accord avec les résultats chimiques obtenus avec *C. tougourensis*.

Il est également très intéressant de constater que la teneur en flavonoïdes obtenue avec l'extrait EA de *C. tougourensis* (21.97 ± 1.34 μg équivalent quercétine / mg d'extrait) était supérieure à celle rapportée par **Bremer et al. (1994)** sur l'espèce *Centaurea microcarpa* qui n'était que de 1.0475 μg EQ mg/ d'extrait EA.

1.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les composés des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* ont été identifiés par GC-MS. le chromatogramme de chaque extrait est représenté au niveau des **Figures 18** et **19** respectivement. La formule moléculaire, le temps de rétention et l'aire du pic de chaque composé identifié sont représentés dans le **Tableau 7** et **8**.

Les données obtenues ont révélé la présence de 45 composés dans l'extrait n-BuOH, dans lequel 12 composés étaient majoritaires, à savoir ; 2H-Furo[2,3-b]indole, 3,3a,8,8a-tétrahydro-2,3-diméthyl- (16.12 %), Benz[c]pyran-1,3-dione, 4,4-diméthyl - (14.87 %), acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique (9.69 %), hydromorphone (7.94 %), acétamide, N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p (6.14 %), 2,6-Di-n-propyl-4-(2-furyl)pyridine (6.11 %), Norhydrocodone (5.98 %), Anthracène, 1, 2,3,4,5,6,7,8-octahydro- (4.72 %), 2,4,6-Triméthylbenzonnitrile, N-oxyde (4.47 %), 3-O-Méthyl-d-glucose (2.94 %), 3,5-Diéthyl-4-(2-furyl)pyridine (2.75 %) et 3H-Pyrrolo[3,2-f]quinoléine, 5-méthoxy-1,2,7,9-tétraméthyl- (2.30 %).

L'analyse de l'extrait EA a permis l'identification de 23 composés, parmi lesquels 13 composés étaient majoritaires à savoir ; [Bi-1,4-cyclohexadiène-1-yl]-3,3',6,6'-tétrone, 4,4'-dihydroxy-2,2',5,5'-tétraméthyl- (27.31 %), Acide thiosulfurique (H₂S₂O₃), ester de S-(2-aminoéthyle) (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, 1,5,4-dibromo- (5.74 %), heptacos-1-ène (5.03 %), acide propionique, 3-iodo-, ester tétradécylique (4.92 %), 2-Méthyl-E-7-octadécène (4.68 %), 7,8-Epoxy lanostan-11-ol, 3-acétoxy- (3.65 %), 4-Fluoro-1-méthyl-5- acide carboxylique, éthyl(ester) (3.15 %), tétrapentacontane, 1,5,4-dibromo- (2.79 %), acide undéc-10-énoïque, ester tétradécylique (2.77 %), 3,7,11,15-tétraméthyl-2-hexadécén-1-ol (2.72%).

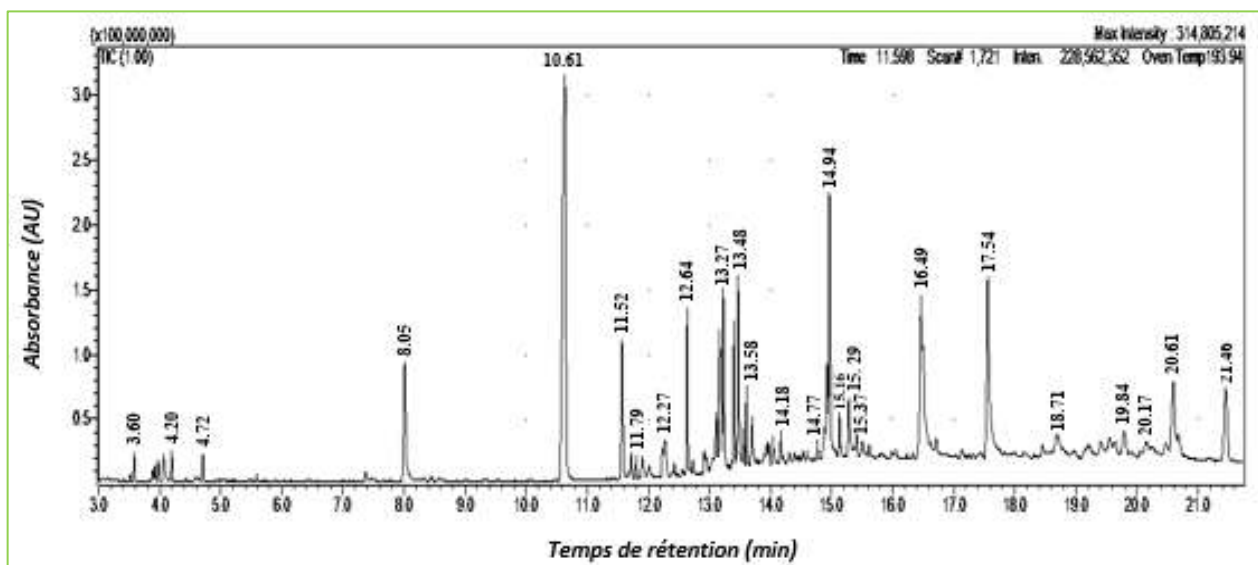


Figure 18. Chromatogramme (GC-MS) de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis*.

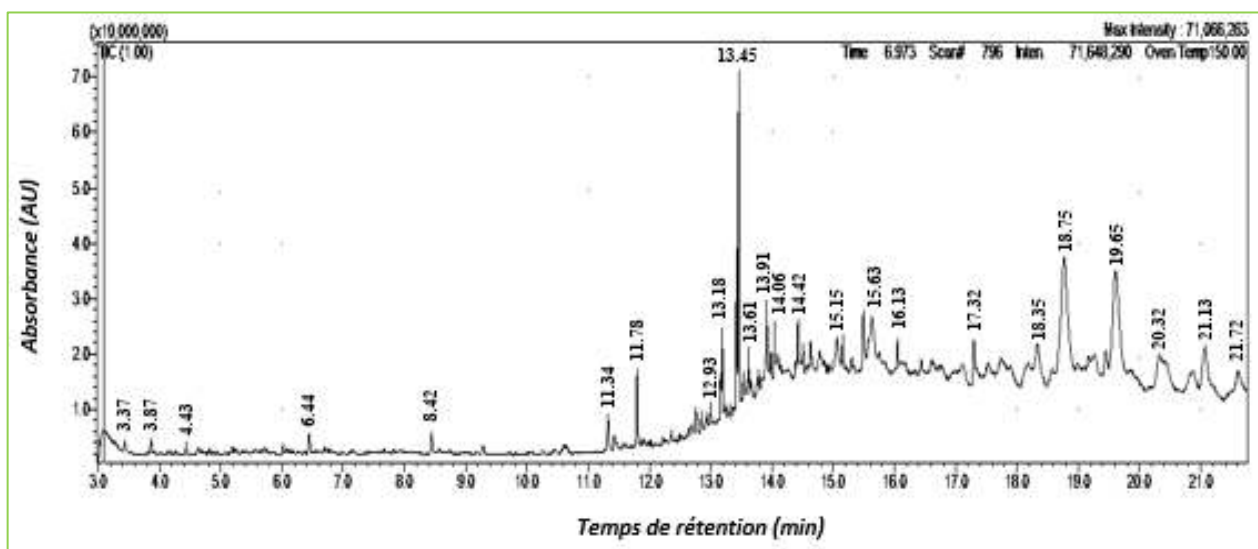


Figure 19. Chromatogramme (GC-MS) de l'extrait EA de *C. tougourensis*.

Tableau 7. Constituants phytochimiques identifiés dans l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* par GC-MS.

Pic N°	TR (min)	Aire (%)	Formule moléculaire	Identité
1	3.17	0.04	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	dl-Allo-cystathionine
2	3.48	0.02	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	Acide 2-propénoïque, ester 1-méthylundécyclique
3	3.52	0.10	C ₁₀ H ₁₈ O	5-Octen-2-one, 3,6-diméthyl-
4	3.60	0.28	C ₈ H ₁₄ O	4-Hexen-2-one, 3,4-diméthyl-
5	3.86	0.20	C ₆ H ₁₂ O ₂	1,2-Cyclopentane-1,2-diol, 3-méthyl-
6	3.92	0.25	C ₈ H ₁₄ O	4-Hepten-3-one, 5-méthyl-
7	4.07	0.39	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ Si	Silanediamine, 1,1-diméthyl-N,N'-diphényl-
8	4.20	0.36	C ₈ H ₁₄ O	3-Heptyn-2-ol, 2-méthyl-
9	4.56	0.08	C ₈ H ₁₆ O ₈	1-Gala-1-ido-octose
10	4.63	0.13	C ₁₁ H ₁₂ OS ₂	Méthanone, 1,3-dithian-2-ylphényl-
11	4.72	0.34	C ₁₀ H ₂₂ O	n-Propyle heptyl éther
12	5.16	0.04	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	S-(2-aminoéthyl)-dl-cystéine
13	5.59	0.12	C ₆ H ₁₂ O ₅	2-Déoxy-D-galactose
14	5.88	0.03	C ₃₄ H ₅₀ O ₄	Cholest-7-en-3.beta.,5.alpha.-diol-6.alpha.-benzoate
15	6.17	0.03	C ₇ H ₁₅ NO	2-(oxan-3-yl)éthanamine
16	7.11	0.01	C ₇ H ₁₂ O ₆	2,5-Monoformal-1-rhamnitol
17	7.19	0.02	C ₈ H ₁₄ O ₅	1,3:2,5-Diméthylène-L-rhamnitol
18	7.38	0.16	C ₈ H ₉ NO	Éthanone, 1-(6-Méthyl-3-Pyridinyl)-
19	8.05	4.47	C ₁₀ H ₁₁ NO	2,4,6-Triméthylbenzonnitrile, N-oxyde
20	8.43	0.12	C ₇ H ₅ N ₅ O ₃	Acide ptérine-6-carboxylique
21	9.57	0.06	C ₁₅ H ₁₁ F ₁₃ N ₂ O ₆	Uridine, 5-tridécafluorohexyle-
22	10.61	14.87	C ₁₁ H ₁₀	Benz[c]pyran-1,3-dione, 4,4-diméthyl-
23	11.52	6.14	-	Acétamide, N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p
24	11.72	0.46	C ₁₉ H ₁₃ BrClNO ₃	3-[3-Bromophényl]-7-chloro-3,4-dihydro-10-hydroxy-1,9(2H,10H)-acridinedione
25	11.79	0.45	-	1-[2-[2H,4H-1,2,4-Triazin-3,5-dithione]]-1-désoxy-.beta.-d-ribose
26	11.93	0.62	-	2,2-Diméthyl-3-phényl-N-tert-butylaziridine-1-carboxamide
27	12.04	0.37	C ₇ H ₁₂ O ₆	2,5-Monoformal-1-rhamnitol
28	12.27	2.94	C ₇ H ₁₄ O ₆	3-O-Méthyl-d-glucose
29	12.64	4.72	C ₁₄ H ₁₈	Anthracène, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-
30	12.75	0.36	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	Curan-19,20-diol, 16,17-didehydro-, (19S)-

31	12.97	1.18	C ₁₅ H ₁₈ N ₂	Acridin-9-amine, 1,2,3,4-tétrahydro-5,7-diméthyl-
32	13.16	2.30	-	3H-Pyrrolo[3,2-f]quinoléine, 5-méthoxy-1,2,7,9-tétraméthyl-
33	13.27	5.98	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	Norhydrocodone
34	13.39	2.75	C ₁₃ H ₁₅ NO	3,5-Diéthyl-4-(2-furyl)pyridine
35	13.48	6.11	-	2,6-Di-n-propyl-4-(2-furyl)pyridine
36	13.58	1.49	C ₂₅ H ₃₈ O ₂	Ester 4-phényl-cyclohexyle acide 4-hexyl-cyclohexanecarboxylique
37	13.61	1.28	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₄	3-[2,3-Dihydro-2,2-diméthylbenzofuran-7-yl]-5-méthoxy-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one
38	14.18	0.65	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	9,9-Diméthoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione
39	14.77	0.48	C ₂₈ H ₄₂ O	Anthiaergostan-5,7,9,22-tétraen, 3-ureido-
40	14.94	7.94	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	Hydromorphone
41	15.16	1.36	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	Acide tétradécanoïque, 2-décyl-2-méthyl-
42	15.29	1.55	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	Spiro[2H-furo[3,2-b]indole-2,2'-[2H]indol]-3'-ol, 1',3,3',3a,4,8b-hexahydro-3',3a,8b-triméthyl-
43	15.37	0.51	C ₃₀ H ₅₄ OSi	Cholest-5-en-3-ol, (3.alpha.)-, dérivé TMS
44	16.49	8.37	C ₁₂ H ₁₅ NO	2H-Furo[2,3-b]indole, 3,3a,8,8a-tétrahydro-2,3-diméthyl-
45	17.54	7.75	C ₁₂ H ₁₅ NO	2H-Furo[2,3-b]indole, 3,3a,8,8a-tétrahydro-2,3-diméthyl-
46	18.71	1.08	/	Composé non identifié
47	19.84	0.96	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	Acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique
48	20.17	0.39	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	Acide octanoïque, ester hexadécylique
49	20.61	4.95	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	Acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique
50	21.46	4.74	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	Acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique
/	/	100	/	Totale

Tableau 8. Constituants phytochimiques identifiés dans l'extrait EA de *C. tougourensis* par GC-MS.

Pic N°	TR (min)	Aire (%)	Formule moléculaire	Identité
1	3.37	0.56	C ₇ H ₁₄ O	5-Hexen-2-ol, 5-méthyl-
2	3.87	0.94	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	dl-Allo-cystathionine
3	4.43	0.42	C ₆ H ₄ Cl ₂	Benzène, 1,3-dichloro-
4	5.18	0.19	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	S-[2-Aminoéthyl]-dl-cystéine
5	5.23	0.13	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	1-Méthoxy-3-(2-hydroxyéthyl)nonane
6	6.44	1.27	C ₇ H ₉ NO ₂	1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-éthyl-4-méthyl-
7	8.42	1.45	C ₁₄ H ₃₀ O	1-Tétradécanol
8	8.57	0.08	C ₁₇ H ₃₁ F ₃ O ₂	3-Trifluoroacétoxyptadécane
9	11.34	2.64	C ₁₄ H ₁₆ O ₂ S ₂	3-Méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde
10	11.46	0.81	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
11	11.78	3.41	C ₁₄ H ₁₆ O ₂ S ₂	3-Méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde
12	12.37	0.38	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
13	12.93	1.07	C ₁₄ H ₁₆ O ₂ S ₂	3-Méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde
14	13.14	0.04	C ₁₁ H ₂₀ O	(2,2,6-Triméthyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-méthanol
15	13.18	5.03	C ₂₇ H ₅₄	Heptacos-1-ène
16	13.31	0.25	C ₁₆ H ₃₀ O	7-Hexadécénale, (Z)-
17	13.45	8.91	C ₁₈ H ₃₆ O	2-Pentadécane, 6,10,14-triméthyl-
18	13.61	2.72	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-Tétraméthyl-2-hexadécén-1-ol
19	13.91	3.86	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
20	14.06	2.77	C ₂₅ H ₄₆ O ₂	Acide undéc-10-énoïque, ester tétradécyclique
21	14.42	3.09	C ₅₄ H ₁₀₈ Br ₂	Tétrapentacontane, 1,54-dibromo-
22	15.15	2.65	C ₅₄ H ₁₀₈ Br ₂	Tétrapentacontane, 1,54-dibromo-
23	15.49	3.15	C ₇ H ₉ FN ₂ O ₂	Acide 4-fluoro-1-méthyl-5-carboxylique, éthyl(ester)
24	15.63	4.92	C ₁₇ H ₃₃ IO ₂	Acide propionique, 3-iodo-, ester tétradécyclique
25	16.13	1.86	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
26	16.65	0.81	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	Iso-allochololate d'éthyle
27	17.32	2.79	C ₅₄ H ₁₀₈ Br ₂	Tétrapentacontane, 1,54-dibromo-
28	18.35	3.65	C ₃₂ H ₅₄ O ₄	7,8-Epoxyanostan-11-ol, 3-acétoxy-
29	18.75	13.83	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[Bi-1,4-cyclohexadiène-1-yl]-3,3',6,6'-tétrone, 4,4'-dihydroxy-2,2',5,5'-

				tétraméthyl-
30	19.65	13.48	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[Bi-1,4-cyclohexadiène-1-yl]-3,3',6,6'-tétrone, 4,4'-dihydroxy-2,2',5,5'- tétraméthyl-
31	20.32	5.02	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
32	21.13	4.68	C ₁₉ H ₃₈	2-Méthyl-E-7-octadécène
33	21.72	3.14	C ₂ H ₇ NO ₃ S ₂	Acide thiosulfurique (H ₂ S ₂ O ₃), ester S-(2-aminoéthyl)
/	/	100	/	Totale

Une étude utilisant l'approche GC-MS a déterminé la composition chimique de l'extrait n-BuOH de l'espèce *Centaurea solstitialis* et a permis l'identification de cinq flavonoïdes qui étaient 3-(4-hydroxybenzoyl)-cynaratriol, Kaempférol 3-O-rhamnoside, Astragaline, 4β, 15-dihydro-3-déshydrosolstiline, 6-Methoxy kaempférol 3-O-β-glucopyranoside respectivement (**Aliouchea et al., 2020**). Ainsi, certains de ces composés ont une nature osidique et cette information est très capitale puisque leur espèce peut en partie intervenir dans les processus antioxydant et antidiabétique, en effet parmi les composés identifiés au niveau de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis*, certains composés aussi étaient de nature osidique : le 3-O-Méthyl-d-glucose et le 2-Désoxy-D-galactose.

L'analyse phytochimique par GC-MS de l'extrait EA de *Centaurea senegalensis* a révélé la présence de 18 composés dont la majorité étaient en grande partie des acétylènes naturels tels que 1, 5-heptadiène-3-yne, le 2-hexyne-1-ol et le 2-méthyl-1,5 hexadiène-3-ène et qui étaient de plus des composés majoritaires avec des pourcentages de 23.2%, 12.3% et 6.6% respectivement dans leur extrait (**Idris et al., 2019**). Un dérivé d'acétamide a été identifié du nom de N-prop-2-énylacétamide tandis que dans l'extrait EA de *C. tougourensis*, un autre dérivé d'acétamide a été identifié appelé acétamide, N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p et qui était l'un des composés majoritaires avec un pourcentage de 6.14 %.

Une étude récente (**Sharonova et al., 2021**) a comparé la composition phytochimique de trois espèces de *Centaurea* respectivement *C. jacea*, *C. cyanus* et *C. scabiosa* et a révélé leur richesse en composés bioactifs. Ainsi, 13 composés ont été identifiés à partir de l'extrait méthanolique de *C. jacea* et qui étaient majoritairement des flavonoïdes. Deux composés majoritaires ont été identifiés dans l'extrait éthanolique de *C. cyanus* ; catéchol et alpha-amyrine respectivement, qui à eux seuls représentent 20% de la composition phytochimique de cette espèce. A partir de l'extrait éthanolique de *C. scabiosa* ; 27 composés au total ont été identifiés dont 29.10% étaient des acides gras carboxyliques, 15.35% étaient des composés hétérocycliques, 15.22% des esters, 6.33% des hydrazides aromatiques, 4.61% des

sesquiterpénoïdes, 4.45% des phénylpropanoïdes, 3.44% des éthers aromatiques, 3.38% des disaccharides mais aucun composé en commun avec *C. tougourensis* n'a été observé.

Onze composés ont été identifiés par **Kumar et al. (2017)** à partir de l'extrait méthanolique de *Centaurea depressa* et qui étaient des flavonoïdes, ces composés ont démontré dans la même étude une très bonne activité antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire.

Yayli et ses collaborateurs (2005) ont identifié un nombre important de composés au niveau des huiles essentielles de *Centaurea sessilis* et *Centaurea armena* ; ainsi, près de 35.1% des composés identifiés chez *C. sessilis* étaient de nature sesquiterpénique et diterpénique. Cette fraction était majoritaire tandis que les composés qui étaient des monoterpènes étaient minoritaires (2.8%). Des résultats équivalents ont été obtenus avec *C. armena*. Une autre étude toujours menée sur les huiles essentielles de *Centaurea sibthorpii* a permis l'identification de 63 composants dont la majorité était essentiellement des composés de nature sesquiterpénique (**Formisano et al., 2008**). Cette même équipe a identifié 73 composés à partir des huiles essentielles d'une autre espèce de *Centaurea* appelée *C. spinosociliata*, dont la fraction majoritaire était composée d'hydrocarbures (37.9%) (**Formisano et al., 2010**).

1.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-DAD)

Il est important de souligner que la technique HPLC-DAD est une technique de référence pour l'identification et la quantification des composés à partir de divers extraits végétaux (**Baker et al., 2019**).

L'analyse HPLC des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* a révélé la présence de treize composés phénoliques basés sur une séparation moléculaire à trois longueurs d'onde : 280 nm, 320 nm et 350 nm (**Figures 20-25**) respectivement. Les composés identifiés étaient principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques à savoir : acide gallique, catéchine, quercétine, rutine, coumarine, vanilline, acide trans-férulique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide caféique et l'acide chlorogénique en plus de l'acide tannique comme tanin hydrolysable. Et des acides cinnamique et trans-cinnamique comme précurseurs de composés phénoliques.

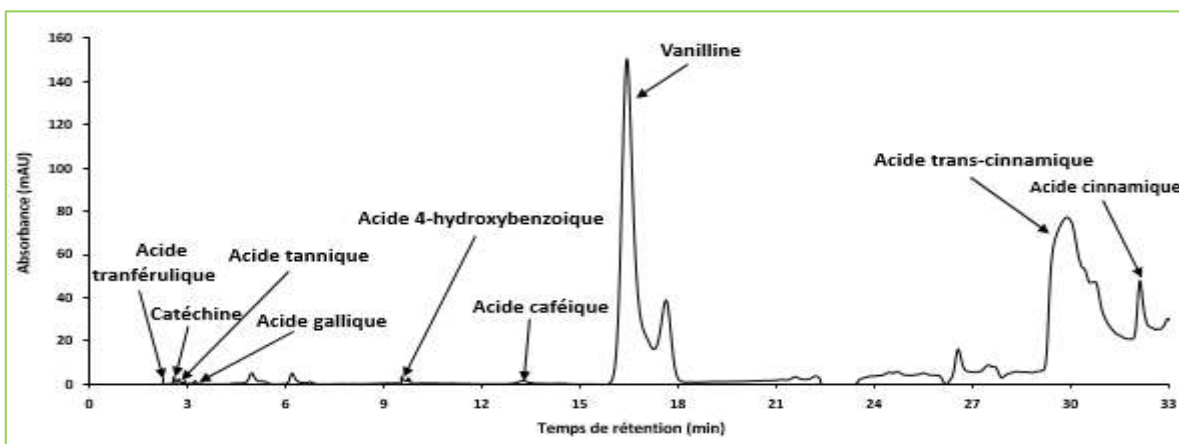


Figure 20. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 280 nm.

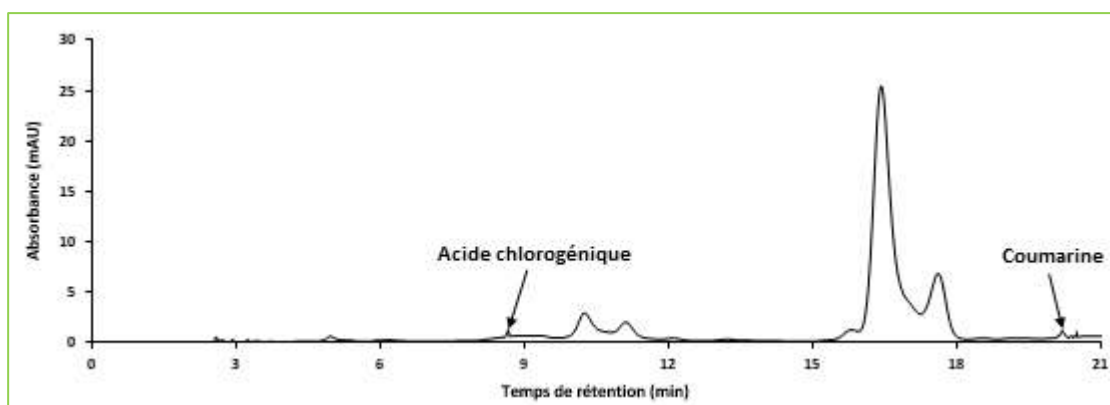


Figure 21. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 320 nm.

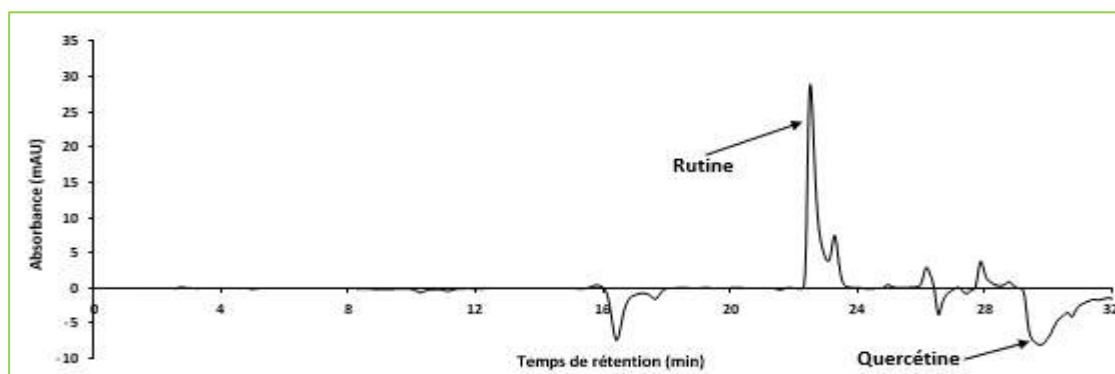


Figure 22. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 350 nm.

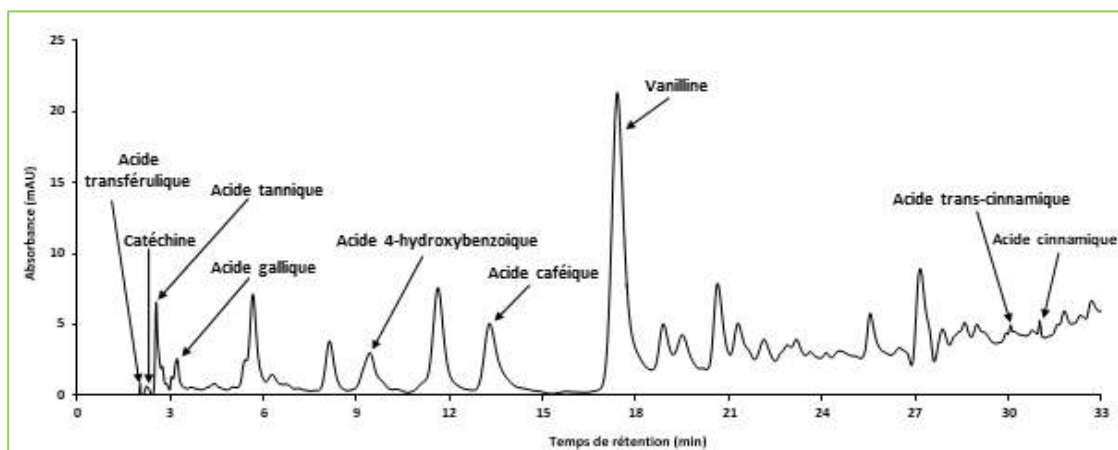


Figure 23. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 280 nm.

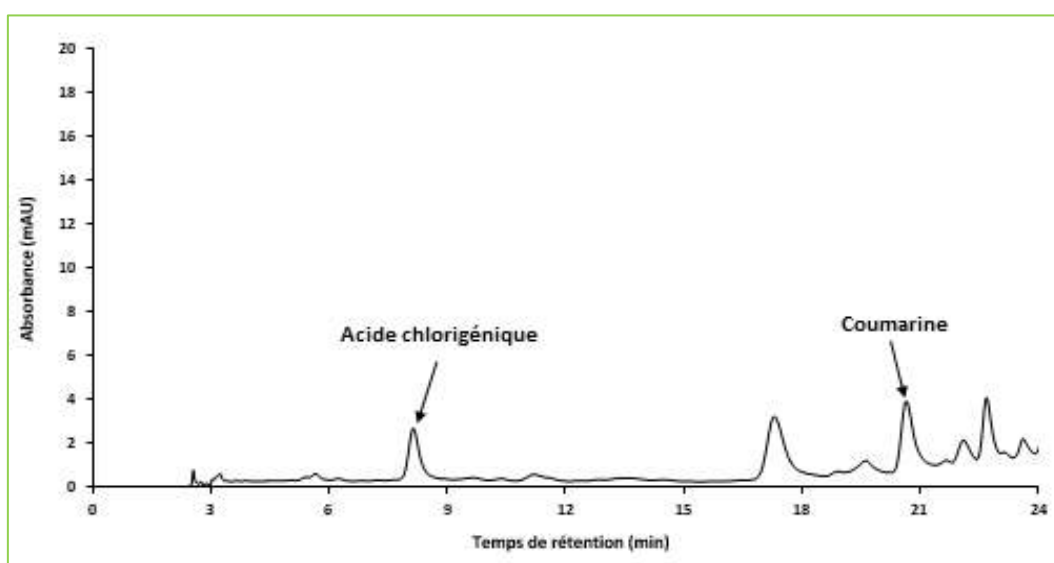


Figure 24. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 320 nm.

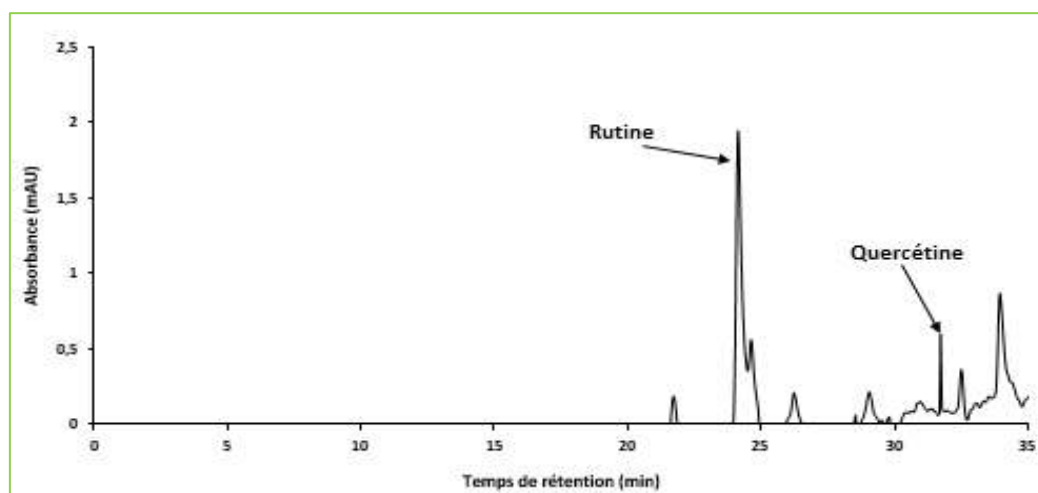


Figure 25. Chromatogramme (HPLC-DAD) de l'extrait EA de *C. tougourensis* à la longueur d'onde de 350 nm.

Une étude menée par (**Albayrak et al., 2007**) utilisant l'approche HPLC a révélé la présence de beaucoup de composés phénoliques au niveau des extraits méthanoliques, BuOH et EA de *C. amaena* et *C. aksoyi*. Les composés qu'ils ont identifiés sont: acide gallique, acide caféique, acide férulique, acide chlorogénique, acide protocatéchique, acide ellagique, hydrate de catéchine, épicatechine, gallate d'épigallocatechine, acide rosmarinique, acide syringique, quercétine, quercétine-3- β -D-glucoside, myricétine, phloridzine hydrate, rutine, acide p-coumarique, acide o-coumarique, kaempférol, bergaptène et psoralène. Beaucoup de ces composés ont également été identifiés dans l'extrait n-BuOH et EA de *C. tougourensis*, ce qui renforce notre étude.

Une autre équipe de recherche (**Azzouzi et al., 2016**) a déterminé via HPLC la composition chimique de l'extrait n-BuOH et EA de l'espèce *Centaurea choulettiana* et a identifié neuf acides phénoliques respectivement; acide gentisique, acide chlorogénique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide vanillique, acide p-coumarique, acide férulique, l'acide salicylique et l'acide protocatéchique. C'est très intéressant de constater que presque tous ces composés ont également été identifiés dans *C. tougourensis*.

Une étude récente menée par **Souilah et al. (2021)** a permis l'identification de trente sept composés à partir des extraits BuOH et EA de l'espèce *Centaurea papposa*. Parmi ces composés, treize ont été identifiés dans *C. tougourensis* et avec des temps de rétention comparables à ceux trouvés dans cette étude.

Le temps de rétention et la teneur de chaque composé identifié dans les extraits n-BuOH et EA sont présentés dans le **Tableau 9**. L'extrait n-BuOH contient une teneur élevée de vanilline (6.19 ± 1.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$) suivie de la rutine (1.89 ± 0.19 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et de la catéchine (1.40 ± 0.36 $\mu\text{g}/\text{mg}$), tandis que les teneurs les plus élevées dans l'extrait d'EA étaient celle de l'acide chlorogénique (2.34 ± 0.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$), suivie de l'acide cinnamique (1.71 ± 0.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et enfin de l'acide caféique (1.01 ± 0.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Notant aussi que, la plupart de ces composés ont été identifiés à 280 nm pour les deux extraits.

Une autre étude menée par **Acet (2020)** a permis l'identification de quatorze composés à partir de l'extrait EA de *Centaurea triumfetti* et qui étaient principalement des flavonoïdes et acides phénoliques. Parmi ces composés, huit étaient en commun avec ceux identifiés dans l'extrait EA de *C. tougourensis*, il s'agit de catéchine, rutine, quercétine, acide chlorogénique, acide férulique, acide trans-cinnamique et l'acide caféique. Le contenu d'acide chlorogénique détecté dans l'extrait EA de *C. triumfetti* était très important (11.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de la poudre végétale) mais la teneur d'acide chlorogénique détecté dans *C. tougourensis* était supérieure (24.15 ± 4.72 $\mu\text{g g}^{-1}$). Les contenus d'acide caféique, d'acide trans-cinnamique, d'acide

férulique, de catéchine et de rutine enregistrée chez *C. tougourensis* étaient largement supérieurs à ceux détectés au niveau de *C. triumfetti*. Ce même chercheur a démontré que ces composés ont une bonne activité antimicrobienne, antioxydante contre le DPPH et l'ABTS en plus d'une activité contre l'alpha amylase ce qui ouvre de nouvelle voie dans le traitement des maladies en relation avec le stress oxydatif et le diabète.

Une autre étude menée par **Azzouzi (2017)** a permis d'identifier, par HPLC, plusieurs composés dans l'extrait n-BuOH de *C. fragilis* qui étaient dans leur majorité des acides phénoliques tels que, l'acide sinapique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechique, l'acide vanillique, ainsi que l'acide syringique. Certains flavonoïdes ont également été identifiés dans le même extrait de *C. fragilis* tels que la scutéllarine, rutine, quercétine-3-O- β -glucoside, apigétrine, néohespéridine. La rutine et la baicaline étaient parmi les composants identifiés avec un contenu remarquable (96.92 et 81.71 mg/kg plante) respectivement, ce qui est en accord avec nos résultats trouvés au niveau de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* puisque une teneur élevée de rutine a été détectée ($29.99 \pm 3.02 \mu\text{g g}^{-1}$ de la poudre végétale).

Tableau 9. Résultats d'identification et d'évaluation des teneurs en composés phénoliques et acides cinnamiques dans les extraits de *C. tougourensis* par HPLC-DAD à différentes longueurs d'onde (280, 320 et 350 nm).

Composés identifiés	Temps de rétention (min) dans l'extrait n-BuOH	Teneur ($\mu\text{g}/\text{mg}$) dans l'extrait n-BuOH	Temps de rétention (min) dans l'extrait EA	Teneur ($\mu\text{g}/\text{mg}$) dans l'extrait EA	Teneur ($\mu\text{g}/\text{g}$) dans la poudre végétale	Longueur d'onde correspondante (nm)
Acide gallique	3.66	–	3.66	–	-	280
Catéchine	2.59	1.40 ± 0.36	2.70	–	22.14 ± 5.67	280
Quercétine	30.59	0.56 ± 0.07	31.74	–	8.95 ± 1.10	350
Rutine	23.27	1.89 ± 0.19	23.96	–	29.99 ± 3.02	350
Coumarine	20.15	–	20.64	0.90 ± 0.20	9.23 ± 2.04	320
Vanilline	16.42	6.19 ± 1.03	17.40	0.86 ± 0.03	107.07 ± 8.33	280
Acide transférulique	2.26	–	2.26	–	–	280
Acide cinnamique	31.05	–	31.80	1.71 ± 0.16	17.60 ± 1.62	280
Acide trans-cinnamique	30.72	0.96 ± 0.06	30.76	–	15.29 ± 0.87	280
Acide 4-hydroxybenzoïque	9.55	–	9.43	0.33 ± 0.07	3.37 ± 0.73	280
Acide tannique	2.73	0.57 ± 0.13	2.74	0.50 ± 0.09	14.21 ± 1.47	280
Acide caféique	13.23	–	13.29	1.01 ± 0.11	10.38 ± 1.14	280
Acide chlorogénique	8.63	–	8.13	2.34 ± 0.46	24.15 ± 4.72	320

1.6. Criblage qualitative de l'activité anti-radicalaire du DPPH par (CCM)

Le test anti-radicalaire qualitative au DPPH est un très bon moyen de déceler l'activité antioxydante possible d'un extrait de plante (Buitrago *et al.*, 2016). Ainsi, dans cette étude, deux extraits de la partie aérienne de l'espèce *C. tougourensis* ont été évalués, les extraits n-BuOH et EA respectivement et ils semblent présenter une activité antioxydante très intéressante.

Pour l'extrait n-BuOH, l'éluant (30% méthanol /70% chloroforme) a donné les meilleurs résultats, la décoloration des bandes de cet extrait a été spontanée, puis est devenue intense et plus élargie au cours du temps (après 30 min et après 1 h) (Figure 26). Ainsi des bandes jaunâtres très visibles à l'œil nu ont été observées sous lampe UV (365 nm) indiquant clairement la réduction du radical DPPH (1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl). Des résultats comparables ont été obtenues avec l'extrait EA, mais en utilisant un éluant composé de (50% n-hexane /50% acétate d'éthyle) (Figure 27).

Au niveau de ces plaques CCM, et précicément après migration, ce changement de coloration du violet vers le jaune pâle, laisse supposer que *C. tougourensis* contient des composés antioxydants ayant réduit le (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en une forme non radicalaire appelée (2, 2 diphényl-1-picrylhydrazine) (Shimamura *et al.*, 2014).

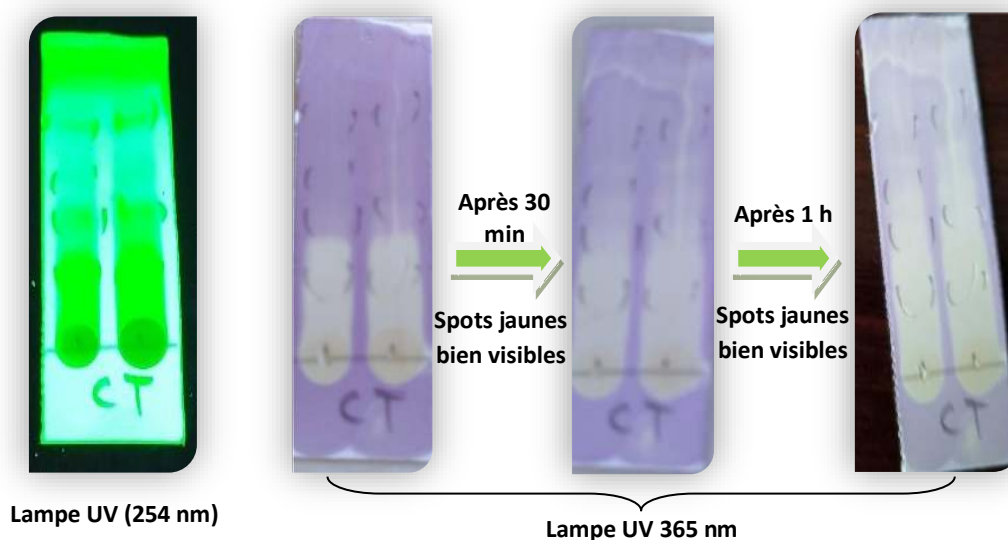


Figure 26. Révélation du test au DPPH en utilisant l'éluant (30% méthanol /70% chloroforme) pour l'extrait n-butanolique.

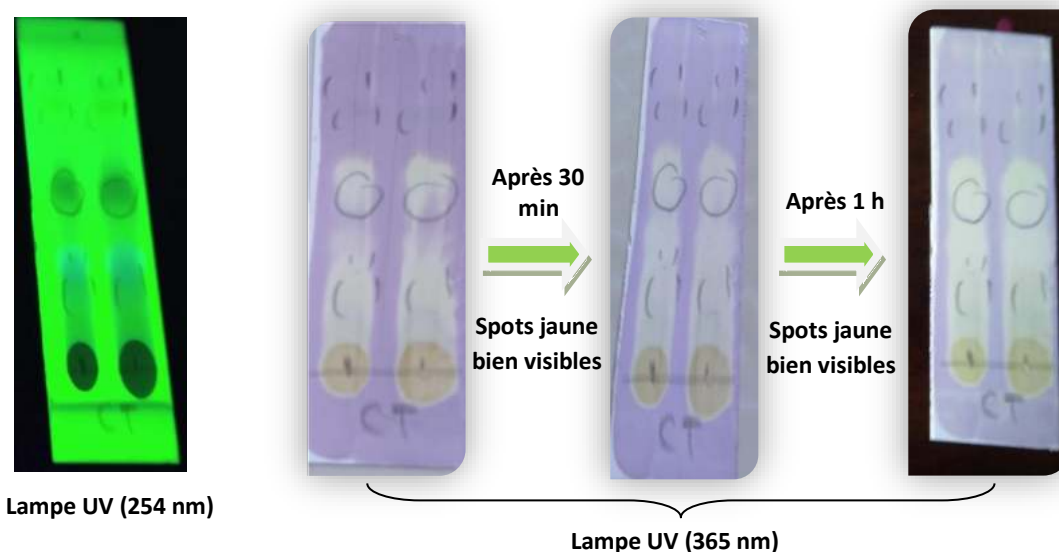


Figure 27. Révélation du test au DPPH en utilisant l'éluant (50% n-hexane /50% acétate d'éthyle) pour l'extrait acétate d'éthyle.

Bien qu'archaïque, le test CCM permet de mettre en évidence l'activité antiradicalaire possible d'une espèce végétale, de plus, il est peu coûteux et ne nécessite que très peu de moyens et de réactifs (Villet et Alary, 1980).

Plusieurs études ont montré que les saponines, les flavonoïdes et les triterpènes ont un pouvoir antioxydant remarquable (Kicel et Olszewska, 2015), mais d'autres classes de métabolites secondaires ont également un effet antiradicalaire non négligeable telles que les tanins, les anthocyanes et les alcaloïdes (Mottaghipisheh *et al.*, 2018) qui ont pu agir seuls ou éventuellement en synergie pour réduire le DPPH. Toutes ces classes de métabolites secondaires ont été identifiées chez *C. tougourensis*, ce qui explique les propriétés antioxydantes de cette espèce.

Les résultats d'un test CCM effectué sur l'extrait d'une espèce, *C. napifolia*, ont révélé une bonne activité antiradicalaire contre le radical DPPH. Ainsi des taches jaunes bien visibles ont été mises en évidence par visualisation sous UV à 254 nm et à 365 nm (Sid et Laib, 2020).

2. Résultats d'évaluation des activités biologiques *in vitro*

2.1. Activité antioxydante

2.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité antioxydante possible de *C. tougourensis* a été évaluée à l'aide de DPPH et a révélé une capacité anti-radicalaire remarquable pour les deux extraits n-BuOH et EA, et ceci d'une manière dose-dépendante. Cependant, les résultats obtenus dans ce test avec l'extrait n-

BuOH étaient plus importants avec une activité inhibitrice maximale de ($77.79 \pm 1.86\%$) (**Figure 28**). Alors que les résultats de l'extrait EA étaient de ($58.55 \pm 0.99\%$) pour les mêmes concentrations testées. Il est également intéressant de signaler que les valeurs IC_{50} des deux extraits étaient plus importantes que celles des standards testés. Ces valeurs étaient de ($0.72 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) pour l'extrait n-BuOH et ($4.69 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) pour l'extrait EA et considérées comme très hautement significatives ($p < 0.001$) par rapport aux valeurs standards qui étaient de ($15.74 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$) pour le BHA et ($6.55 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$) pour le BHT (**Tableau 11**).

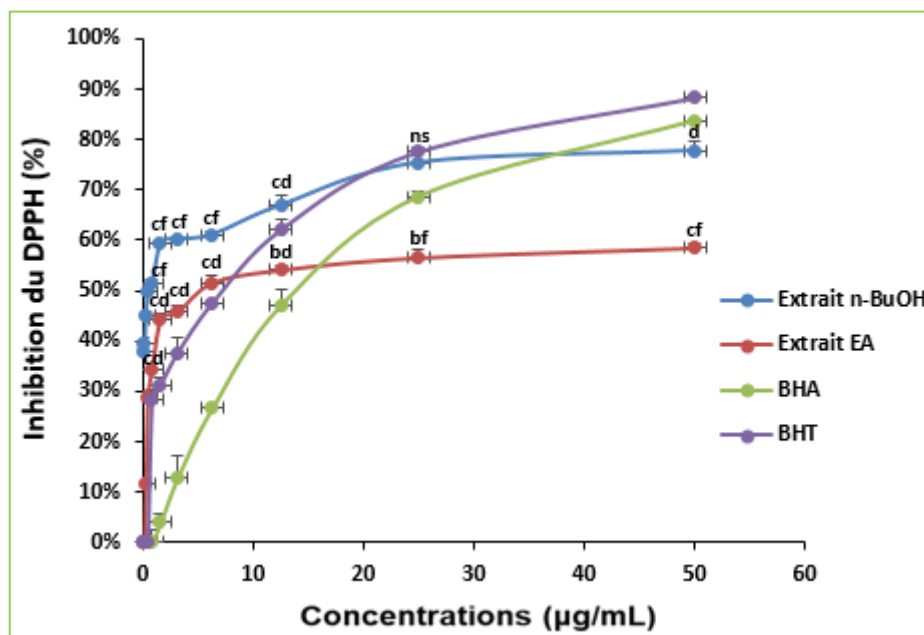


Figure 28. Capacité antiradicalaire des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD ($n = 3$). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$, ^f $p < 0.001$ à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

L'analyse phytochimique de *C. tougourensis* a révélé que cette espèce contient des teneurs considérables de plusieurs flavonoïdes et acides phénoliques, ce qui expliquerait les propriétés pharmacologiques de cette espèce végétale. Ces composés peuvent agir de manière synergique en tant qu'agents antioxydants pour réduire le DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en une forme non radicalaire (2, 2 diphényl-1-picrylhydrazine) (**Carmona-Jiménez et al., 2014**) via la capacité de don d'atomes d'hydrogène. Il est également très important de souligner que le test DPPH est l'un des tests les plus simple, peu coûteux, fiable et surtout rapide pour déceler les propriétés antioxydantes d'une espèce végétale (**Kedare et al., 2011**).

Cette technique a été initialement développée par **Blois (1958)** afin d'identifier les agents anti-oxydants et les incorporer dans l'industrie alimentaire surtout celle utilisant les boîtes de

conserves pour aider à préserver la nourriture d'une éventuelle oxydation et conserver ainsi leur qualité nutritionnelle.

Plusieurs études (**Conforti et al., 2008 ; Ugur et al., 2009 ; Aktumsek et al., 2013**) ont montré que les espèces de *Centaurea* possèdent des propriétés antioxydantes non négligeables en raison de leur richesse en divers composants phénoliques qui contribuent fortement à la suppression des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou bien des espèces réactives de l'azote (RNS) en inhibant les enzymes impliquées dans leur production et/ou en régulant la baisse de l'expression de leurs gènes respectifs (**Mattera et al., 2017**). Parmi ces espèces de *Centaurea*, certaines ont démontré un pourcentage remarquable d'inhibition du radical DPPH à la concentration de 1000 µg/mL, telles que *C. polypodiifolia* (93.53 ± 0.14%), *C. pyrrhoblephara* (90.06 ± 2.21%) et *C. antalyense* (85.07 ± 0.6%), ce qui est en rapport avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*. L'extrait EA de *Centaurea ensiformis* semble avoir aussi une bonne activité antiradicalaire (85.15%) et c'était apparemment l'alpha-tocopherol qui était à l'origine de cette activité. D'autres espèces de la famille des Astéracées ont également montré une bonne activité antiradicalaire, telles que *Artemisia scoparia* et *Artemisia spicigera* avec des valeurs IC₅₀ respectives de (0.778 mg/mL) et (0.999 mg/mL) (**Afshar et al., 2011**). deux valeurs d'IC₅₀ (179 ± 1.34 µg/mL) et (426 ± 1.84 µg/mL) ont été rapportées par **Ugur et al., (2009)** en analysant l'effet de l'extrait méthanolique de *Centaurea centaurium* contre le stress oxydant et la peroxydation lipidique. L'extrait n-BuOH de *Centaurea sphaerocephala* a également donné une bonne activité antiradicalaire contre DPPH avec une valeur IC₅₀ de (16.67 ± 0.11 µg/mL) tandis que la valeur issue de l'extrait EA de cette plante était meilleure (11.59 ± 0.04 µg/mL) (**Lahneche et al., 2019**). Toutefois, l'extrait n-BuOH de cette espèce a montré le meilleur pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (37.50%) avec la concentration maximale testée de 200 µg/ml.

Lorsque les agents stressants sont produits en excès ; ils peuvent représenter une menace réelle pour le fonctionnement de l'organisme et leurs effets nocifs sont observés à la fois aux niveaux cellulaires et moléculaires (**Avery, 2011**). Une autre étude utilisant des rats a montré que les polyphénols peuvent prévenir le vieillissement des muscles squelettiques via une amélioration de l'expression de PGC-1β (**Charles et al., 2013**), conduisant à une augmentation importante des mécanismes de défense anti-oxydants.

La rutine et la quercétine sont probablement parmi les agents antioxydants les plus puissants et plusieurs études (**Igarashi et Ohmuma, 1995 ; Magalingam et al., 2013 ; Liu et al., 2017**) utilisant des souris et des rats comme modèle expérimental, ont rapporté que ces

flavonoïdes peuvent réduire considérablement le stress oxydatif et la peroxydation lipidique. Cette réduction a été observée dans plusieurs tissus; notamment le cerveau, les reins et le foie ; en protégeant et en améliorant l'expression de gènes clés codant pour des protéines impliquées dans les processus antioxydants comme la glutathion S transférase α (GST α), la paraoxonase-1 (PON-1) et la glutamate-cystéine ligase (GCL). En conséquence, ces enzymes diminueront considérablement le taux plasmatique de malondialdéhyde (MDA) et le glutathion (GSH) considérés comme les principaux marqueurs du stress oxydatif (**Al-Rejaie et al., 2013**).

Les acides phénoliques jouent également un rôle très important dans le renforcement des mécanismes antioxydatifs de l'organisme, parmi ces composés, les dérivés de l'acide cinnamique semble agir directement sur les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en réduisant considérablement leur production et en minimisant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (**Pontiki et al., 2014**). Une autre étude a montré que ce composé possède une fraction dont le mécanisme n'est pas encore complètement illucidé mais qui semble provoquer le don d'atomes H afin de faciliter le processus d'élimination des radicaux (**Kumar et Goel, 2019**).

D'autres composés identifiés dans les extraits de *C. tougourensis* tels que le 3-méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde et le tétrapentacontane, 1,54-dibromo- ont déjà démontré de puissants effets antioxydants et antimutagéniques (**Al-abd et al., 2017 ; Abeer, 2019**). L'effet antioxydant de ces deux composés serait généré via une action directe sur la voie de signalisation Nrf2, ce qui déclenche une cascade de mécanismes intrinsèques qui renforcent considérablement la défense contre le stress oxydatif (**Lee et al., 2017**). Ainsi plusieurs mécanismes sont générés tels que l'activation de la transcription de certains gènes codant pour des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) via l'activation de l'élément de réponse cis-antioxydant (ARE) (**Hu et al., 2010**). Il a également été rapporté que l'acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique possède une activité antioxydante et antitumorale non négligeable (**Su et al., 2013**).

2.1.2. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante de *C. tougourensis* a également été évaluée à l'aide du test CUPRAC et a révélé une capacité anti-radicalaire pour les deux extraits n-BuOH et EA de manière dose-dépendante. Cependant, le résultat obtenu dans le test d'extrait n-BuOH était plus efficace avec un taux d'absorbance maximum de (2.66 ± 0.1) , alors que le résultat de l'extrait EA était de (2.41 ± 0.28) pour les mêmes concentrations testées (**Tableau 10**). Il est

également intéressant de signaler que les valeurs $A_{0.5}$ des deux extraits étaient inférieures à 3.125 tandis que les valeurs des standards étaient de loin supérieures à cette valeur ; (3.64 ± 0.19) pour le BHA et (9.62 ± 0.87) pour le BHT respectivement (**Tableau 11**).

Tableau 10. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC) des extraits de *C. tougourensis*.

Extraits / standards	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Extrait n-BuOH	$1.85 \pm 0.11^{\text{cf}}$	$1.91 \pm 0.05^{\text{cf}}$	$1.96 \pm 0.05^{\text{bf}}$	$2.11 \pm 0.08^{\text{af}}$	$2.21 \pm 0.01^{\text{cf}}$	$2.47 \pm 0.02^{\text{ce}}$	$2.66 \pm 0.1^{\text{cd}}$
Extrait EA	$1.53 \pm 0.08^{\text{cf}}$	$1.57 \pm 0.2^{\text{cf}}$	$1.58 \pm 0.06^{\text{af}}$	$1.70 \pm 0.00^{\text{cf}}$	$1.78 \pm 0.03^{\text{cd}}$	$1.81 \pm 0.02^{\text{ce}}$	$2.41 \pm 0.28^{\text{c}}$
BHT	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.66 ± 0.07	1.03 ± 0.07	1.48 ± 0.09	2.04 ± 0.14	2.32 ± 0.28
BHA	0.46 ± 0.00	0.78 ± 0.01	1.34 ± 0.08	2.36 ± 0.17	3.45 ± 0.02	3.76 ± 0.03	3.93 ± 0.01

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$; extraits vs différents standards, ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ est statistiquement significatif avec une comparaison à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$, ^f $p < 0.001$ par comparaison à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

Les résultats du test CUPRAC suggèrent que le Cu^{+2} a été réduit en Cu^{+} en présence de néocuproïne et ceci pourrait être dû à l'effet antioxydant des composés bioactifs présents dans *C. tougourensis*. Ceux ci auraient peut être généré cet effet en activant la voie de signalisation des protéines kinases de type 3 (Liu *et al.*, 2018), et ceci a été auparavant démontré au niveau des féculs de maïs (Melo-Silveira *et al.*, 2014).

Les principaux acides phénoliques ayant joué également un rôle très important dans les réactions antioxydantes sont l'acide gallique et l'acide chlorogénique. Ces deux composés peuvent augmenter les niveaux de superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et catalase, ce qui renforce considérablement les mécanismes de défense antioxydants (Kumar et Goel, 2019 ; Sarker et Oba, 2020). D'autre part, l'acide caféique est aussi un agent antioxydant important en raison de sa capacité unique à réduire la production de l'alpha toxine de 95%, ce qui est vraiment important car l'alpha toxine est un pro-oxydant et également un facteur de virulence qui peut altérer la polarité et les processus de diffusion des membranes épithéliales conduisant à une dérégulation irréversible de l'équilibre redox cellulaire (He *et al.*, 2017).

Tableau 11. Capacité antioxydante (IC₅₀ et A_{0.50} µg/mL) pour les tests DPPH et CUPRAC.

Extraits / standards	Test DPPH	Test CUPRAC
	IC ₅₀ (µg/mL)	A _{0.50} (µg/mL)
Extrait n-BuOH	0.72±0.07 ^{cf}	< 3.125
Extrait EA	4.69±0.04 ^{ce}	< 3.125
BHA	15.74±0.47	3.64±0.19
BHT	6.55±0.59	9.62±0.87

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification p<0.05, p<0.01, p<0.001 ; extraits vs différents standards, ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif avec comparaison à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^dp<0.05, ^ep<0.01, ^fp<0.001 avec comparaison à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

Plusieurs études ont montré le potentiel antioxydant issu d'autres espèces du genre *Centaurea*, ainsi l'activité antiradicalaire de *Centaurea urvillei* serait due à la présence de méthoxyflavones dans ses feuilles (Ulubelen et Oksuz, 1982), celle de *C. cariensis*, à la présence de flavonoïdes (Halfon, 1989), celle de *C. americana* à la présence des esquiterpènes et des lignanes dans sa partie aérienne et de ses graines (Cooper *et al.*, 2002). Parmi ces espèces, certaines ont montré des absorbances non négligeables dans le test CUPRAC à la concentration testée de 800 µg/mL telles que *C. polypodiifolia* (1.31 ± 0.11), *C. pyrrhoblephara* (0.97 ± 0.16), et *C. antalyense* (1.03 ± 0.127) (Aktumsek *et al.*, 2013).

Une autre étude utilisant le test CUPRAC a révélé que la quercétine, la fisétine, l'épigallocatechine et la catéchine avaient des effets antiradicalaires considérables en participant activement avec leurs groupes OH à la réduction du Cu⁺² en Cu⁺ et en limitant ainsi la formation des radicaux libres (Apak *et al.*, 2008). Ceci permettrait de contrôler la concentration sanguine de l'oxyde nitrique afin d'empêcher l'apparition de la peroxydation lipidique susceptible de perturber la fluidité et la perméabilité membranaire (Nishizawa *et al.*, 2021). Beaucoup d'espèces du genre *Centaurea* contiennent ces composés, telles que *C. maculosa* et *C. antalyense* (Bais *et al.*, 2003 ; Conforti *et al.*, 2008) et possèdent des activités antioxydantes considérables. Il est également très important dans le test CUPRAC d'utiliser la néocuproïne puisqu'elle permet aux glycosides flavonoïdes de subir une hydrolyse acide en leurs aglycones correspondants afin qu'ils puissent pleinement exprimer leur pouvoir antioxydant (Xu *et al.*, 2020).

Il a également été démontré que l'acide tannique et l'acide caféique possédaient une capacité remarquable de piégeage des radicaux peroxydes, améliorant ainsi la résistance des lipoprotéines de basse densité (LDL) au stress oxydatif, surtout au stress induit par le

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Rosenblat et al., 2015**). De plus, ces deux molécules peuvent aussi minimiser les dommages des vaisseaux causés par le LDL oxydé, puisque les LDL de faible poids moléculaire ont tendance à s'oxyder rapidement, surtout au niveau de la fraction d'acides aminés de type apo B (**Parthasarathy et al., 2010**). Les chercheurs travaillant sur ces deux molécules phénoliques ont aussi remarqué un effet antioxydant dose dépendant que ce soit pour le modèle *in vitro* ou bien *in vivo*.

Un composé nommé dl-Allo-cystathionine a été identifié au niveau des deux extraits de *C. tougourensis* et semble avoir une bonne activité antiradicalaire. Ainsi **Jahan et ses collaborateurs (2020)** ont montré par une approche de docking moléculaire, qui se base principalement sur un processus de transfert d'énergie, que ce composé pourrait mimer l'activité de deux enzymes clés, la superoxyde-dismutase et la catalase respectivement, en se liant à leurs récepteurs respectifs afin de déclencher et de potentialiser la réponse antioxydante vis-à-vis des radicaux libres, surtout de type ROS.

2.1.3. Activité du piégeage de l'ABTS

Le test ABTS est l'un des meilleurs tests utilisés dans l'évaluation de l'activité antioxydante d'une plante en raison de sa fiabilité, rapidité et du peu de matériel nécessaire à sa réalisation (**Munteanu et Apetrei, 2021**). Comme le montre le **Tableau 12**, la capacité anti-radicalaire de l'extrait n-BuOH semble être plus efficace que celle de l'extrait EA et ceci pour toutes les concentrations évaluées. Les résultats ont également révélé que les propriétés antioxydantes des deux extraits évoluent de manière dose-dépendante pour atteindre un pourcentage d'inhibition de (90.22 ± 4.37%) pour l'extrait n-BuOH et (71.74 ± 2.2%) pour l'extrait EA pour la plus grande concentration testée (200 µg/mL).

Les valeurs IC₅₀ ont également été calculées et étaient de (8.04 ± 0.21 µg/mL) pour l'extrait n-BuOH et de (51 ± 0.15 µg/mL) pour l'extrait EA, mais ces valeurs ont été considérées supérieures par rapport à celles des standards BHA (1.81 ± 0.10 µg/mL) et BHT (1.29 ± 0.30 µg/mL), respectivement (**Tableau 16**).

Des résultats équivalents ont été rapportés par **Han et al. (2019)**, dont lequel les divers extraits de sa plante ont exprimé une activité antiradicalaire contre les radicaux libres ABTS•+ comparables à la notre. Ainsi le pourcentage d'inhibition de sa plante variait entre 60.12 à 96.32 %. D'autres espèces de *Centaurea* ont aussi démontré un pourcentage remarquable d'inhibition du radical ABTS à la concentration de 800 µg/mL, telles que *C. polypodiifolia* (93.42 ± 4.72%), *C. pyrrholephara* (91.13 ± 3.37%) et *C. antalyense* (90.65 ± 1.35%) (**Aktumsek et al., 2013**).

L'acide férulique ainsi que l'acide transférulique ont des propriétés antioxydantes remarquables. Une étude a montré que ces deux composés pouvaient réduire via un transfert d'électrons. Les deux acides phénoliques férulique et transférulique en plus d'autres flavonoides peuvent significativement diminuer le niveau du marqueur malondialdéhyde (MDA) dans divers tissus, surtout au niveau du cerveau, du foie et des reins. La MDA est très utilisée dans divers tests, particulièrement ceux évaluant l'activité antioxydante *in vivo* des plantes, puisque ce marqueur est un bon indicateur d'une manifestation du stress oxydatif (Cherian *et al.*, 2019). Elle est utilisée notamment pour évaluer l'action des composés bioactifs d'une plante sur les dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Ainsi ce composé est considéré comme un bon marqueur de la peroxydation lipidique (Gawel *et al.*, 2004).

Tableau 12. Capacité antioxydante des extraits de *C. tougourensis* par le test ABTS.

Extraits / standards	Concentration (µg/ml)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Extrait n-BuOH	29.37 ± 1.11 ^{ab}	47.6 ± 0.26 ^{ab}	63.86 ± 5.25 ^{ab}	84.57 ± 0.66 ^{ab}	87.81 ± 0.53	89.58 ± 0.7	90.22 ± 4.37 ^{ns}
Extrait EA	8.29 ± 2.09 ^{ab}	13.69 ± 1.07 ^{ab}	18.93 ± 0.4 ^{ab}	31.91 ± 1.35 ^{ab}	47.6 ± 1.07 ^{ab}	63.8 ± 2.15 ^{ab}	71.74 ± 2.2 ^{ab}
BHA	83.42 ± 4.09	93.52 ± 0.09	93.58 ± 0.09	93.63 ± 0.16	93.63 ± 0.95	94.20 ± 0.90	95.39 ± 2.62
BHT	59.22 ± 0.59	78.55 ± 3.43	90.36 ± 0.00	92.18 ± 1.27	93.37 ± 0.86	94.87 ± 0.87	96.68 ± 0.39

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.001$; extraits vs différentes substances standards ; ^a $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^b $p < 0.001$ à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

Les extraits méthanolique et n-BuOH de *Centaurea ensiform* semblent avoir un très bon effet antiradicalaire, un pourcentage maximal d'inhibition du radical ABTS•+ a été observé avec la dose maximale de 100 µg/ml. Parmi les composés qui ont généré cet effet se trouvent le taciocide, l'acide protocatéchique, la vicénine-2, et la syringine qui sont tous des flavonoides et des acides phénoliques, ce qui prouve une fois de plus les propriétés pharmacologiques des composés phénoliques. La meilleure valeur de l'IC₅₀ a été rapportée avec l'acide protocatéchique (6.47 µg/ml) et était meilleure que celle rapportée avec le standard acide ascorbique (20.5 µg/ml) (Erel *et al.*, 2014). Une étude récente menée par Aissous *et al.* (2021), a montré que l'extrait n-BuOH de *centaurea maroccana* avait un bon effet antiradicalaire contre le radical ABTS^{•+} avec un pourcentage maximal d'inhibition de (93.05 ± 0.65 %) en utilisant la dose maximale de 200 µg/ml et une IC₅₀ de (15.13 ± 0.87). Ces valeurs étaient très proches de celles des standards BHA et BHT, ce qui est en parfait accord avec

les résultats trouvés avec *C. tougourensis* puisque des valeurs très proches ont été trouvées avec la même dose testée.

Il a été démontré que la coumarine et la vanilline pouvaient significativement diminuer la bioactivité de l'oxyde d'azote (NO) dans les cellules endothéliales en entraînant une vasodilatation, ce qui augmente considérablement le flux sanguin afin d'accélérer l'arrivée des enzymes antioxydantes pour neutraliser cet excès de radicaux libres (**Yamagata et Yamori, 2020**).

Une autre étude a montré que la quercétine pouvait inhiber l'expression de la protéine d'adhésion aux cellules vasculaires de type 1 (VCAM-1) et E-sélectine, au niveau des cultures endothéliales en activant la voie de signalisation TLR-NF- κ B dans l'endothélium (**Kleemann et al., 2011**), ce qui empêcherait le développement de plusieurs maladies liés à un stress oxydatif prolongé telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde et les lésions de perfusion post-ischémique (**Uchmanowicz, 2020**).

Une autre étude menée par **Hung et al. (2015)** a démontré que la rutine et la quercétine pouvaient inhiber le stress oxydatif généré par les LDLox, en réduisant l'activité de la sirtuine 1 (SIRT1) et de protéine kinase activée par l'AMP cyclique, ce qui se traduit par une diminution de l'expression des enzymes du complexe NADPH oxydase telle que NOX2 et NOX4.

2.1.4. Test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline

Il s'agit d'un test se basant sur la phénanthroline, qui en présence d'un agent antioxydant, forme un complexe stable avec l'ion Fe^{+2} qu'on appelle ferroïne (**Hu et al., 2017**). Comme montré dans le **Tableau 13**, Il semble que la capacité anti-radicalaire de l'extrait n-BuOH était plus efficace que celle de l'extrait d'acétate d'éthyle. Les résultats ont également révélé que les propriétés antioxydantes des deux extraits évoluent de manière dose-dépendante pour atteindre une absorbance maximale de (3.84 ± 0.53) pour l'extrait n-BuOH tandis que (0.76 ± 0.14) pour l'extrait EA, et ceci pour la plus haute concentration testée (200 $\mu\text{g/mL}$). Les valeurs $A_{0.5}$ des échantillons testés sont indiquées dans le **Tableau 16**. En effet, la valeur $A_{0.5}$ de l'extrait n-BuOH ($4.46 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$) était très proche de celle du standard BHT ($2.24 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$), et les différences ont été considérées comme non significatives. Tandis que la valeur de l'extrait EA (139.07 ± 0.02) étaient très supérieures aux valeurs BHA (0.93 ± 0.07) et BHT (2.24 ± 0.17).

Tableau 13. Capacité antioxydante des extraits de *C. tougourensis* par le test de la phénanthroline.

Extraits / standards	Concentration (µg/ml)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Extrait n-BuOH	0.48 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.07 ^{ab}	0.7 ± 0.18 ^b	1.01 ± 0.11 ^a	2.08 ± 0.22 ^{ab}	3.21 ± 0.32 ^{ab}	3.84 ± 0.53
Extrait EA	0.31 ± 0.05 ^{ab}	0.33 ± 0.01 ^{ab}	0.34 ± 0.01 ^{ab}	0.36 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.03 ^{ab}	0.45 ± 0.02 ^{ab}	0.76 ± 0.14 ^{ab}
BHA	0.73 ± 0.02	0.93 ± 0.01	1.25 ± 0.04	2.10 ± 0.05	4.89 ± 0.06	>5	>5
BHT	0.53 ± 0.03	1.23 ± 0.02	1.84±0.01	3.48 ± 0.03	4.84 ± 0.01	>5	>5

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.001$; extraits vs différentes substances standards ; ^a $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^b $p < 0.001$ à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

Le test de la phénanthroline est considéré comme un test récent servant à l'évaluation de l'activité antioxydante possible d'un extrait ou bien d'une huile essentielle d'une plante (**Bensaad et al., 2021**). L'évaluation de la capacité antiradicalaire d'une espèce du genre *Centaurea* en utilisant cette approche a été réalisée pour la première fois, dans la présente étude.

Une étude menée sur les rats a montré que l'acide caféique pouvait considérablement réduire le stress oxydatif que subissent constamment les muscles squelettiques des membres postérieurs, surtout de la part des espèces ROS et NOS, ce qui pourrait considérablement réduire les risques de développer une ischémie reperfusion des muscles squelettiques (**Ozyurt et al., 2007**). De plus, des niveaux plasmatiques très bas de MDA et de NO ont été rapportés tandis que la concentration de SOD et de la catalase a été également observée ce qui suggère le début du phénomène de régulation des réactions d'oxydo-réduction.

Les cardiomyocytes qui sont des cellules musculaires du cœur, sont très sensibles au stress oxydatif. Plusieurs études (**Michel, 1996 ; Yasin et al., 2019**) ont montré que le benzène, 1,3-dichloro- et l'acide tétradécanoïque, 2-décyl-2-méthyl- empêcheraient le développement des maladies cardiovasculaires telles que la maladie coronarienne (rétrécissement des artères), la thrombose veineuse profonde, l'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie. Ceci se produit en activant deux gènes, SIRT1 qui code pour une protéine enzymatique humaine appelée sirtuine 1 (**Singh et al., 2018**) et la deuxième eNOS (**Lee et Im, 2021**). Ce processus permettra la régulation et la stimulation en même temps de

l'expression d'ARNm des gènes codant pour plusieurs enzymes antioxydantes, surtout la catalase et la SOD grâce à de tels antioxydants naturels. Ces deux composés empêcheraient également le développement de la maladie de Marfan en protégeant le gène codant pour une protéine qui s'appelle fibrilline d'un éventuel stress oxydatif. Notant que le Benzène, 1,3-dichloro- a été identifié au niveau de l'extrait EA de *C. tougourensis* et que l'acide tétradécanoïque, 2-décyl-2-méthyl- au niveau de l'extrait n-BuOH de cette espèce.

Le système nerveux central est également la cible de beaucoup d'agents pro-oxydants en raison de sa forte consommation d'oxygène et de fer ; mais aussi à cause de son importante teneur en lipides, ce qui le rend très sensible au stress oxydatif surtout des espèces de type ROS (Salim, 2007). Il a été démontré que certains composés naturels tels que la rutine et la quercétine pourraient stimuler certaines cellules nerveuses à réguler la réponse immunitaire et la réparation cellulaire. Ainsi, en renforçant la fonction immunitaire, les neurones avec d'autres types de cellules nerveuses augmentent leurs capacités à résister aux dommages et à se réparer (Grosso *et al.*, 2013). Le mécanisme moléculaire qui a été proposé pour expliquer cette réduction du stress oxydatif par ces deux composés, c'est la voie de signalisation Krox20 dont l'activation entraînerait une augmentation du GSH intracellulaire, ce qui abaisserait automatiquement les niveaux de ROS et la prévention de l'afflux de Ca^{2+} (Cui *et al.*, 2020 ; Ishige *et al.*, 2001). Ces flavonoïdes seraient aussi capables d'améliorer la neuroplasticité, ce qui renforcerait les processus d'apprentissage et de mémorisation du cerveau (Silva *et al.*, 2019).

2.1.5. Test de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

Le but de cette analyse est de tester l'effet des extraits de la plante sur l'inhibition de la formation du radical galvinoxyl. Ainsi, comme le montre le **Tableau 14**, il semblerait que la capacité antiradicalaire de l'extrait n-BuOH était également plus efficace que celle de l'extrait EA. Les résultats ont aussi révélé que les propriétés antioxydantes des deux extraits évoluent de manière dose-dépendante pour atteindre un pourcentage d'inhibition de ($84.16 \pm 0.16\%$) pour l'extrait n-BuOH et ($58.7 \pm 0.4\%$) pour l'extrait EA pour la plus haute concentration testée de 200 $\mu\text{g/mL}$ et les résultats ont été considérés comme hautement significatifs ($p < 0.01$) par rapport aux standards. D'autre part, la valeur IC_{50} de l'extrait n-BuOH était remarquable ($4.25 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$) et considérée comme inférieure au BHA ($5.38 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$), tandis que celle de l'extrait EA était de (154.66 ± 0.01) comme le montre le **Tableau 16**.

Tableau 14. Capacité antioxydante des extraits de *C. tougourensis* par le test GOR.

Extraits / standards	Concentration (µg/ml)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Extrait n-BuOH	41.06 ± 0.43 ^b	64.38 ± 1.08 ^a	73.59 ± 0.84 ^a	79.85 ± 1.41 ^a	82.24 ± 0.27 ^{ab}	82.91 ± 0.14 ^{ab}	84.16 ± 0.16 ^{ab}
Extrait EA	–	–	1.08 ± 0.36 ^{ab}	11.55 ± 0.39 ^{ab}	35.24 ± 0.52 ^{ab}	46.78 ± 0.67 ^{ab}	58.7 ± 0.4 ^{ab}
BHA	39.15 ± 0.88	54.16 ± 0.27	65.02 ± 1.26	70.19 ± 0.51	70.32 ± 0.65	70.60 ± 0.10	70.94 ± 0.07
BHT	49.23 ± 0.77	61.29 ± 0.69	68.89 ± 0.26	70.02 ± 0.50	70.49 ± 0.55	71.13 ± 0.74	71.20 ± 0.32

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.001$; extraits vs différentes substances standards ; ^a $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^b $p < 0.001$ à l'hydroxytoluène butylé (BHT).

Le test GOR est considéré comme un bon test d'évaluation de l'activité antioxydante et la simplicité de sa réalisation font de lui l'un des tests les plus convoités de cette décennie (**Dose et al., 2016**). L'évaluation de l'activité antioxydante de *C. tougourensis* par ce test est considérée comme originale sur une espèce du genre *Centaurea*.

La richesse des plantes en flavonoïdes, tanins, saponines et terpènes surtout des espèces de la famille des Asteraceae telles que *Smallanthus sonchifolius*, *Serratula strangulata* pourraient expliquer la capacité antiradicalaire de ces espèces contre les radicaux galvinoxyls qui ont exprimé des valeurs IC₅₀ de (3.06 µg/mL) et (1.14±0.18µg/mL) respectivement empêchant ainsi la cytotoxicité (**Sugahara et al., 2015 ; Cai et al., 2020**). Ces chercheurs ont aussi démontré que les extraits méthanolique et EA de *S. strangulata* seraient même capables de supprimer la génération cellulaire de radicaux O₂(-) par les cellules érythrocytaires dans un modèle cellulaire activé par le phorbol 12-myristate 13-acétate.

Une étude menée par **Yang et al. (2011)**, a montré de bonnes propriétés antioxydantes contre le radical GOR par des composés naturels dont les valeurs IC₅₀ rapportées étaient de 13.36 µg/mL pour la cinnamoylphénéthylamine, de 5.88 µg/mL pour la féruloylphénéthylamine, de 0.02 µg/mL pour la caféoylphénéthylamine, de 0.24µg/mL pour la féruloyltyramine et de µg/mL pour la caféoyltyramine.

Une autre étude réalisée sur les rats a montré que le l-Gala-l-ido-octose et leS-[2-Aminoéthyl]-dl-cystéine, qui sont des composés identifiés l'un dans l'extrait n-BuOH et l'autre dans l'extrait EA de *C. tougourensis*, pouvaient protéger les mitochondries contre les dommages oxydatifs, surtout de type (ROS) et (NOS) (**Osuocha et al., 2020**), en activant

l'une des deux voies de signalisation suivante ; MAPK/ERK ou bien PI3K/AKT ce qui a pour effet de stimuler un réseau constitué de plusieurs protéines et enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase ainsi qu'un certain nombre d'antioxydants de faible poids moléculaire tels que l' α -tocophérol et l'ubiquinone (**Desmier, 2016**).

Les mitochondries sont des organites très importants, elles utilisant l'oxygène disponible dans la cellule afin de convertir l'énergie chimique de la nourriture qui est généralement sous forme du glucose, d'acides aminés et des graisses en énergie sous une forme utilisable par la cellule hôte. Le rendement de ces organelles est le plus optimale surtout celle du système nerveux puisque le cerveau est l'organe nécessitant le plus d'énergie (**Seager et al., 2020**). Ce processus de conversion est appelé phosphorylation oxydative et cette dernière se produit à l'intérieur des mitochondries. Il implique les ions calcium (Ca^{2+}) qui agissent comme des seconds messagers afin de fournir l'ATP nécessaire à ce processus (**Martínez et al., 2020**).

Une étude a montré que les mitochondries pouvaient également être productrices de radicaux libres, en effet lors d'un métabolisme normal, une fraction d'ATP est utilisée pour produire des radicaux libres mitochondriaux (RLM) qui causent des dommages oxydatifs de faible ampleur dans leurs tissus (**Sanz et Stefanatos, 2008**). Cependant, à long terme cette accumulation de radicaux libres peut causer des problèmes majeurs affectant beaucoup le système cardiovasculaire, respiratoire et excréteur et même un vieillissement prématuré puisque ces dommages affecteraient les protéines, les lipides, ainsi que des mutations d'ADN mitochondrial (ADNmt).

Le 1-tétradécanol a été identifié dans l'extrait EA de *C. tougourensis*, et l'acide ptérine-6-carboxylique dans l'extrait n-BuOH. Plusieurs études (**Hasturk et al., 2007 ; Lam et al., 2014 ; Elsharkawy et Shiboob, 2017**) menées sur des souris, ont montré que ces deux composés pouvaient régler l'activité de l'ADN polymérase gamma qui est l'ADN polymérase mitochondriale et surtout prévenir la mutation de son gène puisque dans le cas d'une mutation, ce gène pourrait accumuler des niveaux, 500 fois plus élevés, d'espèces réactives d'oxygène mitochondriale (mtROS). Ces études ont également montré que ces deux composés pouvaient favoriser la longévité des souris et prévenir ainsi leur vieillissement prématuré.

2.1.6. Pouvoir réducteur (FRAP)

Ce test se base sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) en présence d'un agent antioxydant (**Payne et al., 2013**). Les résultats indiquent que la capacité antioxydante de l'extrait n-BuOH était plus efficace que celle de l'extrait EA. Les résultats ont

également révélé que les propriétés antioxydantes des deux extraits évoluent de manière dose-dépendante pour atteindre une absorbance maximale de (0.98 ± 0.24) pour l'extrait n-BuOH et (0.56 ± 0.03) pour l'extrait EA (**Tableau 15**) et ceci pour la plus haute concentration testée ($200 \mu\text{g/mL}$). Les valeurs $A_{0.5}$ des échantillons testés ont également été calculées (**Tableau 16**), l'extrait n-BuOH ($11.16 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$) a montré de meilleurs résultats par rapport au standard α -tocophérol ($34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 15. Capacité antioxydante des extraits de *C. tougourensis* par le test FRAP.

Extraits / standards	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Extrait n-BuOH	0.22 ± 0.01^{abc}	0.35 ± 0.01^{abc}	0.54 ± 0.04^{abc}	0.73 ± 0.07^{bc}	0.73 ± 0.1^a	0.81 ± 0.16^{ac}	0.98 ± 0.24^c
Extrait EA	0.09 ± 0.01^{ab}	0.11 ± 0.01^{abc}	0.12 ± 0.01^{ab}	0.19 ± 0.06^{ab}	0.2 ± 0.01^{abc}	0.36 ± 0.03^{abc}	0.56 ± 0.03^{ac}
Acide ascorbique	0.35 ± 0.05	0.46 ± 0.03	0.84 ± 0.12	0.93 ± 0.30	1.18 ± 0.34	1.37 ± 0.20	1.44 ± 0.21
Acide tannique	0.28 ± 0.02	0.78 ± 0.06	1.02 ± 0.07	1.24 ± 0.18	0.86 ± 0.6	1.01 ± 0.21	1.02 ± 0.13
α -tocophérol	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.73 ± 0.03	1.37 ± 0.08	1.81 ± 0.09

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification $p < 0.001$; extraits vs différentes substances standards ; ^a $p < 0.001$ à l'acide ascorbique, ^b $p < 0.001$ à l'acide tannique, ^c $p < 0.001$ à l' α -tocophérol.

Tableau 16. Capacité antioxydante (IC_{50} et $A_{0.50} \mu\text{g/mL}$) pour les tests ABTS, FRAP, GOR et phénanthroline.

Extraits / standards	Activités antioxydantes			
	Test ABTS	Test FRAP	Test GOR	Test de la Phénanthroline
	$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$A_{0.50} (\mu\text{g/mL})$	$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$A_{0.50} (\mu\text{g/mL})$
Extrait n-BuOH	8.04 ± 0.21	11.16 ± 0.64^c	4.25 ± 0.6^{ns}	4.46 ± 0.55^a
Extrait EA	51 ± 0.15^{ab}	138.33 ± 0.05^{cde}	154.66 ± 0.01^{ab}	139.07 ± 0.02^{ab}
BHA	1.81 ± 0.10	NT	5.38 ± 0.06	0.93 ± 0.07
BHT	1.29 ± 0.30	NT	3.32 ± 0.18	2.24 ± 0.17
Acide ascorbique	NT	6.77 ± 1.15	NT	NT
Acide tannique	NT	5.39 ± 0.91	NT	NT
α -tocophérol	NT	34.93 ± 2.38	NT	NT

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnet. Niveau de signification $p < 0.001$; extraits vs différentes substances standards ; ^a $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'hydroxyanisole butylé (BHA), ^b $p < 0.001$ à l'hydroxytoluène butylé (BHT), ^c $p < 0.001$ à l'acide ascorbique, ^d $p < 0.001$ à l'acide tannique, ^e $p < 0.001$ à l' α -tocophérol, NT : non testé.

L'espèce *Centaurea Cyanus* a révélé une faible activité antiradicalaire dans le test FRAP avec des valeurs d'IC₅₀ > 900 µg/ml pour tous les extraits testés y compris l'extrait n-BuOH et EA (**Escher et al., 2018**). Ces chercheurs ont suspecté que la présence d'anthocyanes en grande quantité dans la plante *C. Cyanus* serait en partie responsable de ce faible résultat puisque les anthocyanes ont tendance à entraîner des variations du pH lors du test FRAP. Notant que ce test est basé sur la capacité du pH à réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺. La réaction FRAP est menée à un pH acide de 3.6 pour maintenir la solubilité du fer, de sorte que la réaction à faible pH diminue le potentiel d'ionisation qui entraîne le transfert d'atomes d'hydrogène et augmente le potentiel redox, qui est le mécanisme dominant de la réaction (**Benzie et Strain, 1996**).

Parmi les espèces de *Centaurea* déjà étudiées, certaines ont montré des absorbances non négligeables avec l'extrait n-BuOH dans le test FRAP à la concentration de 800 µg/mL telles que *C. polypodiifolia* (1.17 ± 0.03), *C. pyrrhoblephara* (0.84 ± 0.08), et *C. antalyense* (0.85 ± 0.03) (**Aktumsek et al., 2013**). Dans une autre étude, c'est plutôt l'extrait aqueux de *Centaurea bornmuelleri* qui a montré une meilleure activité dans le test FRAP avec une valeur d'IC₅₀ de (69.81 mg/g) (**Zengin et al., 2019**). Cependant, c'est l'extrait EA de *Centaurea saligna* qui a montré le meilleur effet antiradicalaire dans le même test avec une valeur d'IC₅₀ de (110 mg/g) (**Zengin et al., 2018**).

De nombreuses maladies ont été traitées et éradiquées grâce à l'évolution de la médecine et plus particulièrement de la phytothérapie, qui a servi de support et de source importante de composés bioactifs (**Proestos et al., 2020**). Des études antérieures (**Ugur et al., 2009 ; Escher et al., 2018**) réalisées sur deux espèces de *Centaurea*, à savoir, *C. ensiformis* et *C. cyanus* ont montré des activités antioxydantes significatives de cette espèce avec un effet dose-dépendant et ont suspecté que les composés phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes, identifiés dans leurs extraits sont responsables de cet effet biologique.

Une autre étude réalisée par **Karamać (2009)** a montré que les tanins possèdent la capacité de retarder l'oxydation en empêchant l'oxydation des ions Fe²⁺ en sa forme ionisée appelée Fe³⁺. **Dhouibi et al. (2020)** ont souligné les propriétés antioxydantes de *Centaurea kroumirensis* et *Centaurea sicula* et ont suggéré que les teneurs élevées en polyphénols enregistrées chez ces espèces pourraient expliquer leur grande activité de piégeage des radicaux libres. Mais les composés bioactifs d'une plante peuvent agir de manière synergique pour briser la chaîne des radicaux libres (**Lobo et al., 2010**).

Les propriétés antiradicalaires de la vanilline sont bien connues, son activité serait même supérieure à celle de l'acide ascorbique (**Tai et al., 2010**), ce qui explique pourquoi cette

substance naturelle est fréquemment utilisée dans le secteur agro-alimentaire. En effet, elle entre dans la composition de plusieurs aliments mais également dans l'industrie pharmaceutique en entrant dans la composition chimique de plusieurs médicaments tels que Zeus chem, spectrum, ou bien vanilone infantile (Bezerra *et al.*, 2016). L'industrie cosmétique également ne fait pas exception, puisque ce composé est trouvé dans les crèmes pour lutter contre l'apparition prématurée des signes de vieillesse tels que les rides (Dhanalakshmi *et al.*, 2016).

2.2. Activité photoprotectrice

L'activité photoprotectrice de *C. tougourensis* a également été évaluée sur la base du facteur de protection solaire (SPF) et comme indiqué dans le **Tableau 17**, l'extrait n-BuOH a montré un SPF maximal de (56.035) D'autre part, l'extrait EA a montré un SPF maximal de (8.382).

En se référant aux directives de la Commission européenne sur les facteurs de protection solaire (**Tableau 3**), il est clair que l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* a un SPF élevé tandis que l'extrait EA a un SPF faible.

Tableau 17. Calcul du facteur de protection solaire (FPS) à partir des extraits de *C. tougourensis*.

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (normalisé)	Extraits de <i>C. tougourensis</i>			
		Extrait n-BuOH		Extrait EA	
		Absorbances	FPS	Absorbances	FPS
290	0.0150	5.966±0.015	0.894	0.897±0.001	0.134
295	0.0817	5.921±0.011	4.837	0.893±0.002	0.729
300	0.2874	5.896±0.005	16.945	0.871±0.002	2.503
305	0.3278	5.814±0.015	19.058	0.837±0.002	2.743
310	0.1864	5.32±0.015	9.916	0.801±0.001	1.493
315	0.0837	4.428±0.03	3.706	0.771±0.000	0.645
320	0.0180	3.776±0.017	0.679	0.754±0.002	0.135
Total	1	-	56.035	-	8.382

FPS: facteur de protection solaire; EE: est le spectre d'efficacité érythémique; I: spectre d'intensité du simulateur solaire; EE x I: sont des valeurs constantes.

La lumière du soleil est vitale pour tous les organismes vivants, en effet elle aide à réguler notre rythme circadien et elle offre la capacité de fabriquer de la vitamine D qui est un nutriment important permettant à l'os de fixer et d'absorber le calcium et le phosphore pour améliorer le processus de minéralisation (Mead, 2008). D'autre part, le soleil émet également d'autres catégories de rayons qui peuvent être nocifs comme le rayonnement UV à large spectre également appelé soleil cancérigène (D'Orazio *et al.*, 2013).

Des études récentes (**He et al., 2021 ; Twilley et al., 2021**) utilisant l'approche de la formulation ont prouvé que les crèmes solaires à base de plantes sont efficaces contre les rayonnements UV. Ces chercheurs ont constaté que les métabolites secondaires présents dans les plantes, notamment la lignine et les alcaloïdes, peuvent absorber les rayons UV-B (**Yavaş et al., 2020**). Les flavonoïdes ont la meilleure photoprotection dans la gamme UV-B en plus d'une protection UV-A non négligeable. Parmi ces flavonoïdes, la quercétine et la catéchine ont prouvé leur capacité à prévenir la fragmentation du collagène, le cancer cutané prématuré et les processus de photovieillessement cutané (**Kostyuk et al., 2018 ; Petruk et al., 2018 ; Cefali et al., 2019**) en réduisant et/ou en neutralisant de manière significative les dommages causés par les radicaux libres de l'oxygène dans les cellules et également dans la matrice extracellulaire (**Saewan et Jimtaisong, 2015**).

Une étude récente a montré que l'acide tannique peut protéger efficacement les cellules fibroblastes L929 de l'irradiation UVB en inhibant l'expression d'une enzyme clé appelée métalloprotéinase-1 (MMP-1) (**Daré et al., 2020**). La même étude a rapporté un effet photoprotecteur non négligeable exercé par l'acide gallique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus pour *C. tougourensis*. Un autre travail de recherche a souligné l'effet photoprotecteur de l'acide caféique sur les fibroblastes cutanés diploïdes humains (KF1) contre les rayons UV-B et UV-C et aucun signe de cytotoxicité n'a été détecté (**Neradil et al., 2003**).

La quercétine et la rutine ont prouvé leur capacité à stabiliser la composition chimique et la structure moléculaire des composants des écrans solaires via des effets de co-régulation mutuelle (**Choquenot et al., 2008**), et même à améliorer la photoprotection des composants des écrans solaires de manière synergique (**Heurung et al., 2014**). L'acide trans-férulique offre également une bonne protection contre les rayons UV et atteint une valeur SPF de 37% (**Peres et al., 2018**), c'est pourquoi ces phyto-molécules entrent dans la composition de nombreuses crèmes solaires cosmétiques tels que Sun Bum et alba Botanica (**Geoffrey et al., 2019**).

En effet, la Commission européenne a publié en 2006 une directive sur les catégories de produits solaires (**Commission of the European Communities, 2006**) ; et selon leurs facteurs de protection indiqués (**Tableau 3**), *C. tougourensis* pourrait être un bon candidat pour entrer dans la composition des crèmes solaires naturelles.

La peau humaine contient un pigment clé appelé mélanine qui donne de la couleur à la peau, aux yeux et aux cheveux. Ce pigment agit comme un écran solaire naturel pour limiter la pénétration des rayons UV (**Brenner et Hearing, 2008**). Une étude récente réalisée par

Netcharoensirisuk *et al.* (2021) a montré que les flavonoïdes peuvent réellement améliorer le processus de synthèse de la mélanine et même traiter le mélanome via une activation du facteur de transcription MiTF et d'autres enzymes clés, à savoir la dopachrome tautomérase DCT2 et la protéine 1 liée à la tyrosinase (TYRP-1), conduisant ainsi à une inhibition remarquable de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules de mélanome (**Liu-Smith et Meyskens, 2016**).

2.3. Activité hémostatique

Comme mentionné dans le **Tableau 18**, les deux extraits de *C. tougouensis* ont accéléré les temps de coagulation de manière dose-dépendante, le meilleur effet hémostatique a été enregistré pour la concentration maximale testée de 4 mg/mL avec un temps de coagulation correspondant à (22.07 ± 3.72 s) pour l'extrait n-BuOH et (47.33 ± 7.09 s) pour l'extrait EA, ce qui correspondent à un pourcentage de raccourcissement du temps de coagulation de (86.71 %) et (71.42 %) respectivement, et ces résultats ont été considérés comme hautement significatifs ($p < 0.001$) par rapport à ceux du groupe témoin.

Tableau 18. Effet des extraits de *C. tougouensis* sur le temps de coagulation du plasma.

Echantillons	Concentrations (mg/mL)	Temps de coagulation moyen (s)	Raccourcissement du temps de coagulation (%)
Témoin	/	165.66 \pm 13.05	/
Extrait n-BuOH	0.125	73.5 \pm 4.94 ^c	55.63%
	0.25	61 \pm 4.24 ^c	63.17%
	0.5	50.33 \pm 1.15 ^c	69.61%
	1	43 \pm 2.82 ^c	74.06%
	2	28 \pm 3.13 ^c	83.09%
	4	22.07 \pm 3.72 ^c	86.71%
Extrait EA	0.125	152.33 \pm 12.58 ^{ns}	8.24%
	0.25	99.5 \pm 4.94 ^b	39.93%
	0.5	88.5 \pm 2.12 ^c	46.57%
	1	73 \pm 11 ^c	55.93%
	2	53 \pm 5.56 ^c	68%
	4	47.33 \pm 7.09 ^c	71.42%

Toutes les valeurs sont des moyennes \pm SD, n=3. ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 par rapport au groupe témoin. ^{ns} : non significatif.

Une étude réalisée par **Kose *et al.* (2012)** en utilisant des rats comme modèle expérimental a prouvé que les composés bioactifs présents dans les extraits de plantes, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques, peuvent considérablement diminuer le processus de saignement en accélérant l'arrivée du sang sur les sites de blessure via une

vasoconstriction qui améliore considérablement le mécanisme de coagulation par une cascade constituée de plaquettes (**Nignpense et al., 2019**) et d'autres médiateurs clés de la pro-coagulation comme le facteur III (thromboplastine).

Une étude réalisée par **Jesus et al. (2012)** a montré que l'acide tannique peut activer les plaquettes et améliorer leur processus d'adhésion dans les tissus lésés en particulier dans l'intestin, ce qui accélère considérablement le processus de coagulation afin d'arrêter l'hémorragie et le saignement et ainsi limiter l'apparition des ulcères, ce qui est en accord avec les résultats de cette étude. Il a également été rapporté que la catéchine peut réguler le processus d'activation des plaquettes, en particulier chez les patients souffrant de maladie artérielle périphérique (**Carnevale et al., 2014**), suggérant ainsi que ce composé a une influence non négligeable sur le phénomène hémostatique.

Des études récentes ont souligné l'effet pro-coagulant possible des flavonoïdes, des stéroïdes et des terpènes en utilisant à la fois des approches *in vitro* et *in vivo* (**Yin et al., 2018 ; Li et al., 2020**). Il a été démontré que ces classes de molécules bioactifs peuvent s'opposer à l'effet anticoagulant des composés tels que la warfarine (**Cordier et al., 2012**), et ce malgré le fait que les flavonoïdes et la warfarine ne partagent pas les mêmes sites de liaison comme montré précédemment par l'approche de docking moléculaire de **Rimac et al. (2017)**. La présence de ces molécules a été confirmée chez *C. tougourensis*.

Il est également intéressant de constater que l'acide férulique a une très bonne activité hémostatique. Une étude réalisée par **Huang et al. (2017)** a montré que cette acide phénolique peut considérablement réduire le temps de coagulation sanguine et le temps de saignement de l'utérus des souris, mais ces chercheurs ont également constaté que ce composé agirait en synergie avec d'autres composés tels que l'acide p-coumarique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide caféique et l'acide protocatéchique afin de renforcer les contractions utérines et accélérer le flux sanguin et le processus de cicatrisation de l'utérus.

Il est très connu que l'anémie est associée avec les troubles de coagulation sanguine, ainsi un composé nommé Benz[c]pyran-1,3-dione, 4,4-dimethyl- a été identifié au niveau de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis*, avec une forte proportion (14.87%). Une étude a montré que ce composé peut lutter efficacement contre certains parasites responsables de l'anémie, comme *Trypanosoma brucei* (**Ibrahim et al., 2013**), en aidant les lymphocytes T et les anticorps du système immunitaire à reconnaître ce parasite car de nombreux parasites sont capables de changer de forme (**Berezovskaya et al., 2018**). Une hypothèse suggère que ce composé génère cet effet via une cascade biochimique impliquant une multitude de molécules, en particulier des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMP) et

des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) pour initier la réponse immunitaire précoce aux infections (Mogensen, 2009). Il a également été rapporté que ce composé possède une propriété anticancéreuse non négligeable en contrôlant les processus de division cellulaire, via une régulation épigénétique de certains gènes clés responsables de la différenciation cellulaire notamment en contrôlant les processus de méthylation/alkylation dans les promoteurs de ces gènes pour empêcher la croissance tumorale (Lewandowska *et al.*, 2011).

2.4. Activité anti-inflammatoire

2.4.1. Test de stabilisation des membranes des globules rouges

Cette activité a été testée *in vitro* en utilisant des globules rouges (GR) d'origine humaine et cette technique est considérée comme un bon moyen d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires d'un extrait végétal vis-à-vis du stress thermique que subissent les GR (Anosike *et al.*, 2012). Ce test a révélé que l'extrait n-BuOH a un effet anti-inflammatoire avec une relation dose-effet et une inhibition maximale de l'hémolyse de ($97.84 \pm 0.006\%$). Il est très intéressant de constater que l'extrait n-BuOH a montré une inhibition de l'hémolyse des globules rouges supérieure à celle du diclofénac pour les concentrations testées de 400 et 800 $\mu\text{g/mL}$, mais la différence a été trouvée comme non significative (Figures 29). L'extrait EA n'a pas montré des résultats semblables à l'extrait n-BuOH ; ainsi, son activité était presque absente et le pourcentage maximal d'inhibition de l'hémolyse enregistré pour cette extrait était de ($19.40 \pm 0.006\%$).

Les valeurs EC_{50} ont également été enregistrées et étaient de ($154.15 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$) pour l'extrait n-BuOH et de ($95.8 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$) pour le standard (Tableau 19), ce qui laisse suggérer que *C. tougourensis* pourrait être un bon candidat pour remplacer les médicaments AINS.

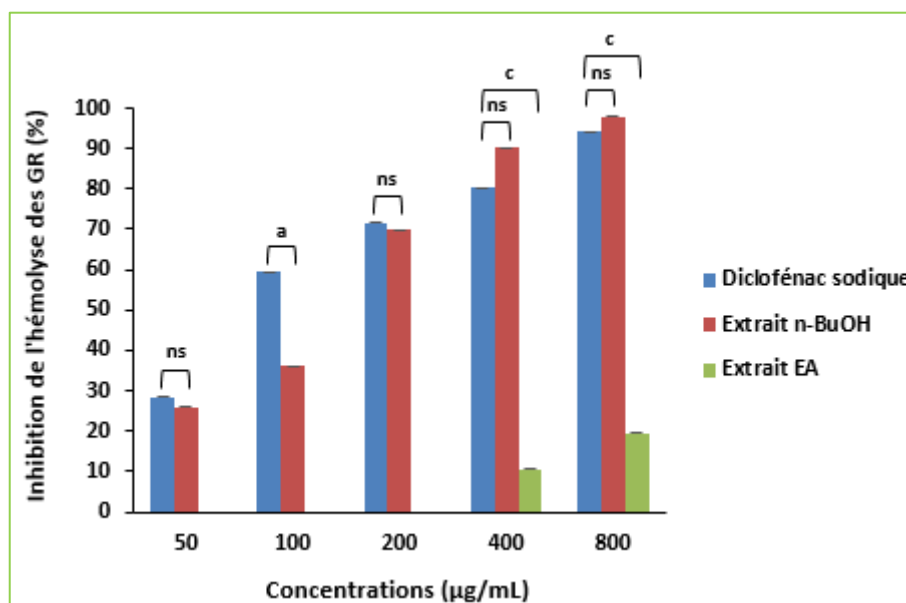


Figure 29. Activité anti-inflammatoire (test d'hémolyse induit par la chaleur) des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnett. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport au diclofénac sodique, ^{ns} non significatif.

La réponse inflammatoire est cruciale pour le mécanisme de défense du corps, elle nous permet de réparer et de surmonter les dommages causés par les blessures, les traumatismes, les infections ou bien les dysfonctionnements internes dus à des pathologies auto-immunes (**Chen et al., 2017**). Cependant, parfois l'immunité innée n'est pas suffisante pour faire face aux stimuli externes, ce qui nécessite l'utilisation immédiate de médicaments anti-inflammatoires (AINS) malgré leurs effets secondaires dangereux (**Davis et Robson, 2016**).

Plusieurs études ont démontré que la richesse des plantes en flavonoïdes et terpènes (**Sülsen et al., 2017**) pouvait exercer de très importants effets anti-inflammatoires et antioxydants. Une étude réalisée par **Csupor et al. (2013)** sur onze espèces de *Centaurea* utilisant à la fois des essais *in vitro* et *in vivo* ont corrélé les fortes activités anti-inflammatoires de ces espèces avec les principaux composés flavonoïdes identifiés et ont suggéré que ces composés bioactifs réduisaient considérablement la production de COX-1 et COX-2, qui sont les principaux médiateurs pro-inflammatoires libérés lors de la réponse inflammatoire.

Une autre étude (**Alper et Güneş, 2019**) a indiqué que *Centaurea solstitialis* pouvait réguler le processus inflammatoire en modulant la sécrétion d'enzymes et de cytokines clés comme l'IL1 α , l'IL-6 et le TNF α , qui empêchent la dérégulation du système immunitaire. Il est en effet bien établi que la réponse inflammatoire et l'immunité sont liées l'une à l'autre.

D'autre part, **Joujeh et al. (2020)** ont démontré une relation dose-effet entre la teneur en phénols de *Centaurea iberica* et son effet anti-hémolytique. Notant également que des résultats similaires ont été rapportés dans une étude sur *Centaurea cineraria*, où il a observé une forte teneur en composés phénoliques (41.12 ± 0.6) mg EAG/g et dans cette même étude, une protection remarquable des érythrocytes contre l'hémolyse oxydative a été décelée et a été associée à la forte teneur en phénols.

La quercétine est très impliquée dans la régulation des réactions inflammatoires du système immunitaire. Ainsi, une étude réalisée sur des souris a prouvé que ce flavonoïde aurait un effet de stabilisation sur les mastocytes durant les réactions allergiques (**Penissi et al., 2003**), et également un effet immunosuppresseur sur la fonction des cellules dendritiques afin d'empêcher l'activation des lymphocytes T (**Huang et al., 2010**) et ainsi d'empêcher le déclenchement de la réaction immunitaire.

La quercétine inhibe la production d'enzymes pro-inflammatoires telles que la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase (LOX) (**Lee et al., 2010**), ce qui a été démontré au niveau de la lignée cellulaire murine RAW 264.7 et ceci serait dû à une inhibition exercée par ce composé sur la lipo-polysaccharide (LPS), précisément en inhibant la phosphorylation de la tyrosine phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-(p85) (**Kim et al., 1998**), ce qui empêchera la LPS d'exercer son activité pro-inflammatoire.

Il a également été démontré que la coumarine peut significativement réduire l'œdème et l'inflammation des tissus en inhibant la biosynthèse des prostaglandines, par implication d'intermédiaires hydroperoxy d'acides gras (**Hussain et al., 2016**). Ce composé empêcherait aussi l'hémolyse des globules rouges en bloquant les processus oxydatifs exercés sur ces dernières, surtout du stress induit par l'oxyde nitrique synthase (NOS) (**Lucas et al., 2011**).

Une étude a démontré les effets anti-inflammatoires considérables de l'acide tannique sur les cellules microgliales de type (BV2) en inhibant l'inflammation produite par les lipopolysaccharides (LPS) par inhibition de la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS) via la suppression de l'activation de la voie NF- κ B (**Wu et al., 2019**). Ce composé empêcherait également la liaison des LPS au récepteur 'Toll Like Receptor' de type 4 (TLR4) (**Kuzmich et al., 2017**), ce qui a pour effet d'empêcher la libération des cytokines pro-inflammatoires.

La catéchine serait capable d'apporter des effets protecteurs remarquables contre l'inflammation induite par l'urate monosodique en modulant l'activation de l'inflammation NLRP3 (**Jhang et al., 2015**), ce qui a également pour conséquence de stopper l'infiltration et la prolifération des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les cellules épithéliales coliques, les macrophages et les lymphocytes T, aidant à réduire les réactions inflammatoires (**Fan et al., 2017**).

2.4.2. Tests de dénaturation de l'albumine sérique bovine et de l'albumine de l'œuf de poule

Il est bien connu que la structure d'une protéine détermine sa fonction, c'est pourquoi toute altération des conformations tridimensionnelles d'une protéine que l'on appelle "état dénaturé" (**Dill et Shortle, 1991**), privera systématiquement ces dernières de leur rôle physiologique. Les protéines sont dénaturées à 100 °C mais d'autres facteurs notamment les facteurs internes peuvent être impliqués dans le processus de dénaturation, tels que des réponses inflammatoires excessives ou des maladies auto-immunes (**Atassi et Casali, 2008**). A long terme, ces phénomènes ont des conséquences négatives sur la santé de l'organisme et parfois même irréversibles.

La capacité de *C. tougourensis* à inhiber la dénaturation de l'albumine bovine a été étudiée et a révélé un effet modéré pour les deux extraits testés. Ainsi, l'extrait n-BuOH a montré une activité inhibitrice maximale de ($68.94 \pm 0.007 \%$) à la dose maximale testée de ($800 \mu\text{g/mL}$), tandis qu'un taux de ($63.47 \pm 0.003 \%$) a été obtenu pour l'extrait EA. Ces données ont été considérées comme hautement significatives ($p < 0.001$) par rapport au standard diclofénac sodique qui a montré un pourcentage d'inhibition de ($90.23 \pm 0.810 \%$) à la même concentration testée (**Figure 30**). Il est également intéressant de voir que l'effet anti-inflammatoire des deux extraits était presque le même aux concentrations testées de 200 et $400 \mu\text{g/mL}$.

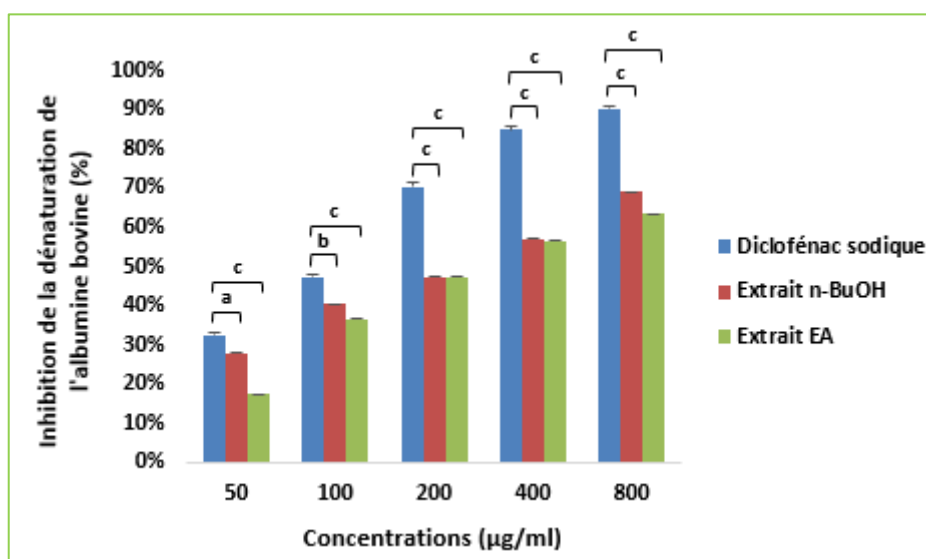


Figure 30. Activité anti-inflammatoire (test de dénaturation de l'albumine bovine) des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD ($n=3$). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification: ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ (est statistiquement significatif par rapport au diclofénac sodique, ^{ns} non significatif).

Un 2^{ème} test ayant pour but de tester l'effet inhibiteur des extraits de *C. tougourensis* sur la dénaturation de l'albumine de l'œuf de la poule cette fois ci a été réalisé. Les résultats ont évolué d'une manière dose-dépendante. Ainsi, ce test a révélé que l'extrait n-BuOH a une activité inhibitrice maximale de ($96.91 \pm 0.09 \%$), comparable à celle du standard aux doses de 400 et $800 \mu\text{g/mL}$, où la différence entre leurs activités est non significative (**Figures 31**). D'autre part, l'extrait EA n'a pas montré les mêmes résultats que l'extrait n-BuOH, ainsi, une activité modeste a été enregistrée pour cet extrait avec un pourcentage d'inhibition de l'hémolyse de ($38.74 \pm 0.007\%$) à la plus élevée concentration testée.

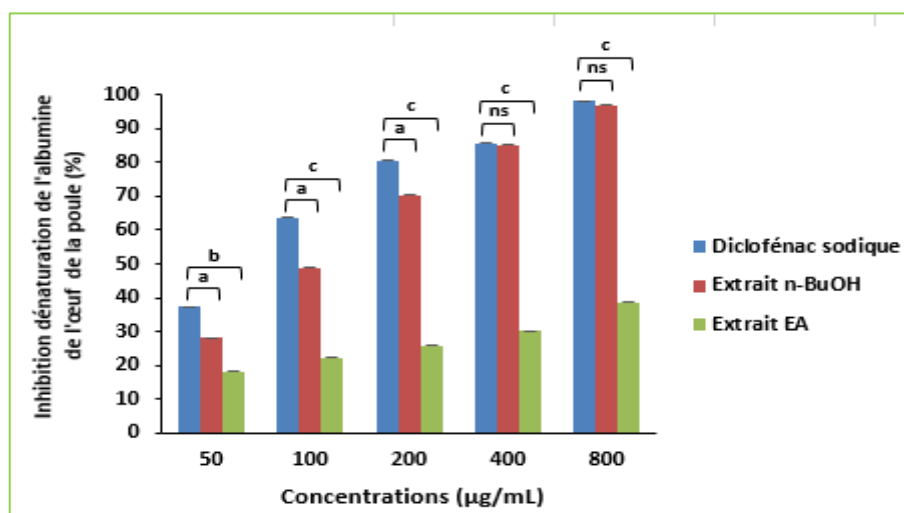


Figure 31. Activité anti-inflammatoire (test de dénaturation de l'albumine de l'œuf de la poule) des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport au diclofénac sodique, ^{ns} non significatif.

Les valeurs EC₅₀ ont également été calculées pour les deux tests. Ainsi, pour le test BSA, des valeurs EC₅₀ comparables ont été enregistrées pour les deux extraits testés. Ces valeurs étaient (335 \pm 0.03 µg/mL) pour l'extrait n-BuOH et (338 \pm 0.07 µg/mL) pour l'extrait EA, alors que l'EC₅₀ pour le diclofénac sodique était (115.76 \pm 0.19 µg/mL). Dans le test de dénaturation de l'albumine d'œuf, l'EC₅₀ était de (120.81 \pm 0.2 g/mL) pour l'extrait n-BuOH et (77.77 \pm 0.2 µg/mL) pour le diclofénac sodique, la différence était statistiquement significative (p<0.01). (**Tableau 19**).

Tableau 19. Activité anti-inflammatoire (valeurs EC₅₀) du standard et des extraits de *C. tougourensis*.

Extraits / standard	Activité anti-inflammatoire		
	Test d'hémolyse induit par la chaleur	Test de dénaturation de l'albumine d'œuf de la poule	Test de dénaturation de l'albumine bovine
	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)
Extrait n-BuOH	154.15 \pm 0.14 ^c	120.81 \pm 0.2 ^b	335 \pm 0.03 ^c
Extrait EA	ND	ND	338 \pm 0.07 ^c
Diclofénac sodique	95.8 \pm 0.19	77.77 \pm 0.2	115.76 \pm 0.19

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport au diclofénac sodique, ^{ns} non significatif.

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par **Banerjee et al. (2014)** et **Marrassini et al. (2018)** et dont lesquels ils ont clairement montré la capacité de leur plante à inhiber la dénaturation de l'albumine mais aussi les activités des protéinases, et ont associé cela à la richesse de leurs espèces en flavonoïdes, tanins et composés alcaloïdes.

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma (35-50 g/L) (**Weaving et Batstone, 2016**) qui assure des fonctions vitales comme le transport d'hormones, de vitamines et d'acides gras (**Van der Vusse, 2009**), mais c'est également un élément crucial pour maintenir une pression osmotique physiologique normale dans les vaisseaux sanguins en stabilisant le volume du liquide extracellulaire via une contribution par sa propre pression connue sous le nom de pression oncotique (**Michel et Phillips, 1987**). Une hypoalbuminémie peut avoir de graves répercussions sur les fonctions rénales et hépatiques (**Haller, 2005**) vitales à la vie.

L'un des composés identifié dans l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* nommé 2-(oxan-3-yl) éthanamine semble avoir une bonne activité anti-inflammatoire via la suppression des voies de signalisation COX/LOX, ce qui réduit considérablement la libération de COX-1, COX-2 et de la lipoxigénase (**Rani et al., 2014**). Ceci conduira à la diminution de la perméabilité vasculaire afin d'empêcher l'arrivée d'autres cytokines pro-inflammatoires qui risqueraient d'altérer la conformation structurale des protéines telles que l'albumine et la globuline (**Osman et al., 2016**).

Un autre composé identifié dans *C. tougourensis* semble posséder des propriétés anti-inflammatoires non négligeables, il s'agit d'un dérivé de la pyridine appelé 3,5-Diéthyl-4-(2-furyl) pyridine qui stimule l'activité des protéines chaperons, précisément Hsp27, Hsp90, et Hsp110, afin d'aider au repliement moléculaire correct des autres protéines telles que les protéines plasmatiques. Ceci permettra d'éviter la formation d'agrégats protéiques et d'éviter une éventuelle dénaturation des protéines (**Kampinga, 2006**). Ce composé semble réguler les propriétés physico-chimiques du milieu où se trouvent les protéines, principalement le pH afin d'empêcher une éventuelle altération structurale, ce qui priverait la protéine ou l'enzyme de ses fonctions (**Amer et al., 2021**). En effet, il est très connu que les protéines sont très sensibles au variation du pH (**Nikolaidis et al., 2017**). Ce composé empêcherait même l'interaction des protéines avec des substances pathogènes susceptibles de les dénaturer.

Une étude a montré que la vanilline pourrait inhiber la dénaturation protéique en inhibant l'activité des lipopolysaccharides (LPS), susceptibles d'altérer l'expression ARNm des gènes de l'albumine bovine et celle de l'ovalbumine. Cette démarche a été démontrée dans le modèle murins (**Mikheeva et al., 1998**). Une autre étude a montré aussi que la vanilline

pouvait inhiber les réponses inflammatoires induites par le LPS dans les cellules microgliales de type BV-2 (Awasthi *et al.*, 2016). Cet effet protecteur a été expliqué par ces chercheurs par la capacité de la vanilline à réguler les modifications du processus de glycation précoce et l'agrégation de type amyloïde de l'albumine empêchant ainsi tout changement de sa conformation spatiale.

La rutine pourrait également être un bon agent anti-inflammatoire en freinant la sécrétion de l'IL-6 induite par les lipopolysaccharides (LPS) ainsi que l'expression de NF- κ B (Jantrawut *et al.*, 2017), puisque l'inhibition de ces deux médiateurs pro-inflammatoires peut servir non seulement à mettre fin à l'inflammation mais également à inhiber d'autres cytokines ou mécanismes susceptibles d'altérer la structure des protéines.

2.5. Activité antidiabétique (Test d'inhibition de l'alpha amylase)

Dans ce test, les deux extraits de *C. tougouensis* ont donné un effet inhibiteur modéré de l'activité de l'alpha-amylase, mais l'activité de l'extrait n-BuOH semble être légèrement supérieure à celle de l'extrait EA. L'activité inhibitrice maximale a été observée à la concentration de 1000 μ g/mL avec des pourcentages d'inhibition respectifs de (61.36 %) pour l'extrait n-BuOH et (52.27%) pour l'extrait EA, alors que la valeur de l'acarbose utilisé comme standard dans cette étude était de (94.61 \pm 1.14 %) (Figure 44).

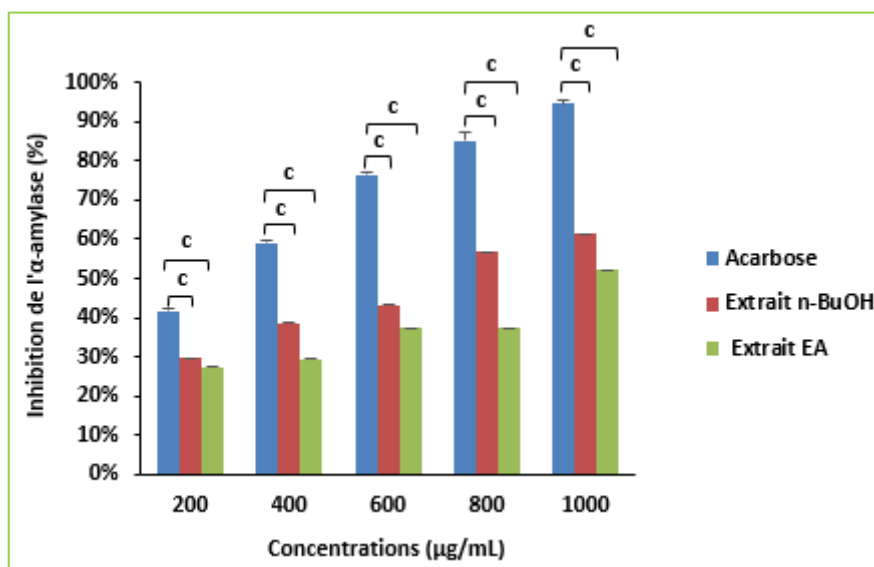


Figure 32. Activité inhibitrice de l' α -amylase par les extraits de *C. tougouensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport à l'acarbose.

Les valeurs IC₅₀ ont également été calculées et étaient (711.5 \pm 0.03 μ g/mL) pour l'extrait n-BuOH et (962 \pm 0.02 μ g/mL) pour l'extrait EA respectivement tandis que cette valeur était

de ($284.33 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$) pour l'acarbose (**Tableau 20**). Notant que la différence entre les résultats des extraits et celui du standard a été trouvée hautement significatives ($p < 0.001$), et ceci pour toutes les concentrations testées.

Tableau 20. Détermination des valeurs IC_{50} du standard et extraits de *C. tougourensis* dans le test d'inhibition de l' α -amylase.

Extraits / standard	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrait n-BuOH	711.5 ± 0.03^c
Extrait EA	962 ± 0.02^c
Acarbose	284.33 ± 0.06

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ est statistiquement significatif par rapport à l'acarbose.

Le diabète de type 2 est l'une des maladies les plus répandues et les plus dangereuses de cette décennie, qui peut être le résultat de plusieurs facteurs tels que le dysfonctionnement mitochondriaux des cellules β pancréatiques, la résistance à l'insuline et/ou une intolérance au glucose (**Robertson et Harmon, 2007**).

Plusieurs études réalisées dans le secteur de la biotechnologie ont rapporté que les plantes peuvent prévenir et traiter efficacement le diabète de type 2, en raison de leur richesse en flavonoïdes et acides phénoliques qui peuvent s'opposer au processus de stress oxydatif en particulier la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Pham-Huy et al., 2008**). Parmi ces composés phénoliques, une lactone appelée coumarine a une forte activité antidiabétique.

Une étude réalisée par **Laddha et Kulkarni. (2019)** a montré qu'un patient diabétique qui recevait régulièrement des médicaments à base de coumarines, présentait une atténuation considérable des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires normalement générées par les complications du diabète.

Il a également été rapporté que la coumarine peut protéger les glandes salivaires et pancréatiques des dommages causés par le stress oxydatif; ces glandes sont responsables de la production de l' α -amylase (**Li et al., 2017**). La coumarine peut également limiter la production excessive d' α amylase et d' α glucosidase en activant la voie de signalisation de la protéine kinase AMP dépendante (AMPK) (**Zhao et al., 2015**).

Il est bien établi qu'il existe un lien entre le stress oxydatif et l'activité de l' α -amylase. En effet, une forte libération de radicaux libres dérégulera automatiquement l'activité de

l'alpha-amylase dont il a été prouvé que l'accumulation de radicaux libres chez une souche de *S. Cerevisiae* pourrait induire une surexpression du gène HAP1 qui à son tour induirait une surproduction d'alpha-amylase (**Martínez et al., 2016**). Ce phénomène génère à long terme plusieurs complications liées au diabète (**Asmat et al., 2016**).

Il a également été prouvé que dans le modèle de rats diabétiques, qu'une réduction du processus de stress oxydatif augmenterait significativement la sensibilité à l'insuline (**Tangvarasittichai, 2015**), ce qui pourrait augmenter l'activité du transporteur GLUT4, qui a pour fonction principale de favoriser l'absorption du glucose afin de réduire la glycémie à un taux physiologique (**Navale et Paranjape, 2016**). Une étude menée par **Zierath et Wallberg-Henriksson (2002)** a démontré que l'augmentation de GLUT4 pourrait être due à une augmentation importante de la voie de transduction du transport dans laquelle des séries de protéines vont agir via une cascade; ces protéines sont respectivement la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), la protéine kinase C (PKC) et les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR).

Récemment, une étude réalisée sur huit espèces de *Centaurea* a montré qu'elles pouvaient diminuer significativement l'activité de l'alpha-amylase et les chercheurs l'ont associée à la richesse de ces plantes en phénols, flavonoïdes et tanins (**Zengin et al., 2016**) ce qui est en parfait accord avec le constat de cette étude.

Les propriétés antioxydantes et anticancéreuses de la vanilline sont bien connues, mais ce composé a également un effet anti-hyperglycémiant non négligeable. **Lu et al. (2019)** ont montré que ce composé peut réguler le taux sérique de glucose et d'insuline chez le rat diabétique et même conserver l'intégrité des tissus pancréatiques. Une autre étude menée par **Iannuzzi et al. (2017)** a prouvé que ce composé pouvait prévenir les complications du diabète en bloquant la glycation de l'insuline, précisément via un processus de liaison non covalente entre la vanilline et l'arginine 22 (Arg22) chargée positivement de l'insuline. Ce processus permet à l'insuline de récupérer son effet biologique et de réduire la glycémie à un état physiologique. Notant qu'un effet hypoglycémiant comparable a été observé chez les rats diabétiques qui ont été traités à l'aide d'acide 4-hydroxybenzoïque et les chercheurs ont noté en outre, une augmentation importante de la teneur en glycogène hépatique (**Peungvicha et al., 1998**).

Une autre étude a montré que le 2-pentadécane, 6,10,14-triméthyl- pourrait être un bon candidat pour traiter le diabète, via une forte inhibition exercée sur l'activité de l'alpha-amylase et également sur celle de l'alpha-glucosidase (**Bahadori et al., 2016**), puisque le processus de

catabolisme des glucides par ces enzymes est anormale pendant le diabète sucré (**Garcia-Garcia et al., 2020**), ce qui suggère que ce composé pourrait effectivement diminuer le taux de glucose vers des niveaux physiologiques. Les effets neuroprotecteurs et antimicrobiens de ce composé ont également été rapportés (**Naidoo et al., 2014**).

2.6. Activité neuroprotectrice

Le système nerveux humain est l'un des systèmes corporels les plus complexes et les plus organisés, il coordonne les activités de l'ensemble de l'organisme (**Galli et al., 2003**). Mais la dégénérescence progressive des cellules nerveuses pourrait conduire à des maladies graves et irréversibles (**Forman et al., 2004**). Par conséquent, la recherche de nouveaux traitements pour la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres maladies affectant le système nerveux est devenue cruciale.

La cholinestérase est indispensable pour le bon fonctionnement du système nerveux. Ainsi, le niveau physiologique d'un neurotransmetteur clé appelé acétylcholine (ACh) est maintenu par cette enzyme (**Kutty, 1980**). Mais en situation pathologique, cette enzyme peut être responsable d'un taux anormal d'AChE dû à une hydrolyse excessive et plusieurs études suggèrent que le manque d'AChE pourrait entraîner des troubles de la mémoire et même une démence à long terme (**Higley et Picciotto, 2014**).

Comme présenté dans les **Figure 33 et 44**, l'effet inhibiteur le plus significatif de *C. tougourensis* sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) a été observé à la concentration de (200 µg/mL) et ceci pour les deux extraits testés. Cet effet semble être plus efficace sur l'AChE avec un pourcentage d'inhibition maximal de (84.71 ± 3.56%) donné par l'extrait n-BuOH tandis que l'extrait EA a montré à la même dose un pourcentage d'inhibition de (74.11 ± 0.48%). Les deux extraits ont présenté des différences statistiquement significatives (p<0.05) par rapport à la galantamine qui a été utilisée comme référence dans cette étude.

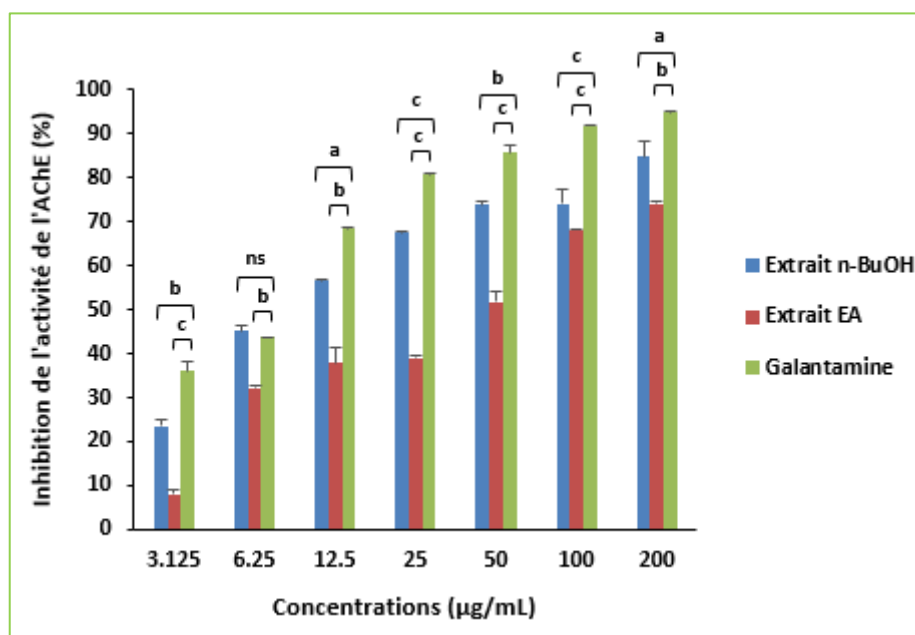


Figure 33. Activité neuroprotectrice (anti-acétylcholinestérase) des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001 est statistiquement significatif par rapport à la galantamine, ^{ns} non significatif.

Dans le test BChE, un effet neuroprotecteur modeste a été observé avec l'extrait n-BuOH (56.12 ± 2.63 %) à la concentration de 200 µg/mL avec une valeur IC₅₀ de 173.53 ± 0.04 µg/mL, en outre un effet non négligeable a été observé avec l'extrait d'EA (17.67 ± 2.28 %). Il a été noté que dans les deux tests, l'activité neuroprotectrice des extraits de *C. tougourensis* dépendait fortement de la concentration, il s'agit ainsi d'un effet neuroprotecteur dose-dépendant. Il est également intéressant de constater que la valeur IC₅₀ de l'extrait EA dans le test anti-AChE était de (43.27 ± 0.12 µg/mL), tandis que l'IC₅₀ de l'extrait n-BuOH (9.8 ± 0.62 µg/mL) était très proche de celle de la galantamine (6.27 ± 1.15 µg/mL) (**Tableau 21**), ce qui est un résultat très prometteur.

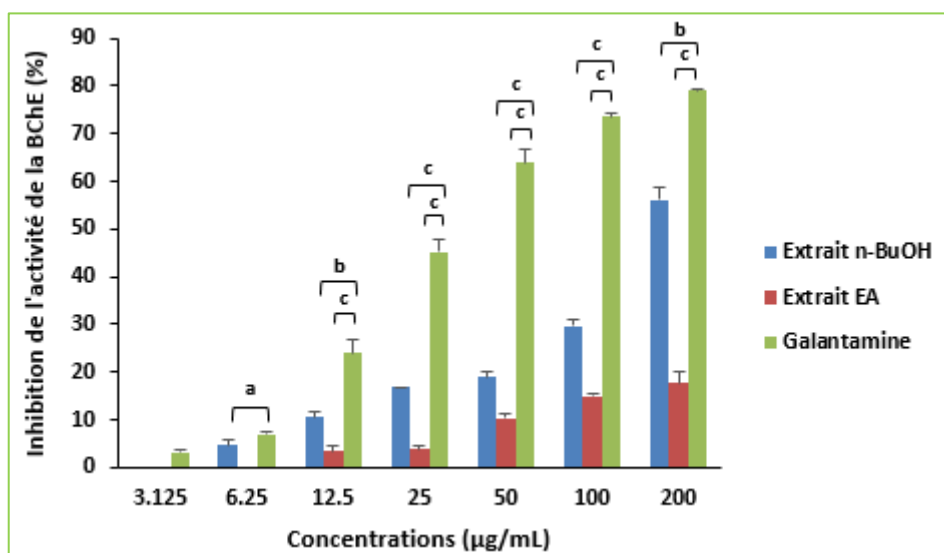


Figure 34. Activité neuroprotectrice (anti-butyrylcholinestérase) des extraits de *C. tougourensis*.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport à la galantamine, ^{ns} non significatif.

Tableau 21. Activités neuroprotectrices (IC₅₀ µg/ml) du standard et des extraits et de *C. tougourensis*.

Extraits / standards	Activité neuroprotectrice	
	Activité inhibitrice de l'AChE	Activité inhibitrice de la BChE
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrait n-BuOH	9.8 \pm 0.62 ^{ns}	173.53 \pm 0.04 ^c
Extrait EA	43.27 \pm 0.12 ^b	ND
Galantamine	6.27 \pm 1.15	34.75 \pm 1.99

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport à la galantamine, ND : non déterminé.

L'utilisation des plantes pour traiter les troubles neurodégénératifs pourrait être une bonne alternative. Une étude récente a montré que les composés naturels contenus dans les plantes, notamment d'origine phénolique (Phan *et al.*, 2019), pourraient stopper l'agrégation de la plaque amyloïde surtout de type β induite par l'acétylcholinestérase via l'inhibition de la toxicité de la protéine β -amyloïde, qui est l'une des principales causes de la maladie d'Alzheimer puisque l'on sait que le déclin de la population neuronale entraîne une perte progressive des fonctions cognitives.

Une autre étude menée par **Aktumsek et al. (2013)** sur trois espèces de *Centaurea*, à savoir *C. polypodiifolia* var. *pseudobehen*, *C. pyrrhoblephara* et *C. antalyense* a abouti à une activité inhibitrice modérée sur l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, notant que les flavonoïdes et les saponines étaient présents dans ces plantes à des teneurs élevées, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*.

Les cellules gliales sont parmi les populations cellulaires les plus importantes du système nerveux central. Ces cellules coordonnent l'activité des neurones, fournissent de l'oxygène et des nutriments et renforcent la plasticité du système nerveux central (**Jessen, 2004**). Une étude a montré qu'au niveau des cellules gliales, la quercétine serait capable d'inhiber les niveaux d'ARNm de la TNF- α et de l'interleukine (IL)-1 α normalement induites par le lipopolysaccharide (LPS) (**Geraets et al., 2007**), cet effet de la quercétine a pour conséquence de protéger les cellules gliales d'une éventuelle apoptose et protège ainsi la population neuronale (**Bureau et al., 2008**).

La vanilline est l'un des polyphénols les plus prometteurs dans le traitement des maladies liées au système nerveux. Ainsi une étude menée par **Lan et al. (2019)**, a montré que ce composé pouvait diminuer considérablement le volume de l'infarctus cérébral, ainsi que l'œdème cérébral et les dommages histomorphologiques chez le rat nouveau-né en atténuant considérablement les dommages oxydatifs. La vanilline préserverait même l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique ce qui la place comme candidat prometteur dans le traitement de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique néonatale (**Dhanalakshmi et al., 2015**).

Une autre étude menée sur les souris a montré que l'acide caféique a des propriétés neuroprotectrices remarquables. Les chercheurs de cette étude ont signalé qu'en plus de l'effet relaxant de ce composé, il pouvait également empêcher la dégénérescence des neurones et des différentes catégories de cellules gliales surtout les astrocytes et les oligodendrocyte qui sont vitales pour le maintien d'une fonction nerveuse optimale. L'acide caféique exercerait cet effet neuroprotecteur en activant la voie de signalisation érythroïde nucléaire 2 liée au facteur hème oxygénase-1 (Nrf2/HO-1) (**Morroni et al., 2018**). Plusieurs études ont montré que l'activation de cette voie empêcherait l'apparition de la maladie d'Alzheimer (**Colonnello et al., 2020**), permettrait la régulation du niveau de calcium dans le sang, réduirait le niveau de stress oxydatif mitochondrial et activerait d'autres processus tels que l'autophagie, la nécrose cellulaire programmée et la régulation de l'horloge biologique (**Zhang et al., 2020**).

Il a également été trouvé que l'acide trans-férulique pouvait considérablement réduire le stress oxydatif au niveau cérébral en empêchant la production du peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂) et ainsi la synthèse du peptide amyloïde bêta responsable de beaucoup de dysfonctionnement au niveau du système nerveux central, surtout de la dégénérescence massive des neurones conduisant à long terme à la maladie d'Alzheimer (**Nagai et al., 2017**).

le 2,6-Di-n-propyl-4-(2-furyl) pyridine a un bon effet neuroprotecteur (**Lee et al., 2020**) en freinant la dégénérescence progressive des neurones au cours de la maladie d'alzheimer et de parkinson ou bien lors des traumatismes sévères en inhibant l'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants (Kv), ce qui a pour effet de lutter contre le stress oxydatif induit par le glutamate et l'apoptose des lignées cellulaires neuronales hippocampiques de souris appelées (HT22) (**He et al., 2013**).

Il a été signalé dans une autre étude que la 2-pentadécane, 6,10,14-triméthyl- a un effet neuroprotecteur non négligeable (**Naidoo et al., 2014**) sur une lignée cellulaire dérivée d'un phéochromocytome de la médullosurrénale du rat appelé PC12. Ce composé semble également protéger les neurones contre les blessures induites par les neurotoxines (**Yang et al., 2020**), et il serait aussi doté d'une capacité à supprimer la neuro-inflammation protégeant ainsi les fonctions cérébrales primordiales telles que la mémoire et l'apprentissage (**Vauzour et al., 2008**) ainsi que d'autres fonctions cognitives.

Le dl-Allo-cystathionine posséderait également des effets neuroprotecteurs non négligeables (**Lajtha, 2013**) comparables à ceux des composés précédemment cités. Cependant, ce composé favoriserait également la survie neuronale en stimulant la sécrétion du facteur de croissance nerveuse (FCN) ainsi que sa liaison à son récepteur respectif (**Yuan et al., 2003**). Le dl-Allo-cystathionine régulerait même le mécanisme de transfert des influx nerveux entre les neurones en régulant la balance des synapses électriques et synapses chimiques (**Cejnar et al., 2020**).

2.7. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de *C. tougourensis* a été évaluée à l'aide de plusieurs souches microbiennes dont quatre référencées. Comme le montre le **Tableau 22**, l'extrait EA de *C. tougourensis* était actif sur deux souches microbiennes parmi les sept testées, à savoir: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* pathogène. Cet extrait a montré des concentrations minimales inhibitrices (CMI) respectives de 0.00625 mg/mL et 0.0125 mg/mL avec des zones d'inhibition respectives de (8.07 ± 0.17 mm) et (7.74 ± 0.22 mm) alors que l'extrait n-BuOH n'était actif que sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) avec une valeur MIC de 0.0125 mg/mL et une zone d'inhibition correspondante à 8.68 ± 0.37 mm (**Tableau**

23). Ceci permet de conclure que l'extrait EA de *C. tougourensis* a un effet anti-microbien plus important que l'extrait n-BuOH.

Tableau 22. Sensibilité de certaines souches microbiennes aux extraits de *C. tougourensis*.

Extraits / Antibiotiques	Souches microbiennes						
	Bactéries Gram positives		Bactéries Gram négatives				Levure
	Sa	PSa	Ec	PEc	Pa	Kp	Ca
Extrait n-BuOH	+	-	-	-	-	-	-
Extrait EA	+	-	-	+	-	-	-
Pénicilline	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicine	+	+	+	+	+	+	+

Sa : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), PSa : *Staphylococcus aureus* pathogène, Ec : *Escherichia coli* (ATCC 25922), PEc : *Escherichia coli* pathogène, Pa : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1117), Kp : *Klebsiella pneumoniae*, Ca : *Candida albicans* (ATCC 90029).

Tableau 23. Calcul des diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (MIC) des souches microbiennes testées.

Extraits / antibiotiques	Concentration (mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		Souches microbiennes	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> pathogène
Extrait n-BuOH	0.1	9.95 ± 0.14 ^{ab}	-
	0.05	9.32 ± 0.08 ^{ab}	-
	0.025	8.94 ± 0.23 ^{ab}	-
	0.0125	8.68 ± 0.37 ^{ab}	-
	0.00625	-	-
CMI (mg/ml)	/	0.0125	-
Extrait EA	0.1	12.04 ± 0.89 ^{ab}	9.08 ± 0.3 ^{ab}
	0.05	10.19 ± 0.38 ^{ab}	8.67 ± 0.45 ^{ab}
	0.025	9.85 ± 0.21 ^{ab}	8.39 ± 0.28 ^{ab}
	0.0125	9.42 ± 0.25 ^{ab}	7.74 ± 0.22 ^{ab}
	0.00625	8.07 ± 0.17 ^{ab}	-
CMI (mg/ml)	/	0.00625	0.0125
Pénicilline	/	32 ± 0.0	32 ± 0.0
Gentamicine	/	34 ± 0.0	36 ± 0.0

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n=3). ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Niveau de signification p < 0.001 ; extraits vs différentes substances standards ; ^ap < 0.001 est statistiquement significatif par rapport à la pénicilline, ^bp < 0.001 à la gentamicine, (CMI) concentration minimale inhibitrice.

Sur la base de certains résultats de recherche, il semble que les espèces de *Centaurea* possèdent des activités antibactériennes non négligeables. Une étude récente menée par Naeim *et al.* (2020) sur divers extraits de *Centaurea pumilio* montre un effet antimicrobien

considérable avec l'extrait acétate d'éthyle contre des bactéries multirésistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et *Salmonella enterica* (ATCC 14028), mais en revanche, leur extrait n-butanolique n'a montré aucun effet antibactérien, ce qui est conforme aux résultats obtenus avec *C. tougourensis*. Notant que les doses utilisées dans notre étude sont approximativement les mêmes que celles utilisées dans l'étude précédemment citée.

L'extrait acétate d'éthyle d'une autre espèce de *Centaurea* nommée *C. babylonica* a montré presque les mêmes résultats contre une bactérie et une levure formant des endospores, respectivement *Bacillus cereus* et *Candida albicans* (Güvensen *et al.*, 2019), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*. Une étude récente (Jurca *et al.*, 2020) impliquant quatre souches de *Streptococcus* a montré que les composés bioactifs de la plante, en particulier les polyphénols et dont les anthocyanes pourraient exercer un effet antibactérien important via une interaction avec des lipopolysaccharides bactériens ; les rendant plus exposés parce que ceci conduit à une augmentation significative de l'expression du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), diminuant ainsi l'expression du facteur de transcription (STAT3), ce qui améliore la réponse antibactérienne.

Une étude a montré que le composé (2H-Furo[2,3-b]indole, 3,3a,8,8a-tétrahydro-2,3-diméthyl-) pourrait à long terme inhiber une enzyme bactérienne appelée MenB, la 1,4-dihydroxy-2-naphtoyl-CoA synthase pour prévenir la tuberculose, mais aussi inhiber le processus de réplication du *Vibrio cholerae* du fait que cette bactérie est responsable du choléra (Gang, 2011), ce qui suggèrent que ce composé identifié pourrait être un bon candidat pour l'élaboration d'antibiotiques plus efficaces.

Il a également été rapporté que le benz[c]pyran-1,3-dione, 4,4-diméthyl- est efficace contre plusieurs souches bactériennes pathogènes telles que *pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Gilbert *et al.*, 2021). Plusieurs études ont également montré que ce composé posséderait des propriétés antivirales (Hashem *et al.*, 2007) et antiparasitaires (Rathelot *et al.*, 2002) remarquables.

Un autre composé identifié dans l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* nommé 3-trifluoroacétoxy-pentadécane a montré des effets antimicrobiens non négligeables contre plusieurs souches pathogènes dont cinq étaient des bactéries et quatorze des champignons et levures (Hadi et Hussein, 2016).

Il est également très intéressant de constater que la vanilline présente de fortes propriétés antimicrobiennes avec une activité démontrée contre un certain nombre de souches de levures

et de moisissures (**Cava-Roda et al., 2021**), ce qui explique pourquoi ce composé est associé à plusieurs conservateurs, surtout dans les boîtes de jus et les boîtes de conserves.

L'acide caféique posséderait également une activité antibactérienne non négligeable contre plusieurs souches pathogènes comme les staphylocoques mais semble agir surtout sur les bactéries anaérobies, en particulier contre les cocci (**Georgopoulou et al., 1994**). Des effets antimicrobiens comparables ont été rapportés avec la rutine, ce composé semble être plus inhibiteur de la prolifération des bactéries *Escherichia coli* et est considéré comme agent potentiel d'inhibition de la formation de biofilm de *Klebsiella pneumoniae* en entravant l'expression d'un gène appelé MrkA (**Wang et al., 2021**).

Quatre autres composés identifiés dans les extraits de *C. tougourensis* posséderaient également une activité antimicrobienne contre les souches pathogènes citées précédemment, ceux-ci ont un effet comparable à celui des autres molécules identifiés et cités précédemment. Ces composés sont respectivement l'acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique, le 2-pentadécane, 6,10,14-triméthyl, le 3-méthyl-4-(phénylthio)-2-prop-2-ényl-2,5-dihydrothiophène 1,1-dioxyde et le tétrapentacontane, 1,54-dibromo- (**Sharma et al., 2020; Divya et al., 2016; Rahman et al., 2014; Naidoo et al., 2014**). Le silanediamine, 1,1-diméthyl-N, N'-diphényl- qui est un autre composé identifié au niveau de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* semble également agir sur les bactéries gram positif mais de manière très faible (**Van Wyk, 2020**).

3. Résultats d'évaluation des activités biologiques *in vivo*

3.1. Evaluation de la toxicité aigue

Au cours des deux semaines d'observation, aucun signe de toxicité ou de décès n'a été enregistré. L'activité locomotrice et la consommation d'aliments et d'eau par jour de chaque souris étaient régulières. Il n'y a pas eu de réactions allergiques ni de perte de poils. Ces résultats suggèrent que *C. tougourensis* est dénué de toxicité et ceci même pour une dose de 2000 mg/kg, ce qui est en accord avec les résultats précédemment rapportés sur une autre espèce du genre *Centaurea* nommé *C. repens* pour laquelle les chercheurs ont testé 3 doses, 1000 ; 2000 et 5000 mg/kg et aucune d'entre elles n'a révélé de signes de toxicité (**Moradi et al., 2017**).

De plus, les diverses analyses biochimiques et hématologiques menées par ces chercheurs sur *C. repens* ont montré des valeurs physiologiques de divers paramètres, notamment, le taux de GR, GB, plaquette sanguine, granulocytes, lymphocytes, albumine et globuline.

En raison de la très faible toxicité des plantes de la famille des Astéraceae (**Medeiros-Neves et al., 2018**), ces espèces sont très convoitées et font l'objet de beaucoup d'investigations. Beaucoup de plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies, surtout de type chronique telles que le diabète, l'arthrite et même pour soulager les maux de tête et la migraine (**Mahadeo et al., 2018**).

Une autre étude testant la toxicité chronique et sub-chronique de *Centaurium erythraea* chez les rats a révélé le caractère non toxique de cette espèce (**Tahraoui et al., 2010**) ; cette investigation menée sur les rongeurs a également démontré la non toxicité de cette espèce pour les doses de 100, 600 et 1200 mg/kg. De plus, les examens histologiques de divers organes, notamment le foie et les reins n'ont révélé aucun signe de lésion ou de congestion vasculaire. Les chercheurs de cette étude ont rapporté par la suite que la DL₅₀ de cette espèce était de 8000 mg/kg, ce qui suggère que la toxicité de cette plante est négligeable.

Le test de toxicité aigüe de divers extraits de *Centaurea phyllocephala*, notamment le n-BuOH, EA et méthanolique n'a révélé aucun signe de toxicité sur les modèles murins de l'étude et ceci pour de diverses doses testées (100-2000 mg/kg) ; malgré la richesse de ces extraits en alcaloïdes et en tannins (**Twaij et al., 1983**). En effet les plantes très riches en ces deux classes de métabolites secondaires sont généralement toxiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec *C. tougourensis*.

Un autre travail mené par **Bourhia et son équipe (2019)** sur un modèle murin, a montré que les saponines et les flavonoïdes avaient un grand pouvoir préventif et protecteur contre la toxicité et plus précisément l'overdose qui est généralement provoquée par la consommation d'une dose excessive d'une drogue. D'autres travaux, cette fois-ci à l'échelle clinique, ont également prouvé le potentiel anti-toxique des anthocyanes et des terpènes extraits de diverses espèces de la famille des Astéraceae (**Koc et al., 2015 ; Ștefănescu et al., 2020**), ce qui montre une fois de plus le caractère médicamenteux de ces plantes.

3.2. Activité analgésique centrale

Le test de la plaque chauffante d'Eddy est très utilisé pour comprendre les mécanismes centraux de la douleur, en particulier la modulation centrale des signaux nociceptifs (**Garland et al., 2012**). Comme le montre la **Figure 35**. Les résultats de l'expérience ont révélé qu'à trente minutes après les pré-traitements oraux ; seul le groupe ayant reçu l'aspirine a exprimé un temps de réaction très prolongé (18.26 ± 0.71 sec) et considéré comme hautement significatif ($p < 0.001$) par rapport au groupe témoin.

Le groupe de souris qui a été prétraité par la dose (400 mg/kg) de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* a pris un meilleur temps de réaction par rapport au groupe traité par la dose (200 mg/kg). Cependant, un temps de réaction très similaire a été observé pour ces deux groupes à soixante minutes après leurs pré-traitements respectifs. Les valeurs étaient (14.78 ± 0.88 sec et 14.91 ± 0.99 sec) respectivement et sont considérées comme légèrement plus élevées par rapport au groupe témoin (12.87 ± 1.15 s) mais toutefois non significatives. Le groupe traité à l'aspirine a montré le meilleur temps de réaction au même moment (25.2 ± 1.04 sec) avec une différence hautement significative ($p < 0.001$) par rapport au groupe témoin.

L'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* a montré l'effet antinociceptif maximal à cent vingt minutes après le traitement (15.33 ± 1.33 sec) et a été considéré comme significatif ($P < 0.05$) par rapport au groupe témoin alors que la dose de 200 mg/kg était juste (10.42 ± 1.14 sec) et cela peut être interprété par le fait que la régulation de la réponse à la douleur par la plante n'était pas vraiment significative, ce qui suggère un petit effet inhibiteur de *C. tougourensis* sur la libération de certains médiateurs inflammatoires clés comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et la substance P qui sont directement impliqués dans le processus douloureux (Ellis et Bennett, 2013).

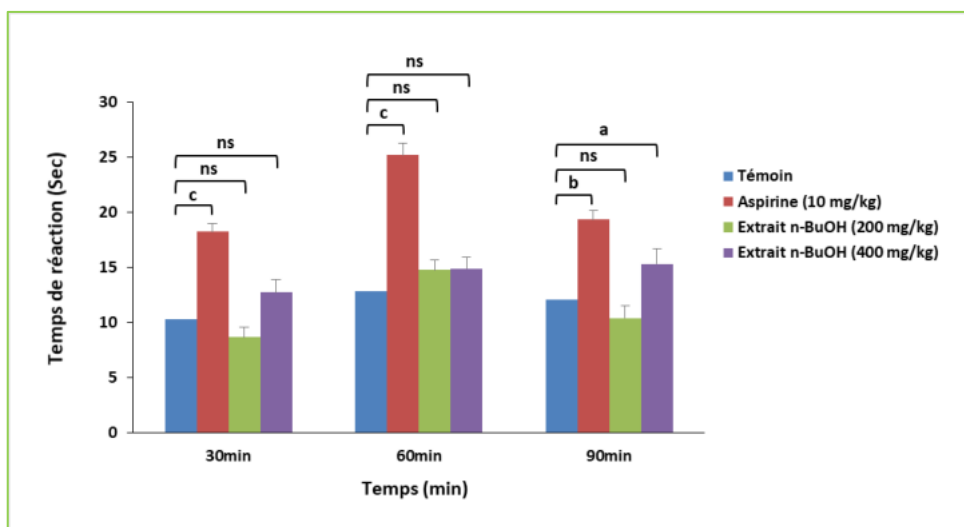


Figure 35. Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur le temps de réaction des souris au stimulus nociceptif.

Toutes les valeurs sont moyennes \pm SEM, $n=6$. ANOVA suivie du test multiple de Dunnett. Seuil de significativité ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin, ^{ns} non significatif.

L'inhibition de ces médiateurs conduit à une diminution significative de l'action nociceptive sur les terminaisons sensorielles qui minimisent généralement la sensation de la douleur (Smith *et al.*, 2007) mais le rôle de la sérotonine dans la douleur n'est pas bien connu jusqu'à présent car il semble favoriser et inhiber le processus douloureux en même temps

(Marks *et al.*, 2009). Cela peut expliquer cette augmentation importante du temps de latence et la suppression temporaire de la sensation de douleur chez les souris (Zhang *et al.*, 2014).

Une autre hypothèse pourrait être la capacité de *C. tougourensis* à stimuler la libération de certains neurotransmetteurs clés appelés endorphines via l'activation de la matière grise périaqueducule (PAG), dont l'une des fonctions principales de ces petits neuropeptides est l'inhibition de la transmission des impulsions douloureuses au niveau synaptique dans la corne dorsale (Foley *et al.*, 1979). Une autre étude a prouvé que l'endorphine peut également inhiber la libération d'un autre neuropeptide appelé substance P (SP) afin d'éviter la transmission périphérique et centrale des impulsions nociceptives (Chen *et al.*, 2014).

Une étude réalisée par Djeddi *et al.* (2012) a montré qu'une espèce algérienne endémique appelée *Centaurea pullata* exprimait une activité analgésique élevée en raison de la présence de terpènes appelés eudesmanolides. Une autre étude suggère que les composés phénoliques pourraient agir comme agents anti-nociceptifs via la stimulation des récepteurs opioïdes (Lavich *et al.*, 2005), ce qui pourrait diminuer l'hyperalagésie thermique et la libération de substances pro-nociceptives. Osama et Ikram (2018) ont montré une activité analgésique remarquable de leur plante dans le modèle expérimental utilisant des souris et des rats et ont suggéré que les flavonoïdes présents dans leur plante retardaient le métabolisme de l'acide arachidonique de la voie des cyclooxygénases, ce qui expliquerait l'activité analgésique de *C. tougourensis*.

Une autre étude a montré que le N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p possède un bon effet analgésique et cytotoxique en particulier contre la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7 du sein (Kaplancikli *et al.*, 2012). L'effet analgésique de ce composé serait généré via une interférence à la transduction du signal induite par la protéine G, ce qui a pour conséquence d'inhiber la synthèse des prostaglandines (Cashman, 1996).

Un autre composé identifié dans l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* nommé 2-(oxan-3-yl) éthanamine posséderait des propriétés analgésiques remarquables (Rani *et al.*, 2014). Ce composé serait capable de limiter considérablement la sensation de la douleur générée par des stimuli tels que la chaleur, en se liant aux récepteurs neuronaux qui activent une voie de signalisation neuronale appelé 5-HT afin d'augmenter la libération de neuropeptides clés tel que l'endorphine (Ossipov *et al.*, 2014) pour soulager la sensation de douleur. Une autre hypothèse indiquerait que ce composé exercerait un effet analgésique comparable à celui des opioïdes via une inhibition des neurones GABAergiques ou bien l'activation des neurones glutamatergiques (Zhu *et al.*, 2019).

Il semble que les alcaloïdes aient également une bonne activité analgésique en interférant avec l'activité des neurotransmetteurs clés impliqués dans le processus inflammatoire comme la sérotonine, la dopamine et la norépinéphrine, ce qui réduit considérablement la production du médiateur chimique de l'inflammation (**Bribi et al., 2015**). Les flavonoïdes peuvent également augmenter la quantité de sérotonine endogène ou peuvent interagir avec les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₃ pouvant être impliqués dans le mécanisme de l'activité analgésique centrale (**Cortes-Altamirano et al., 2018**). Il est également très intéressant de constater que *C. tougourensis* utilisée dans la présente étude contient des flavonoïdes, des terpènes et des alcaloïdes qui peuvent être impliqués dans cet effet protecteur comme indiqué dans les études de recherche citées ci-dessus.

Dans cette étude, deux composés clés ont été identifiés dans l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis*, nommés hydromorphe et norhydrocodone. Ces derniers peuvent soulager efficacement la sensation de douleur, en particulier la douleur neuropathique (**Murray et Hagen, 2005 ; Navani et al., 2013**), en raison de leur effet analgésique comparable à ceux précédemment rapportés avec la morphine, partageant d'ailleurs les mêmes récepteurs opioïdes (**Jones et al., 1999**) et divers tests cliniques l'ont prouvé (**Hayek et al., 2016**). Il a également été rapporté que l'hydromorphe peut réguler le processus respiratoire en agissant sur la moelle allongée pour coordonner les mouvements expiratoires et inspiratoires.

Une étude a montré que la vanilline peut se lier au récepteur vanilloïde de la même manière que l'eugénol afin de produire un effet analgésique ainsi qu'un effet de relaxation musculaire (**Ueno et al., 2019**). Plusieurs études (**Wu et al., 2017 ; McArthur et al., 2019**) utilisant l'approche de la sensibilité thermique ou bien l'allodynie mécanique statique provoquée par l'application d'un léger champ électrique sur la peau a démontré que la vanilline pouvait supprimer la douleur générée par ce phénomène en se liant à deux récepteurs, l'un appelé; potentiel de récepteur transitoire ankyrine 1 (TRPA1) et l'autre potentiel de récepteur transitoire vanilloïde de type 1 (TRPV1). Une autre étude a même montré que la vanilline pourrait agir sur le système nerveux périphérique afin de réduire les sensations de douleur mais le mécanisme exact n'a pas encore été élucidé.

Une autre étude a indiqué que l'acide tannique est un bon agent analgésique (**Zhang et al., 2015**) en modulant l'activité des canaux M/Kv7 K(+) ainsi que les canaux de type Cl(-) activés par le calcium et les canaux Na(+) voltage-dépendants exprimés dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) qui jouent un rôle important dans la nociception. Ce composé a été identifié dans les extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* ce qui suggère que cette plante

pourrait être un candidat idéal pour le traitement des douleurs inflammatoires liées à l'arthrose, l'arthrite rhumatoïdale et les brûlures (Lindler et al., 2020).

3.3. Activité anti-inflammatoire

3.3.1. Œdème de la patte induit par la carraghénane

Le **Tableau 24** montre qu'au cours de la phase précoce et précisément 1 h après l'injection de carraghénane, il y avait une augmentation significative de l'œdème de la patte de souris dans tous les groupes traités. Ceci a été immédiatement suivi d'une diminution progressive de l'œdème. Cette diminution était hautement significative ($p < 0.001$) pour presque tous les groupes traités lorsqu'on la compare à celle du groupe témoin.

Au cours de la phase tardive (4 jusqu'à 24 h), l'inhibition de l'œdème de la patte par l'extrait n-BuOH de la plante était efficace aux deux doses (200 et 400 mg/kg), mais la dose de 400 mg/kg avait un effet légèrement meilleur. 24 h après l'injection de carraghénane, les pourcentages d'inhibition de l'œdème de la patte étaient de (53.15 %) pour la dose de 200 mg/kg et (55.26 %) pour la dose de 400 mg/kg, tandis que le groupe traité par l'indométhacine présentait une réduction d'œdème de (60 %) au cours de la même période.

Le groupe traité par l'indométhacine a montré une légère augmentation du diamètre de la patte (0.1 mm) 24 h après l'injection de carraghénane tandis que des diminutions non négligeables de l'œdème de la patte ont été observées chez les groupes traités par les deux doses d'extrait n-BuOH (1.78 ± 0.04 mm et 1.7 ± 0.03 mm) pour les doses 200 mg/kg et 400 mg/kg, respectivement.

Tableau 24. Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur le diamètre des pattes des souris avant et après l'administration du carraghénane.

Echantillons	Dose (mg/kg)	Diamètre de la patte (mm)							
		Avant le traitement				Après le traitement			
			1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h
Témoin	-	1.75 ± 0.06	3.35 ± 0.14	3.78 ± 0.25	3.99 ± 0.19	4.29 ± 0.24	4.68 ± 0.09	4.02 ± 0.12	3.8 ± 0.13
Indométhacine	20 mg/kg	1.69 ± 0.03^{ns}	2.12 ± 0.03^c (36.71%)	1.91 ± 0.05^c (49.47%)	1.7 ± 0.04^c (57.39%)	1.59 ± 0.1^c (62.93%)	1.4 ± 0.02^c (70.08%)	1.42 ± 0.06^c (64.67%)	1.52 ± 0.02^c (60%)
Extrait n-BuOH	200 mg/kg	1.74 ± 0.02^{ns}	3.1 ± 0.14^{ns} (7.46%)	2.96 ± 0.09^b (21.69%)	2.66 ± 0.06^c (33.33%)	2.46 ± 0.08^c (42.65%)	2.29 ± 0.05^c (51.06%)	2.13 ± 0.05^c (47.01%)	1.78 ± 0.04^c (53.15%)
	400 mg/kg	1.72 ± 0.03^{ns}	2.79 ± 0.1^b (16.71%)	2.73 ± 0.12^c (27.77%)	2.53 ± 0.04^c (36.59%)	2.39 ± 0.05^c (44.28%)	2.27 ± 0.04^c (51.49%)	2.09 ± 0.04^c (48%)	1.7 ± 0.03^c (55.26%)

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=6. ANOVA suivie du test multiple de Dunnett. Seuil de signification ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ par rapport au groupe témoin, ^{ns} non significatif. Les valeurs données entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte.

L'œdème de la patte induit par la carraghénine est un modèle expérimental bien connu utilisé pour déterminer le potentiel anti-inflammatoire d'extraits de plantes. Le test se déroule en deux phases. Au cours de la première phase, il ya une augmentation de l'œdème de la patte qui pourrait s'expliquer par l'importante libération d'histamine et de sérotonine, entraînant une libération de bradykinine et une augmentation de la perméabilité vasculaire (**Jiang et al., 2015**).

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent un effet anti-inflammatoire possible de *C. tougourensis*, et ils sont en accord avec le fait établi que la réduction de l'œdème a lieu dans les deuxième et troisième heures après l'injection de carraghénane (**Erel et al., 2014**). La diminution de l'œdème de la patte dans les groupes traités par *C. tougourensis* au cours de la phase tardive pourrait être due à une forte inhibition de l'expression du monoxyde d'azote synthétase (iNOS) et les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) ce qui a pour conséquence d'empêcher la libération des prostaglandines E2 (PGE2) et le monoxyde d'azote (NO) qui sont les principaux médiateurs pro-inflammatoires de cette phase (**Isailovic et al., 2015**).

Cela pourrait également être du à un blocage du recrutement de la cytokine (IL-1 β) qui est normalement impliquée durant la deuxième phase, bloquant ainsi l'apparition de cette phase (**Ferraccioli et al., 2010**). Le groupe traité par l'indométhacine a montré une légère augmentation du diamètre des pattes 24 h après l'injection de la carraghénane, probablement due à une légère réactivation du processus inflammatoire (**Lu et al., 2007**).

Dans certains tests utilisant des rats, il a été rapporté que l'acétamide, N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p possède une activité anti-inflammatoire non négligeable en réduisant considérablement l'œdème de la patte et les taux plasmatiques de COX-1, COX-2 (**Autore et al., 2010 ; Rani et al., 2014**). Un effet anti-inflammatoire comparable du Benz[c]pyran-1,3-dione, 4,4-dimethyl- a également été rapporté par **Shehab et al. (2016)**. Notant que ces deux composés ont été identifiés au niveau de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis*.

Concernant l'extrait acétate d'éthyle de *C. tougourensis*; certains composés identifiés ont déjà montré des propriétés pharmacologiques remarquables. Une étude réalisée par **Nadkarni (1954)** ont démontré que l'ester S-(2-aminoéthyl)ique de l'acide thiosulfurique (H₂S₂O₃) a un effet anti-inflammatoire significatif, en particulier contre l'inflammation affectant les bronches appelée bronchite et peut également prévenir l'inflammation liée aux articulations, aux muscles et à l'arthrite (**Patil et al., 2006**). Une étude récente (**Kurade et al., 2021**), a montré que ce composé est déjà utilisé dans le processus de filtration des eaux usées et de bons

résultats ont été rapportés, ce qui est une bonne étape en biotechnologie et surtout pour la préservation de l'écosystème.

Les paramètres hématologiques et biochimiques ont également été analysés afin de mieux comprendre le mécanisme d'inflammation induite par la carraghénane mais surtout de confirmer si l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* avait un effet protecteur contre l'apparition d'oedèmes. Ainsi comme le montre le **Tableau 25**, l'analyse des paramètres hématologiques a révélé que les groupes de souris qui ont été traités par l'indométacine ou bien par l'extrait n-BuOH (400 mg/kg) ont affiché des taux très faibles de globules blancs et de plaquettes par rapport au groupe témoin non sain et la différence a été considérée comme hautement significative ($p < 0.001$), ce qui suggère que la plante et l'indométacine ont réduit et maîtrisé la réponse inflammatoire très rapidement par rapport au groupe de témoin non sain, empêchant ainsi l'intervention des cytokines pro-inflammatoires (Naseri *et al.*, 2018) surtout de la prostaglandine D2 (PGD2) pour réduire la réponse inflammatoire. Il est très connu que l'indométacine a un effet inhibiteur persistant sur la fonction plaquettaire pendant au moins 24 heures (Cheung *et al.*, 1999).

Toutefois, ces deux groupes ont exprimé un pourcentage élevé de lymphocytes ($77.3 \pm 2.19\%$) pour le groupe n-BuOH (400 mg/kg) et ($82.17 \pm 2.24\%$) pour le groupe indométhacine ; ce qui signifie qu'un nombre important de lymphocytes a été recruté pour contrôler et réguler le processus inflammatoire induit par l'administration de carraghénane (Cronkite et Strutt, 2018). Par ailleurs, des niveaux comparables de globules rouges, d'hématocrite et d'hémoglobine ont été retrouvés pour les trois groupes traités et la différence a été ainsi considérée comme non-significative.

Tableau 25. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur les divers paramètres hématologiques après induction de l'œdème de la patte par le carraghénane chez les souris.

Échantillons/ Paramètres hématologiques	GR ($10^6/\mu\text{L}$)	GB ($10^3/\mu\text{L}$)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	HT (%)	HB (g/dL)	Lym (%)
Témoin non sain	7.96 ± 0.45	5.9 ± 0.17	289 ± 19.31	34 ± 1.76	14.4 ± 0.91	47.72 ± 3.08
Indométhacine (20mg/kg)	$7.94 \pm 0.69^{\text{ns}}$	$2.29 \pm 0.02^{\text{c}}$	$187.5 \pm 16.23^{\text{c}}$	$41.03 \pm 1.04^{\text{a}}$	$12.7 \pm 1.3^{\text{ns}}$	$82.17 \pm 2.24^{\text{c}}$
Extrait n-BuOH (400mg/kg)	$7.62 \pm 1.11^{\text{ns}}$	$3.2 \pm 0.08^{\text{b}}$	$168 \pm 13.58^{\text{c}}$	$34.9 \pm 2.25^{\text{ns}}$	$13.05 \pm 1.86^{\text{ns}}$	$77.3 \pm 2.19^{\text{c}}$

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=6. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnet. Niveau de signification ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin non sain. Abréviation; GR : globules rouges, GB : globules blancs, PLT : plaquettes, HT : hématocrite, HB : hémoglobine, Lym : lymphocytes.

D'autre part, les résultats biochimiques des deux paramètres étudiés, à savoir la protéine C-réactive (CRP) et l'albumine, sont élucidés dans le **Tableau 26**. La CRP est un marqueur bien connu qui révèle le degré d'inflammation en fonction de son niveau dans le sang (**Anderson et al., 1998**). Un taux sanguin élevé de CRP indiquerait forcément un processus inflammatoire en cours (**Sproston et Ashworth, 2018**). Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que le niveau du CRP pour les groupes traités par les deux doses de l'extrait n-BuOH (200 et 400 mg/kg), était le même que celui du groupe traité par l'indométhacine s'exprimant dans les deux cas par une valeur nulle. Cette différence a été considérée comme très hautement significative ($P < 0.001$) par rapport au groupe témoin non sain. La production de CRP et d'interleukine-6 (IL-6) est fortement liée puisque la sécrétion du CRP est stimulée et dépend beaucoup de l'IL-6 (**Del Giudice et Gangestad, 2018**). De plus, l'IL-6 est un puissant agent pro-inflammatoire ce qui signifie que l'extrait n-BuOH (400 mg/kg) et l'indométhacine ont peut être inhibé significativement la production d'IL-6.

La concentration sanguine d'albumine des groupes traités par les deux doses d'extrait n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* et ceux traités par le médicament était significativement plus élevée ($p < 0.001$) que celle du groupe témoin non sain, ce qui indique que l'inflammation dans ces trois groupes est inférieure à celle du groupe témoin non sain.

Plusieurs recherches (**Ballmer, 2001 ; Ishida et al., 2014**) ont montré que l'hypoalbuminémie indiquait une augmentation des phénomènes inflammatoires pouvant conduire à long terme à l'apparition d'un œdème.

Tableau 26. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur les divers paramètres biochimiques après induction de l'œdème de la patte par le carraghénane chez les souris.

Échantillons / Paramètres biochimiques	Albumine (g/L)	CRP (mg/L)
Témoin	29.56 ± 1.17	16.5±0.73
Indométacine (20 mg/kg)	64.80 ± 1.69 ^c	0 ± 0.00 ^c
Extrait n-BuOH (200 mg/kg)	46.72 ± 1.45 ^c	0 ± 0.00 ^c
Extrait n-BuOH (400 mg/kg)	50.03 ± 2.89 ^c	0 ± 0.00 ^c

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n=6. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnet. Niveau de signification ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ par rapport au groupe témoin. Abréviation; CRP : protéine C réactive.

L'étude histopathologique utilisant la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a montré que les groupes de souris prétraités avec l'indométhacine ou bien par l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à une dose de 400 mg/kg n'ont présenté aucun signe d'inflammation, comme le montrent respectivement la **Figure 36C** et la **Figure 36E**. Plusieurs sections ont montré une

peau kératinisée à épithélium pavimenteux reposant sur un derme composé de structures annexes de morphologie normale. De plus, il y avait des faisceaux de muscles striés et de trabécules osseuses entourant les espaces médullaires qui contenaient des éléments hématopoïétiques de richesse normale.

Une hyperkératose a été observée dans le groupe traité par l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à la dose de 200 mg/kg (**Figure 36D**), probablement due à une réponse inflammatoire. En revanche, une congestion vasculaire a été observée dans le groupe témoin non sain appelé témoin-carraghénane (**Figure 36B**), ce qui laisse suggérer l'apparition d'une réaction inflammatoire. Cependant, cette congestion pourrait également résulter d'un traumatisme pendant l'expérimentation, par exemple lors de la coupure de la patte.

Les résultats de cette étude permettent de déduire qu'une dose élevée de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* peut bloquer le processus inflammatoire en raison de ses teneurs importantes en phénols et en tanins. En effet, plusieurs travaux antérieurs (**Debbache-Benaid et al., 2013 ; de Oliveira et al., 2014**) ont montré qu'une teneur élevée en tanins peut être responsable d'effets pharmacologiques tels qu'une inhibition importante des complications macro et microvasculaires.

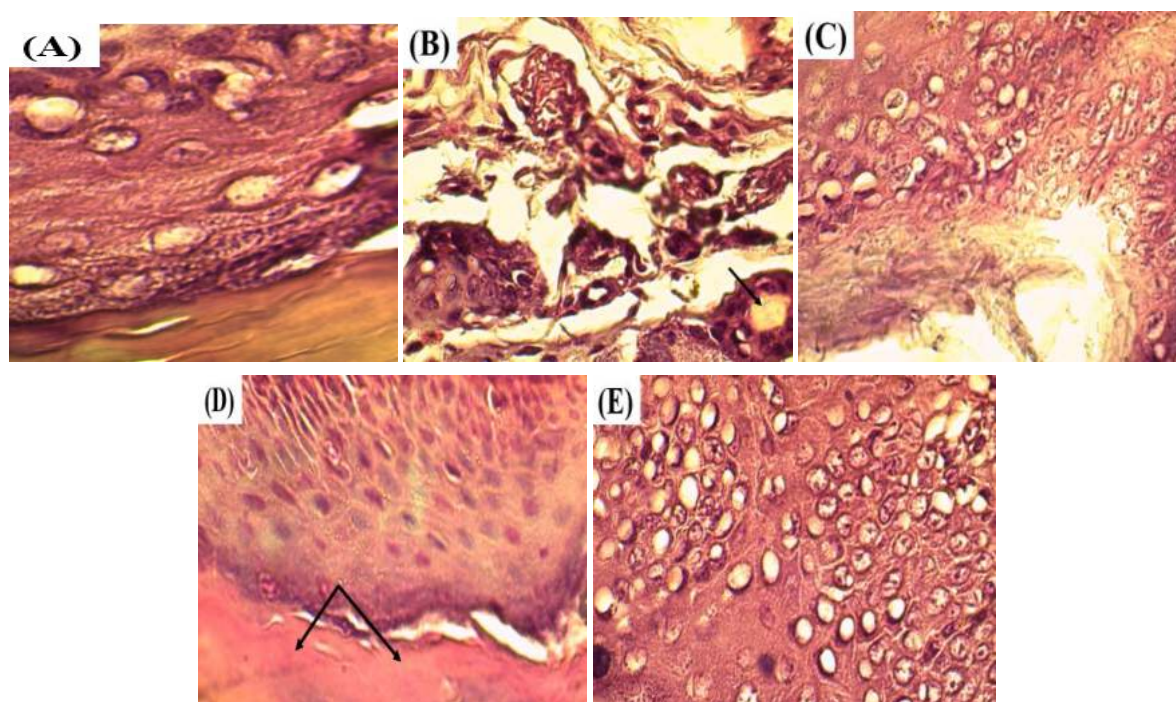


Figure 36. Coupes histologiques des pattes des souris après injection sous-plantaire de carraghénane.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Témoin sain, (B) Témoin non sain, (C) Indométhacine (20 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). Flèche noire indique une congestion vasculaire ou bien une stéatose.

3.3.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

Comme indiqué dans le **Tableau 27**, l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* a montré une suppression non négligeable de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton avec un pourcentage d'inhibition maximale de (39.58 %), et ceci, pour la plus élevée concentration testée (400 mg/kg), tandis que la valeur d'indométacine était légèrement plus élevée (47.91 %). Ces résultats ont été considérés comme hautement significatifs ($p < 0.001$) par rapport au groupe témoin. Notant qu'une faible variation de poids de l'oreille (10.35 %) a été observée dans le groupe de souris qui ont reçu l'extrait n-BuOH (400 mg/kg), alors que celle du groupe témoin était très importante (38.27 %).

Tableau 27. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris.

Echantillons	Dose (mg/kg)	Diamètre de l'oreille (mm)			Poids de l'oreille (mg)		
		Avant le traitement	Après le traitement		Oreille gauche (témoin)	Oreille droite (traitée)	Variation du poids
			2h	4h			
Témoin	-	0.28 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.01	37.15 ± 1.61	75.42 ± 2.79	38.27%
Indométhacine	20 mg/kg	0.23 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.01 ^c (42.22%)	0.25 ± 0.00 ^c (47.91%)	37.82 ± 2.81 ^{ns}	42.26 ± 2.06 ^c	4.44%
Extrait n-BuOH	200 mg/kg	0.26 ± 0.01 ^{ns}	0.36 ± 0.01 ^c (20%)	0.35 ± 0.01 ^c (27.08%)	36.11 ± 2.2 ^{ns}	52.53 ± 3.25 ^b	16.42%
Extrait n-BuOH	400 mg/kg	0.26 ± 0.01 ^{ns}	0.32 ± 0.01 ^c (28.96%)	0.29 ± 0.01 ^c (39.58%)	33.56 ± 0.69 ^{ns}	43.91 ± 2.66 ^c	10.35%

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n=6. ANOVA suivie du test multiple de Dunnett. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 par rapport au groupe témoin, ^{ns} n'est pas significatif. Les valeurs données entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition de l'œdème de l'oreille.

Les flavonoïdes sont capables d'empêcher l'activation d'un facteur de transcription clé appelé facteur nucléaire-kappa (NF-κB) qui joue un rôle crucial dans l'établissement des réponses immunitaires et inflammatoires, les flavonoïdes peuvent également empêcher l'interaction de ce facteur avec des sites de liaison à l'ADN spécifiques de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (**Panaro et al., 2012**), puisque l'on sait que (NF-κB) est responsable de nombreuses productions de cytokines telles que les lipoxigénases (LOX), la cyclooxygénase 2 (COX -2), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) et plusieurs interleukines (IL-1, IL-6 et IL-8). D'autres chercheurs ont suggéré que les flavonoïdes pouvaient générer cet effet anti-inflammatoire via l'activation de la voie p38 MAPK (**Goetttert et al., 2010**) mais pourraient également empêcher la transcription de l'ARNm de

l'oxyde nitrique synthase (iNOS) (**Catarino et al., 2014**) qui représente un agent pro-inflammatoire important.

La sérotonine est un neurotransmetteur très important qui coordonne la communication neuronale, aide l'homme à contrôler ses émotions, à surmonter le stress, à digérer les nutriments, à développer les fonctions cérébrales du fœtus (**Jenkins et al., 2017; Lv et Liu, 2017**) et il est également considéré comme un agent pro-inflammatoire clé (**Wu et al., 2019**), générant ces effets en agissant sur son récepteur appelé récepteur de la sérotonine 1A (5-HT1A) ou sur d'autres sous-types de ce récepteur comme le 5-HT2A et le 5-HT6.

Plusieurs études (**Dennis Bilavendran et al., 2019 ; Kamat et al., 2020**) ont rapporté que la 2, 6-Di-n-propyl-4-(2-furyl) pyridine et la 3, 5-Diethyl-4-(2-furyl) pyridine peuvent exercer un effet anti-inflammatoire en limitant les interactions entre la sérotonine et son récepteur et même entre les analogues de la sérotonine et son récepteur sans exception. Une autre hypothèse indique que ces deux composés génèrent une suppression temporaire du processus de dégranulation des neutrophiles, ce qui entraînerait une diminution significative de la libération de médiateurs pro-inflammatoires puisque ces granules contiennent de la sérotonine, de l'histamine, des interleukines (IL), des protéases et d'autres pro-inflammatoires (**Tordera et al., 1994**). Le 3, 5-diéthyl-4-(2-furyl) pyridine a également un bon effet anticonvulsivant (**Kumar et al., 2010**) et le 2,6-Di-n-propyl-4-(2-furyl) pyridine a une puissante propriété vasodilatatrice (**Trcka et Vejdelek, 1956**).

L'examen histopathologique des oreilles a révélé que les groupes de souris qui ont été traités avec l'indométacine (20 mg/kg) (**Figure 37C**) ou bien les deux doses d'extraits n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* (**Figure 37D et 37E**) ont préservé l'épaisseur et l'intégrité de l'oreille. Cependant, une hyperplasie épidermique a été observée au niveau du groupe témoin non sain (huile de croton) (**Figure 37B**) et était bordée par une importante infiltration de neutrophiles qui s'est propagée jusqu'aux zones cartilagineuses et musculaires striées, cela laisse supposer la survenue d'une réponse inflammatoire importante. Plusieurs œdèmes ont également été observés dans la couche dermique.

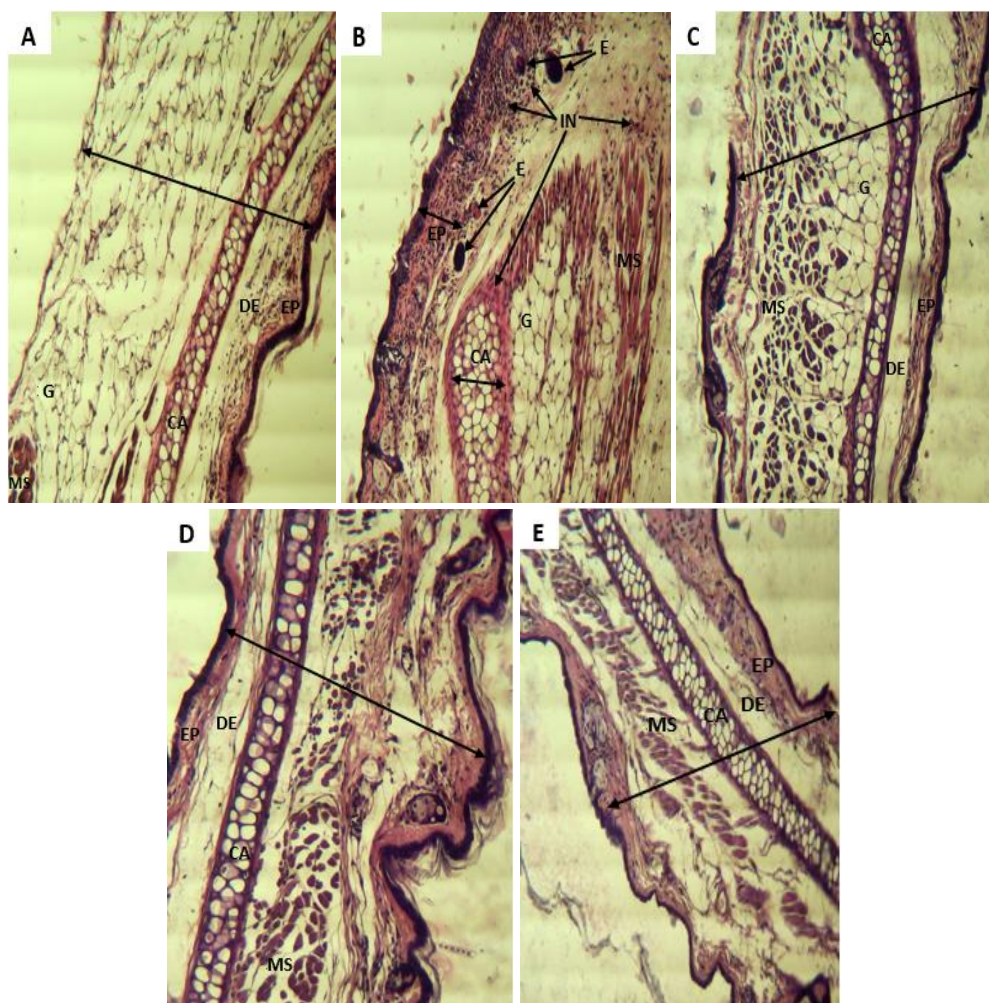


Figure 37. Coupes histologiques des tissus de l'oreille des souris.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Témoin sain, (B) Témoin non sain (Huile de Croton), (C) Indométhacine (20 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). CA: cartilage. DE: derme. E: œdème. EP: épiderme. G:graisse. MS: muscle strié. IN: infiltration de neutrophiles.

3.4. Activité antipyrétique

Comme le montre le **Tableau 28**, les résultats obtenus ont révélé que 16 h après l'induction de la fièvre par la levure de bière ; l'extrait à concentration de 200 mg/kg a montré un effet antipyrétique non négligeable tandis que des résultats plus considérables ont été observés pour la concentration la plus élevée de 400 mg/kg avec une température rectale correspondante réduite à $(32.36 \pm 0.18 \text{ }^{\circ}\text{C})$ 5h après le traitement. Il est également intéressant d'observer que pendant les premières heures de traitement, le pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie était presque le même pour les groupes paracétamol (150 mg/kg) et extrait (400 mg/kg), et était considéré en général comme significatif ($P < 0.05$) par rapport au groupe témoin. Cependant, pendant les 4^{ème} et 5^{ème} heures qui ont suivi le traitement ; la propriété antipyrétique de la plante était supérieure à celle du groupe paracétamol à la concentration de

(400 mg/kg) et a atteint (90.18%), alors que la valeur du groupe paracétamol n'était que de (79.2%).

Tableau 28. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur la température rectale avant et après l'injection de la levure de bière.

Echantillons	Dose (mg/kg)	Normal	16h Après injection de la levure		Température rectale (°C)				
			1h	2h	Après le traitement				
					3h	4h	5h		
Témoin	-	32.66 ± 0.22	34.73 ± 0.24	34.66 ± 0.24	34.48 ± 0.26	34.41 ± 0.25	34.08 ± 0.27	33.56 ± 0.23	
Paracétamol	150 mg/kg	32.15 ± 0.23 ^{ns}	34.9 ± 0.23 ^{ns}	33.93 ± 0.11 ^{ns} (35.27%)	33.48 ± 0.16 ^a (51.63%)	33.13 ± 0.12 ^b (64.36%)	32.96 ± 0.14 ^b (70.54%)	32.73 ± 0.17 ^a (79.2%)	
Extrait n-BuOH	200 mg/kg	32.46 ± 0.24 ^{ns}	34.48 ± 0.18 ^{ns}	34.1 ± 0.23 ^{ns} (18.81%)	33.85 ± 0.26 ^{ns} (31.18%)	33.56 ± 0.3 ^a (45.54%)	33.21 ± 0.29 ^a (62.87%)	32.88 ± 0.23 ^{ns} (78.9%)	
	400 mg/kg	32.1 ± 0.22 ^{ns}	34.75 ± 0.27 ^{ns}	33.76 ± 0.31 ^a (37.35%)	33.43 ± 0.29 ^a (49.84%)	33.06 ± 0.26 ^b (63.77%)	32.53 ± 0.2 ^c (83.75%)	32.36 ± 0.18 ^b (90.18%)	

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n=6. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnett. Niveau de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 par rapport au groupe témoin, ^{ns} non significatif. Les valeurs données entre parenthèses indiquent le pourcentage d'inhibition de la pyrexie.

Les résultats obtenus signifient que *C. tougourensis* contient de nombreux composés bioactifs qui interfèrent dans la libération de prostaglandines (PG), en agissant directement sur l'hypothalamus (Harms *et al.*, 1973). En effet, plusieurs travaux de recherche (Makonnen *et al.*, 2003 ; Kwon *et al.*, 2011) ont montré que la présence de flavonoïdes, de tanins et de saponines a été corrélée au potentiel antipyrétique de leurs plantes. Ces composés pourraient également agir via un processus synergique.

Il est bien connu que pendant la fièvre ; il y a une libération importante de prostaglandines (PG) qui sont des cytokines pro-inflammatoires clés. La diminution importante de la température rectale enregistrée dans cette étude pourrait être expliquée par le fait que les composés de *C. tougourensis* ont la capacité d'inhiber la production de cette cytokine. Une étude récente (Siswadi *et al.*, 2021) a montré que l'acide octadécanoïque, 9-oxo-, ester méthylique possède la capacité de s'opposer aux processus de biosynthèse et de libération des prostaglandines (PG) suggérant un blocage possible des activités de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase (Hrdý *et al.*, 2020).

Une autre étude (Akkol *et al.*, 2009) réalisée sur deux espèces de *Centaurea*; *C. depressa* et *C. solstitialis* a révélé que la forte teneur en terpènes de ces espèces notamment les lactones sesquiterpéniques est responsable de leurs activités antipyrétiques en agissant sur le système nerveux central (SNC) puisque l'hypothalamus agit comme un centre de thermorégulation

(**Tan et Knight, 2018**), ce qui est en parfait accord avec les résultats obtenus, puisque *C. tougourensis* contient une quantité considérable de terpènes.

Les composés bioactifs des plantes peuvent également inhiber l'effet pyrogène de nombreux microbes. Des tests cliniques très récents ont même montré que certaines classes de composés comme les saponines et les flavonoïdes pourraient diminuer l'augmentation anormale de la température suite au rejet de greffe ou à des lésions tissulaires (**Relja et al., 2020**). Cette capacité de molécules bioactives permettra ainsi la fabrication de médicaments plus efficaces avec moins d'effets secondaires que les médicaments présents actuellement sur le marché, notamment, les antibiotiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Davis et Robson, 2016**).

3.5. Activité antiulcéreuse

Les résultats macroscopiques (**Figure 38**) et histopathologiques (**Figure 39**) ont révélé qu'à l'exception du groupe témoin (**Figures 38B et 38B**), qui présentait des congestions vasculaires visibles et des lésions tissulaires, presque tous les groupes traités ne présentaient aucun signe d'ulcère.

Les effets anti-ulcéreux observés dans cette étude sont en accord avec les résultats d'autres travaux de recherche impliquant des modèles murins et qui ont montré des effets anti-ulcéreux significatifs de certaines espèces de *Centaurea* telles que *C. solstitialis* et *C. cyanus* via la prévention de la formation de lésions au niveau de la muqueuse gastrique en raison de leur teneur élevée en phénols et en flavonoïdes (**Gürbüz et Yesilada, 2007**). Ces composés réduisent le risque de développer des maladies inflammatoires de l'intestin telles que la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn en inhibant les voies de signalisation JAK2/STAT3 et NF- κ B (**Hong et al., 2019**).

Une étude de **Pirvu et al. (2015)** a démontré que les polysaccharides peuvent agir en synergie avec les polyphénols pour renforcer les effets gastroprotecteurs de *Centaurea cyanus*. Cela pourrait être expliqué par le fait que les polysaccharides fournissent une couche protectrice qui consolide la couche muqueuse gastrique.

Les mucilages se sont avérés être utiles dans le traitement de plusieurs maladies gastro-intestinales. Une étude sur des groupes de rats ulcérés a montré que les mucilages réduisaient significativement l'acidité du suc gastrique et augmentaient le pH gastrique (**Banji et al., 2010**). Cela suggère que les mucilages peuvent agir comme des barrières qui protègent le tube digestif des diverses enzymes digestives et excès d'acidité gastro-intestinale (**Sharma et al., 2014**). Dans cette étude, il a été constaté que *C. tougourensis* contenait des niveaux élevés de

mucilages et la procédure utilisée dans la préparation de l'extrait a favorisé l'extraction de ces molécules.

La quercétine a un effet protecteur très important sur les cellules gastro-intestinales (**Penissi *et al.*, 2003**), principalement en régulant la voie de signalisation MAPK/ERK, ce qui a également pour effet la stabilité le pH du jus gastrique empêchant ainsi l'apparition d'ulcère. Ce composé permettrait même la régénération et la réparation de la muqueuse gastrique endommagée (**Alarcón de la Lastra *et al.*, 1994**).

La rutine limiterait considérablement la sécrétion d'acide chlorhydrique, de pepsine, de leucotriènes, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) empêchant ainsi l'apparition de l'ulcère peptique. Ce dernier est un type d'ulcère affectant l'œsophage, le jéjunum et le site anastomotique gastrique (**Brito *et al.*, 2018**). Ce qui prouve une fois de plus le potentiel pharmacologique des flavonoïdes.

Une autre étude menée sur les rats a montré que le N-[3-[2-(2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-3-indolyl)-1-oxoéthyl]p possède une bonne activité antiulcéreuse, en particulier contre l'ulcère gastroduodéal et la rectocolite hémorragique (**Alasmay *et al.*, 2018**). Ce composé se comporterait comme un antagoniste de l'histamine en se fixant sur son récepteur et en empêchant ainsi la libération excessive du suc gastrique (**Amagase *et al.*, 1996**), puisque il est bien connu qu'une libération massive du suc gastrique est l'un des facteurs contribuant à l'apparition d'ulcère. Une approche récente utilisant le docking moléculaire a même confirmé ce résultat (**Zahran *et al.*, 2021**).

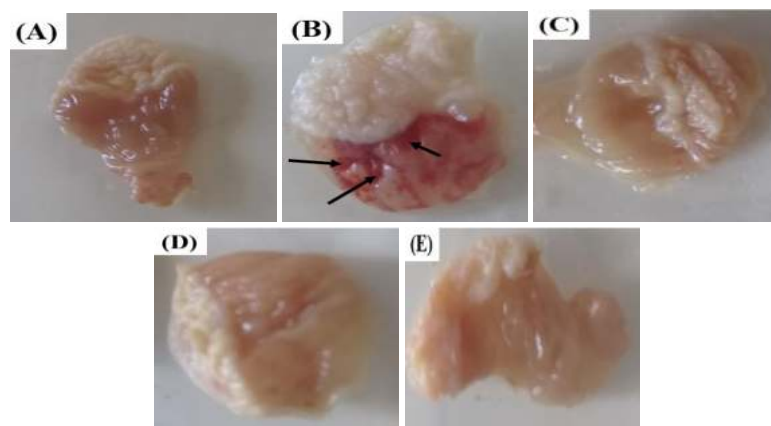


Figure 38. Effet de l'extrait n-BuOH de *Centaurea tougourensis* sur l'aspect macroscopique de la muqueuse gastrique dans le test de l'ulcère induit par l'éthanol chez les souris.

(A) Témoïn sain, (B) Témoïn non-sain, (C) Oméprazole (20 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg).

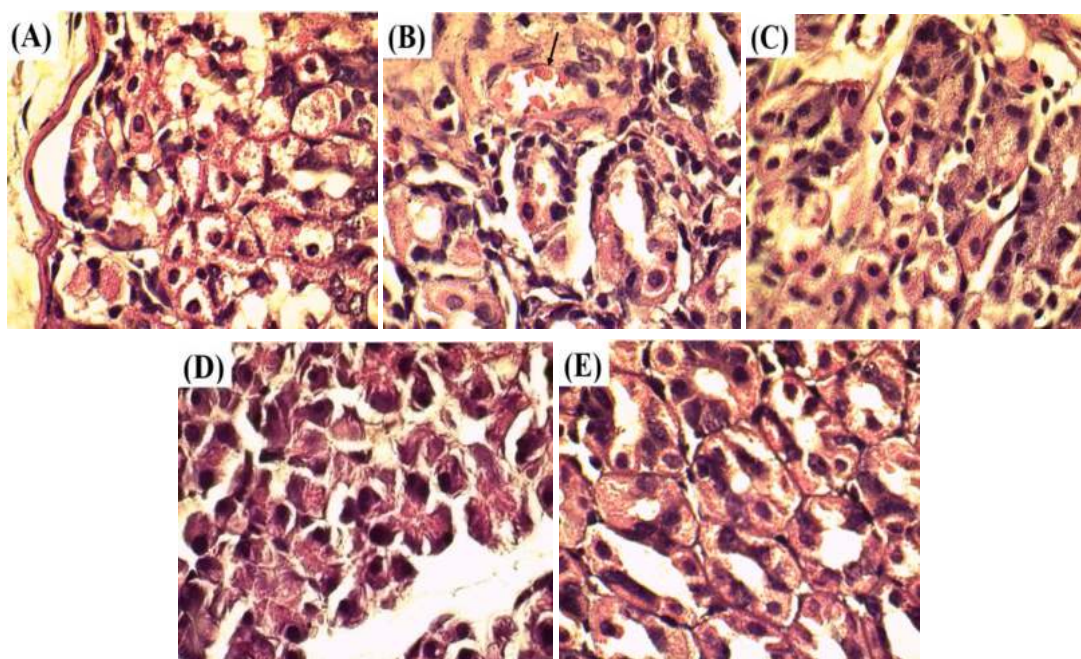


Figure 39. Examen histopathologique des tissus des glandes gastriques des souris.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Témoin sain, (B) Témoin non-sain, (C) Oméprazole (20 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). Flèche noir indique une congestion vasculaire.

3.6. Activité cicatrisante

Ce test a été effectué selon le modèle de plaie provoquée par excision. Comme le montre le **Tableau 29**, la superficie des plaies des cinq groupes a été observée durant une période de 18 jours afin de connaître le rythme de cicatrisation et l'efficacité de l'extrait de la plante. Apparemment les deux doses de l'extrait n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* ont réduit la superficie des plaies de manière très significative ($p < 0.001$) par rapport au témoin non sain. Il est également très intéressant de constater que l'efficacité des deux doses de l'extrait était presque la même jusqu'au 10^{ème} jour de traitement. Cependant, la dose de 400 mg/kg a montré une efficacité plus importante le 14^{ème} jour, dont la surface de la plaie a été réduite à $(34.83 \pm 1.54 \text{ mm}^2)$, alors que pour celle du groupe traité avec la dose de 200 mg/kg la réduction a abouti à $(79.47 \pm 1.08 \text{ mm}^2)$.

Au bout de la 18^{ème} journée de traitement, le groupe de souris qui a été traité par la plus forte dose de l'extrait a atteint un pourcentage de réduction de la zone de la plaie presque parfait (99.80%). Il est à noter que les superficies ont été calculées à l'aide du logiciel image J et un exemple de calcul de la superficie d'une plaie est présenté au niveau de la **figure 41**.

Les résultats ont aussi montré que les souris du groupe véhicule traités par un mélange, principalement à base de paraffine bio ont cicatrisé rapidement. Ce groupe a affiché le meilleur pourcentage de réduction de la surface de plaie (28.45%) au début du traitement par rapport aux autres groupes pour atteindre vers la fin un pourcentage considérable de

(93.57%). Cette effet serait peut être du à la paraffine bio à base de cire d'abeille qui est très utilisé pour soulager les brûlures. Plusieurs civilisations anciennes telles que les aztèques, les chinoises l'ont incorporé dans leur préparation destinée à fermer rapidement les plaies afin de stopper le saignement pour éviter de contracter des infections liées à l'entrée des germes via ces plaies (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Cependant, le groupe qui a été traité avec la pommade Bétadine n'a pas montré de bons résultats durant les premiers jours de traitement, mais à partir du 10^{ème} jour, la réduction de la superficie des plaies de ce groupe a nettement diminué ($64.23 \pm 1.27 \text{ mm}^2$). Cette diminution a été considérée comme très hautement significative par rapport au groupe témoin non sain. Le groupe traité par la bétadine a donné un pourcentage maximal de réduction de la surface de la plaie de (95.43%).

Tableau 29. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur l'évolution de la superficie des plaies durant 18 jours

Echantillons	Superficie des plaies (mm ²)					
	Jour 0	Jour 3	Jour 6	Jour 10	Jour 14	Jour 18
Témoin non sain	268.39 ± 2.11	254.97 ± 1.68	229.10 ± 2.80	148.93 ± 1.42	78.52 ± 0.82	50.77 ± 1.36
Véhicule	275.65 ± 1.27 ^{ns}	197.22 ± 1.49 ^b (28.45%)	105.34 ± 1.86 ^c (61.78%)	88.59 ± 1.74 ^c (67.86%)	61.74 ± 2.42 ^a (77.60%)	17.71 ± 1.64 ^c (93.57%)
Bétadine	264.58 ± 1.73 ^{ns}	251.28 ± 0.89 ^{ns} (5.02%)	159.43 ± 1.05 ^c (39.74%)	64.23 ± 1.27 ^c (75.72%)	48.90 ± 0.81 ^b (81.56%)	12.08 ± 1.24 ^c (95.43%)
Extrait n-BuOH (200 mg/kg)	273.07 ± 1.77 ^{ns}	183.61 ± 1.95 ^c (32.76%)	160.56 ± 1.68 ^c (41.20%)	99.12 ± 1.23 ^b (63.70%)	79.47 ± 1.08 ^{ns} (70.89%)	22.31 ± 1.62 ^b (91.82%)
Extrait n-BuOH (400 mg/kg)	273.29 ± 1.48 ^{ns}	190.95 ± 2.16 ^c (30.12%)	159.73 ± 1.18 ^c (41.55%)	91.48 ± 0.95 ^c (66.52%)	34.83 ± 1.54 ^c (87.25%)	0.54 ± 0.04 ^c (99.80%)

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n=6. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 par rapport au groupe témoin non sain. ^{ns} non significatif. Les valeurs données entre parenthèses indiquent le pourcentage de réduction de la zone de la plaie.

L'examen macroscopique a révélé un rythme de cicatrisation très rapide pour les groupes de souris ayant reçu les deux doses d'extrait n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* (figures 40 et 42) et aucun signe d'inflammation n'a été détecté dans ces deux groupes (figures 42D et 42E). Cependant, une discrète infiltration neutrophilique a été notée suggérant le début du processus de cicatrisation. Il est également important de souligner que seul le groupe qui a été traité par la plus forte dose de *C. tougourensis* a cicatrisé complètement au bout de 18 jours.

Un processus inflammatoire significatif a été observé à la fois dans les groupes véhicule et groupe témoin non sain (**figures 42A et 42B**). Ceci a été confirmé par l'observation de plusieurs congestions vasculaires marquées par les cercles rouges ainsi qu'une infiltration importante de granulocytes dans les sites de lésions. Il a également été noté que le groupe de souris qui a reçu de la bétadine n'a pas cicatrisé complètement. Sur le plan microscopique, il n'y avait pas d'effet anti-inflammatoire en raison de la présence de plusieurs congestions vasculaires mais aussi d'une propagation importante de neutrophiles (**figure 42C**).

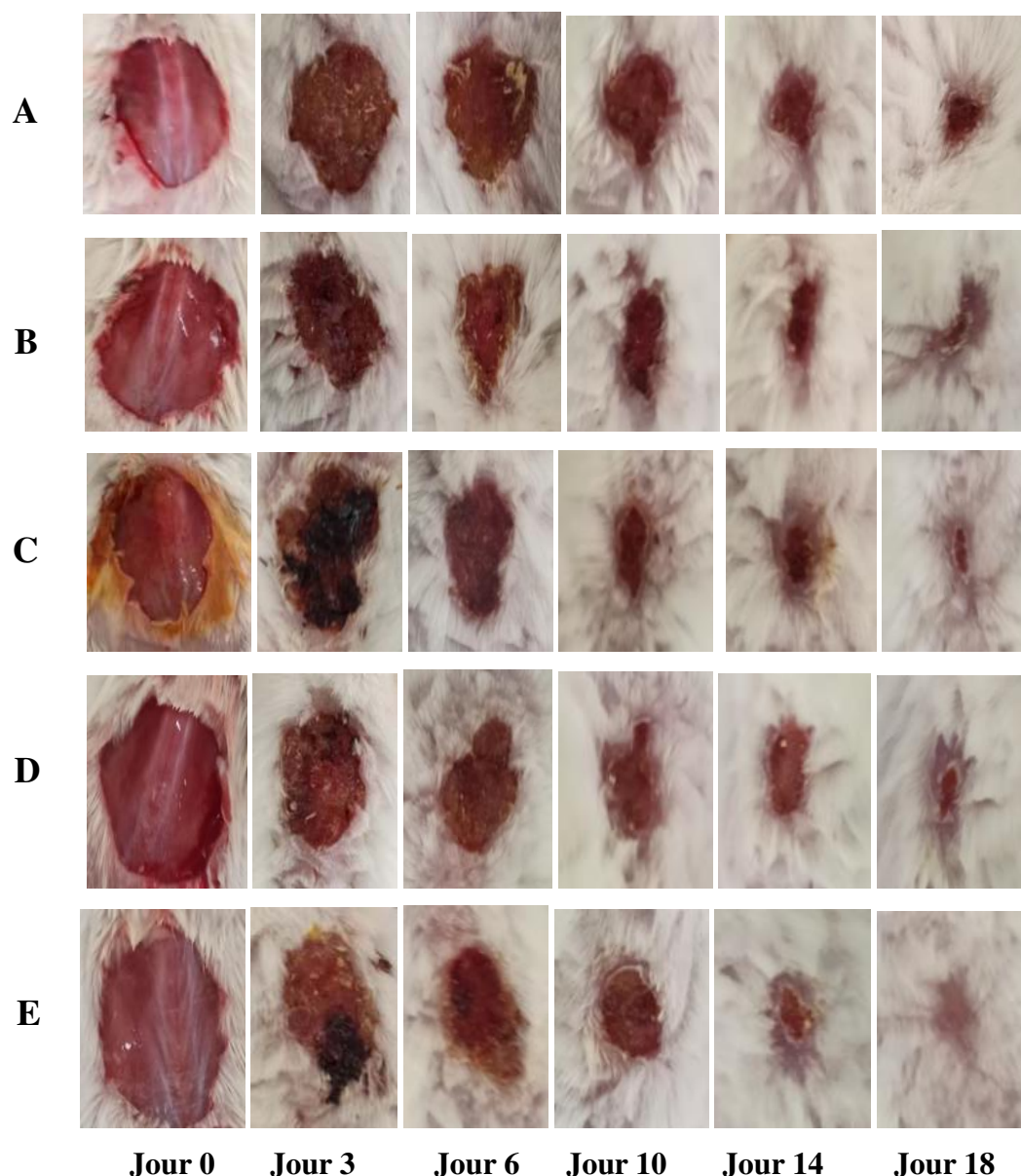


Figure 40. Examen macroscopique de l'évolution de la surface des plaies des souris durant une période de 18 jours.

Zone de contraction de la plaie à différents jours après l'excision de ; (A) Témoin non sain, (B) Véhicule, (C) Bétadine, (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n- BuOH (400 mg/ kg).

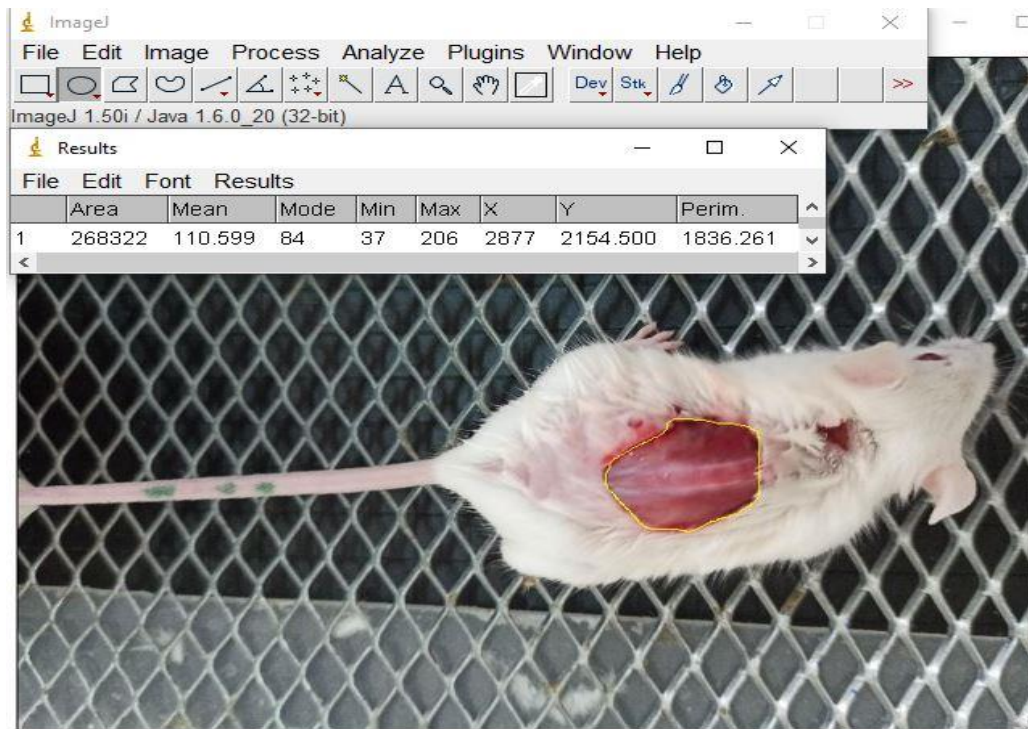


Figure 41. Exemple d'un traitement de la superficie d'une plaie par le logiciel Image J.

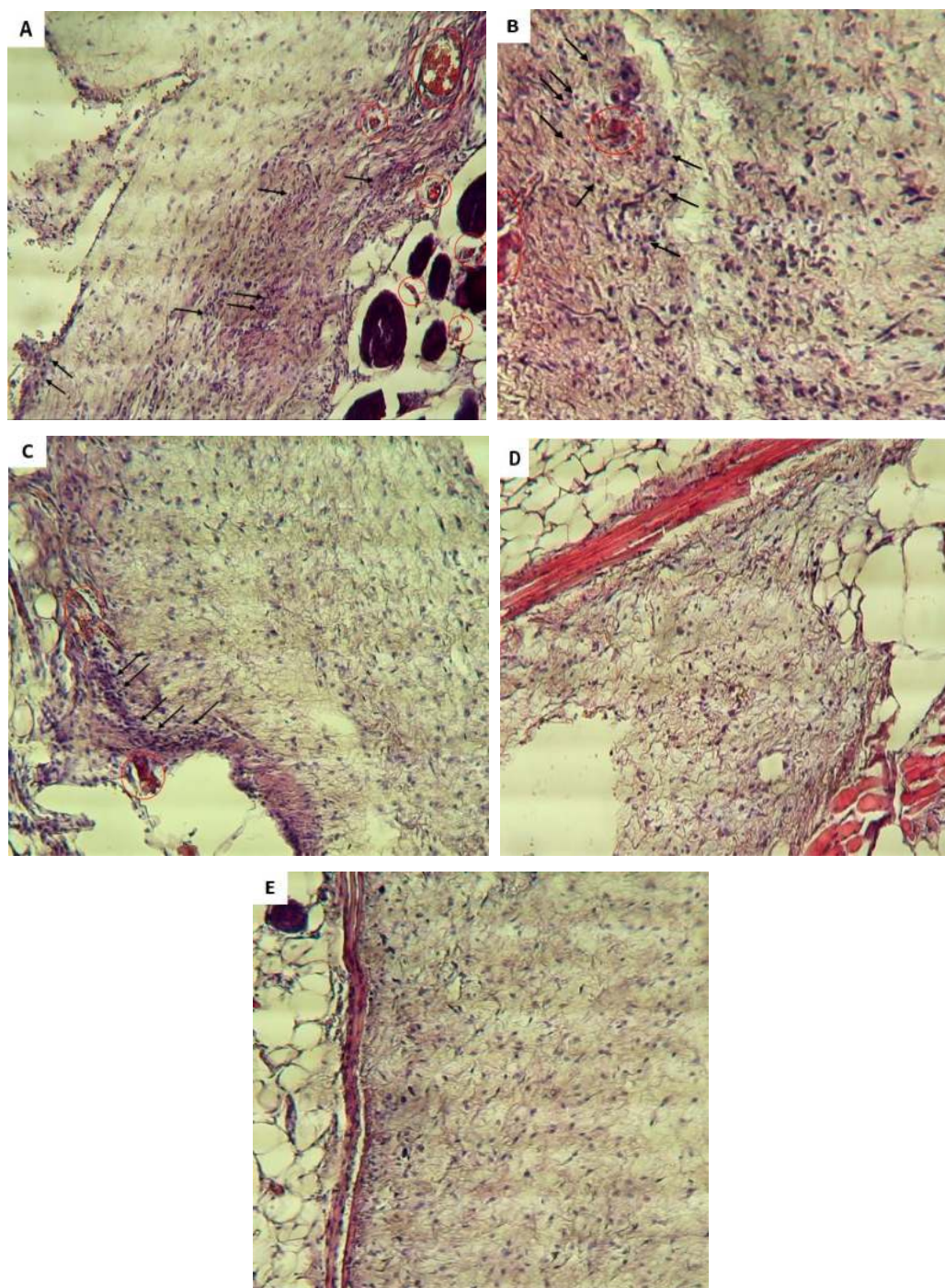


Figure 42. Coupes histologiques des tissus de la peau des souris.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Groupe témoin non sein, (B) Véhicule, (C) Bétadine, (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). Cercle rouge (congestion vasculaire). Flèche noire (infiltration de neutrophile).

Les saponines exercent des effets anti-inflammatoires remarquables en bloquant directement l'inflammation (**Kim et al., 1998**). Elles diminuent l'infiltration des neutrophiles en diminuant ainsi la réponse inflammatoire basée sur l'immunité. Des recherches récentes impliquant des triterpènes ont suggéré que ces composés ont des propriétés anti-inflammatoires importantes, par exemple, la cicatrisation rapide des plaies en accélérant

l'implication de plusieurs médiateurs appelés « cascade de cicatrisation » aux niveaux cellulaire et moléculaire (**Agra et al., 2015**). Les événements résultant, réduisent considérablement le temps de fermeture de la plaie.

Plusieurs enzymes et protéines telles que la métalloprotéinase matricielle de type 9 (MMP-9), intégrine et progranuline sont synthétisées au tout début de la réaction inflammatoire afin de permettre l'installation des premières réponses cellulaires à la cicatrisation des plaies (**Cole et al., 2001**). Ainsi, la réponse aux lésions tissulaires implique de multiples événements cellulaires et extracellulaires, respectivement, la coagulation, l'inflammation, la ré-épithélialisation et l'angiogenèse. Celles-ci sont suivies d'une fibroplasie avec synthèse de collagène, contraction et enfin fermeture de la plaie (**Palmieri et al., 2017**).

Les flavonoïdes peuvent prévenir les lésions microvasculaires liées à l'infarctus du myocarde et aux troubles du myocarde (**Fauci, 2018**) en améliorant le processus d'hématopoïèse via une élévation des niveaux de Ca^{2+} cytosolique (**Borst et al., 2014**). Elle résulte d'une cascade moléculaire : la protéine G active la phospholipase C (PLC) qui à son tour conduit à la synthèse d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DG) (**Williamson et al., 1985**). Ce phénomène augmente considérablement l'agrégation plaquettaire et d'autres éléments sanguins afin d'accélérer le processus de cicatrisation dans la zone de la lésion (**Brass et Joseph, 1985**).

Une autre étude a montré qu'il ya un lien très important entre les composés bioactifs des plantes et les espèces réactives de l'oxygène produites par les mitochondries (mtROS) (**Xu et Chisholm, 2014**). Un autre mécanisme clé régulant la cicatrisation des plaies est le stress oxydatif, les mtROS favorisent la cicatrisation des plaies épithéliales en favorisant le recrutement des fibroblastes riches en filaments d'actine (**Doillon et al., 1987 ; Kopecki et Cowin, 2016**) et ceci a été prouvé avec différents modèles animaux, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*.

Une étude (**Kapoor et al., 2004**) a montré que la catéchine est capable d'induire une accélération et amélioration significative du processus de cicatrisation dans le modèle de plaie induit par incision chez le rat. Cet effet de la catéchine se traduit par stimulation de la maturation et orientation des fibres de collagène afin de renforcer la cicatrisation au niveau du site lésé. De plus, une augmentation du nombre de nouveaux vaisseaux sanguins a été observée ainsi qu'une nette augmentation de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), ce qui en accord avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis* puisque la catéchine a été identifiée dans l'extrait n-BuOH.

Une autre étude menée sur les souris a montré que les dérivés de la catéchine tels que 4'-O-méthylépicatechine-3-O-gallate, 4'-O-méthylépigallocatechine-3-O-gallate, l'épigallocatechine-3-O-férulate et le 4'-O-méthylépigallocatechine-3-O-férulate peuvent significativement renforcés le processus de cicatrisation en augmentant la migration et la prolifération des fibroblastes au niveau du site lésé (**Schmidt *et al.*, 2010**) et ceci serait du en partie à l'inhibition exercée par ces composés sur la voie de signalisation p38 α MAPK. Il a été prouvé que l'inhibition de cette voie réduirait considérablement la production de cytokines pro-inflammatoires et cette information est très importante puisque la cicatrisation des plaies est altérée par la présence d'une inflammation chronique non résolutive (**Medicherla *et al.*, 2009**). Cette même étude a montré que l'inhibition de cette voie augmenterait significativement le processus de réépithélialisation chez les souris diabétiques. Ces dérivés participeraient même à la régulation de la voie NF- κ B, cette dernière est très importante puisqu'elle permet de réguler la cicatrisation des plaies induite par la fibroïne en modulant les protéines cibles telles que le collagène (**Pollini et Paladini, 2020 ; Park *et al.*, 2018**).

3.7. Activité hépatoprotectrice

Les résultats biochimiques issus de l'étude de l'activité hépatoprotectrice indiquent clairement que *C. tougourensis* a un bon effet hépatoprotecteur et ceci avec les deux concentrations testées (200 et 400 mg/kg), mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec la concentration la plus élevée, qui était plus efficace pour tous les paramètres testés. La différence a été est hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au groupe témoin non sain dit témoin-paracétamol (**Tableau 30**), et ceci pour la plupart des paramètres testés.

Dans cette étude, une silymarine naturelle a également été testée, isolée et purifiée à partir d'une espèce de plante appelé *Silybum marianum*. Ce composé a donné des résultats presque similaires par rapport à la silymarine industrielle, notamment pour les paramètres dosés suivants: urée, créatinine et ALAT. Notant que l'influence de la silymarine naturelle sur les quatre paramètres testés liés au métabolisme des lipides était également comparable à celle de la silymarine industrielle.

Tableau 30. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* et de deux types de silymarine sur divers paramètres biochimiques chez les souris après induction d'hépatotoxicité.

Paramètres biochimiques	Témoïn sain	Groupes traités par le paracétamol				
		Témoïn-Paracétamol	Silymarine industrielle (100 mg/kg)	Silymarine naturelle (100 mg/kg)	n-BuOH (200 mg/kg)	n-BuOH (400 mg/kg)
Urée (mmol/L)	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.03 ^{ns}	0.15 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.01 ^{ns}	0.15 ± 0.01 ^a
Créatinine (mmol/L)	0.18 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.1 ^{ns}	0.23 ± 0.04 ^{ns}	0.2 ± 0.1 ^{ns}	0.21 ± 0.02 ^{ns}
ASAT (U/L)	69.08 ± 1.57	94.96 ± 1.6	64 ± 2.37 ^b	84.07 ± 1.82 ^{ns}	69.42 ± 0.25 ^b	67.19 ± 1 ^b
ALAT (U/L)	19.98 ± 1.11	30.4 ± 0.25	19.75 ± 0.35 ^a	22.2 ± 0.28 ^{ns}	19.43 ± 2.45 ^a	10.29 ± 1.35 ^c
Phosphatase alcaline (U/L)	35.65 ± 2.75	53.84 ± 1.4	48.05 ± 1.64 ^{ns}	59.27 ± 0.81 ^{ns}	43.96 ± 0.88 ^a	36.65 ± 1.15 ^b
Triglycérides (mmol/L)	0.20 ± 0.00	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.08 ^{ns}	0.23 ± 0.06 ^{ns}	0.3 ± 0.03 ^{ns}	0.2 ± 0.01 ^{ns}
Cholestérol total (mmol/L)	0.3 ± 0.04	0.5 ± 0.01	0.39 ± 0.07 ^{ns}	0.39 ± 0.05 ^{ns}	0.33 ± 0.02 ^{ns}	0.34 ± 0.09 ^{ns}
HDL-C (mmol/L)	0.25 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.26 ± 0.03 ^{ns}	0.28 ± 0.06 ^{ns}	0.27 ± 0.06 ^{ns}	0.21 ± 0.05 ^a
LDL-C (mmol/L)	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00 ^{ns}	0.04 ± 0.01 ^{ns}	0.03 ± 0.00 ^{ns}	0.04 ± 0.00 ^{ns}	0.03 ± 0.00 ^{ns}

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n=6. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnett. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 par rapport au groupe témoin paracétamol, ^{ns} non significatif. ALAT: Alanine aminotransférase. ASAT: Aspartate-aminotransférase. HDL-C : cholestérol à lipoprotéines de haute densité. LDL-C: cholestérol à lipoprotéines de basse densité.

La catéchine semble exercer des effets hépatoprotecteurs non négligeables. Une étude menée par **Venkatakrishnan *et al.* (2018)** a montré que ce flavonoïde pouvait diminuer le stress oxydatif exercé sur les hépatocytes en augmentant de façon significative l'activité antioxydante de plusieurs enzymes clés telles que la glutathion réductase (GR), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD); ce qui a également pour effet d'empêcher l'apparition de stéatose hépatique ainsi que le maintien de niveau physiologique de LDL, HDL et de triglycérides via la propriété hypolipidémique de ce composé (**Kah *et al.*, 2020**).

Chez le modèle murin, plusieurs études (**Domitrović *et al.*, 2012** ; **Liu *et al.*, 2017**) ont montré que la rutine pouvait atténuer l'hépatotoxicité exercée par le tétrachlorure de carbone (CCL₄.) Ainsi, des niveaux très faibles d'ALAT et d'ASAT sanguins ont été rapportés. Ces études ont également montré que la rutine pouvait partiellement freiner la production des radicaux libres surtout les espèces réactives d'oxygène (ROS), réguler l'expression des gènes lipogéniques et réguler également l'expression du gène du récepteur alpha qui est physiologiquement activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- α). De plus les

examens histologiques du foie réalisés par ces chercheurs ont révélé des tissus avec des signes d'inflammation légère.

L'activité hépatoprotective de certains acides phénoliques tels que l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide caféique ainsi que celle de divers dérivés de l'acide cinamique a également été rapportée, ces deux composés peuvent inhiber de manière dose-dépendante l'activité de la 5-lipoxygénase puisque l'activité de cette enzyme est associée à plusieurs troubles de la fonction hépatique (**Sal'nikova et al., 1989 ; Shah et Verma, 2012**). Ces deux composés pourraient également augmenter l'activité de plusieurs enzymes anti-oxydantes telles que la glutathion réductase et la glutathion transférase (**Pérez-Alvarez et al., 2001**) mais aussi inhiber la peroxydation lipidique (**Hohmann et al., 2013**) et ainsi diminuer le stress oxydatif exercé sur les hépatocytes.

L'investigation histopathologique a révélé que les groupes de souris qui ont été traités avec les deux extraits n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* ne présentaient aucun signe d'inflammation (**Figure 43E et 43F**). Cependant, une congestion vasculaire (cercle rouge) a été observée dans le groupe traité par la silymarine naturelle (100 mg/kg) mais l'aspect général des hépatocytes était normal et quelques nécroses (flèche bleue) ont été observées dans le groupe traité par la silymarine industrielle (100 mg/kg) (**figures 43C et 43D**) respectivement.

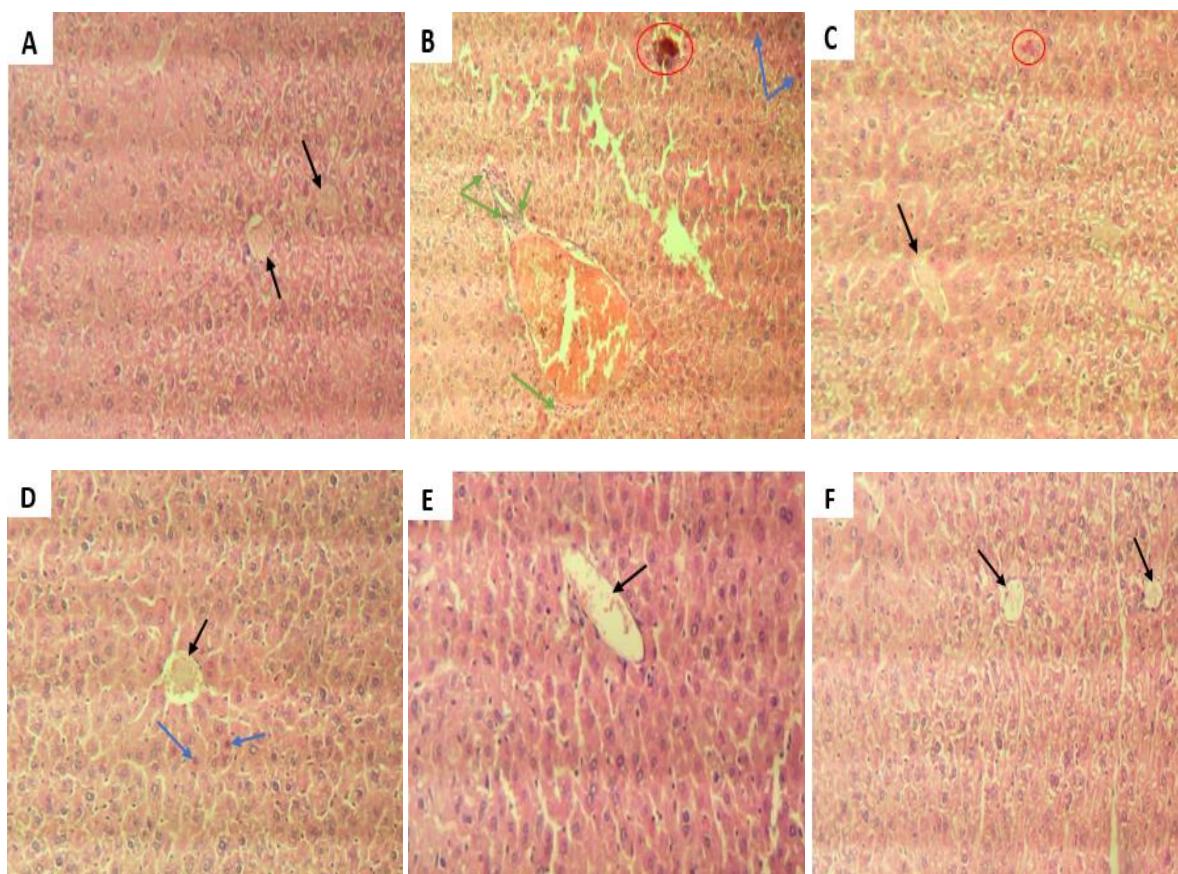


Figure 43. Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris après induction d'hépatotoxicité.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Contrôle normal, (B) Contrôle paracétamol, (C) Silymarine naturelle (100 mg/kg), (D) Silymarine industrielle (100 mg/kg) (E) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (F) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). Flèche noire (veine centrale). Flèche verte (infiltration de neutrophiles). Cercle rouge (congestion vasculaire).

Un autre composé identifié dans cette étude nommé 2H-Furo [2,3-b] indole, 3,3a,8,8a-tétrahydro-2,3-diméthyl- possède un puissant effet hépatoprotecteur, qui pourrait s'expliquer par sa capacité à prévenir la fibrose hépatique, conséquence d'un processus inflammatoire chronique (**Suleria et Goyal, 2021**). Les chercheurs stipulent que cet effet protecteur est généré par une forte inhibition exercée par ce phytoconstituant sur un complexe protéique appelé Ga-Interacting Vesicle Associated protein (GIV) pour empêcher son interaction avec les sous-unités de la protéine G alpha (**Lopez-Sanchez et al., 2014**), ce qui limite considérablement les voies de signalisation pro-fibrogéniques, en particulier la voie RTK(active)-pTyrGIV-PI3K (**Lin et al., 2011**) ; et ce composé identifié dans l'extrait n-BuOH serait à l'origine des résultats obtenus, en jouant le rôle expliqué par ces auteurs.

L'effet hépatoprotecteur de la silymarine industrielle est bien connu par la communauté scientifique. Plusieurs recherches ont déjà rapporté l'effet anti-inflammatoire de la silymarine

sur les cellules hépatiques animales et humaines mais aussi pour préserver les fonctions hépatiques et l'intégrité histologique du foie (**Trappoliere et al., 2009 ; Freitag et al., 2015**).

Le potentiel hépatoprotecteur des polyphénols est bien connu en particulier celui des flavonoïdes et des terpènes et les chercheurs l'ont expliqué par le fait que ces biocomposés peuvent ralentir et même empêcher le processus de nécrose des cellules hépatiques (**Roy et al., 2006**), et cela a été démontré dans plusieurs études en utilisant le paracétamol ou bien le (CCl₄) comme agents hépatotoxiques (**Rezende et al., 2014 ; Zhang et al., 2020**).

Il existe une relation importante entre les processus antioxydant et hépatoprotecteur puisque le foie est le principal centre de détoxification. En situation de stress oxydatif, les polyphénols sont capables d'activer une voie importante appelée voie de signalisation Nrf-2 qui en retour augmente considérablement l'expression d'enzymes clés à savoir ; l'hème oxygénase-1 (HO-1) et la phosphoramidite adénine dinucléotide quinone oxydoréductase-1 (NQO-1) pour réduire considérablement les dommages causés par le stress oxydatif dans les tissus hépatiques en améliorant le processus d'élimination des radicaux libres (**Hseu et al., 2012**). Une autre étude a suggéré que les phytoconstitués pourraient réguler le processus d'échange par canaux membranaires, en particulier ceux des hépatocytes, ce qui contribue à un échange optimal de fluides à travers la membrane (**Schulze et al., 2019**).

Une autre étude a montré que la quercétine pouvait aider à détruire la lignée cellulaire de cancer du foie humain de type Hep-G2 en renforçant l'effet cytotoxique d'autres composés exercé sur cette lignée tumorale. Ce composé réduit également le stress oxydatif que subissent les hépatocytes par des agents pro-oxydants tels que le H₂O₂ et réduirait aussi considérablement le niveau plasmatique d'ASAT et d'ALAT et ceci a été démontré chez le modèle d'hépatotoxicité induite chez le rat par le paracétamol (**Tzankova et al., 2017**), ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec *C. tougourensis*. Ce flavonoïde serait même capable d'inhiber l'activité des virus responsables de l'hépatite A et de l'hépatite B (**Miltonprabu et al., 2017**), notant que le mécanisme exact n'a pas encore été élucidé.

Une étude menée par **Bioud et al. (2017)** sur des souris de sexe male a montré que *Centaurea choulettiana* a la capacité de réguler plusieurs paramètres hématologiques et biochimiques et surtout de potentialiser l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la GSH (63.29%), la glutathion peroxydase (66.38%), la catalase (67.61%) et la superoxyde dismutase (68.16%). Néanmoins, ces chercheurs ont également rapporté des niveaux bas de MDA dans le sang pour les lots qui ont été traités avec cette espèce. Ainsi, un pourcentage d'inhibition maximal de ce marqueur a été rapporté (54.90%) pour la dose de 150 µg/ml de l'extrait n-BuOH de cette plante, également une diminution d'un autre marqueur du

stress oxydatif appelé myéloperoxydase (MPO) avec un pourcentage de (52.21%) et les résultats histopathologiques du foie et des reins ont révélé des tissus sains pour les lots qui ont été traités par cette plante.

3.8. Activité antihyperglycémiant

3.8.1. Test de tolérance au glucose (OGTT)

Dans cette étude, l'activité hypoglycémiant de *C. tougourensis* a été évaluée sur la base du test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT), en raison de sa fiabilité et de son importance pour diagnostiquer le pré-diabète et le diabète (Kim *et al.*, 2016). D'autre part ce test visait la mise en évidence de l'impact de la plante sur la sensibilité à l'insuline et son taux de libération (Mari *et al.*, 2001). Comme indiqué dans la **figure 44**, l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* (400 mg/kg) a diminué significativement ($P < 0.01$) la glycémie 30 min après l'induction du diabète (1.63 ± 0.34 g/l) avec un pourcentage anti-hyperglycémique de (35.57%) tandis que le groupe de référence traité par la glibenclamide (10 mg/kg, ip) avait seulement un taux de (21.34%) au même moment. C'est intéressant de voir que pendant la première heure du traitement; l'effet anti-hyperglycémiant de *C. tougourensis* est resté supérieur à celui du groupe glibenclamide. Néanmoins, pendant les 90-120 min après le traitement, l'effet antidiabétique du glibenclamide est devenu plus significatif ($P < 0.05$) que le groupe de souris traité par *C. tougourensis*, par rapport au groupe témoin mais l'écart de différence entre leurs activités a été réduit à la fin de l'expérience.

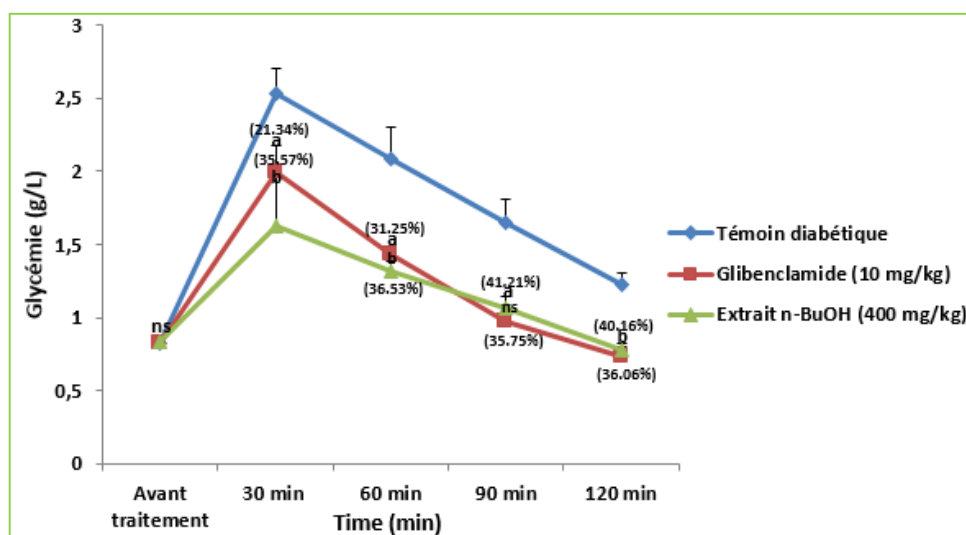


Figure 44. Effet anti-hyperglycémiant de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* (test OGTT).

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=6. ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport au groupe témoin diabétique.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2020; près de 442 millions de personnes dans le monde souffraient du diabète, en particulier dans les pays du tiers monde où

les revenus sont faibles. Il est également rapporté que le diabète est la septième cause de décès chez les adultes (**Khan et al., 2020**). Les plantes sont considérées comme de nouvelles ressources alternatives pour traiter diverses pathologie dont le diabète de type 2 (**Levy, 2019**). Cette diminution importante du niveau glycémique dans le groupe traité par *C. tougourensis* suggère que la plante pourrait fortement stimuler les cellules β pancréatiques pour produire et libérer de l'insuline dans la circulation sanguine afin de réduire l'excès du glucose sanguin (**Röder et al., 2016**) en augmentant sa consommation (**Kooti et al., 2016**) ou en le stockant sous forme de molécule de réserve appelée glycogène (**Wang et al., 2016**).

Les composés bioactifs de l'extrait n-buOH de *C. tougourensis*, en particulier les classes de flavonoïdes, triterpènes, mucilages, alcaloïdes et saponines identifiés par criblage phytochimique, peuvent expliquer son effet anti-hyperglycémiant significatif. Plusieurs travaux de recherche (**Coskun et al., 2005; Kang et al., 2018; Ghorbani et al., 2019**) ont démontré que certaines plantes peuvent traiter efficacement l'hyperglycémie postprandiale grâce à leur richesse en flavonoïdes, iridoïdes et alcaloïdes.

Une autre étude réalisée sur des rats diabétiques a montré que les métabolites secondaires notamment les flavonoïdes peuvent cicatriser et régénérer les cellules bêta endommagées en stoppant le stress oxydatif exercé sur elles par un radical libre appelé peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui conduit à une récupération optimale et physiologique de la sécrétion d'insuline (**Lapidot et al., 2002**).

Une étude réalisée sur *Centaurea bruguierana* a révélé la remarquable activité antidiabétique de cette espèce, en utilisant le rat comme modèle expérimental. Les chercheurs de cette étude ont suspecté une forte inhibition du processus de glycogénolyse hépatique (**Khanavi et al., 2012**). Une autre espèce de *Centaurea*, nommée *Centaurea horrida*, a montré des résultats comparables chez la souris et ceci pour toutes les doses testées (**Raafat et al., 2013**). Ces résultats pourraient être dus aux teneurs élevées en anthocyanes, acides phénoliques, alcaloïdes et tanins identifiés dans les espèces *Centaurea*, ce qui a été démontré par (**Al-Easa et Rizk, 1992**) sur 132 espèces *Centaurea*.

La richesse de *Centaurea alexanderina* en flavonoïdes et en sesquiterpéniques lactones pourrait expliquer la forte activité antidabétique enregistrée chez cette espèce (**Ahmed et al., 1970 ; Ismail et al., 1986 ; Kubacey et al. 2012**), ce qui est en accord avec les résultats de notre étude. Une recherche récente menée par **Wang et al. (2019)** utilisant des souris a prouvé que les saponines peuvent améliorer la résistance à l'insuline via l'activation de la voie de signal AMPK/NF- κ B qui conduit à la régulation du métabolisme énergétique. Ces données pourraient conduire à l'avenir à comprendre mais surtout à mieux prévenir l'apparition et

l'évolution des complications macro- et microvasculaires liées au diabète de type 2 non diagnostiqué (**Hemningsen et al., 2015**), mais des recherches supplémentaires doivent être menées pour mieux comprendre ce processus.

Dans notre étude, un autre composé a également été identifié mais en faible proportion (0.12 %), nommé 2-Déoxy-D-galactose. Ce composé favorise l'absorption du galactose par *Escherichia coli*, mais il est également considéré comme un meilleur substrat pour le système de transport du galactose, en particulier le système de transport du méthyl galactoside (Mgl) (**Henderson et al., 1977**), ce qui permettra à l'avenir de lutter plus efficacement contre *Escherichia coli*, puisque l'excès de cette flore bactérienne dans le corps humain est la cause d'infections urinaires emphysémateuse chez plus de 70% des cas de patients diabétiques et dans 40% d'une cholécystite emphysémateuse (**Suri et al., 2009**). Une étude menée par **Hollman et al. (1999)** a montré que que la quercétine favorise considérablement l'aborption intestinale du glucoce via un mécanisme impliquant un co-transporteur intestinal Na⁺ dépendant appelé (SGLT1). Ce qui a pour effet de diminuer considérablement la glycémie.

3.8.2. Diabète induit par la streptozotocine

Les résultats de l'activité antidiabétique donnés par ce test sont présentés au niveau de la **figure 45**, l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* a significativement réduit l'hyperglycémie exercée par la streptozotocine, surtout avec la concentration testée de 400 mg/kg. La glycémie a été réduite progressivement dès le 1^{er} jour de traitement pour atteindre la valeur de (93.2 ± 3.61 mg/dL) à la fin de la 3^{ème} semaine, ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de l'hyperglycémie de (68.29%). Il est également intéressant de constater que ces valeurs sont proches de celles exprimées par le glibenclamide (5 mg/kg) utilisé comme standard dans cette étude et qui a montré une glycémie moyenne de (82.8 ± 2.31 mg/dL), correspondant à un pourcentage d'inhibition de (71.83 %). Notant que ces données ont été considérées comme hautement significatives (p<0.001) par rapport au groupe témoin diabétique.

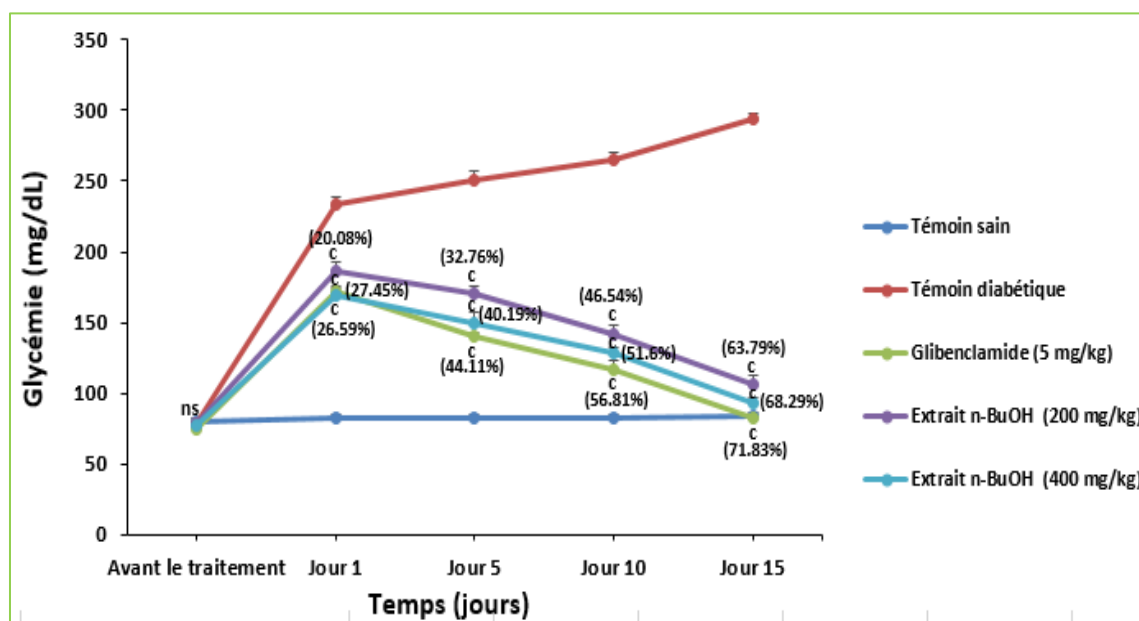


Figure 45. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* sur la glycémie des souris.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=6. ANOVA suivie du test multiple de Dunnet. Seuil de signification ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 est statistiquement significatif par rapport au groupe témoin diabétique.

Les plantes sont connues pour leurs effets antidiabétiques, en particulier les espèces du genre *Centaurea* telles que *C. alexanderina* qui a montré une capacité remarquable à réguler la glycémie dans différentes pathologies du diabète notamment le diabète de type 2 qui est marqué par une élévation anormale du taux de glycémie (Kubacey *et al.*, 2012). Plusieurs études (Ota et Ulrich, 2017 ; Rocha *et al.*, 2020) ont rapporté que pendant le diabète, des composés tels que les tanins, les saponines et les alcaloïdes peuvent augmenter la sensibilité et la sécrétion d'insuline pour réduire la glycémie à un état physiologique, ce qui peut expliquer l'effet anti-hyperglycémiant de *C. tougourensis*.

Parmi ces composés, le 3-O-Méthyl-D-glucose a démontré dans des travaux antérieurs une forte activité antidiabétique. Ainsi une étude réalisée par Shamni *et al.* (2017) a montré que ce composé peut augmenter de manière significative l'activité intrinsèque du transporteur de glucose de type 4 (GLUT-4) qui favorise l'absorption du glucose musculaire en particulier par les muscles squelettiques pendant l'exercice (Richter *et al.*, 2013), mais aussi dans les tissus adipeux (Flores-Opazo *et al.*, 2018), en conduisant à une importante réduction de l'hyperglycémie. Ce composé avait éventuellement procédé de la sorte pour donner les résultats de cette étude.

Le 3-O-méthyl-D-glucose est également impliqué au cours de la première phase de développement embryonnaire appelée myogénèse et peut augmenter les activités de transport de GLUT-4 et d'hexoses dans les myotubes, indépendamment des voies de signalisation Akt/PKB ou AMPK (Shamni *et al.*, 2017).

Les groupes de souris traités par *C. tougourensis* à la concentration de 400 mg/kg ont également montré une diminution significative ($p < 0.01$) des divers paramètres biochimiques testés dans cette étude, notamment l'urée (0.26 ± 0.02 g/L), l'ASAT (270 ± 1.3 U/L) et l'ALAT (40.5 ± 2 U/L), par rapport au groupe témoin diabétique.

Ces valeurs ont été meilleures que celles enregistrées par le glibenclamide. Cependant, les résultats des triglycérides, du cholestérol total, du HDL-C et du LDL-C étaient élevés dans presque tous les groupes traités (**Tableau 31**).

Tableau 31. Effet de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* et du glibenclamide sur les divers paramètres biochimiques chez les souris après induction du diabète

Paramètres biochimiques	Témoin sain	Groupes traités par la streptozotocine			
		Témoin diabétique	Glibenclamide (5mg/kg)	n-BuOH (200 mg/kg)	n-BuOH (400 mg/kg)
Urée (g/L)	0.235 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.28 ± 0.04^{ns}	0.31 ± 0.04^{ns}	0.26 ± 0.02^a
Créatinine (mg/L)	4 ± 0.00	4 ± 0.00	4 ± 0.00^{ns}	4 ± 0.00^{ns}	4 ± 0.00^{ns}
ASAT (U/L)	238 ± 3.5	414 ± 2.81	325 ± 2.26^a	335 ± 1.65^{ns}	270 ± 1.3^b
ALAT (U/L)	30.5 ± 1.75	64 ± 2.48	48.5 ± 2.75^b	51 ± 2.96^a	40.5 ± 2^b
Triglycérides (g/L)	1.16 ± 0.04	1.73 ± 0.25	1.51 ± 0.46^{ns}	1.74 ± 0.25^{ns}	1.72 ± 0.28^{ns}
Total cholestérol (g/L)	0.85 ± 0.03	1.26 ± 0.03	0.94 ± 0.04^a	1.31 ± 0.13^{ns}	1.26 ± 0.17^{ns}
HDL-C (g/L)	0.52 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.51 ± 0.1^a	0.83 ± 0.11^{ns}	0.83 ± 0.09^{ns}
LDL-C (g/L)	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.12^{ns}	0.16 ± 0.02^{ns}	0.08 ± 0.02^b

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, $n=6$. ANOVA à sens unique suivie de plusieurs tests de Dunnett. Seuil de signification ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ par rapport au groupe témoin diabétique, ^{ns} non significatif. ALAT: Alanine aminotransférase. ASAT: Aspartate-aminotransférase. HDL-C: cholestérol à lipoprotéines de haute densité. LDL-C: cholestérol à lipoprotéines de basse densité.

Il est bien connu que le risque de développer un diabète de type 2 est fortement lié à une élévation anormale des concentrations sanguines de créatinine, d'urée, d'ALAT et d'ASAT (**Kanazawa et al., 2011 ; Xie et al., 2018**), considérées comme les principaux marqueurs de dysfonctionnement rénal et hépatique mais également responsables de la pancréatite aiguë, qui en conséquence augmente la résistance à l'insuline et supprime sa sécrétion, conduisant ainsi à une hyperglycémie anormale. Plusieurs études ont montré que les biocomposés présents dans les plantes peuvent réduire considérablement la synthèse d'urée et de créatinine en empêchant le métabolisme des protéines car les acides aminés comme la méthionine, l'arginine, la glycine, l'alanine, la citrulline et le glutamate sont les éléments de base de leur production (**da Silva et al., 2009 ; Cao et al., 2018**).

Il semble que les flavonoïdes possèdent également un effet diurétique remarquable, qui contribue de manière significative à l'élimination d'une quantité excessive d'urée et de créatinine de l'organisme (**Vargas et al., 2018**). Les flavonoïdes participent activement à la régulation de l'activité des enzymes hépatiques clés telles que la glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'ALAT et l'ASAT en régulant la voie de la néoglucogenèse hépatique (**Zareei et al., 2017**).

Une étude a montré que l'acide gallique a un potentiel antidiabétique non négligeable en favorisant le transport du glucose par le transporteur de type GLUT4 et sa consommation par les cellules musculaires afin de produire de l'énergie (**Variya et al., 2019**). Cet acide phénolique semble également agir sur le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ) (**Sawant et al., 2018**) aussi sur la voie de signalisation PI3K/AKT (**Huang et al., 2018**), ce qui a pour conséquence de stimuler la sécrétion de l'insuline mais surtout d'augmenter sa sensibilité afin de diminuer le niveau anormal de la glycémie.

La quercétine semble également jouer un rôle très important dans la régulation de la glycémie. Une étude menée sur des rats a montré que ce composé pouvait significativement réduire l'hyperglycémie provoquée par la streptozotocine en inhibant l'activité de la glucokinase hépatique (**Vessal et al., 2003**). Cette étude a aussi montré une réduction importante du taux de cholestérol et des triglycérides. Il est également très intéressant de souligner que ces effets ont été obtenus en très faible dose de quercétine.

Plusieurs études ont montré qu'il existe un lien très important entre les réponses antidiabétiques et anti-inflammatoires (**Wellen et al., 2005 ; Katsiki et al., 2020**), car l'effet antidiabétique des métabolites secondaires peut réduire considérablement le processus de saignement et les complications microvasculaires liées à l'inflammation chronique en diminuant de manière significative la libération locale de cytokines citées précédemment et même la sécrétion d'une protéine clé impliquée dans le processus inflammatoire appelée protéine C-réactive (CRP) (**Shi et al., 2011 ; Kothari et al., 2016**).

L'examen histopathologique des tissus hépatiques a révélé que les groupes de souris traitées avec du glibenclamide (5 mg/kg) ou bien avec de l'extrait n-BuOH de *C. tougourensis* à une concentration de 400 mg/kg ne présentaient aucun signe d'inflammation au niveau des sinusoides, mais des granulocytes (flèche jaune) ont été observés autour de la veine centrale, voire disséminée dans le parenchyme hépatique (**figure 46C**).

Un autre phénomène appelé vacuolisation a été observé au niveau du foie des groupes traités par l'extrait (400 mg/kg), qui peut être expliqué par l'installation d'une sclérose ou l'existence d'une stéatose (**Figure 46E**). Une infiltration importante de neutrophiles (flèche

jaune) a été observée dans le groupe contrôle-diabétique mais également une nécrose (flèche bleue) et une congestion vasculaire autour de la veine centrale (cercle rouge) dans ce groupe (**Figure 46B**).

Concernant le groupe de souris qui ont été traitées avec l'extrait n-BuOH à une concentration de 200 mg/kg, de petites lésions indiquent une discrète congestion, dont l'atténuation pourrait être le résultat de l'action de l'extrait de la plante. Cependant, des nécroses cellulaires ont été décelées, comme le montre les flèches bleues (**Figure 46D**). Cela pourrait être dû au processus de réponse inflammatoire, ce qui suggère le début de la réponse immunologique.

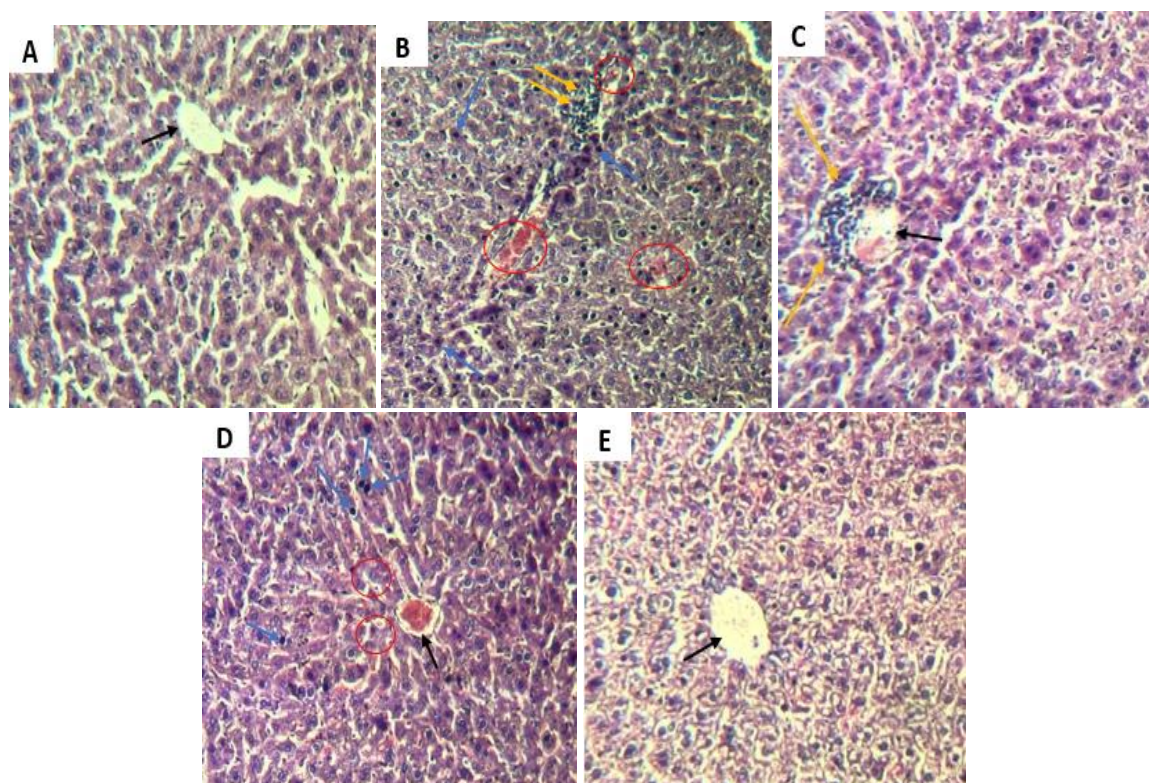


Figure 46. Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris après induction du diabète.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et d'éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Témoin sain, (B) Témoin diabétique, (C) Glibenclamide (5 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n-BuOH (400 mg/kg). Flèche noire (veine centrale). Flèche bleue (nécrose). Cercle rouge (congestion vasculaire). Flèche jaune (infiltration de neutrophiles).

Par ailleurs, l'étude histopathologique du pancréas a révélé que les groupes de souris qui ont été traitées avec les extraits n-BuOH (200 et 400 mg/kg) de *C. tougourensis* (**Figure 47D et 47E**) ou bien avec du glibenclamide (5 mg/kg) (**Figure 47C**) ont conservé l'intégrité des îlots de Langerhans (flèche verte) et n'ont présenté aucun signe d'inflammation. Cependant, plusieurs congestions vasculaires (cercle rouge) ont été observées dans le groupe témoin-diabétique (**Figure 47B**).

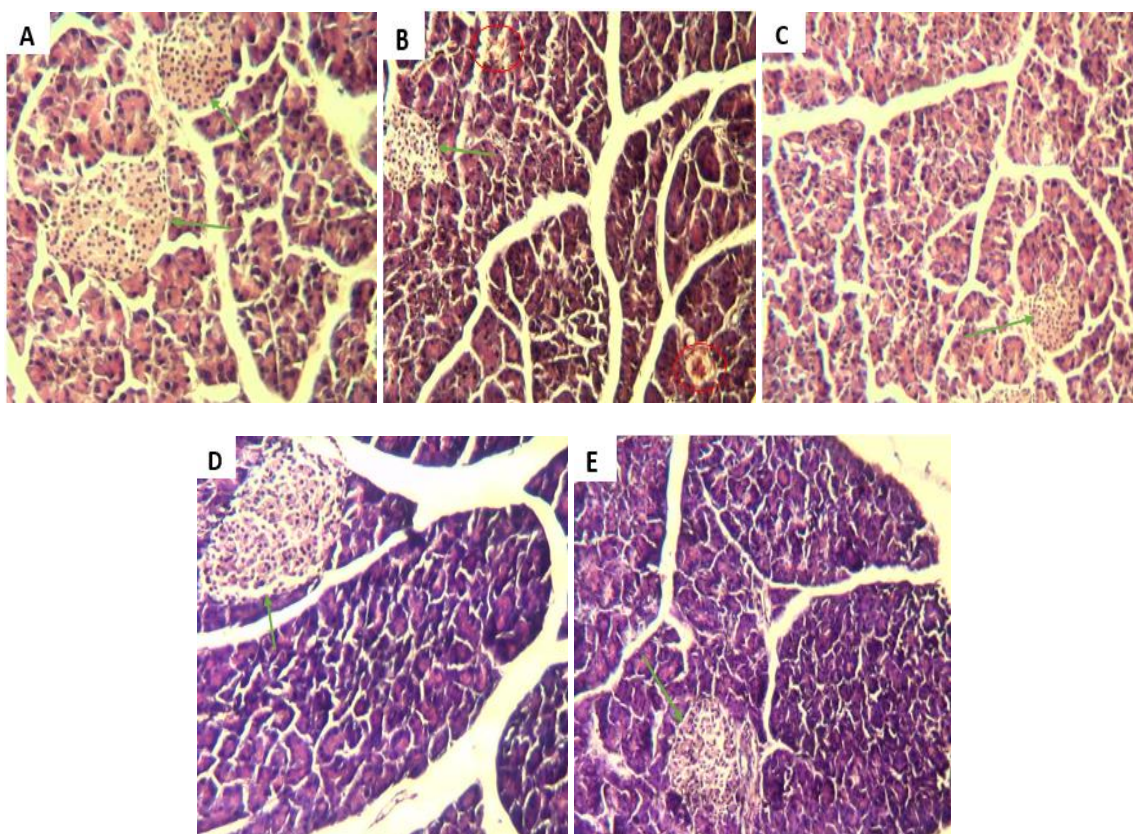


Figure 47. Coupes histologiques des tissus du pancréas des souris après induction du diabète.

Coloration effectuée à l'aide d'hématoxyline et d'éosine (H&E), grossissement $\times 100$; (A) Témoin sain, (B) Témoin diabétique, (C) Glibenclamide (5 mg/kg), (D) Extrait n-BuOH (200 mg/kg), (E) Extrait n- BuOH (400 mg/kg). Îlots de Langerhans (flèche verte). Cercle rouge (congestion vasculaire).

Une étude réalisée par **Zengin et al. (2018)** a montré que l'hespéridine, un flavonoïde isolé de *Centaurea saligna*, pourrait jouer un rôle important dans le traitement du diabète de type 2 en empêchant et/ou en réduisant l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (**Jugran et al., 2021**) observées au cours du diabète via l'activation de la voie de signalisation AMPK, qui en retour, réactive et améliore la fonction des cellules β pancréatiques conduisant ainsi à la régulation de la sécrétion d'insuline. Ce processus empêche également l'apoptose anormale de ces cellules β en inhibant directement l'activation de Cdk2 ainsi que du facteur pro-apoptotique Bax (**White et al., 2018**).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'industrie pharmaceutique fait face aujourd'hui à de nombreux challenges et l'apparition récente de la pandémie de la covid-19 a poussé la communauté scientifique à revoir son approche de la thérapie en se tournant vers des ressources plus naturelles, plus saines mais surtout plus respectueuses de l'écosystème, telles que les plantes qui représentent également une source pharmacologique inestimable. Ces progrès ont permis à beaucoup de médicaments de voir le jour et l'éradication de plusieurs épidémies. Les patients souffrant de maladies chroniques telles que le diabète, l'asthme, l'insuffisance rénale, ou bien les maladies cardiovasculaires ont pu ainsi retrouver une vie plus harmonieuse et plus équilibrée.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude indiquent que le criblage phytochimique qualitatif de l'extrait brut éthanolique de *C. tougourensis* a permis de déceler la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires, principalement les tanins, les flavonoïdes, les triterpènes, les alcaloïdes, les saponines et les mucilages qui étaient présents en grande quantité, tandis que les quinones et les anthocyanes étaient présents en quantité modérée. Cependant, les stéroïdes, les composés cyanogènes et les glycosides cardiotoniques étaient absents. Le criblage qualitatif de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH a également été effectué et a révélé de bons résultats.

L'analyse quantitative des extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis* a révélé des contenus en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins très importants pour les deux extraits avec une légère pré-dominance de l'extrait EA pour la teneur totale en polyphénols et tanins tandis que l'extrait n-BuOH a montré une meilleure teneur en flavonoïdes.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) a permis d'identifier 45 composés dans l'extrait de n-BuOH et 23 composés dans l'extrait EA de *C. tougourensis*, et certains des composés majoritaires présents dans cette plante ont déjà prouvé un bon potentiel pharmacologique, ce qui expliquerait en partie les bons résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus dans cette étude.

L'analyse par HPLC-DAD a révélé au niveau de ces deux extraits la présence de 13 composés qui étaient principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques, respectivement la catéchine, la quercétine, la rutine, la coumarine, la vanilline, l'acide trans-férulique, l'acide gallique, l'acide cinnamique, l'acide trans-cinnamique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide tannique, l'acide caféique, et l'acide chlorogénique. Ces composés sont très connus pour leurs propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antidiabétique.

L'approche *in vitro* a révélé de bons résultats pour les extraits n-BuOH et EA de *C. tougourensis*, qui ont évolué d'une manière doses-dépendante. Cependant, l'extrait n-BuOH a donné de meilleurs résultats. Dans cette partie, diverses techniques ont été utilisées ; la capacité antioxydante a été testée via les tests DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, GOR ainsi que le test de chélation des ions de fer avec la phénanthroline. L'activité neuroprotectrice a été évaluée et a montré la capacité des deux extraits à inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase et de la butyryl-cholinestérase.

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des deux extraits a révélé de bons résultats, que ce soit pour le test de stabilisation des membranes des globules rouges, ou bien celui de dénaturation de l'albumine bovine sérique (BSA) et celle de l'œuf de la poule.

Les deux extraits de *C. tougourensis* ont également montré une bonne activité inhibitrice de l'alpha amylase, ce qui suggère le potentiel antidiabétique de cette espèce.

L'activité photoprotectrice des deux extraits a été évaluée en calculant le facteur de protection solaire (SRF) et les divers résultats obtenus, en plus des directives de la Commission européenne, ont permis de dire que l'extrait n-BuOH a un SRF élevé tandis que le SRF de l'extrait EA est faible.

Concernant l'activité antimicrobienne, l'extrait n-BuOH a été actif sur une seule souche de bactérie qui était *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) tandis que l'extrait EA a été actif sur cette souche mais également sur une autre souche appelée *Escherichia coli* pathogène.

En raison des bons résultats *in vitro* obtenus avec l'extrait n-BuOH, il a été préférable de continuer l'axe *in vivo* avec cet extrait afin de comprendre tout son potentiel. Aussi, le test de toxicité aiguë n'a révélé aucun signe de toxicité de la plante et ceci même pour la dose testée de 2000 mg/kg.

L'activité analgésique centrale a été évaluée avec le test de la plaque chauffante, et a montré la capacité de la concentration de 400 mg/kg de l'extrait n-BuOH à prolonger la durée et la résistance des souris vis-à-vis de stimuli thermiques douloureux.

Les divers résultats obtenus, suggèrent que *C. tougourensis* posséderait également une bonne activité anti-inflammatoire et les deux approches utilisées, celle de l'inflammation provoquée par la carraghénane et l'autre provoquée par l'huile de croton, le prouvent. D'autres activités ont également été évaluées telles que les activités antiulcéreuse, antipyrétique et hépatoprotectrice et ceci pour les deux concentrations testées (200 et 400 mg/kg) mais les résultats ont été plus significatives avec la concentration de 400 mg/kg. De plus, les divers dosages biochimiques et hématologiques effectués à partir du sang prélevé des souris, ont permis de renforcer et d'appuyer les résultats de cette étude.

L'activité cicatrisante a été étudiée selon le modèle de plaie provoquée par excision et le calcul des diamètres des plaies a été calculé pour la première fois en utilisant une approche moderne à l'aide du logiciel Image J, en plus des examens macroscopique et microscopique.

Cette plante a également montré une bonne activité antidiabétique, que ce soit pour le test de tolérance au glucose (OGTT) ou bien du diabète induit par la streptozotocine.

Les tissus d'organes prélevés à la fin de chaque activité ont été soumis à un examen macroscopique puis microscopique afin d'identifier un éventuel signe d'inflammation telles qu'une congestion vasculaire, une infiltration des neutrophiles ou bien une hyperkeratose.

Cette étude a ainsi permis de lever le voile sur les propriétés phytochimiques et pharmacologiques de *Centaurea tougourensis*.

Cependant, pour l'approfondissement et la continuité de ce travail, plusieurs pistes doivent être envisagées surtout sur le plan physiologique, voire génétique, afin de comprendre et de déterminer les voies de signalisations et enzymes à l'origine des propriétés pharmacologiques des divers composés identifiés dans *C. tougourensis*, en s'appuyant en partie sur l'approche de la microscopie à fluorescence.

Une autre perspective serait la détermination du possible effet synergique entre les divers composés identifiés dans les extraits de *C. tougourensis*, et de cerner le potentiel pharmacologique des fractions minoritaires de cette espèce.

Références bibliographiques

- Abe H, Katada K, Orita M, Nishikibe M. (1991). Effects of calcium antagonists on the erythrocyte membrane. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 43(1): 22-26.
- Acet T. (2020). Determining the phenolic components by using HPLC and biological activity of *Centaurea triumfetti*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*. 155(1): 1-6.
- Acconcia F, Marino M. (2016). Steroid Hormones: Synthesis, Secretion, and Transport. *Principles of Endocrinology and Hormone Action*, 14(9): 1-31.
- Afshar FH, Delazar A, Janneh O, Nazemiyeh H, Pasdaran A, Nahar L, Sarker SD. (2011). Evaluation of antimalarial, free-radical-scavenging and insecticidal activities of *Artemisia scoparia* and *A. Spicigera*, Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21(6): 986-990.
- Agada R, Usman WA, Shehu S, Thagariki D. (2020). In vitro and in vivo inhibitory effects of *Carica papaya* seed on α -amylase and α -glucosidase enzymes. *Heliyon*. 6(3): e03618.
- Agra LC, Ferro JN, Barbosa FT, Barreto E. (2015). Triterpenes with healing activity: A systematic review. *The Journal of dermatological treatment*. 26(5): 465-470.
- Ahmadiani S, Nikfar S. (2016). Challenges of access to medicine and the responsibility of pharmaceutical companies: a legal perspective. *Daru*. 24(1): 13.
- Ahmed ZF, Rimpler H, Rizk AM, Hammouda FM, Ismail SI. (1970). The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry*. 9(29): 1595-1601.
- Ahmed MF, Kazim SM, Ghori SS, Mehjabeen SS, Ahmed SR, Ali SM, Ibrahim M. (2010). Antidiabetic Activity of *Vinca rosea* Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *International journal of endocrinology*. 2010: 841090.
- Aissous I, Benrebai M, Cacan E, Caglar B, Erenler R, Ameddah S, Benayache S, Benayache F, Bensouici C. (2021). Antioxidant and antiproliferative activities of the n-butanol extract of *Centaurea maroccana* Ball aerial parts. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 34(1): 5-11.
- Akbar S, Fries DS, Malone MH. (1995). Effect of various pretreatments on the hypothermic activity of repin in naive rats. *Journal of ethnopharmacology*. 49(2): 91-99.
- Akkol EK, Arif R, Ergun F, Yesilada E. (2009). Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of ethnopharmacology*. 122(2): 210-215.
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*. 55(9): 290-296.
- Alasmary FAS, Awaad AS, Alafeefy AM, El-Meligy RM, Alqasoumi SI. (2018). Novel quinazoline and acetamide derivatives as safe anti-ulcerogenic agent and anti-ulcerative colitis activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 26(1): 138-143.
- Alarcón de la Lastra C, Martín MJ, Motilva V. (1994). Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*. 48(1): 56-62.
- Albayrak S, Atasagun B, Aksoy A. (2017). Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 10(6): 599-606.
- Alper M, Güneş H. (2019). The Anticancer and Anti-inflammatory Effects of *Centaurea solstitialis* Extract on Human Cancer Cell Lines. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 2019 16(3): 273-281.
- Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Sayed-Ahmed MM, Al-Shabanah OA, Abuohashish HM, Ahmed MM. (2013). Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 13: 136.
- Ali SS, Ahmad WANW, Budin SB, Zainalabidin S. (2020). Implication of dietary phenolic acids on inflammation in cardiovascular disease. *Reviews in cardiovascular medicine*. 21(2): 225-240.

- Aliouchea L, Mossetb P, León F, Brouardc I, Benayache S, Sarrie D Benayachea F. (2020). Characterization of Chemical Compounds and Antioxidant Activity of *Centaurea solstitialis* sp. schouwii (DC.) Q. et S. (Asteraceae). *Current Bioactive Compounds*. 16: 618-626.
- Alves de Almeida AC, de-Faria FM, Dunder RJ, Manzo LP, Souza-Brito AR, Luiz-Ferreira A. (2017). Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2017: 8528210.
- Ambrosy AP, Butler J, Ahmed A, Vaduganathan M, van Veldhuisen DJ, Colucci WS, Gheorghiad M. (2014). The use of digoxin in patients with worsening chronic heart failure: reconsidering an old drug to reduce hospital admissions. *Journal of the American College of Cardiology*. 63(18): 1823-1832.
- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(46): 7970-7981.
- Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Bektas Oğlu B, Bener M. (2008). Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts. *Methods in molecular biology*. 477: 163-193.
- Amagase K, Kato S, Yamamoto H, Okabe S. (1996). Effects of the novel histamine H₂-receptor antagonist (+/-)-(E)-1-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-3-[2-[[[5-(methylamino)methyl-2-furyl]methyl]thio]ethyl]-2-(methylsulfonyl) guanidine on gastric secretion and gastroduodenal ulcers in rats. *Arzneimittelforschung*. 46(2): 177-184.
- Amer M, Maged A, Wesam S, Magda A Samar M. (2021). Recent Advances in Chemistry and Pharmacological Aspects of 2-Pyridone Scaffolds. *Journal of Saudi Chemical Society*. 25(6): 101259.
- Amna R, Sobia K, Tariq M. (2020). Phytochemical investigation of medicinally important plants of the Pothohar region of Pakistan. *Journal of traditional Chinese medicine*. 40(5): 883-890.
- Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy reviews*. 10(20): 84-89.
- Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. (1998). Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 32(1): 35-41.
- Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Daru*. 20(1): 76.
- Ansar S, Siddiqi NJ, Zargar S, Ganaie MA, Abudawood M. (2016). Hepatoprotective effect of Quercetin supplementation against Acrylamide-induced DNA damage in wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 16(1): 327.
- Arya, SS, Rookes JE, Cahill DM. (2021). Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *advanced traditional medicine*. 4(11): 244-247.
- Asmat U, Abad K, Ismail K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24(5): 547-553.
- Atassi MZ, Casali P. (2008). Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity*. 41(2): 123-132.
- Avery SV. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*. 434(2): 201-210.
- Autore G, Caruso A, Marzocco S. (2010). Acetamide derivatives with antioxidant activity and potential anti-inflammatory activity. *Molecules*. 15(3): 2028-2038.
- Awasthi S, Saraswathi NT. (2016). Vanillin restrains non-enzymatic glycation and aggregation of albumin by chemical chaperone like function. *International journal of biological macromolecules*. 87(12): 1-6.
- Ayad R, Ababsa ZE, Belfadel F, Akkal S, León F, Brouard, I, Medjroubi K. (2012). Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2(14): 151-154.

- Ayad R, Akkal S. (2019). Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. *Studies in Natural Products Chemistry*. 63(29): 357-414.
- Azqueta A, Collins AR. (2012). Carotenoids and DNA damage. *Mutation research*. 733(1-2):4-13.
- Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P, Chalchat JC, Boumaza O, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. (2016). Essential Oil Composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(9): 1545-1548.
- Azzouzi Djihane. (2017). Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle (LMD). Université frères mentouri constantine 1.
- Baatouche S, Cheriet T, Sarri D, Mekkiou R, Boumaza O, Benayache S, Benayache F, Brouard I, León F, Seghiri R. (2019). *Centaurea microcarpa* Coss. & Dur. (Asteraceae) extracts: New cyanogenic glucoside and other constituents. *Natural product research*. 33(21): 3070-3076.
- Baker MM, Hammad SF, Belal TS. (2019). Development and validation of a versatile HPLC-DAD method for simultaneous determination of the antiviral drugs daclatasvir, ledipasvir, sofosbuvir and ribavirin in presence of seven potential impurities. Application to assay of dosage forms and dissolution studies. *Drug development and industrial pharmacy*. 45(7): 1111-1119.
- Bahadori MB, Salehi P, Sonboli A. (2016). Comparative study of the essential oil composition of *Salvia urmiensis* and its enzyme inhibitory activities linked to diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *International Journal of Food Properties*. 20(3): 2974-2981.
- Bais HP, Walker TS, Kennan AJ, Stermitz FR, Vivanco JM. (2003). Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(4): 897-901.
- Balić A, Mokos M. (2019). Do We Utilize Our Knowledge of the Skin Protective Effects of Carotenoids Enough? *Antioxidants*. 8(8): 259.
- Ballmer PE. (2001). Causes and mechanisms of hypoalbuminaemia. *Clinical Nutrition*. 20(3): 271-273.
- Banerjee R, Gupta S, Dey D, Maiti S, Dhara D. (2014). Synthesis of PEG containing cationic block copolymers and their interaction with human serum albumin. *Reactive and Functional Polymers*. 74: 81-89.
- Banji D, Singh J, Banji OJ. (2010). Scrutinizing the aqueous extract of leaves of *pedalium murex* for the antiulcer activity in rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 23(3): 295-299.
- Barbosa ADP. (2014). An overview on the biological and pharmacological activities of saponins. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(8): 47-50.
- Barreda VD, Palazzesi L, Tellería MC, Olivero EB, Raine JI, Forest F. (2015). Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of Antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(35): 10989-10994.
- Barreda VD, Palazzesi L, Katinas L, Crisci JV, Tellería MC, Bremer K, Passalia MG, Bechis F, Corsolini R. (2012). An extinct Eocene taxon of the daisy family (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. *Annals of botany*. 109(1): 127-134.
- Battandier JA. (1989). *Flore de l'Algérie (Dicotyledones)*. Alger, Algeria.
- Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. (2009). Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *Journal of dental research*. 88(9): 807-811.
- Belbache H. (2018). Investigation phytochimique et biologique de *Centaurea sempervirens* L. (Asteraceae). THESE Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Université frères mentouri constantine 1.
- Belgacem A, Gdara NB, Khemiri I, Bitri L. (2019). Exploration of hypoglycemic effect of an extract from leaves of a plant from Tunisian pharmacopeia: *Artemisia campestris* (Asteraceae). *African health sciences*. 19(4): 2846-2853.

- Belcacec S, Benayache S, Belbache H, Boubekri C. (2014). Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(3):1275-1279.
- Berezovskaya F, Karev GP, Katsnelson MI, Wolf YI, Koonin EV. (2018). Stable coevolutionary regimes for genetic parasites and their hosts: you must differ to coevolve. *Biology direct*. 13(1): 27.
- Benayache F, Benayache S, Medjroubi K, Massiott, G, Aclinou P, Drodz B, Nowaks G. (1992). Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata*. *Phytochemistry*, 31(12): 4359-4360.
- Benarba B, Belabid L, Righi K, Bekkar AA, Elouissi M, Khaldi A, Hamimed A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of ethnopharmacology*. 175: 626-637.
- Bensaad MS, Dassamiour S, Hambaba L, Bensouici C, Haba H. (2021) In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougouensis* Boiss. & Reut. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 9(6): 790-802.
- Bentamene A, Boucheham R, Baz M, Benayache S, Creche J, Benayache F. (2010). Chemistry of natural compounds. 46(3): 452-453.
- Bentamene A, Benayache S, Creche J. (2007). Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 43: 749-750.
- Bentamène A, Benayache S, Crèche J, Petit G, Bermejo-Barrera J, Leon F, Benayache F. (2005). A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10): 1061-1065.
- Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 39(1): 70-76.
- Bezerra DP, Soares AKN, de Sousa DP. (2016). Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-9.
- Białecka-Florjańczyk E, Fabiszewska A, Zieniuk B. (2018). Phenolic Acids Derivatives - Biotechnological Methods of Synthesis and Bioactivity. *Current pharmaceutical biotechnology*. 19(14): 1098-1113.
- Bianchet MA, Erdemli SB, Amzel LM. (2008). Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases. *Vitamins and hormones*. 78(2): 63-84.
- Bicha S, Chalard P, Hammoud L, León F. (2013). Maroccanin: A New γ -lactone and Other Constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). *Records of Natural Products*. 114-118.
- Bioud K, Azzouzi D, Benrebai M, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F, Ameddah S. (2017). Renoprotective Effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Leaves on Cisplatin -induced Oxidative Stress and Renal dysfunction in Mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 7 (11): 147-154.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*. 4617 (181): 1119-1200.
- Böhm F, Tinkler JH, Truscott TG. (1995). Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical. *Nature medicine*. 1(2): 98-99.
- Bolton JL, Dunlap T. (2017). Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chemical research in toxicology*. 30(1): 13-37.
- Bonta RK. (2020). Dietary Phenolic Acids and Flavonoids as Potential Anti-Cancer Agents: Current State of the Art and Future Perspectives. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 20(1): 29-48.
- Borst O, Münzer P, Schmid E, Schmidt EM, Russo A, Walker B. (2014). 1,25(OH)₂ vitamin D₃-dependent inhibition of platelet Ca²⁺ signaling and thrombus formation in *klotho*-deficient mice. *FASEB Journal*. 28(5): 2108-2119.
- Botelho AFM, Pierezan F, Soto-Blanco B, Melo MM. (2019). A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicon*. 158: 63-68.
- Bourhia M, Laasri FE, Moussa SI, Ullah R, Bari A, Saeed Ali S, Kaoutar A, Haj Said AA, El Mzibri M, Said G, Khilil N, Benbacer L. (2019). *Phytochemistry, Antioxidant Activity, Antiproliferative Effect,*

- and Acute Toxicity Testing of Two Moroccan Aristolochia Species. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2019(75): 9710876.
- Bozić T, Novaković I, Gasić MJ, Juranić Z, Stanojković T, Tufegdžić S, Kljajić Z, Sladić D. (2010). Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone. European journal of medicinal chemistry. 45(3): 923-929.
- Brahmachari G. (2017). Discovery and development of antidiabetic agents from natural products natural product drug discovery. Amsterdam: Elsevier. 1er edition, 332.
- Brass LF, Joseph S. (1985). A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. Journal of Biological Chemistry. 260: 15172-15179.
- Bremer K, Anderberg A. (1994). Asteraceae: Cladistics and Classification Hardcover – Illustrated. Timber Press. United States.
- Brogan C. Alkaloids cancer treatments. Accede le 12 juillet 2021. Disponible sur: http://www.Vincaalkaloids\AlkaloidsCancerTreatmentLivestrong_com.mh .
- Cai YJ, Dai JQ, Fang JG, Ma LP, Hou LF, Yang L, Liu ZL. (2020). Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulata*. Canadian journal of physiology and pharmacology. 80(12): 1187-1194.
- Cao H, Chen X, Jassbi AR, Xiao J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. Biotechnology advances. 33(1): 214-223.
- Breitenbucher JG, Arienti KL, McClure KJ. (2001). Scope and limitations of solid-supported liquid-liquid extraction for the high-throughput purification of compound libraries. Journal of combinatorial chemistry. 3(6): 528-533.
- Bremer K (1994). Asteraceae: Cladistics and Classification Hardcover – Illustrated. Timber Press. United state.
- Brenner M, Hearing VJ. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochemistry and Photobiology. 84(3): 539-549.
- Bribi N, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Vezza T, Maiza F, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J. (2015). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Total Alkaloid Extract from *Fumaria capreolata*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2015: 736-895.
- Brito SA, de Almeida CLF, de Santana TI, da Silva Oliveira AR, do Nascimento Figueiredo JCB, Souza IT, de Almeida LL, da Silva MV, Borges AS, de Medeiros JW, da Costa Silva Neto J, de Cássia Ribeiro Gonçalves R, Kitagawa RR, Sant'Ana AEG, Rolim LA, de Menezes IRA, da Silva TG, Caldas GFR, Wanderley AG. (2018). Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018: 1731459.
- Buitrago DA, Rojas-Vera J, Peñaloza Y. (2016). In vitro antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela. Revista de biologia tropical. 64(4): 1431-1439.
- Bungau S, Abdel-Daim MM, Tit DM, Ghanem E, Sato S, Maruyama-Inoue M, Yamane S, Kadonosono K. (2019). Health Benefits of Polyphenols and Carotenoids in Age-Related Eye Diseases. Oxidative medicine and cellular longevity. 2019: 9783429.
- Bureau G, Longpré F, Martinoli MG. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. Journal of neuroscience research. 86(2): 403-410.
- Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. International journal of molecular sciences. 14(6):12780-805.
- Canbay HS. (2017). Effectiveness of Liquid-Liquid Extraction, Solid Phase Extraction, and Headspace Technique for Determination of Some Volatile Water-Soluble Compounds of Rose Aromatic Water. International journal of analytical chemistry. 2017: 4870671.

- Cao YF, Li J, Zhang Z. (2019). Plasma Levels of Amino Acids Related to Urea Cycle and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Chinese Adults. *Frontiers in endocrinology*. 10(4): 50.
- Catarino MD, Alves-Silva JM, Pereira OR, Cardoso SM. (2014). Polyphenols: Food Sources, Bioactive Properties and Antioxidant Effects. In: Cobb DT (4th ed). New York. Nova Science Publishers. 87-112.
- Carev I, Maravić A, Bektašević M, Ruščić M, Siljak-Yakovlev S, Politeo O. (2018). *Centaurea rupestris* L.: cytogenetics, essential oil chemistry and biological activity. *Croatica Chemica Acta*. 91: 1–8.
- Carnevale R, Loffredo L, Nocella C, Bartimoccia S, Bucci T, De Falco E. (2014). Epicatechin and catechin modulate endothelial activation induced by platelets of patients with peripheral artery disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 691015.
- Carranza-Torres IE, Viveros-Valdez E, Guzmán-Delgado NE, García-Davis S, Morán-Martínez J, Betancourt-Martínez ND, Balderas-Rentería I, Carranza-Rosales P. (2019). Protective effects of phenolic acids on mercury-induced DNA damage in precision-cut kidney slices. *Iranian journal of basic medical sciences*. 22(4): 367-375.
- Carvalho AR Jr, Diniz RM, Suarez MAM, Figueiredo CSSES, Zagnignan A, Grisotto MAG, Fernandes ES, da Silva LCN. (2018). Use of Some Asteraceae Plants for the Treatment of Wounds: From Ethnopharmacological Studies to Scientific Evidences. *Frontiers in pharmacology*. 9: 784.
- Cásedas G, Les F, López V. (2020). Anthocyanins: Plant Pigments, Food Ingredients or Therapeutic Agents for the CNS? A Mini-Review Focused on Clinical Trials. *Current pharmaceutical design*. 26(16): 1790-1798.
- Cashman JN. (1996). The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*. 5(52): 13-23.
- Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández E. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food chemistry*. 113(4): 859–871.
- Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, Igartuburu JM, Garcia Barroso C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*. 165: 198-204.
- Cava-Roda R, Taboada-Rodríguez A, López-Gómez A, Martínez-Hernández GB, Marín-Iñiesta F. (2021). Synergistic Antimicrobial Activities of Combinations of Vanillin and Essential Oils of Cinnamon Bark, Cinnamon Leaves, and Cloves. *Foods*. 10(6): 1406.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*. 104(1-2): 164-167.
- Chairungsi N, Jumpatong K, Suebsakwong P, Sengpracha W, Phutdhawong W, Buddhasukh D. (2006). Electrocoagulation of quinone pigments. *Molecules*. 11(7): 514-522.
- Chang Z, Jian P, Zhang Q, Liang W, Zhou K, Hu Q, Liu Y, Liu R, Zhang L. (2021). Tannins in *Terminalia bellirica* inhibit hepatocellular carcinoma growth by regulating EGFR-signaling and tumor immunity. *Food & function*. 12(8): 3720-3739.
- Charles AL, Meyer A, Dal-Ros S, Auger C, Keller N, Ramamoorthy TG. (2013). Polyphenols prevent ageing-related impairment in skeletal muscle mitochondrial function through decreased reactive oxygen species production. *Experimental Physiology*. 98(2): 536-545.
- Cefali LC, Ataíde JA, Fernandes AR, Sousa I, Gonçalves F, Eberlin S. (2019). Flavonoid-Enriched Plant-Extract-Loaded Emulsion: A Novel Phytocosmetic Sunscreen Formulation with Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 8(10):443.
- Cejnar P, Vyšata O, Kukul J. (2020). Simple capacitor-switch model of excitatory and inhibitory neuron with all parts biologically explained allows input fire pattern dependent chaotic oscillations. *Scientific Reports*. 10(4): 7353.
- Chen W, McRoberts JA, Marvizón JC. (2014). μ -Opioid receptor inhibition of substance P release from primary afferents disappears in neuropathic pain but not inflammatory pain. *Neuroscience*. 267(1): 67-82.

- Chen X, Mukwaya E, Wong MS, Zhang YA (2014) systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical biology*. 52(5): 655-660.
- Chen Y, Miao Y, Huang L, Li J, Sun H, Zhao Y, Yang J, Zhou W. (2014). Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an in vivo and in vitro evaluation. *BMC complementary and alternative medicine*. 14(2): 86.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 9(6): 7204-7218.
- Chen J, Xu B, Sun J, Jiang X, Bai W. (2021). Anthocyanin supplement as a dietary strategy in cancer prevention and management: A comprehensive review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 19(4): 1-13.
- Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP. (2019). Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 11(2): S297-S300.
- Cheung PY, Peliowski A, Radomski M. (1999). Differential Inhibition of Platelet Aggregation by Indomethacin and Inhaled Nitric Oxide in Critically Ill Infants. *Pediatric Research*, 45(4): 189A-189A.
- Chevigny N, Schatz-Daas D, Lotfi F, Gualberto JM. (2020). DNA Repair and the Stability of the Plant Mitochondrial Genome. *International journal of molecular sciences*. 21(1): 328.
- Chikov PS. (1983). 2nd ed. Atlas of medicine plants areas and resources of the USSR. Moscow. 56-57.
- 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.
- Chopra B, Dhingra AK, Dhar KL, Nepali K. Emerging role of terpenoids for the treatment of cancer: A review. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 21(16): 29.
- Choquenot B, Couteau C, Papis E, Coiffard LJ. (2008). Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products*. 71(6): 1117-1118.
- Christen P, Aoki T, Shimomura K. (1992). Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant cell reports*. 11(12): 597-600.
- Chuclá MT, Lamela M, Gato A, Cadavid I. (1988). *Centaurea corcubionensis*: a study of its hypoglycemic activity in rats. *Planta medica*. 54(2): 107-109.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 38(6): 421-464.
- Commission of the European Communities. (2006). Recommendation of 22 September 2006 on sun protection products and manufacturers' claims. 265: 39-43.
- Cordier W, Steenkamp V. (2012). Herbal remedies affecting coagulation: a review. *Pharmaceutical Biology*. 50(4): 443-452.
- Cole J, Tsou R, Wallace K. (2001). Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays. *Wound Repair Regen*. 9(5): 360-370.
- Colonnello A, Aguilera-Portillo G, Rubio-López LC, Robles-Bañuelos B, Rangel-López E, Cortez-Núñez S, Evaristo-Priego Y, Silva-Palacios A, Galván-Arzate S, García-Contreras R, Túnez I, Chen P, Aschner M, Santamaría A. (2020). Comparing the Neuroprotective Effects of Caffeic Acid in Rat Cortical Slices and *Caenorhabditis elegans*: Involvement of Nrf2 and SKN-1 Signaling Pathways. *Neurotoxicity research*. 37(2): 326-337.
- Commission Des Comunautes Europeennes. (2006). Recommandation du 22 septembre 2006 relative aux produits de protection solaire et aux allégations des fabricants.
- Conforti F, Menichini F, Loizzo MR, Statti AG, Rapisarda A, Menichini F. (2008). Antioxidant, alpha-amylase inhibitory and brine-shrimp toxicity studies on *Centaurea centaurium* L. methanolic root extract. *Natural Product Research*. 22(16):1457-1466.

- Cooper, G., Laird, A., Nahar, L., & Sarker, S.D. (2002). Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 65-67.
- Cornelius F, Kanai R, Toyoshima C. (2013). A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. *The Journal of biological chemistry*. 288(9): 6602-6616.
- Coronado-Aceves EW, Velázquez C, Robles-Zepeda RE, Jiménez-Estrada M, Hernández-Martínez J, Gálvez-Ruiz JC, Garibay-Escobar A. (2016). Reynosin and santamarine: two sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* with bactericidal activity against clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmaceutical biology*. 54(11): 2623-2628.
- Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernandez A, Jaime HB, Carrillo-Mora P, Bandala C, Reyes-Long S, Alfaro-Rodríguez A. (2018). Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. *Current neuropharmacology*. 16(2): 210-221.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*. 51(2): 117-123.
- Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12(4): 564-582.
- Cronkite DA, Strutt TM. (2018). The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. *Journal of Immunology Research*. 2018: 1-14.
- Crouse RG. (1980). Plant dermatitis due to the Compositae (Asteraceae) family. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2(5): 417-424.
- Csupor D, Widowitz U, Blazsó G, Laczkó-Zöld E, Tatsimo JS, Balogh A, Boros K, Dankó B, Bauer R, Hohmann J. (2013). Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the Carpathian Basin. *Phytotherapy Research*. 27: 540-544.
- Csupor D, Peták Z, Hohmann J. (2011). Magyarországi *Centaurea* fajok gyógyászati perspektívája a tudományos adatok tükrében [Medicinal perspective of Hungarian *Centaurea* species in the light of scientific evidence]. *Acta pharmaceutica Hungarica*. 2011;81(2): 63-75.
- Cui X, Lin Q, Liang Y. (2020). Plant-Derived Antioxidants Protect the Nervous System From Aging by Inhibiting Oxidative Stress. *Frontiers in aging neuroscience*. 12: 209.
- da Silva Júnior EN, Jardim GAM, Jacob C, Dhawa U, Ackermann L, de Castro SL. (2019). Synthesis of quinones with highlighted biological applications: A critical update on the strategies towards bioactive compounds with emphasis on lapachones. *European journal of medicinal chemistry*. 179: 863-915.
- da Silva RP, Nissim I, Brosnan ME, Brosnan JT. (2009). Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Endocrinology and metabolism*. 296(2): E256-E261.
- Daré RG, Nakamura CV, Ximenes VF, Lautenschlager, SOS. (2020). Tannic Acid, A Promising Anti-Photoaging Agent: Evidences of its Antioxidant and Anti-Wrinkle Potentials, and its Ability to Prevent Photodamage and MMP-1 Expression in L929 Fibroblasts Exposed to UVB. *Free Radical Biology and Medicine*. 160: 342-355.
- Davis A, Robson J. (2016). The dangers of NSAIDs: look both ways. *British journal of general practice*. 66 (645): 172-173.
- Debbache-Benaida N, Atmani-Kilani D, Schini-Keirth VB, Djebbli N, Atmani D. (2013). Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 3(9): 697-704.
- de Jesus NZ, de Souza Falcão H, Gomes IF, de Almeida Leite TJ, de Moraes Lima GR, Barbosa-Filho JM. (2012). Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(3): 3203-3228.

- de Oliveira RG, Mahon CP, Ascêncio PG, Ascêncio SD, Balogun SO, de Oliveira Martins DT. (2014). Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *Journal of ethnopharmacology*. 155(1): 387-395.
- Del Giudice M, Gangestad SW. (2018). Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70: 61-75.
- Deng L, Qi Y, Liu Z, Xi Y, Xue W. (2019). Effect of tannic acid on blood components and functions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 184: 110505.
- Dennis Bilavendran J, Manikandan A, Thangarasu P, Sivakumar K. (2019). Synthesis and discovery of pyrazolo-pyridine analogs as inflammation medications through pro- and anti-inflammatory cytokine and COX-2 inhibition assessments. *Bioorganic Chemistry*. 94: 103484.
- Desmier T. (2016). Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges.
- Dev S. (2010). Impact of natural products in modern drug development. *Indian journal of experimental biology*. 48(3): 191-198.
- Dhanalakshmi C, Janakiraman U, Manivasagam T, Justin Thenmozhi A, Essa MM, Kalandar A, Khan MA, Guillemain GJ. (2016). Vanillin Attenuated Behavioural Impairments, Neurochemical Deficits, Oxidative Stress and Apoptosis Against Rotenone Induced Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical research*. 41(8): 1899-1910.
- Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Nataraj J, Justin Thenmozhi A, Essa MM. (2015). Neurosupportive Role of Vanillin, a Natural Phenolic Compound, on Rotenone Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2015;2015: 626028.
- 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*). *Applied Sciences*. 10(7): 2267.
- Ding S, Jiang H, Fang J. (2018). Regulation of Immune Function by Polyphenols. *Journal of immunology research*. 2018: 1264074.
- Dill KA, Shortle D. (1991). Denatured states of proteins. *Annual review of biochemistry*. 60: 795-825.
- Dimkić I, Petrović M, Gavrilović M, Gašić U, Ristivojević P, Stanković S, Janačković P. (2020). New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express*. 10(1): 183.
- Diniz TC, Silva JC, de Lima-Saraiva SR, Ribeiro FP, Pacheco AG, de Freitas RM, Quintans-Júnior LJ, Quintans Jde S, Mendes RL, Almeida JR. (2015). The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015: 171756.
- Dittrich, M, Heywood VH, Harborne JB, Turner BL. (1977). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. 7th Edition, vol 2. Academic Press, London.
- Dixon RA, Sarnala S. (2020). Proanthocyanidin Biosynthesis-a Matter of Protection. *Plant physiology*. 184(2): 579-591.
- Djeddi S, Karioti A, Sokovic M, Koukoulitsa C, Skaltsa H. (2008). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(7): 3725–3731.
- Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. (2012). Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. *Journal of Applied Sciences Research*. 8(6): 2876-2880.
- Djeddi S, Karioti A, Sokovic M, Stojkovic D, Seridi R, Skaltsa H. (2007). Minor Sesquiterpene Lactones from *Centaurea pullata* and Their Antimicrobial Activity. *Journal of Natural Products*. 70(11): 1796–1799.
- Doillon CJ, Hembry RM, Ehrlich HP, Burke JF. (1987). Actin filaments in normal dermis and during wound healing. *The American journal of pathology*. 126(1): 164-170.

- Domitrović R, Jakovac H, Vasiljev Marchesi V, Vladimir-Knežević S, Cvijanović O, Tadić Z, Romić Z, Rahelić D. (2012). Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta pharmacologica Sinica*. 33(10): 1260-1270.
- D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6): 12222-12248.
- Dose J, Matsugo S, Yokokawa H, Koshida Y, Okazaki S, Seidel U, Eggersdorfer M, Rimbach G, Esatbeyoglu T. (2016). Free Radical Scavenging and Cellular Antioxidant Properties of Astaxanthin. *International journal of molecular sciences*. 17(1): 103.
- Ed Nignpense B, Chinkwo KA, Blanchard CL, Santhakumar AB. (2019). Polyphenols: Modulators of Platelet Function and Platelet Microparticle Generation?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 21(1): 146.
- Eguchi R, Ono N, Hirai Morita A, Katsuragi T, Nakamura S, Huang M, Altaf-UI-Amin M, Kanaya S. (2019). Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics*. 20(1): 380.
- Elekofehinti OO. (2015). Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants - A review. *Pathophysiology*. 22(2): 95-103.
- Ellis A, Bennett DLH. (2013). Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*. 111(1): 26-37.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherston RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- Elomaa P, Zhao Y, Zhang T. (2018). Flower heads in Asteraceae-recruitment of conserved developmental regulators to control the flower-like inflorescence architecture. *Horticulture research*. 5(1): 36.
- Elsharkawy ER, Shiboob MH. (2017). Antioxidant Activity of Phenolic and Alkaloid Fractions Accumulated in *Artemisia Judaica* and *Artemisia Herba Alba*. 17(4): 155-164.
- Epifano F, Preziuso F, Taddeo VA, Fiorito S, Genovese S. (2018). An Example of a Novel Efficient Plant Extraction Technique: Electromagnetic Induction Heating. *Molecules*. 23(11): 3048.
- Erb M, Kliebenstein DJ. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*. 184(1): 39-52.
- Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NU, Karaalp C. (2014). Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical Biology*. 52(6): 775-781.
- Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, Krenn L. (2011). Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical biology*. 49(8): 840-849.
- Ericson-Neilsen W, Kaye AD. (2014). Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *The Ochsner journal*. 14(2): 203-207.
- Escher GB, Santos JS, Rosso ND, Marques MB, Azevedo L, do Carmo MAV, Daguer H, Molognoni L, Prado-Silva LD, Sant'Ana AS, da Silva MC, 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.
- Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES. (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral research*. 68(3): 124-134.
- Fan FY, Sang LX, Jiang M. (2017). Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*. 22(3): 484.
- Fauci AS. (2018). *Harrison's principles of internal medicine*. Medical Publishing Division. 20th ed. McGraw-Hill. 3691-3697.
- Ferhat M, Kadi I, Lahouaou A. Recherche de substances bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Coss et Dur. Mémoire pour l'obtention du diplôme des Etudes Supérieures en Biologie (DES) en biochimie. Université Mohamed Boudiaf - M'sila.

- Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tolusso B, De Benedetti F. (2010). Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine*. 16(11-12): 552-557.
- Fiz O, Valcárcel V, Vargas P. (2002). Phylogenetic position of Mediterranean Astereae and character evolution of daisies (Bellis, Asteraceae) inferred from nrDNA ITS sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 25(1): 157-171.
- Flores-Opazo M, Boland E, Garnham A, Murphy RM, McGee SL, Hargreaves M. (2018). Exercise and GLUT4 in human subcutaneous adipose tissue. *Physiological reports*. 6(22): e13918.
- Foley KM, Kourides IA, Inturrisi CE, Kaiko RF, Zaroulis CG, Posner JB, Houde RW, Li CH. (1979). beta-Endorphin: analgesic and hormonal effects in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(10): 5377-5381.
- Formisano C, Bancheva S, Bruno M, Rossellic S. (2010). Volatile components from aerial parts of *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *cristata* (Bartl.) Dostál and *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *spinosociliata* growing wild in Croatia. *Croatica Chemica Acta*. 83(4): 403-408.
- Formisano C, Mignola E, Senatore, F, Bancheva S, Bruno M, Rosselli S. (2008). Volatile constituents of aerial parts of *Centaurea sibthorpii* (Sect. *Carduiformes*, Asteraceae) from Greece and their biological activity. *Natural Product Research*. 22(10): 840-845.
- Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, Kinnell H, Mason JI, Evans DB, Bhattacharya S, Flannigan S, Franks S, Monteiro A, O'Shaughnessy PJ. (2011). Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 96(6): 1754-1762.
- Font M, Garcia-Jacas N, Vilatersana R, Roquet C, Susanna A. (2009). Evolution and biogeography of *Centaurea* section *Acrocentron* inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. *Annals of botany*. 103(6): 985-997.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(06): 587.
- Freitag AF, Cardia GF, da Rocha BA. (2015). Hepatoprotective Effect of Silymarin (*Silybum marianum*) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2015(5): 538317.
- Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*. 21(17): 6275.
- Gandhidasan R, Thamaraiachelvan A, Baburaj S. (1991). Anti inflammatory action of *Lannea coromandelica* by HRBC membrane stabilization. *Fitoterapia*. 62(4): 81-83.
- Gang DR. (2011). *The Biological Activity of Phytochemicals*. Springer. New York.
- Garcia-Jacas N, Uysal T, Romaschenko K, Suárez-Santiago VN, Ertuğrul K, Susanna A. (2006). *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. *Annals of Botany*. 98: 741-753.
- Garland EL. (2012). Pain Processing in the Human Nervous System. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 39(3): 561-571.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie*. 57(9-10): 453-455.
- Geoffrey K, Mwangi AN, Maru SM. (2019). Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(7): 1009-1018.
- Geraets L, Moonen HJ, Brauers K, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. (2007). Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *The Journal of nutrition*. 137(10): 2190-2195.

- Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. (1994). Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *International endodontic journal*. 27(3):139-143.
- Ghorbani A, Rashidi R, Shafiee-Nick R. (2019). Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111: 947–957.
- Giangaspero A, Ponti C, Pollastro F, Del Favero G, Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S. (2009). Topical Anti-inflammatory Activity of Eupatilin, A Lipophilic Flavonoid from Mountain Wormwood (*Artemisia umbelliformis* Lam.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(17): 7726-7730.
- Gilbert DN, Chambers FH, Saag MS. (2021). *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*. Virginia, Sanford Corporation.
- Ginsburg H, Demel RA. (1984). Interactions of hemin, antimalarial drugs and hemin-antimalarial complexes with phospholipid monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 35(4): 331-347.
- Gledhill D. (2008). *The Names of Plants*, Cambridge University Press, 97-98.
- Goettert M, Schattel V, Koch P, Merfort I, Laufer S. (2010). Biological evaluation and structural determinants of p38 α mitogen-activated-protein kinase and c-Jun-N-terminal kinase 3 inhibition by flavonoids. *A european journal of chemical biology*. 11: 2579-2588.
- Gomes de Melo J, de Sousa Araújo TA, Thijian Nobre de Almeida e Castro V, Lyra de Vasconcelos Cabral D, do Desterro Rodrigues M, Carneiro do Nascimento S, Cavalcanti de Amorim EL, de Albuquerque UP. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*. 15(12): 8534-8542.
- Gower DB. (1974). Modifiers of steroid-hormone metabolism: a review of their chemistry, biochemistry and clinical applications. *Journal of steroid biochemistry*. 5(5): 501-523.
- Gries G, Schaefer PW, Gries R, Fan YB, Higashiura Y, Tanaka B. (2002). 2-Methyl-(Z)-7-octadecene: sex pheromone of allopatric *Lymantria lucescens* and *L. serva*. *Journal of chemical ecology*. 28(3): 469-478.
- Gupta AK, Bharadwaj M, Mehrotra R. (2016). Skin Cancer Concerns in People of Color: Risk Factors and Prevention. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 17(12): 5257-5264.
- Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, Alatar AA, Cantini C, Cai G, Hausman JF, Siddiqui KS. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes (Basel)*. 9(6): 309.
- Grosso C, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB. (2013). The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Current medicinal chemistry*. 20(37): 4694-4719.
- 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.
- Gürbüz I, Yesilada E. (2007). Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *Journal of Ethnopharmacology*. 112(2): 284-291.
- Güvensen N, Keskin D, Güneş H, Kesik Oktay M, Yıldırım H. (2019). Antimicrobial property and antiproliferative activity of *Centaurea babylonica* (L.) L. on human carcinomas and cervical cancer cell lines. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 26(2): 290-297.
- Gyovai A, Minorics R, Kiss A, Mernyák E, Schneider G, Szekeres A, Zupkó I. (2018). Antiproliferative Properties of Newly Synthesized 19-Nortestosterone Analogs Without Substantial Androgenic Activity. *Frontiers in Pharmacology*. 9.
- Hadi I, Hussein HM. (2016). Antimicrobial Activity and Spectral Chemical Analysis of Methanolic Leaves Extract of *Adiantum Capillus-Veneris* Using GC-MS and FT- IR Spectroscopy. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(3); 369-385
- Halfon B. (1989). Flavonoids from *Centaurea cariensis* Boiss. *Doga Turkish Journal of Medical Sciences*. 3: 138-140.

- Haller, C. (2005). Hypoalbuminemia in Renal Failure: Pathogenesis and Therapeutic Considerations. *Kidney and Blood Pressure Research*. 28(5-6): 307-310.
- Hammoud L, Seghiri R, Benayache S, Mosset P, Lobstein A, Chaabi M, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. (2012). A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Natural product research*. 26(3): 203-208.
- Han M, Li G, Liu X, Li A, Mao P, Liu P, Li H. (2019). Phenolic profile, antioxidant activity and anti-proliferative activity of crabapple fruits. *Horticultural plant journal*. 5(4): 155-163.
- Harborne JB. (1973). *Phytochemical Methods, An Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd edition. Springer netherlands. Chapman and Hall, London, Ltd.
- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*. 16(5): 821-847.
- Harms PG, Ojeda SR, McCann SM. (1973). Prostaglandin involvement in hypothalamic control of gonadotropin and prolactin release. *Science*. 181(4101): 760-761.
- Hasan MM, Mahmud MRA, Islam MG. (2019). GC-MS Analysis of Bioactive Compounds in Ethanol Extract of *Putranjiva roxburghii* Wall. *Fruit Peel. Pharmacog J*. 11(1):146-149.
- Hashem A, Youssef AS, Kandeel K, Abou-Elmagd WS. (2007). Conversion of some 2(3H)-furanones bearing a pyrazolyl group into other heterocyclic systems with a study of their antiviral activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 42(7): 934-939 .
- Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*. 59(2): 205-215.
- Hasturk H, Jones VL, Andry C, Kantarci A. (2007). 1-Tetradecanol complex reduces progression of *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis in rabbits. *Journal of periodontology*. 78(5): 924-932.
- Havsteen BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. 96(2-3): 67-202.
- Hayek SM, Veizi E, Hanes M. (2016). Intrathecal Hydromorphone and Bupivacaine Combination Therapy for Post-Laminectomy Syndrome Optimized with Patient-Activated Bolus Device. *Pain medicine*. 17(3): 561-571.
- He H, Li A, Li S, Tang J, Li L, Xiong L. (2021). Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 134: 111161.
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 44(2): 532-553.
- He M, Liu J, Cheng S, Xing Y, Suo WZ. (2013). Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural regeneration research*. 8(14): 1297-1306.
- Hemmingsen B, Lund SS, Gluud C, Vaag A, Almdal TP, Wetterslev J. (2015). Targeting intensive glycaemic control versus targeting conventional glycaemic control for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (6): CD008143.
- Henderson PJ, Giddens RA. (1977). 2-Deoxy-D-galactose, a substrate for the galactose-transport system of *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*. 168(1): 15-22.
- Henriques JF, Serra D, Dinis TCP, Almeida LM. (2020). The Anti-Neuroinflammatory Role of Anthocyanins and Their Metabolites for the Prevention and Treatment of Brain Disorders. *International journal of molecular sciences*. 21(22): 8653.
- Heurung AR, Raju SI, Warshaw EM. (2014). Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. *Dermatitis*. 25(6): 289-326.
- Higley MJ, Picciotto MR. (2014). Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression. *Current opinion in neurobiology*. 2014. 29: 88-95.

- Hilpold A, Garcia-Jacas N, Vilatersana R, Serna A. (2014). Taxonomical and nomenclatural notes on *Centaurea*: A proposal of classification, a description of new sections and subsections, and a species list of the redefined section *Centaurea*. *Collectanea Botanica*, 33.
- Hilpold A, Garcia-Jacas N, Vilatersana R, Susanna A. (2009). Two additions to the *Jacea-Lepteranthus* complex: Parallel adaptation in the enigmatic species *Centaurea subtilis* and *C. exarata*. *Collectanea Botanica* (Barcelona) 28: 47–58.
- Ho HT, Stevens SC, Terentyeva R, Carnes CA, Terentyev D, Györke S. (2011). Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors. *The Journal of physiology*. 589(19): 4697-708.
- Hinderer W, Seitz HU. (1988). Flavonoids. *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*, 23–48.
- Ho KY, Huang JS, Tsai CC, Lin TC, Hsu YF, Lin CC. (1999). Antioxidant activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 51(9): 1075-1078.
- Hohmann M, Longhi-Balbinot DT, Guazelli CF, Navarro SA, Zarpelon AC, Casagrande R, Arakawa NS, Verri W. (2016). Sesquiterpene Lactones: Structural Diversity and Perspectives as Anti-Inflammatory Molecules. *Studies in natural products chemistry*, 49: 243-264.
- Hollman PCH. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(9): 842–852.
- Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free radical research*. 31(6): 569-573.
- Holzgrabe U, Kapková P, Alptüzün V, Scheiber J, Kugelmann E. (2007). Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert opinion on therapeutic targets*. 11(2): 161-179.
- Hong JY, Chung KS, Shin JS, Park G, Jang YP, Lee KT. (2019). Anti-Colitic Effects of Ethanol Extract of *Persea americana* Mill. through Suppression of Pro- Inflammatory Mediators via NF- κ B/STAT3 Inactivation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(1): 177.
- Horvat D, Šimić G, Drezner G, Lalić A, Ledenčan T, Tucak M, Plavšić H, Andrić L, Zdunić Z. (2020). Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activity of Major Cereal Crops. *Antioxidants* (Basel). 9(6): 527.
- Hosseinimehr SJ, Pourmorad F, Shahabimajid N, Shahrbandy K, Hosseinzadeh R. (2007). In vitro antioxidant activity of *Polygonium hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. *Pakistan journal of biological sciences*. 10(4): 637-640.
- Hosseinzade A, Sadeghi O, Naghdipour Biregani A, Soukhtehzari S, Brandt GS, Esmailzadeh A. (2019). Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Frontiers in immunology*. 10: 51.
- Hostettmann K, Kizu H, Tomimori T. (1982). Molluscicidal properties of various saponins. *Planta medica*. 44(1): 34-35.
- Hrdý J, Súkeníková L, Petrásková P. (2020). Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of *Streptomyces*-A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs? *Microorganisms*. 8(5): 621.
- Hseu YC, Chou CW, Senthil Kumar KJ. (2012). Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food and chemical toxicology*. 50(5): 1245-1255.
- Hu Q, Zhou B, Dang P, Li L, Kong J, Zhang X. (2017). Facile colorimetric assay of alkaline phosphatase activity using Fe(II)-phenanthroline reporter. *Analytica chimica acta*. 950: 170-177.
- Huang Q, Ma W, Xiong G, Deng L, He Y. (2020). The protective effect of Hederagenin on pulmonary fibrosis by regulating the Ras/JNK/NFAT4 axis in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 84(6): 1131-1138.

- Huang W, Hutabarat RP, Chai Z, Zheng T, Zhang W, Li D. (2020). Antioxidant Blueberry Anthocyanins Induce Vasodilation via PI3K/Akt Signaling Pathway in High-Glucose-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *International journal of molecular sciences*. 21(5): 1575.
- Huang S, Braun HP, Gawryluk RMR, Millar AH. (2019). Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling. *the Plant journal : for cell and molecular biology*. 98(3): 405-417.
- Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International journal of biological sciences*. 14(11): 1483-1496.
- Huang L, Lin C, Li A, Wei B, Teng J, Li L. (2010). Pro-coagulant activity of phenolic acids isolated from *Blumea riparia*. *Natural product communications*. 5(8): 1263-1266.
- Huang RY, Yu YL, Cheng WC, OuYang CN, Fu E, Chu CL. (2010). Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *Journal of immunology*. 184(12): 6815-6821.
- Hughes DA. (1999). Effects of carotenoids on human immune function. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58(3): 713-718.
- Hung CH, Chan SH, Chu PM. (2015). Quercetin is a potent antiatherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation. *Molecular Nutrition and Food Research*. 59: 1905-1917.
- 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.
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016: 7432797.
- Hussain L, Ikram J, Rehman K, Tariq M, Ibrahim M, Akash MSH. (2014). Hepatoprotective effects of *Malva sylvestris* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Turkish Journal of Biology*. 38:396-402.
- Iannuzzi C, Borriello M, Irace G, Cammarota M, Di Maro A, Sirangelo I. (2017). Vanillin Affects Amyloid Aggregation and Non-Enzymatic Glycation in Human Insulin. *Scientific Reports*. 7(1): 15086.
- Ibrahim MA, Aliyu AB, Abdullahi H. (2013). Lactone-rich fraction from *Vernonia blumeoides*: antitrypanosomal activity and alleviation of the parasite-induced anemia and organ damage. *Journal of natural medicines*. 67(4): 750-757.
- Idris A, Aliyu AB, Oyewale AO. (2019). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Centaurea senegalensis* growing in Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 23(6): 1087.
- Igarashi K, Ohmuma M. (1995). Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 59(4): 595-601.
- Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. (2015). Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of autoimmunity*. 60: 1-11.
- Ishida S, Hashimoto I, Seike T, Abe Y, Nakaya Y, Nakanishi H. (2014). Serum albumin levels correlate with inflammation rather than nutrition supply in burns patients: a retrospective study. *The Journal of Medical Investigation*. 61(3.4): 361-368.
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free radical biology & medicine*. 30(4): 433-446.
- Ismail SI, Hammouda FM, Rimpler H, Abdallah SM. (1986). Flavonoids and sesquiterpene lactones, constituents of *Centaurea alexanderina*. *Planta medica*. 52: 527.
- Jaakola L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science*. 18(9): 477-483.
- Jahan I, Tona MR, Sharmin S, Sayeed MA, Tania FZ, Paul A, Chy MNU, Rakib A, Emran TB, Simal-Gandara J. (2020). GC-MS Phytochemical Profiling, Pharmacological Properties, and In Silico

- Studies of *Chukrasia velutina* Leaves: A Novel Source for Bioactive Agents. *Molecules*. 25(15): 3536.
- Jalal S, Ahmad B, Zhang T, Guo L, Huang L. (2020). Santamarine: Mechanistic Studies on Multiple Diseases. *Chemical Biology & Drug Design*. 95: 427–434.
- Janda E, Nepveu F, Calamini B, Ferry G, Boutin JA. (2020). Molecular Pharmacology of NRH:Quinone Oxidoreductase 2: A Detoxifying Enzyme Acting as an Undercover Toxicifying Enzyme. *Molecular pharmacology*. 98(5): 620-633.
- Jantrawut P, Phongpradist R, Muller M, Viernstein H. (2017). Enhancement of anti-inflammatory activity of polyphenolic flavonoid rutin by encapsulation. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 30(5):1521-1527.
- Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. (2017). Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*. 8(1): 56.
- Jessen KR. Glial cells. (2004). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36(10): 1861-1867.
- Jhang JJ, Lu CC, Ho CY, Cheng YT, Yen GC. (2015). Protective Effects of Catechin against Monosodium Urate-Induced Inflammation through the Modulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63(33): 7343-7352.
- Jiang L, Lu Y, Jin J, Dong L, Xu F, Chen S, Wang Z, Liang G, Shan X. (2015). n-Butanol extract from *Folium isatidis* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in macrophages and protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Drug design, development and therapy*. 9: 5601-5609.
- Joseph PK, Howard FH, Michael DJ. (2003). Biological Activities and Contents of Scopolin and Scopoletin in Sweetpotato Clones. *Hort science* 38(6):1129-1133.
- Jones HE, Bigelow GE, Preston KL. (1999). Assessment of opioid partial agonist activity with a three-choice hydromorphone dose-discrimination procedure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 289(3): 1350-1361.
- Jones FA. (1996). Herbs--useful plants. Their role in history and today. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 8(12): 1227-1231.
- Joshua M, Okere C, Sylvester O, Yahaya M, Precious O, Dluya T, Um JY, Neksumi M, Boyd J, Vincent-Tyndall J, Choo DW, Gutsaeva DR, Jahng WJ. (2017). Disruption of Angiogenesis by Anthocyanin-Rich Extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *International journal of scientific and engineering research*. 8(2): 299-307.
- Joujeh R, Zaid S, Mona S. (2020). Phytochemical analysis, total phenolic content, hemolytic and antihemolytic activities of *Centaurea iberica* (Asteraceae), *Scientific Journal of King Faisal University*. 35-43.
- Joy KL, Kuttan R. (1999). Anti-diabetic activity of *Picrorrhiza kurroa* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 67(2): 143–148.
- Juang YP, Liang PH. (2020). Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules*. 25(21): 4974.
- Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, Mesquita DDS, Barriga JRM, Dias KCF, Barbosa TM, Vasconcelos LC, Leal LKAM, Ribeiro JE, Vasconcelos SMM. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural product research*. 34(5): 692-705.
- Jugran AK, Rawat S, Devkota HP, Bhatt ID, Rawal RS. (2021). Diabetes and plant-derived natural products: From ethnopharmacological approaches to their potential for modern drug discovery and development. *Phytotherapy Research*. 35: 223-245.
- Jurca T, Baldea I, Filip GA, Olteanu D, Clichici S, Pallag A, Vicaş L, Marian E, Micle O, Crivii CB, Mureşan M. (2020). A Phytocomplex Consisting of *Tropaeolum majus* L. and *Salvia officinalis* L. Extracts Alleviates the Inflammatory Response of Dermal Fibroblasts to Bacterial Lipopolysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020: 8516153.

- Kabouche A, Kabouche Z, Touzani R. (2011). Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*. 46: 966–967.
- Kaczmarek B. (2020). Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials-A Minireview. *Materials (Basel)*. 13(14): 3224.
- Kadela-Tomanek M, Jastrzębska M, Marciniak K, Chrobak E, Bębenek E, Latocha M, Kuśmierz D, Boryczka S. (2021). Design, synthesis and biological activity of 1,4-quinone moiety attached to betulin derivatives as potent DT-diaphorase substrate. *Bioorganic chemistry*. 106: 104478.
- Kah Hui C, Majid NI, Mohd Yusof H, Mohd Zainol K, Mohamad H, Mohd Zin Z. (2020). Catechin profile and hypolipidemic activity of *Morinda citrifolia* leaf water extract. *Heliyon*. 6(6): e04337.
- Kamat V, Santosh R, Poojary B. (2020). Pyridine- and Thiazole-Based Hydrazides with Promising Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities along with Their In Silico Studies. *ACS Omega*. 5(39): 25228-25239.
- Kampinga HH. (2006). Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. *Handbook of experimental pharmacology*. (172): 1-42.
- Kamrath C, Wudy SA, Krone N. (2014). Steroid biochemistry. *Endocrine development*. 27: 41-52.
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T. (2011). Relationship between bone biochemical markers versus glucose/lipid metabolism and atherosclerosis; a longitudinal study in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 92(3): 393-399.
- Kandikattu K, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar K, Rathore SR. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. 1(5): 729-730.
- Kang J, Guo C, Thome R, Yang N, Zhang Y, Li X, Cao X. (2018). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of iridoid glycosides extracted from *Corni fructus*: possible involvement of the PI3K–Akt/PKB signaling pathway. *RSC Advances* 8(53): 30539–30549.
- Kaplancikli ZA, Altintop MD, Turan-Zitouni G, Ozdemir A, Can OD (2012). Synthesis and analgesic activity of some acetamide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 27(2): 275-280.
- Kapoor M, Howard R, Hall I, Appleton I. (2004). Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *The American journal of pathology*. 165(1): 299-307.
- Karamac M. (2009). Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *International journal of molecular sciences*. 10(12): 5485-5497.
- Katsiki N, Ferrannini E. (2020). Anti-inflammatory properties of antidiabetic drugs: A promised land in the COVID-19 era? *Journal of diabetes and its complications*. 34(12): 107723.
- Kayembe JS. (2012) In vitro antimalarial activity of 11 terpenes isolated from *Ocimum gratissimum* and *Cassia alata* leaves. Screening of their binding affinity with haemin. *Journal of plant studies*. 1(2): 34.
- Kedare SB, Singh RP. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*. 48(4): 412-422.
- Khacha-ananda S, Tragoolpua K, Chantawannakul P, Tragoolpua Y. (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 14(11):6991-6995.
- Khan M, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. (2020). Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of epidemiology and global health*. 10(1): 107-111.
- Khanavi M, Rajabi A, Behzad M, Hadjiakhoondi A, Vatandoost H, Abaee MR. (2011). Larvicidal Activity of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana* Against *Anopheles stephensi* Larvae. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 10(4): 829-833.

- 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.
- Kicel A, Olszewska MA. (2015). Evaluation of antioxidant activity, and quantitative estimation of flavonoids, saponins and phenols in crude extract and dry fractions of *Medicago lupulina* aerial parts. *Natural product communications*. 10(3): 483-486.
- Kim SJ, Lee HJ, Kim BS, Lee D, Lee SJ, Yoo SH, Chang HI. (2011). Antiulcer activity of anthocyanins from *Rubus coreanus* via association with regulation of the activity of matrix metalloproteinase-2. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59(21): 11786-11793.
- Kim JH, Pan JH, Cho HT, Kim YJ. (2016). Black Ginseng Extract Counteracts Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice. *PLoS One*. 11(1): e0146843.
- Kim HS, Jang CG, Oh KW, Oh S, Rheu HM, Rhee GS, Seong YH, Park WK. (1998). Effects of ginseng total saponin on morphine-induced hyperactivity and conditioned place preference in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 60(1): 33- 42.
- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 58(1): 17-24.
- Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, Sakanaka M. (2006). Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *British journal of pharmacology*. 148(6): 860-870.
- 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.
- Kilter H, Böhm M. (2008) Cardiac Glycosides. In: Offermanns S, Rosenthal W. (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 58(1): 17-24.
- Kitouni R, Benayache F, Benayache S. (2015). Flavonoids of the Exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chemistry of Natural Compounds*. 51: 762-763.
- Kleemann R, Verschuren L, Morrison M. (2011). Anti-inflammatory, antiproliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis*. 218: 44-52.
- Kobayashi T, Jung SM, Linton NM, Kinoshita R, Hayashi K, Miyama T, Anzai A, Yang Y, Yuan B, Akhmetzhanov AR, Suzuki A, Nishiura H. (2020). Communicating the Risk of Death from Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Journal of clinical medicine*. 9(2): 580.
- Koc S, Isgor BS, Isgor YG, Shomali Moghaddam N, Yildirim O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical biology*. 53(5): 746-751.
- Koca U, Süntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. (2009). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *Journal of ethnopharmacology*. 126(3): 551-556.
- Kocic B, Filipovic S, Nikolic M, Petrovic B. (2011). Effects of anthocyanins and anthocyanin-rich extracts on the risk for cancers of the gastrointestinal tract. *official journal of the balkan union of oncology*. 16(4): 602-608.
- Koczurkiewicz P, Kłaś K, Grabowska K, Piska K, Rogowska K, Wójcik-Pszczola K, Podolak I, Galanty A, Michalik M, Pękala E. (2019). Saponins as chemosensitizing substances that improve effectiveness and selectivity of anticancer drug-Minireview of in vitro studies. *Phytotherapy research*. 33(9): 2141-2151.

- Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, Benayache S. (2012). Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 23(5): 977–983.
- Kooti W, Farokhipour M, Asadzadeh Z, Ashtary-Larky D, Asadi-Samani M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic Physician*. 8(1): 1832–1842.
- Kopecki Z, Cowin AJ. (2016). The Role of Actin Remodelling Proteins in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Wound Healing - New Insights into Ancient Challenges*.
- Köse YB, İşcan G, Göger F, Akalın G, Demirci B, Başer KH. (2016). Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri*: New Species from Turkey. *Chemistry & biodiversity*. 13(10): 1369-1379.
- Kose R, Sogut O, Demir T, Koruk I. (2012). Hemostatic efficacy of folkloric medicinal plant extract in a rat skin bleeding model. *Dermatologic Surgery*. 38(5): 760-766.
- Kostyuk V, Potapovich A, Albuhaydar AR, Mayer W, De Luca C, Korkina L. (2018). Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Research*. 21(2): 91-101
- Kothari V, Galdo JA, Mathews ST. (2016). Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *Journal of inflammation research*. 9: 27-38.
- Koulivand PH, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A. (2013). Lavender and the nervous system. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013: 681304.
- Kruk J, Szymańska R, Nowicka B, Dłużewska J. (2016). Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New biotechnology*. 33(5): 636-643.
- Krzyzaniak LM, Antonelli-Ushirobira TM, Panizzon G, Sereia AL, de Souza JRP, Zequi JAC, Novello CR, Lopes GC, de Medeiros DC, Silva DB, Leite-Mello EVS, de Mello JCP. (2017).
- Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* and Chemical Characterization of the Inflorescences of *Tagetes patula*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2017: 9602368.
- Krzyzanowska A, Avendaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav*. 2012;2(5): 678-697.
- Kubacey TM, Haggag EG, El-Toumy SA, Ahmed AA, El-Ashmawy IM, Youns MM. (2012). Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *Journal of Pharmacy Research*. 5(6): 3352-3361.
- Kumar N, Goel N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 24: e00370.
- Kumar R, Singh Thakur M, Bhardwaj P, Bhardwaj G, Raghuvanshi R. (2017). Chaurasia OPGC-MS Profiling and Bioactivity Study of Trans-Himalayan Plant *Centaurea depressa*. *Der Pharma Chemica*. 9(20): 63-69.
- Kumar S, Pandey AK. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013: 162750.
- Kumar RS, Idhayadhulla A, Nasser AJ, Kavimani S, Indumathy S. (2010). Synthesis and anticonvulsant activity of a new series of 1,4-dihydropyridine derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 72(6): 719-725.
- Kurade MB, Awasthi MK, Govindwar SP, Jeon BH, Kalyani D. (2021). Editorial: Microbiotechnology Tools for Wastewater Cleanup and Organic Solids Reduction. *Frontiers in Microbiology*. 12: 631506.
- Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee Products in Dermatology and Skin Care. (2020). *Molecules*. 25(3): 556.
- Kuś PM, Jerković I, Tuberoso CI, Marijanović Z, Congiu F. (2014). Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. *Food chemistry*. 142: 12-8.
- Kutty KM (1980) Biological function of cholinesterase. *Clinical Biochemistry*. 13(6): 239–243.

- Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. (2017). TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines*. 5(4): 34.
- Kwon JH, Kim SB, Park KH, Lee MW. (2011). Antioxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from the roots of *Ulmus macrocarpa*. *Archives of pharmacal research*. 34(9): 1459-1466.
- Lacaille-Dubois MA, Wagner H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 2(4): 363-386.
- Laddha AP, Kulkarni YA. (2019). Tannins and vascular complications of Diabetes: An update. *Phytomedicine*. 56: 229-245.
- Lafond M, Vidal N, Letourneux Y, Brunel JM. (2010). A comparison of three rapid and accurate bioluminescent antibiotic susceptibility tests. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 61(1): 16-19.
- Lahneche AM, Boucheham R, Ozen T, Altun M, Boubekri N, Demirtas I, Bicha S, Bentamene A, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2019). In vitro antioxidant, DNA-damaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephala*L. *Anais da Academia Brasileira de Ciencia*. 91(3): e20180462.
- Lam RY, Lin ZX, Sviderskaya EV, Cheng CH. (2014). Mechanistic studies of anti-hyperpigmentary compounds: elucidating their inhibitory and regulatory actions. *International journal of molecular sciences*. 15(8): 14649-14668.
- Lan XB, Wang Q, Yang JM, Ma L, Zhang WJ, Zheng P, Sun T, Niu JG, Liu N, Yu JQ. (2019). Neuroprotective effect of Vanillin on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Biomedecine & pharmacotherapie*. 118: 109196.
- Lange BM, Ahkami A. (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes current status and future opportunities. *Plant biotechnology journal*. 11(2):169-196.
- Langenheim JH. (1994). Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of chemical ecology*. 20(6): 1223-1280.
- Lasztity R, Hidvegi M, Bata A. (1998). Saponins in food. *Food Review International*. 14(4): 371-390.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. (2002). Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic β -Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(25): 7220-7225.
- Lee KM, Hwang MK, Lee DE, Lee KW, Lee HJ. (2010). Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(9): 5815-5820.
- Lee MT, Lin WC, Yu B, Lee TT. (2017). Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 30(3): 299-308.
- Lee Y, Im E. (2021). Regulation of miRNAs by Natural Antioxidants in Cardiovascular Diseases: Focus on SIRT1 and eNOS. *Antioxidants* 10(3): 377.
- Lee D, Choi HG, Hwang JH, Shim SH, Kang KS. (2020). Neuroprotective Effect of Tricyclic Pyridine Alkaloids from *Fusarium lateritium* SSF2, against Glutamate-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in the HT22 Hippocampal Neuronal Cell Line. *Antioxidants*. 9(11): 1115.
- Lem DW, Davey PG, Gierhart DL, Rosen RB. (2021). A Systematic Review of Carotenoids in the Management of Age-Related Macular Degeneration. *Antioxidants*. 10(8): 1255.
- Les F, Cásedas G, Gómez C, Moliner C, Valero MS, López V. (2021). The role of anthocyanins as antidiabetic agents: from molecular mechanisms to in vivo and human studies. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 77: 109–131.
- Levy S. (2019). To Combat Diabetes, Native Peoples Rediscover Traditional Plants. *BioScience* 69(9): 689-696.

- Lewandowska J, Bartoszek A. (2011). DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy--multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis*. 26(4): 475-487.
- Li Y, Chen X, Liu H, Luo F, Li G. (2009). [Effects of ginseng total saponins with berberine on plasma brain natriuretic peptide and Ca²⁺ concentration in experimental rats with chronic congestive heart failure]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 34(3): 324-327.
- Li Q, Song J, Peng S, Wang JP, Qu GZ, Sederoff RR, Chiang VL. (2014). Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. *Plant Biotechnol Journal*. 12(9): 1174-1192.
- Li DL, Zheng X, Chen YC, Jiang S, Zhang Y, Zhang WM, Wang HQ, Du ZY, Zhang K. (2016). Terpenoid composition and the anticancer activity of *Acanthopanax trifoliatum*. *Archives of pharmacal research*. 39(1): 51-58.
- Li H, Yao Y, Li L. (2017) Coumarins as potential antidiabetic agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 69(10): 1253-1264.
- Li Q, Hu X, Xuan Y, Ying J, Fei Y, Rong J, Zhang Y, Zhang J, Liu C, Liu Z. (2018). Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 50(3): 246-253.
- Li C, Hu M, Jiang S, Liang Z, Wang J, Liu Z. (2020). Evaluation Procoagulant Activity and Mechanism of Astragalin. *Molecules*. 25(1): 177.
- Liao Y, Yang X. (2010). Absorption and transportation characteristic of alkaloids from herba ephedra in model of Caco-2 cells monolayer. 35(22): 3010-3015.
- Lin C, Ear J, Pavlova Y. (2011). Tyrosine phosphorylation of the Gα-interacting protein GIV promotes activation of phosphoinositide 3-kinase during cell migration. *Science signaling*. 4(192): ra64.
- Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, Borutaite V. (2016). Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. *Pharmacological research*. 113(Pt B): 808-815.
- Lindler BN, Long KE, Taylor NA, Lei W. (2020). Use of Herbal Medications for Treatment of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Medicines*. 7(11): 67.
- Liu-Smith F, Meyskens FL. (2016). Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Molecular Nutrition and Food Research*. 60(6): 1264-1274.
- Liu Q, Pan R, Ding L, Zhang F, Hu L, Ding B. (2017). Rutin exhibits hepatoprotective effects in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease by reducing hepatic lipid levels and mitigating lipid-induced oxidative injuries. *International Immunopharmacology*. 49: 132-141.
- Liu J, Wang J, Lee S, Wen R. (2018). Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. *PLoS One*. 13(9): e0203612.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. (2010). *Pharmacognosy reviews*. 4(8):118-126.
- Lonergan G, Routsis E, Georgiadis T, Agelis G, Hondrelis J, Matsoukas J, Larsen LK, Caplan FR. (1992). Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *Journal of natural products*. 55(2): 225-228.
- López-Rodríguez M, P García V, Zater H, Benayache S, Benayache F. Cynaratriol. (2009). a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Structure reports online*. 65(8): 1867-1868.
- Lopez-Sanchez I, Dunkel Y, Roh YS. (2014). GIV/Girdin is a central hub for profibrogenic signalling networks during liver fibrosis. *Nature communications*. 5: 4451.
- Lown JW. The mechanism of action of quinone antibiotics. (1983). *Molecular and cellular biochemistry*. 55(1): 17-40.
- Lu TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC, Peng WH. (2007). Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycyne tomentella* root in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 113(1): 142-148.

- Lu JJ, Bao JL, Wu GS, Xu WS, Huang MQ, Chen XP, Wang YT. (2013). Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 13(3): 456-463.
- Lu G, Luo X, Liu Z, Yang L, Lin C, Xu M. (2019). Protective effect of vanillin in streptozotocin-induced diabetes in neonatal rats via attenuation of oxidative stress and inflammation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 18(2): 349-355.
- Lucas L, Russell A, Keast R. (2011). Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current pharmaceutical design*. 17(8): 754-768.
- Lum Nde A, Chukwuma CI, Erukainure OL, Chukwuma MS, Matsabisa MG. (2021). Ethnobotanical, phytochemical, toxicology and anti-diabetic potential of *Senna occidentalis* (L.) link; A review. *Journal of ethnopharmacology*. 283: 114663.
- Lutz M, Fuentes E, Ávila F, Alarcón M, Palomo I. (2019). Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 24(2): 366.
- Lv J, Liu F. (2017). The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 11: 74.
- Maataoui BS, Hunyeur A, Hilalis S. (2006). Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Lebanese Science Journal*. 7(1): 3-8.
- Mabberley DJ. (1987). *The Plant Book*. Cambridge University Press.
- Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. (2013). Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. *International Journal of Molecular Medicine*. 32(1): 235-240.
- Maggio A, Riccobono L, Bancheva S, Bruno M, Senatore F. (2014). Chemical composition of the essential oil of the local endemics *Centaurea davidovii* and *C. parilica* (Asteraceae, sect. *Lepteranthus*) from Bulgaria. *Natural product communications*. 9(9): 1373-1376.
- Mahadeo K, Grondin I, Kodja H, Soulange Govinden J, Jhaumeer Laulloo S, Frederich M, Gauvin-Bialecki A. (2018). The genus *Psiadia*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*. 210: 48-68.
- Makkar, HPS. (2003). Measurement of Total Phenolics and Tannins Using Folin-Ciocalteu Method. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. 49–51.
- Makonnen E, Debella A, Zerihun L, Abebe D, Teka F. (2003). Antipyretic properties of the aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Ocimum suave* and *Ocimum lamiifolium* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 85-91.
- Manga HM, Brkic D, Marie DE, Quetin-Leclercq J. (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 92:209–214.
- Mansur JDS, Breder MNR, Mansur MCDA. (1986). Determinação Do Fator De Proteção Solar Por Espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 61: 121–124.
- Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, Ten Cate H, Mullier F. (2016). Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis journal*. 14: 49.
- Marks DM, Shah MJ, Patkar AA, Masand PS, Park GY, Pae CU. (2009). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for pain control: premise and promise. *Current Neuropharmacology*. 7(4): 331-336.
- Marrassini C, Peralta I, Anesini C. (2018). Comparative study of the polyphenol content-related anti-inflammatory and antioxidant activities of two *Urera aurantiaca* specimens from different geographical areas. *Chinese Medicine* 13(1): 22.
- Marrelli M, Conforti F, Araniti F, Statti GA. (2016). Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in the Treatment of Obesity. *Molecules*. 21(10): 1404.

- Martin E, Dinç M, Duran A. (2009). Karyomorphological study of eight *Centaurea L.* taxa (Asteraceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany*. 33: 97-104.
- Martínez J, Marmisolle I, Tarallo D, Quijano C. (2020). Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes. *Frontiers in endocrinology*. 11: 319.
- Martínez JL, Meza E, Petranovic D, Nielsen J. (2016). The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*. 3: 205-210.
- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 47: 224-229.
- Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, Tresoldi I, Pluchinotta FR, Bergante S. (2017). Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients*. 9(5): 523.
- Mead MN. (2008). Benefits of sunlight: a bright spot for human health. *Environmental Health Perspectives*. 116(4): A160-A167.
- McArthur JR, Finol-Urdaneta RK, Adams DJ. (2019). Analgesic transient receptor potential vanilloid-1-active compounds inhibit native and recombinant T-type calcium channels. *British journal of pharmacology*. 176(13): 2264-2278.
- McCusker MM, Durrani K, Payette MJ, Suchecki J. (2016). An eye on nutrition: The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clinics in dermatology*. 34(2): 276-285.
- Medeiros-Neves B, Teixeira HF, von Poser GL. (2018). The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) - A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of ethnopharmacology*. 224: 451-464.
- Medicherla S, Wadsworth S, Cullen B, Silcock D, Ma JY, Mangadu R, Kerr I, Chakravarty S, Luedtke GL, Dugar S, Protter AA, Higgins LS. (2009). p38 MAPK inhibition reduces diabetes-induced impairment of wound healing. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity*. 2:91-100.
- Medjroubi K, Benayache F, Benayache S, Akkal S, Kaabeche M, Tillequin F, Seguin E. (1998). Eudesmanolide from *Centaurea granata*. *Phytochemistry*. 49(8): 2425–2427.
- Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. (2005). Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*. 76(7-8): 744-746.
- Mehta JP, Parmar PH, Vadia SH, Patel MK, Tripathi CB. (2017). In-vitro antioxidant and in-vivo anti-inflammatory activities of aerial parts of *Cassia* species. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: S1654–S1662.
- Melrose J. (2019). The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. *Biomedicines*, 7(3): 62.
- Melo-Silveira RF, Fidelis GP, Viana RL, Soeiro VC, Silva RA, Machado D, Costa LS, Ferreira CV, Oliveira Rocha HA. (2014). Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: corn cobs. *Molecules*. 19(4): 5360-5378.
- Mendes LF, Gaspar VM, Conde TA, Mano JF, Duarte IF. (2019). Flavonoid-mediated immunomodulation of human macrophages involves key metabolites and metabolic pathways. *Scientific reports*. 9(1): 14906.
- Mengie T, Mequanente S, Nigussie D, Legesse B, Makonnen E. (2021). Investigation of Wound Healing and Anti-Inflammatory Activities of Solvent Fractions of 80% Methanol Leaf Extract of *Achyranthes aspera L.* (Amaranthaceae) in Rats. *Journal of inflammation research*. 14: 1775-1787.
- 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.
- Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, Sprink T. (2019). DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Frontiers in plant science*. 9: 1957.

- Michel CC, Phillips ME. (1987). Steady-state fluid filtration at different capillary pressures in perfused frog mesenteric capillaries. *Journal of Physiology*. 388: 421-435.
- Michel P. (1996). Effets des composts volatils générés par irradiation du polyéthylène sur une flore microbienne alimentaire. *Maitrise en microbiologie appliquée*. Université du québec.
- Michel J, Abd Rani NZ, Husain K. (2020). A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in pharmacology*. 11: 852.
- Mikheeva LM, Grinberg NV, Grinberg VYa, Tolstoguzov VB. (1998). Effect of thermal denaturation on vanillin binding to some food proteins. *Die Nahrung*, 42(3-4): 185-186.
- Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British journal of pharmacology*. 174(11): 1290-1324.
- Milosević T, Argyropoulou C, Solujić S, Murat-Spahić D, Skaltsa H. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*. *Natural product communications*. 5(10): 1663-1668.
- 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.
- Min SW, Kim NJ, Baek NI, Kim DH. (2009). Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 125(3): 497-500.
- Miltonprabu S, Tomczyk M, Skalicka-Woźniak K, Rastrelli L, Daglia M, Nabavi SF, Alavian SM, Nabavi SM. (2017). Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology*. 108(Pt B): 365-374.
- Mogensen TH. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 22(2): 240-273.
- Mohamed SM, Hassan EM, Ibrahim NA. (2010). Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Natural product research*. 24(15): 1395-1402.
- Molaei E, Molaei A, Abedi F, Hayes AW, Karimi G. (2021). Nephroprotective activity of natural products against chemical toxicants: The role of Nrf2/ARE signaling pathway. *Food science & nutrition*. 9(6): 3362-3384.
- Monjane J, Capusiri D, Giménez, Sterner O. (2018). Leishmanicidal activity of onopordopicrin isolated from the leaves of *Brachylaena discolor*.
- Monika P, Geetha A. (2015). The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin-A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *Phytomedicine*. 22(10): 939-945.
- Moodley R, Koorbanally NA, Shahidul Islam M, Jonnalagadda SB. (2014). Structure and antioxidant activity of phenolic compounds isolated from the edible fruits and stem bark of *Harpephyllum caffrum*. *Journal of environmental science and health*. 49(12): 938-944.
- Moradi M, Mojab F, Arbabi Bidgoli S. (2017). Toxicity Assessment of Asteraceae *Centaurea Repens* L Extract in Mice. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 16(3): 1071-1079.
- Morrone F, Sita G, Graziosi A, Turrini E, Fimognari C, Tarozzi A, Hrelia P. (2018). Neuroprotective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in A Mouse Model of Alzheimer's Disease Involves Nrf2/HO-1 Pathway. *Aging and disease*. 9(4): 605-622.
- Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 49(6): 439-462.

- Mottaghipisheh J, Ayanmanesh M, Babadaye-Samani R, Javid A, Sanaeifard M, Vitalini S, Iriti M. (2018). Total anthocyanin, flavonoid, polyphenol and tannin contents of seven pomegranate cultivars grown in Iran. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. 17(3): 211-217.
- Mouffok S, Haba H, Lavaud C, Long C, Benkhaled M. (2012). Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss . & Durieu ex Batt . & Trab. *Records of Natural Products*. 6(3): 292-295.
- Mráz, P, Garcia-Jacas N, Gex-Fabry E, Susanna A, Barres L, Müller-Schärer H (2012). Allopolyploid origin of highly invasive *Centaurea stoebe* s. l. (Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 612–623.
- Muhammad N, Saeed M, Khan, H. (2012). Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1).
- Munteanu IG, Apetrei C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International journal of molecular sciences*. 22(7): 3380.
- Murray A, Hagen NA. Hydromorphone. (2005). *Journal of pain and symptom management*. 29: S57-S66.
- Nabavi SF, Thiagarajan R, Rastrelli L, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Alinezhad H, Nabavi SM. (2015). Curcumin: a natural product for diabetes and its complications. *Current topics in medicinal chemistry*. 15(23): 2445-2455.
- 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.
- 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.
- Nadkarni AK. (1954). *Indian Materia Medica*, I. Bombay, Popular Book Department, 1954.
- 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.
- Naidoo Y, Sadashiva CT, Kasim N, Nicholas A, Naidoo G. (2014). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ocimum obovatum* E. Mey. Ex Benth. (Lamiaceae). *Journal of essential oil-bearing plants*. 17(1): 142-147.
- 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: 79.
- Nagai N, Kotani S, Mano Y, Ueno A, Ito Y, Kitaba T, Takata T, Fujii N. (2017). Ferulic Acid Suppresses Amyloid β Production in the Human Lens Epithelial Cell Stimulated with Hydrogen Peroxide. *BioMed research international*. 2017: 5343010.
- Naseri N, Kalantar K, Amirghofran Z. (2018). Anti-inflammatory activity of *Echium amoenum* extract on macrophages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. *Research in pharmaceutical sciences*. 13(1): 73-81.
- Navale AM, Paranjape AN. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*. 8(1): 5-9.
- Navani DM, Yoburn BC. (2013). In vivo activity of norhydrocodone: an active metabolite of hydrocodone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 347(2): 497-505.
- Nascimento NC, Fett-Neto AG. (2010). Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. *Methods in molecular biology*. 643: 1-13.
- Nasr FA, Shahat AA, Alqahtani AS, Ahmed MZ, Qamar W, Al-Mishari AA, Almoqbil AN. (2020). *Centaurea bruguierana* inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest, and induces apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Molecular biology reports*. 47(8): 6043-6051.
- Neradil J, Veselská R, Slanina J. (2003). UVC-protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells in vitro. *Folia Biologica*. 49(5): 197-202.

- Netcharoensirisuk P, Abrahamian C, Tang R, Chen CC, Rosato AS, Beyers W. (2021). Flavonoids increase melanin production and reduce proliferation, migration and invasion of melanoma cells by blocking endolysosomal/melanosomal TPC2. *Scientific Reports*. 11(1): 8515.
- Newman DJ, Cragg GM, Kingston DGI. (2003). Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 91-109.
- Nikolaidis A, Andreadis M, Moschakis T. (2017). Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra. *Food chemistry*. 232: 425-433.
- Nishizawa H, Matsumoto M, Chen G, Ishii Y, Tada K, Onodera M, Kato H, Muto A, Tanaka K, Igarashi K. (2021). Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell death & disease*. 12(4): 332.
- Nogueira CR, Lopes LMX. (2011). Antiplasmodial Natural Products. *Molecules*. 16(12): 2146-2190.
- Oh SJ, Kim K, Lim CJ. (2016). Photoprotective properties of 20(S)-protopanaxatriol, an aglycone of ginseng saponins: Protection from ultraviolet-B radiation-induced oxidative stress in human epidermal keratinocytes. *Molecular medicine reports*. 14(3): 2839-4285.
- Okonogi T, Hattori Z, Ogiso A, Mitsui S. (1979) Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 17(5): 524-527.
- Okuda T, Ito H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*. 16(3): 2191-2217.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). (2008). «Test no. 425: toxicité orale aiguë: procédure de haut en bas », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. 4: 1-2.
- Ortiz J, Soto J, Fuentes A, Herrera H, Meneses C, Arriagada C. (2019). The Endophytic Fungus *Chaetomium cupreum* Regulates Expression of Genes Involved in the Tolerance to Metals and Plant Growth Promotion in *Eucalyptus globulus* Roots. *Microorganisms*. 7(11): 490.
- Osama M, Ikram R. (2018). Aqua distillation enhances the analgesic and anti-inflammatory properties of *Rosa damascena* mill ; a pilot study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(12): 5344-5349.
- Osman NI, Sidik NJ, Awal A, Adam NA, Rezali NI. (2016). In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *Journal of intercultural ethnopharmacology*. 5(4): 343-349.
- Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Current opinion in supportive and palliative care*. 8(2):143-151.
- Osuocha KU, Iwueke AV, Chukwu EC. (2020). Phytochemical profiling, body weight effect and anti-hypercholesterolemia potentials of *Cnidioscolus aconitifolius* leaf extracts in male albino rat. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 12(2): 19-27.
- Ota A, Ulrich NP. (2017). An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. *Frontiers in pharmacology*. 8(14): 436.
- Ötles S, Kartal C. (2016). Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. 15(1): 5-15.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- Özcan K (2019). Determination of biological activity of *Carduus lanuginosus*: an endemic plant in Turkey. *International Journal of Environmental Health Research*. 1-9.
- Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. (2007). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascular pharmacology*. 47(2-3): 108-112.

- Paczula A, Więcek A, Piecha G. (2016). The role of endogenous cardiogenic steroids in pathogenesis of cardiovascular and renal complications of arterial hypertension. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 70(2): 243-250.
- Palmieri B, Vadalà M, Laurino C. (2017). Review of the molecular mechanisms in wound healing: new therapeutic targets? *Journal of wound care*. 26(12): 765-775.
- Panaro MA, Carofiglio V, Acquafredda A, Cavallo P, Cianciulli A. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *The British journal of nutrition*. 108(9): 1623-1632.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 5(1): e47.
- Panda SK, Luyten W. (2018). Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite*. 25(3): 10.
- Park HJ. (2018). Anabolic steroid-induced hypogonadism: a challenge for clinicians. *Journal of exercise rehabilitation*. 2018;14(1): 2-3.
- Park YR, Sultan MT, Park HJ, Lee JM, Ju HW, Lee OJ, Lee DJ, Kaplan DL, Park CH. (2018). NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta biomaterialia*. 67:183-195.
- Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *Methods in molecular biology*. 610: 403-417.
- Patai S, Rappoport Z. (1988). *The Quinonoid Compounds*. ed. 1.
- Patel S. (2016). Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomed Pharmacother*. 84: 1036-1041.
- Patil MV, Patil DA. (2006). *Ethnobotany of Nasik District*. New Delhi, Maharashtra. Daya books.
- Patočka J, Nepovimova E, Wu W, Kuca K. (2020). Digoxin: Pharmacology and toxicology-A review. *Environmental toxicology and pharmacology*. 79: 103400.
- Payne AC, Mazzer A, Clarkson GJ, Taylor G. (2013). Antioxidant assays - consistent findings from FRAP and ORAC reveal a negative impact of organic cultivation on antioxidant potential in spinach but not watercress or rocket leaves. *Food science & nutrition*. 1(6):439-444.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2): 89-96.
- Phan HTT, Samarat K, Takamura Y, Azo-Oussou AF, Nakazono Y, Vestergaard MC. (2019). Polyphenols Modulate Alzheimer's Amyloid Beta Aggregation in a Structure-Dependent Manner. *Nutrients*. 11(4): 756.
- Peltzer K, Pengpid S. (2019). The use of herbal medicines among chronic disease patients in Thailand: a cross-sectional survey. *Journal of multidisciplinary healthcare*. 12: 573-582.
- Peng Y, Jian Y, Zulfiqar A, Li B, Zhang K, Long F, Peng C, Cai X, Khan IA, Wang W. (2017). Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*. *Natural product research*. 31(19): 2211-2217.
- Penissi AB, Rudolph MI, Piezzi RS. (2003). Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. *Biocell*. 27(2):163-172.
- Peres DD, Sarruf FD, de Oliveira CA, Velasco MVR, Baby AR. (2018). Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 185: 46-49.
- Pérez-Alvarez V, Bobadilla RA, Muriel P. (2001). Structure-hepatoprotective activity relationship of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) derivatives. *Journal of applied toxicology*. 21(6): 527-531.
- Pervaiz T, Songtao J, Faghihi F, Haider MS, Fang J. (2017). Naturally Occurring Anthocyanin, Structure, Functions and Biosynthetic Pathway in Fruit Plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 05(02).
- 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.

- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. (1997). Different embryotoxic effect of vitamin A and B-carotene detected in the chick embryo. *Acta chirurgiae plasticae*. 39(3):91-96.
- Petropoulos S, Fernandes Â, Dias MI, Pereira C, Calhella RC, Chrysargyris A, Tzortzakis N, Ivanov M, D Sokovic M, Barros L, Ferreira ICFR. (2020). Chemical Composition and Plant Growth of *Centaurea raphanina* subsp. *mixta* Plants Cultivated under Saline Conditions. *Molecules*. 25(9): 2204.
- Petruk G, Del Giudice R, Rigano MM, Monti DM. (2018). Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 1454936.
- Peungvicha P, Temsiririrkkul R, Prasain JK, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapan SS, Watanabe H. (1998). 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *Journal of Ethnopharmacology*. 62(1): 79-84.
- Peyrot des Gachons C, Breslin PA. (2016). Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. *Current diabetes reports*. 16(10): 102.
- Pieczykolan A, Pietrzak W, Gawlik-Dziki U, Nowak R. (2021). Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Diabetic Activity of Phenolic Acids Fractions Obtained from *Aerva lanata* (L.) Juss. *Molecules*. 26(12): 3486.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. (2000). *Journal of natural products*. 63(7): 1035-1042.
- Pirvu L, Bubueanu C, Panteli M, Petcu L, Coprean D. (2015). *Centaurea cyanus* L. Polysaccharides and Polyphenols Cooperation in Achieving Strong Rat Gastric Ulcer Protection. *Central European Journal of Chemistry*. 13(1): 910-921.
- Pilc EM, Ganesh S, Kerscher O. (2021). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies Tannic Acid-sensitive mutants. *Micro Publication Biology*. 2021(9): 10.
- Pizzi A. (2019). Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. *Biomolecules*. 9(8): 344.
- Pohl F, Kong Thoo Lin P. (2018). The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. *Molecules*. 23(12): 3283.
- Pollini M, Paladini F. (2020). Bioinspired Materials for Wound Healing Application: The Potential of Silk Fibroin. *Materials*. 13(15): 3361.
- Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Litinas K, Geromichalos G. (2014). Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies. *Molecules*. 19(7): 9655-9674.
- Prassas I, Diamandis EP. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7(11): 926–935.
- Pretorius JC. (2003). Flavonoids: A Review of Its Commercial Application Potential as Anti- Infective Agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2(4): 335–353.
- Proestos C. (2020). The Benefits of Plant Extracts for Human Health. *Foods*. 9(11): 1653.
- Pusceddu M, Floris I, Mangia NP, Angioni A, Satta A. (2021). In Vitro Activity of Several Essential Oils Extracted from Aromatic Plants against *Ascosphaera apis*. *Veterinary sciences*. 8(5): 80.
- Qian L, Su H, Wang G, Li B, Shen G, Gao Q. (2020). Anti-tumor Activity of Bufalin by Inhibiting c-MET Mediated MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling Pathways in Gallbladder Cancer. *Journal of Cancer*. 11(11): 3114-3123.
- Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, Wang XJ. (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese journal of natural medicines*. 12(6): 401-406.
- Quezel P, Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. 2ème édition, CNRS. Paris. 1023-1024.
- Rahman MM, Ahmad SH, Mohamed MT, Ab Rahman MZ. (2014). Antimicrobial Compounds from Leaf Extracts of *Jatropha curcas*, *Psidium guajava*, and *Andrographis paniculata*. *The Scientific World Journal*. 2014: 1-8.
- Rajasekar N, Sivanantham A, Ravikumar V, Rajasekaran S. (2021). An overview on the role of plant-derived tannins for the treatment of lung cancer. *Phytochemistry*. 188: 112799.

- Rajoo A, Ramanathan S, Mansor SM, Sasidharan S. (2021). Formulation and evaluation of wound healing activity of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in a *Staphylococcus aureus* infected Sprague Dawley rat model. *Journal of Ethnopharmacology*. 266: 113414.
- Rani P, Pal D, Hegde RR, Hashim SR. (2014). Anticancer, anti-inflammatory, and analgesic activities of synthesized 2-(substituted phenoxy) acetamide derivatives. *BioMed Research International*. 2014: 386473.
- Rathelot P, Azas N, El-Kashef H. (2002). 1,3-Diphenylpyrazoles: synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. *European journal of medicinal chemistry*. 37(8): 671-679.
- Reyes-Vallejo L. Current use and abuse of anabolic steroids. (2020). *Actas urológicas españolas*. 44(5): 309-313.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*. 26(9-10): 1231-1237.
- Rebas E, Rzaiew J, Radzik T, Zylinska L. (2020). Neuroprotective Polyphenols: A Modulatory Action on Neurotransmitter Pathways. *Current neuropharmacology*. 18(5): 431-445.
- Reid WV, Ali MK, Field CB. (2020). The future of bioenergy. *Global change biology*. 26(1): 274-286.
- Relja B, Land WG. (2020). Damage-associated molecular patterns in trauma. *European journal of trauma and emergency surgery*. 46(4): 751-775.
- Ren Y, Wu S, Burdette JE, Cheng X, Kinghorn AD. (2021). Structural Insights into the Interactions of Digoxin and Na⁺/K⁺-ATPase and Other Targets for the Inhibition of Cancer Cell Proliferation. *Molecules*. 26(12): 3672.
- Requena J, López-Pujol J, Carnicero P. (2020). The *Centaurea alba* complex in the Iberian Peninsula: gene flow, introgression, and blurred genetic boundaries. *Plant Systematics and Evolution*. 306 : 43.
- Rezende TP, do A Corrêa JO, Aarestrup BJ, Aarestrup FM, de Sousa OV, da Silva Filho AA. (2014). Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. *Molecules*. 19(7): 9257-9272.
- Richter EA, Hargreaves M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological reviews*. 93(3): 993-1017.
- Rimac H, Dufour C, Debeljak Ž, Zorc B, Bojić M. (2017). Warfarin and Flavonoids Do Not Share the Same Binding Region in Binding to the IIA Subdomain of Human Serum Albumin. *Molecules*. 22(7): 1153.
- Rivera P, Villaseñor JL, Terrazas T. (2017). Meso- or xeromorphic? Foliar characters of Asteraceae in a xeric scrub of Mexico. *Botanical studies*. 58(1): 12.
- Robertson RP, Harmon JS. (2007). Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letter*. 581(19): 3743-3748.
- Rocha S, Ribeiro D, Fernandes E, Freitas M. (2020). A Systematic Review on Anti-diabetic Properties of Chalcones. *Current medicinal chemistry*. 27: 2257-2321.
- Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*. 48(3): e219.
- Rodrigues E, Mariutti LR, Mercadante AZ. (2013). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of agricultural and food chemistry*. (12):3022-3029.
- Rodrigo G, Almanza G, Åkesson B, Duan R. (2010). Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4: 2204-2210.
- Rogozkin V. Metabolic effects of anabolic steroid on skeletal muscle. (1979). *Medicine and science in sports*. 11(2): 160-163.
- Rosenblat M, Volkova N, Aviram M. (2015). Selective oxidative stress and cholesterol metabolism in lipid-metabolizing cell classes: Distinct regulatory roles for pro-oxidants and antioxidants. *Biofactors*. 41(4): 273-288.

- Roy CK, Kamath JV, Asad M. (2006). Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Indian journal of experimental biology*. 44(4): 305-311.
- Rusak G, Krajacić M, Plese N. (1997). Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antiviral research*. 36(2): 125-129.
- Saad B, Azaizeh H, Said O. (2005). Tradition and perspectives of arab herbal medicine: a review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2(4): 475-479.
- Saewan N, Jimtaisong A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 14(1): 47-63.
- Sajjadi ST, Saboor A, Mohammadi P. (2016). Comparison of aglycon and glycosidic saponin extracts of *Cyclamen coum* tuber against *Candida* spp. *Current medical mycology*. 2(2): 40-44.
- Saklani A, Hegde B, Mishra P, Singh R, Mendon M, Chakrabarty D, Kamath DV, Lobo A, Mishra PD, Dagia NM, Padigaru M, Kulkarni-Almeida AA. (2012). NF- κ B dependent anti-inflammatory activity of chlorojanerin isolated from *Saussurea heteromalla*. *Phytomedicine*. 19(11): 988-997.
- Salazar-Gómez A, Ontiveros-Rodríguez JC, Pablo-Pérez SS, Vargas-Díaz ME, Garduño-Siciliano L. (2020). The potential role of sesquiterpene lactones isolated from medicinal plants in the treatment of the metabolic syndrome - A review. *South African journal of botany*. 135: 240-251.
- Sal'nikova SI, Dorogovoz SM, Slyshkov VV, Guzhva NN. (1989). Gepatozashchitnaia aktivnost' analogov korichnoĭ kisloty [Hepatoprotective activity of analogs of cinnamic acid]. *Farmakologiya i toksikologiya*. 52(3): 77-80.
- Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Lucarini M, Santini Souto EB, Novellino E, Antolak H, Azzini E, Setzer WN, Martins N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International journal of molecular sciences*. 20(6): 1305.
- Salim S. (2007). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 360(1): 201-205.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria*. 329: 19-28.
- Santosh Kumar S, Priyadarsini KI, Sainis KB. (2002). Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Report*. 7(1): 35-40.
- Sandjo LP, Kuete V. (2013). Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa* 4: 135-202.
- Santamarina AB, Pisani LP, Baker EJ, Marat AD, Valenzuela CA, Miles EA, Calder PC. (2021). Anti-inflammatory effects of oleic acid and the anthocyanin keracyanin alone and in combination: effects on monocyte and macrophage responses and the NF- κ B pathway. *Food & function*. 12(17): 7909-7922.
- Sanz A, Stefanatos RK. (2008). The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Current aging science*. 1(1): 10-21.
- Sarker U, Oba S. (2020). Phenolic profiles and antioxidant activities in selected drought-tolerant leafy vegetable amaranth. *Scientific Reports*. 10: 18287.
- Sauer L, Li B, Bernstein PS. (2019). Ocular Carotenoid Status in Health and Disease. *Annual review of nutrition*. 39: 95-120.
- Sawant RL, Wadekar JB, Kharat SB, Makasare HS. (2018). Targeting PPAR- γ to design and synthesize antidiabetic thiazolidines. *EXCLI journal*. 17: 598-607.
- Sayre RM, Agin PP, LeVee GJ, Marlowe E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochem Photobiol*. 29(3): 559-566.
- Seager R, Lee L, Henley JM, Wilkinson KA. (2020). Mechanisms and roles of mitochondrial localisation and dynamics in neuronal function. *Neuronal signaling*. 4(2): NS20200008.
- Schijvens AM, Ter Heine R, de Wildt SN, Schreuder MF. (2019). Pharmacology and pharmacogenetics of prednisone and prednisolone in patients with nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology*. 34(3): 389-403.

- Schmidt CA, Murillo R, Bruhn T, Bringmann G, Goettert M, Heinzmann B, Merfort I. (2010). Catechin Derivatives from *Parapiptadenia rigidawithin* *Vitro*Wound-Healing Properties. *Journal of Natural Products*, 73(12): 2035-2041.
- Schulze RJ, Schott MB, Casey CA, Tuma PL, McNiven MA. (2019). The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *The Journal of cell biology*. 218(7): 2096-2112.
- Shah K, Verma RJ. (2012). Protection against butyl p-hydroxybenzoic acid induced oxidative stress by *Ocimum sanctum* extract in mice liver. *Acta poloniae pharmaceutica*. 69(5): 865-870.
- 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.
- Shamni O, Cohen G, Gruzman A. (2017). Regulation of GLUT4 activity in myotubes by 3-O-methyl-d-glucose. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. 1859(10): 1900-1910.
- Sharma AL, Bhot MA, Chandra N. (2014). Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.). *Kurz. Ancient science of life*. 33(4): 252- 258.
- Shehab WS, Ghoneim AA. (2016). Synthesis and biological activities of some fused pyran derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*. 9(2): S966-S970.
- Sharonova N, Nikitin E, Terenzhev D, Lyubina A, Amerhanova S, Bushmeleva K, Rakhmaeva A, Fitsev I, 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(2): 1279.
- Shen Y, Chen BL, Zhang QX, Zheng YZ, Fu Q. (2019). Traditional uses, secondary metabolites, and pharmacology of *Celastrus* species - a review. *J Ethnopharmacol*. 241:111934.
- Shi YC, Liao JW, Pan TM. (2011). Antihypertriglyceridemia and anti-inflammatory activities of monascus-fermented *dioscorea* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research*. 2011(39): 710635.
- Semaming Y, Pannengpetch P, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. (2015). Pharmacological properties of protocatechuic Acid and its potential roles as complementary medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2015(17): 593902.
- Sen T, Samanta SK. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 147(4): 59-110.
- Shahidi F, Yeo J. (2018). Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *International journal of molecular sciences*. 19(6): 1573.
- 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.
- Shi H, Noguchi N, Niki E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in enzymology*. 335: 157-66.
- Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H. (2014). Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives inter-laboratory evaluation study. *The international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 30(7): 717-721.
- Shui G, Leong LP. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*. 97(2): 277-284.
- Sieberi BM, Omwenga GI, Wambua RK, Samoei JC, Ngugi MP. (2020). Screening of the Dichloromethane: Methanolic Extract of *Centella asiatica* for Antibacterial Activities against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *Scientific World Journal*. 2020: 6378712.
- Silva AR, Grosso C, Delerue-Matos C, Rocha JM. (2019). Comprehensive review on the interaction between natural compounds and brain receptors: Benefits and toxicity. *European journal of medicinal chemistry*.

- Silva FL, Fischer DC, Tavares JF, Silva MS, de Athayde-Filho PF, Barbosa-Filho JM. (2011). Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules*. 16(2): 1070-1102.
- Silvestre CI, Santos JL, Lima JL, Zagatto EA. (2009). Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Analytica chimica acta*. 652(1-2): 54-65.
- Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. (2018). The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 28(8): 643-661.
- Siswadi S, and Saragih GS. (2021). Phytochemical analysis of bioactive compounds in ethanolic extract of *Sterculia quadrifida* R.Br. *AIP Conference Proceedings*. 2353(1): 030098.
- Smith FM, Haskelberg H, Tracey DJ, Moalem-Taylor G. (2007). Role of histamine H3 and H4 receptors in mechanical hyperalgesia following peripheral nerve injury. *Neuroimmunomodulation*. 14(6): 317-325.
- Sobeh M, Mahmoud MF, Hasan RA, Abdelfattah MAO, Sabry OM, Ghareeb MA, El-Shazly AM, Wink M. (2018). Tannin-rich extracts from *Lanea stuhlmannii* and *Lanea humilis* (Anacardiaceae) exhibit hepatoprotective activities in vivo via enhancement of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Scientific reports*. 8(1): 9343.
- Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 10(5): 210-229.
- Soković M, Skaltsa H, Ferreira ICFR. (2019). Editorial: Bioactive Phytochemicals in Asteraceae: Structure, Function, and Biological Activity. *Frontiers in plant science*. 10: 1464.
- Sokovic M, Barros L, Ferreira ICFR. (2020). Wild and Cultivated *Centaurea raphanina* subsp. *mixta*: A Valuable Source of Bioactive Compounds. *Antioxidants (Basel)*. 9(4): 314.
- Son HY, Koo BI, Lee JB, Kim KR, Kim W, Jang J, Yoon MS, Cho JW, Nam YS. (2018). Tannin-Titanium Oxide Multilayer as a Photochemically Suppressed Ultraviolet Filter. *ACS applied materials & interfaces*. 10(32): 27344-27354.
- Souilah N, Belattar H, Bendif H. (2021). Biochemical properties and in vitro activities of extracts from two Asteraceae endemic species wild (Algeria). *RHAZES: Green and Applied Chemistry*. 11(2): 58-70
- 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.
- Sowmya PR, Arathi BP, Vijay K, Baskaran V, Lakshminarayana R. (2015). Role of different vehicles in carotenoids delivery and their influence on cell viability, cell cycle progression, and induction of apoptosis in HeLa cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 406(1-2): 245-253.
- Spellenberg R. (2019). *The Sunflower Family: A Guide to the Family Asteraceae in the Contiguous United States*. 1st edition. Botanical Research Inst of Texas. United States.
- Sproston NR, Ashworth JJ. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, 9: 754.
- Ștefănescu R, Tero-Vescan A, Negroiu A, Aurică E, Vari CE. (2020). A Comprehensive Review of the Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Properties of *Tribulus terrestris* L. *Biomolecules*. 10(5): 752.
- Stewart PM, Krone NP. (2011). The adrenal cortex. In: Melmed S, Polonsky K, Larsen PR, Kronenberg H, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Saunders.
- Storbeck KH, Bloem LM, Africander D, Schloms L, Swart P, Swart AC. (2013). 11 β -Hydroxydihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone, novel C19 steroids with androgenic activity: a putative role in castration resistant prostate cancer? *Molecular and cellular endocrinology*. 377(1-2): 135-146.
- Su Z, Huang H, Li J, Zhu, Y, Huang R, Qiu S. (2013). Chemical Composition and Cytotoxic Activities of Petroleum Ether Fruit Extract of Fruits of *Brucea javanica* (Simarubaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12(5): 735-742.

- Su X, Liu X, Wang S, Li B, Pan T, Liu D, Wang F, Diao Y, Li K. (2017). Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. *Burns*. 43(4): 830-838.
- Subedi NK, Rahman SM, Akbar MA. (2016). Analgesic and Antipyretic Activities of Methanol Extract and Its Fraction from the Root of *Schoenoplectus grossus*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2016(4): 3820704.
- Sugahara S, Ueda Y, Fukuhara K, Kamamuta Y, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2015). Antioxidant Effects of Herbal Tea Leaves from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Multiple Free Radical and Reducing Power Assays, Especially on Different Superoxide Anion Radical Generation Systems. *Journal of food science*. 80(11): C2420-C2459.
- Sukoyan GV, Gongadze NV. (2011). Mechanism of cardioprotective effect of adenocine and non-glycoside cardiotonic drugs during experimental chronic cardiac insufficiency. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 150(5): 610-613.
- Suleria HAR, Goyal M. (2021). *Health Benefits of Secondary Phytocompounds from Plant and Marine Sources*. Florida, Apple Academic Press.
- Sülßen VP, Lizarraga E, Mamadaliyeva NZ, Lago JHG. (2017). Potential of Terpenoids and Flavonoids from Asteraceae as Anti-Inflammatory, Antitumor, and Antiparasitic Agents. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2017: 6196198.
- Sultan I, Lamba N, Liew A, Doung P, Tewarie I, Amamoo JJ, Gannu L, Chawla S, Doucette J, Cerecedo-Lopez CD, Papatheodorou S, Tafel I, Aglio LS, Smith TR, Zaidi H, Mekary RA. (2020). The safety and efficacy of steroid treatment for acute spinal cord injury: A Systematic Review and meta-analysis. *Heliyon*. 6(2): e03414.
- Suri RS, Mahon JL, Clark WF, Moist LM, Salvadori M, Garg AX. (2009). Relationship between *Escherichia coli* O157:H7 and diabetes mellitus. *Kidney International Supplements*. (112): S44-466.
- 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.
- Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76(4): 899-905.
- Szwajgier D, Borowiec K, Pustelniak K. (2017). The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients*. 9(5): 477.
- Szymanowska U, Baraniak B, Bogucka-Kocka A. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Fruit and Juice-In Vitro Study. *Molecules*. 23(7): 1812.
- Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. (2010). Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*. 132(1): 48-55.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta*. 1810(2): 170-177.
- Tan CL, Knight ZA. (2018). Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron*. 98(1): 31-48.
- Tangvarasittichai S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 6(3): 456-480.
- Testai L, Martelli A, Cristofaro M, Breschi MC, Calderone V. (2013). Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 65(5): 750-756.
- Thakur MK, Paramanik V. (2009). Role of steroid hormone coregulators in health and disease. *Hormone research*. 71(4): 194-200.
- Thawabteh A, Juma S, Bader M, Karaman D, Scrano L, Bufo SA, Karaman R. (2019). The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. *Toxins (Basel)*. 11(11): 656.

- Thibado SP, Thornthwaite JT, Ballard TK, Goodman BT. (2018). Anticancer effects of Bilberry anthocyanins compared with NutraNanoSphere encapsulated Bilberry anthocyanins. *Molecular and clinical oncology*. 8(2): 330-335.
- Thompson K, Hosking H, Pederick W, Singh I, Santhakumar AB. (2017). The effect of anthocyanin supplementation in modulating platelet function in sedentary population: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 118(05): 368–374.
- Ting HM, Cheah BH, Chen YC, Yeh PM, Cheng CP, Yeo FKS, Vie AK, Rohloff J, Winge P, Bones AM, Kissen R. (2020). The Role of a Glucosinolate-Derived Nitrile in Plant Immune Responses. *Frontiers in plant science*. 11: 257.
- Trappoliere M, Caligiuri A, Schmid M. (2009). Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*. 50(6): 1102-1111.
- Trcka V, Vejdeck JZ. (1956). Vasodilator effect of several series of pyridine derivatives. *Pharmazie*. 11(4): 242-247.
- 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.
- Tordera M, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. (1994). Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Journal of Biosciences*. 49(3-4): 235-240.
- Trigas P, Constantinidis T, Touloumenidou T. (2008). A new hexaploid species of *Centaurea* section *Acrolophus* (Asteraceae) from Evvia Island, Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 762–774.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2(12): 1231-1246.
- Turabekova MA, Rasulev BF, Dzhakhangirov FN, Toropov AA, Leszczynska D, Leszczynski J. (2014). Aconitum and delphinium diterpenoid alkaloids of local anesthetic activity: comparative QSAR analysis based on GA-MLRA/PLS and optimal descriptors approach. *Journal of environmental science and health*. 32(3): 213-238.
- Twaij HA, Kery A, Al-Khazraji NK. (1983). Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. *Journal of ethnopharmacology*. 1983 9(2-3): 299-314.
- Twilley D, Moodley D, Rolfes H, Moodley I, McGaw LJ, Madikizela B. (2021). Ethanolic extracts of South African plants, *Buddleja saligna* Willd. and *Helichrysum odoratissimum* (L.) Sweet, as multifunctional ingredients in sunscreen formulations. *South African Journal of Botany*. 137: 171-182.
- Tzankova V, Aluani D, Kondeva-Burdina M, Yordanov Y, Odzhakov F, Apostolov A, Yoncheva K. (2017). Hepatoprotective and antioxidant activity of quercetin loaded chitosan/alginate particles in vitro and in vivo in a model of paracetamol-induced toxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 92: 569-579.
- Uchmanowicz I. (2020). Oxidative Stress, Frailty and Cardiovascular Diseases: Current Evidence. *Advances in experimental medicine and biology*. 1216: 65-77.
- Ueno H, Shimada A, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Takahashi Y, Matsumoto Y, Okamoto M, Fujiwara Y, Ishihara T. (2019). Comprehensive behavioral study of the effects of vanillin inhalation in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 115: 108879.
- Ugur A, Duru ME, Ceylan O, Sarac N, Varol O, Kivrak I. (2009). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor. (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). *Natural Product Research*. 23(2): 149-167.
- Ulubelen A, Oksuz S. (1982). Cytotoxic flavones from *Centaurea urvillei*. *Journal of Natural Product*. 45: 373-375.
- Vaishnav P, Demain AL. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 29(2):223-229.

- Valanciene E, Jonuskiene I, Syrpas M, Augustiniene E, Matulis P, Simonavicius A, Malys N. (2020). Advances and Prospects of Phenolic Acids Production, Biorefinery and Analysis. *Biomolecules*. 10(6): 874.
- Valenza A, Bonfanti C, Pasini ME, Bellostà P. (2018). Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Drosophila Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *BioMed research international*. 2018: 6413172.
- Van Ballegooijen AJ, Beulens JW. (2017). The Role of Vitamin K Status in Cardiovascular Health: Evidence from Observational and Clinical Studies. *Current nutrition reports*. 6(3):197-205.
- Van der Vusse GJ. (2009). Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 24(4): 300-307.
- Van Wyk AS. (2020). Phytochemical evaluation of *Curtisia dentata* (Burm.f.) C.A.Sm. stem bark and seasonal and geographical region variability. Université de l'Afrique du Sud. Thèse de doctorat.
- Vargas F, Romecín P, García-Guillén AI. (2018). Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Frontiers in physiology*. 9: 394.
- Variya BC, Bakrania AK, Patel SS. (2020). Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblica officinalis*: Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- γ and Akt signaling. *Phytomedicine*. 73: 152906.
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*. 135C(3): 357-364.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & nutrition*. 3(3-4): 115-126.
- Végh K, Riethmüller E, Hosszú L, Darcsi A, Müller J, Alberti Á, Tóth A, Béni S, Könczöl Á, Balogh GT, Kéry Á. (2018). Three newly identified lipophilic flavonoids in *Tanacetum parthenium* supercritical fluid extract penetrating the Blood-Brain Barrier. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 149: 488-493.
- Venkatakrishnan K, Chiu HF, Cheng JC, Chang YH, Lu YY, Han YC, Shen YC, Tsai KS, Wang CK. (2018). Comparative studies on the hypolipidemic, antioxidant and hepatoprotective activities of catechin-enriched green and oolong tea in a double-blind clinical trial. *Food & function*. 9(2): 1205-1213.
- Vicas SI, Teusdea AC, Carbuнар M, Socaci SA, Socaci C. (2013). Glucosinolates profile and antioxidant capacity of Romanian Brassica vegetables obtained by organic and conventional agricultural practices. *Plant foods for human nutrition*. 68(3): 313-321.
- Vílchez C, Forján E, Cuaresma M, Bédmar F, Garbayo I, Vega JM. (2011). Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine drugs*. 9(3): 319-333.
- Villet A, Alary J, Coeur A. (1980). Separation chromatographique des azepines Nanochromatographie sur couche mince et chromatographie en phase liquide sous pression. *Talanta*. 27(8): 659-663.
- Wallace BJ, Young IG. (1977). Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a ubiA- menA- double quinone mutant. *Biochimica et biophysica acta*. 461(1): 84-100.
- Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, Cate RL, Tizard R, Sinclair LK, Foeller C, Chow EP, Browning JL, Ramachandran KL. (1986). Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*. 320(6057): 77-81.
- Wang LS, Stoner GD. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*. 269(2): 281-290.
- Wang J, Huang Y, Li K, Chen Y, Vanegas D, McLamore ES, Shen Y. (2016). Leaf Extract from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. Promote Glycogen Synthesis in T2DM Mice. *PLOS ONE* 11(11): e0166557.

- Wang Z, Ding Z, Li Z, Ding Y, Jiang F, Liu J. (2021). Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential antibiofilm agent in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients. *Microb Pathog.* 159: 105121.
- Wen H, Cui H, Tian H, Zhang X, Ma L, Ramassamy C, Li J. (2020). Isolation of Neuroprotective Anthocyanins from Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) against Amyloid- β -Induced Cognitive Impairment. *Foods.* 10(1): 63.
- White JP, Billin AN, Campbell ME, Russell AJ, Huffman KM, Kraus WE. (2018). L'axe AMPK/p27Kip1 Régule Les Décisions Autophagie/Apoptose Dans Les Cellules Souches Du Muscle Squelettique âgées. *Rapports sur les cellules souches.* 11(2) : 425-439.
- Weaving G, Batstone GF, Jones RG. (2016). Age and sex variation in serum albumin concentration: an observational study. *Annals of clinical biochemistry.* 53(Pt 1): 106-111.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation.* 115(5): 1111-1119.
- Williams AW, Boileau TW, Zhou JR, Clinton SK, Erdman JW Jr. (2000). Beta-carotene modulates human prostate cancer cell growth and may undergo intracellular metabolism to retinol. *The Journal of nutrition.* 130(4): 728-732.
- Williamson JR, Cooper RH, Joseph SK, Thomas AP. (1985). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver. *American Journal of Physiology.* 248: C203-C216.
- Wong SH, Wong CS, Li TT. (2010). Steroids in regional analgesia. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 11(17): 2839-2848.
- 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.
- Wu SW, Fowler DK, Shaffer FJ, Lindberg JEM, Peters JH. (2017). Ethyl Vanillin Activates TRPA1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 362(3): 368-377.
- Wu YH, Zhang BY, Qiu LP, Guan RF, Ye ZH, Yu XP. (2017). Structure Properties and Mechanisms of Action of Naturally Originated Phenolic Acids and Their Derivatives against Human Viral Infections. *Current medicinal chemistry.* 24(38): 4279-4302.
- Wu H, Denna TH, Storkersen JN, Gerriets VA. (2019). Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. *Pharmacological Research.* 140: 100-114.
- Wu Y, Zhong L, Yu Z, Qi J. (2019). Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- κ B activation. *Drug development research.* 80(2): 262-268.
- Xie Y, Bowe B, Li T, Xian H, Yan Y, Al-Aly Z. (2018). Higher blood urea nitrogen is associated with increased risk of incident diabetes mellitus. *Kidney international.* 93(3): 741-752.
- Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry.* 65(3): 261-291.
- Xu S, Chisholm AD. (2014). *C. elegans* epidermal wounding induces a mitochondrial ROS burst that promotes wound repair. *Developmental Cell.* 31(1): 48-60.
- Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L. (2014). Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *Journal of Ethnopharmacol.* 152(3):540-545.
- Xu CC, Wang B, Pu YQ, Tao JS, Zhang T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines,* 15(10): 721–731.
- Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules.* 24(6): 1123.
- Xu QN, Zhu D, Wang GH, Lin T, Sun CL, Ding R, Tian WJ, Chen HF. (2020). Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum*. *Natural product research.* 12: 1-8.

- Yadav R, Bhartiya JP, Verma SK, Nandkeoliar MK. (2013). The evaluation of serum amylase in the patients of type 2 diabetes mellitus, with a possible correlation with the pancreatic functions. *Journal of clinical and diagnostic research*. 7(7): 1291-1294.
- Yamada Y, Nishii K, Kuwata K, Nakamichi M, Nakanishi K, Sugimoto A, Ikemoto K. (2020). Effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on biological activities and neural functions. *Heliyon*. 6(1): e03240.
- Yamagata K, Yamori Y. (2020). Inhibition of Endothelial Dysfunction by Dietary Flavonoids and Preventive Effects Against Cardiovascular Disease. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 75(1): 1-9.
- Yang Y, Song ZG, Liu ZQ. (2011). Synthesis and antioxidant capacities of hydroxyl derivatives of cinnamoylphenethylamine in protecting DNA and scavenging radicals. *Free radical research*. 45(4): 445-453.
- Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*. 23(4): 762.
- Yang L, Shen K, Ji D. (2020). Natural compounds attenuate heavy metal-induced PC12 cell damage. *The Journal of international medical research*. 48(6): 300060520930847.
- 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.
- Yasin D, Zafarya MD, Ansaria S. (2019). Evaluation of antioxidant and anti-proliferative efficacy of *Nostoc muscorum* NCCU-442. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17(2): 284-293
- Yavaş İ, Ünay A, Ali S, Abbas Z. (2020). UV-B Radiations and Secondary Metabolites. *Turkish Journal of Agriculture*. 8(1): 147-157.
- Yayli N, Yaşar A, Güleç C, Usta A, Kolaylı S, Coşkunçelebi K, Karaoğlu, Ş. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*. 66(14): 1741-1745.
- Yeung WF, Chung KF, Poon MM, Ho FY, Zhang SP, Zhang ZJ, Ziea ET, Wong VT. (2012). Chinese herbal medicine for insomnia: a systematic review of randomized controlled trials. *Sleep medicine reviews*. 16(6): 497-507.
- Yin Z, Zhang Y, Zhang J, Wang J, Kang W. (2018). Coagulatory active constituents of *Malus pumila* Mill. flowers. *Chemistry Central Journal*. 12(1): 126.
- Young AJ, Lowe GL. (2018). Carotenoids-Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 7(2): 28.
- Yu JG, Isaksson A, Rova A, Tegner Y, Eriksson A, Malm C. (2020). Potential effects of long-term abuse of anabolic androgen steroids on human skeletal muscle. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 60(7): 1040-1048.
- Yuan J, Lipinski M, Degtrev A. (2003). Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death. *Neuron*. 40(2): 401-413.
- Zachariah TJ, Leela NK. (2006). Volatiles from herbs and spices. *Handbook of Herbs and Spices*, 177–218.
- Zahran, E. M., Abdelmohsen, U. R., Hussein, A. S., Salem, M. A., Khalil, H. E., Yehia Desoukey, S., Fouad, M. A., & Kamel, M. S. (2021). Antiulcer potential and molecular docking of flavonoids from *Ocimum forskolei* Benth. family Lamiaceae. *Natural product research*. 35(11): 1933-1937.
- 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
- Zareei S, Boojar MMA, Amanlou M. (2017). Inhibition of liver alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase by hesperidin and its aglycone hesperetin: An in vitro and in silico study. *Life sciences*. 178: 49-55.
- Zengin G, Locatelli M, Carradori S, Mocan AM, Aktumsek A. (2016). Total Phenolics, Flavonoids, Condensed Tannins Content of Eight *Centaurea* Species and Their Broad Inhibitory Activities

- against Cholinesterase, Tyrosinase, α -Amylase and α -Glucosidase. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 44(1): 195.
- Zengin G, Bulut G, Mollica A, Nancy Picot-Allain CM, Mahomoodally MF. (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.
- Zengin G, Llorent-Martínez EJ, Sinan KI, Yıldızıtugay E, Picot-Allain C, Mahomoodally MF. (2019). Chemical profiling of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. aerial parts by HPLC-MS/MS and their pharmaceutical effects: From nature to novel perspectives. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 174: 406-413.
- Zahran EM, Abdelmohsen UR, Hussein AS, Salem MA, Khalil HE, Yehia Desoukey S, Fouad MA, Kamel MS. (2021). Antiulcer potential and molecular docking of flavonoids from *Ocimum forskolei* Benth, family Lamiaceae. *Natural product research*. 35(11):1933-1937.
- Zhang Y, Wang C, Wang L, Parks GS, Zhang X, Guo Z, Ke Y, Li KW, Kim MK, Vo B, Borrelli E, Ge G, Yang L, Wang Z, Garcia-Fuster MJ, Luo ZD, Liang Cáceres A, Cabrera O, Morales O, Mollinedo P, Mendia P. (1991). Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 33(3): 213-216.
- Zhang DW, Fu M, Gao SH, Liu JL. (2013). Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013: 636053.
- Zhang X, Zhang H, Zhou N, Xu J, Si M, Jia Z, Du X, Zhang H. (2015). Tannic acid modulates excitability of sensory neurons and nociceptive behavior and the Ionic mechanism. *European journal of pharmacology*. 764: 633-642.
- Zhang J, Han J, Oyeleye A, Liu M, Liu X, Zhang L. (2015). Extraction methods of natural products from Traditional Chinese medicines. *Methods in molecular biology*. 1263: 177-185.
- Zhang X, Zheng W, Wang T, Ren P, Wang F, Ma X, Wang J, Huang X. (2017). Danshen-Chuanxiong-Honghua Ameliorates Cerebral Impairment and Improves Spatial Cognitive Deficits after Transient Focal Ischemia and Identification of Active Compounds. *Frontiers in pharmacology*. 8: 452.
- Zhang J, Song Q, Han X, Zhang Y, Zhang Y, Zhang X, Chu X, Zhang F, Chu L. (2017). Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid. *International immunopharmacology*. 47: 95-105.
- Zhang X, Ding M, Zhu P, Huang H, Zhuang Q, Shen J, Cai Y, Zhao M, He Q. (2019). New Insights into the Nrf-2/HO-1 Signaling Axis and Its Application in Pediatric Respiratory Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019: 3214196.
- Zhang X, Feng J, Su S, Huang L. (2020). Hepatoprotective effects of *Camellia nitidissima* aqueous ethanol extract against CC14-induced acute liver injury in SD rats related to Nrf2 and NF- κ B signalling. *Pharmaceutical biology*. 58(1): 239-246.
- Zhao R, McDaniel WF. (1998). Ginseng improves strategic learning by normal and brain-damaged rats. *Neuroreport*. 9(7): 1619-1624.
- Zhao J, Evangelopoulos D, Bhakta S, Gray AI, Seidel V. (2014). Antitubercular activity of *Arctium lappa* and *Tussilago farfara* extracts and constituents. *Journal of ethnopharmacology*. 155(1): 796-800.
- Zhao DG, Zhou AY, Du Z, Zhang Y, Zhang K, Ma YY. (2015). Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*. *Fitoterapia*. 107: 122-127.
- Zhao T, Li S.J, Zhang ZX, Zhang ML, Shi QW, Gu YC, Kiyota H. (2017). Chemical constituents from the genus *Saussurea* and their biological activities. *Heterocyclic Communications*. 23(5).
- Zheng XT, Yu ZC, Tang JW, Cai ML, Chen YL, Yang CW, Chow WS, Peng CL. (2021). The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator? *Photosynthesis research*. 3(10): 406-408.

- Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. (2002). From receptor to effector: Insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 967: 120-134.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64(4): 555-559.
- Zhu JS, Halpern GM, Jones K. (1998). The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *Journal of alternative and complementary medicine*. 4(3): 289-303.
- Zhu BQ, Zhou HZ, Teerlink JR, Karliner JS. (2004). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) decreases myocardial infarct size and improves cardiac function in rat models of ischemia and ischemia/reperfusion. *Cardiovascular drugs and therapy*. 18(6): 421-431.
- Zhu H, Xiang HC, Li HP, Lin LX, Hu XF, Zhang H, Meng WY, Liu L, Chen C, Shu Y, Zhang RY, Zhang P, Si JQ, Li M. (2019). Inhibition of GABAergic Neurons and Excitation of Glutamatergic Neurons in the Ventrolateral Periaqueductal Gray Participate in Electroacupuncture Analgesia Mediated by Cannabinoid Receptor. *Frontiers in neuroscience*. 13: 484.
- Zhu C, Liu N, Tian M, Ma L, Yang J, Lan X, Ma H, Niu J, Yu J. (2020). Effects of alkaloids on peripheral neuropathic pain: a review. *Chinese medicine*. 15: 106.

Annexes

Annexes

Résultats du criblage qualitatif



Figure 1. Résultats de screening phytochimique des flavonoïdes.



Figure 2. Résultats de screening phytochimique des anthocyanes.



Figure 3. Résultats de screening phytochimique des terpènes.

Annexes



Figure 4. Résultats de screening phytochimique des alcaloïdes.



Figure 5. Résultats de screening phytochimique des quinones.



Figure 6. Résultats de screening phytochimique des saponines.

Annexes



Figure 7. Résultats de screening phytochimique des tanins.



Figure 8. Résultats de screening phytochimique des stéroïdes.



Figure 9. Résultats de screening phytochimique des hétérosides cardiotoniques.

Annexes



Figure 10. Résultats de screening phytochimique des composés cyanogéniques.



Figure 11. Résultats de screening phytochimique des mucilages.

Résultats de l'analyse quantitative

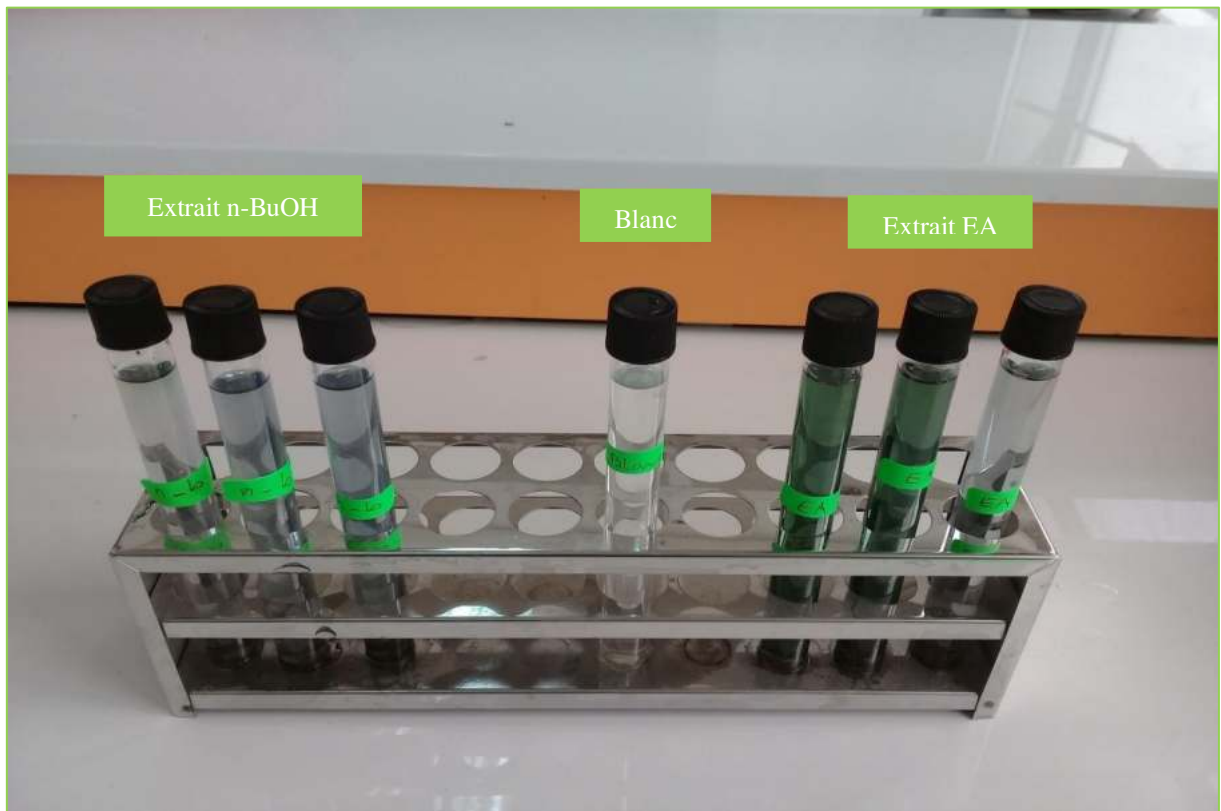


Figure 12. Développement de la réaction de quantification des polyphénols totaux.



Figure 13. Développement de la réaction de quantification des flavonoïdes.

Annexes

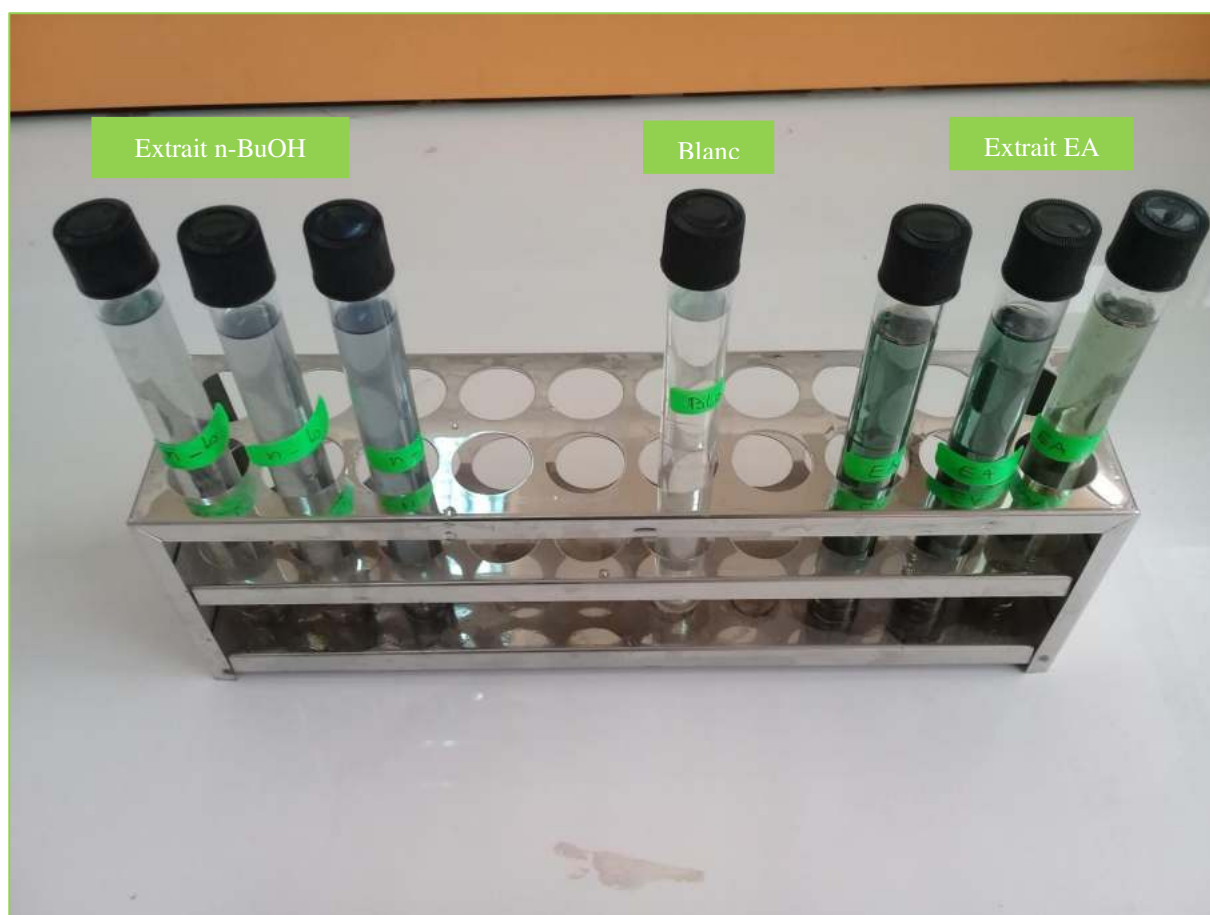


Figure 14. Développement de la réaction de quantification des tanins.

Activité antimicrobienne

Préparation des milieux de culture

Afin de préparer le milieu de culture des bactéries, 38 g de gélose Mueller-Hinton a été ajouté à 1L de DMSO, tandis que pour le champignon, 65 g de gélose de sabourraud a été ajouté à 1L de DMSO. Les milieux sont ensuite chauffés à 100 °C et l'observation d'une couleur jaune foncée ou allant vers l'orange indique qu'ils sont prêts à l'utilisation.

Original Research Article

Evidence of anti-inflammatory and anti-ulcer properties of aerial parts of *Centaurea tougourensis* Boiss. and Reut.

Mohamed Sabri Bensaad^{1,2}, Saliha Dassamiour^{2*}, Leila Hambaba², Mohamed Amine Kahoul³, Mohammed Benhoula⁴

¹Laboratoire de Physio-Toxicologie, Pathologie Cellulaires et Moléculaires-Biomolécules (LPTPCMB), Département de Biologie des Organismes ; ²Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire (LBMBPC), Département de Microbiologie et de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Batna-2 ; ³Laboratoire sciences des aliments (LSA), Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université de Batna-1, Batna ; ⁴Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Béjaia, Béjaia, Algeria

*For correspondence: **Email:** s.dassamiour@univ-batna2.dz; **Tel:** +213-670286603

Sent for review: 24 March 2021

Revised accepted: 17 July 2021

Abstract

Purpose: To determine the anti-inflammatory and anti-ulcer properties of the aerial parts of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut.

Methods: The effects of *n*-butanol (*n*-BuOH) extract of the aerial part of *Centaurea tougourensis* on carrageenan-induced paw edema and ethanol-induced gastric mucosal damage were determined at 2 doses (200 and 400 mg/kg, po) in a mouse model. For each test, the animals were randomly divided into negative and positive control groups, as well as extract-treated groups. The mice were observed for any sign of inflammation for a period of 24h.

Results: Reduction of paw edema by *C. tougourensis* extract was highly significant ($p < 0.001$) at a dose of 400 mg/kg 24 h after carrageenan injection, with 55.26 % inhibition, followed very closely by 53.15 % inhibition at the dose of 200 mg/kg; indomethacin group showed an inhibition of 60 %. Histological examination supported the inhibition results. A significant reduction in inflammation by the extract at a dose of 400 mg/kg was also observed. No sign of ulcer was observed with *C. tougourensis* at the two doses (200 and 400 mg/kg). The total polyphenol content of the *n*-BuOH extract was 85.44 µg gallic acid equivalent/mg of extract. Tannins were the most abundant fraction (51.87 µg tannic acid equivalent/mg of extract), followed by flavonoids (25.55 µg quercetin equivalent/mg of extract).

Conclusion: The results indicate that *C. tougourensis* may have potential beneficial effects in the treatment of diseases associated with inflammation and pain, besides its protective effect on the gastrointestinal tract.

Keywords: Anti-inflammatory, Anti-ulcer, *Centaurea tougourensis*, Flavonoids, Phenolics, Tannin

This is an Open Access article that uses a funding model which does not charge readers or their institutions for access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) and the Budapest Open Access Initiative (<http://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>), which permit unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

INTRODUCTION

It is well known that chronic inflammation is associated with several physiological disorders,

especially those that interfere with the normal functions of the immune system, leading to serious and chronic diseases. As a result, inflammatory pain is generated by these stimuli

due to peripheral tissue damage [1]. Unfortunately, the use of synthetic anti-inflammatory treatments is often associated with undesirable side effects. Therefore, there is urgent need for identification and use of more natural and more efficient medications for chronic inflammation.

The inflammatory response is a complex process that involves key coordination mediators such as prostaglandins (PGs), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon γ (IFN γ), interleukin-1 (IL-1) and IL-6 [2]. These factors ensure good response and the maintenance of internal homeostasis, especially against infections and microbial pathologies which are responsible for some serious chronic inflammations.

In the long term, these inflammatory reactions may damage the gastrointestinal tract, leading to the formation of ulcers [3]. One of the ulcer diseases most frequently seen is peptic ulcer which occurs in the stomach, the first portion of the intestine.

The pharmaceutical industry has considerably evolved during the last decade, allowing for the treatment of several diseases. Thus, the world population now benefits from the contributions of folk medicine, recognizing the empirical knowledge of ancestors [4]. The therapeutic use of medicinal plants is practiced in many countries of the world, especially in developing countries. One of the reasons for resort to medicinal plants is the lack of a modern medical system.

Centaurea is one of the largest genus of herbaceous plants, with more than 500 species mainly distributed in the Mediterranean and West Asia regions. Over the years, studies on *Centaurea* species have demonstrated their pharmacological potential such as antioxidant, anti-microbial, anti-diabetic, cytotoxic, anti-hemolytic and anti-inflammatory properties. These effects are due to their richness in bioactive secondary metabolites, especially flavonoids, terpenes, polyphenols, alkaloids, tannins and saponins [5,6].

EXPERIMENTAL

Plant material

A sample of *C. tougourens* was collected in spring 2019 from Belezma National Park in the municipality of Fesdis, Algeria (GPS coordinates: latitude 35.621975; longitude 6.241327). The sample was identified by taxonomists in the Agronomy Department of the Batna-1 University

(Algeria), where a voucher specimen (no. CT/2019/LPTPCMB) was deposited.

Experimental animals

Female Swiss Albino mice weighing 25 – 30 g were purchased from *Pasteur Institute, Algiers*, and maintained at ambient temperature of 22 ± 1 °C under 12 h light/12 h dark cycle, with free access to feed and water for two weeks, to acclimatize them to laboratory conditions. The experiments were performed in line with the guidelines of the National Research Council [7]. The study was approved by the Biology Animal Ethics Committee of University of Batna-2, Algeria (approval no. was 14/DBO/FSNV/UB2/2017).

Preparation of plant extract

The aerial parts of *C. tougourens* were dried in a dry, ventilated place away from sun rays, and then ground to obtain 300 g of fine powder. Maceration was carried out three times with 3 L of EtOH-H₂O at a volume ratio of 70: 30 at room temperature for 3 days. Thereafter, liquid-liquid extraction was carried out with the following solvents: hexane, ethyl acetate and n-butanol.

Preliminary phytochemical screening

Qualitative analysis of the phyto-constituents present in *C. tougourens* was carried out using standard procedures based on precipitation and colorimetric reactions. The main secondary metabolite classes investigated in phytochemical screening were tannins, steroids, flavonoids, anthocyanins, triterpenes, alkaloids, quinones, saponins, mucilages, cyanogenic compounds and cardiotoxic glycosides.

Determination of total phenolic (TPC), flavonoid (TFC) and tannin (TTC) contents

These tests were performed according to the method of Makkar *et al* [8]. To estimate total phenolic content (TPC), a mixture consisting of 1 mL of extract or standard (gallic acid), 1.8 mL of 10 % Folin-Ciocalteu reagent and 1.2 mL of 7.5 % sodium carbonate was prepared. Absorbance was measured 1 h later at 765 nm. Results were expressed as μg gallic acid equivalent (GAE) per mg extract ($\mu\text{g}/\text{mg}$) and as mg/g of plant powder.

In the determination of flavonoid content (TFC), a solution consisting of 500 μL of extract or standard (quercetin) and 150 μL of 5 % sodium nitrite was vortexed and allowed to stand for 5 min. Then, it was incubated again for 6 min after the addition of 150 μL of aluminum trichloride (10

%). Thereafter, 2 mL of sodium hydroxide (5%) was added to the solution and the final volume was adjusted to 5 mL with distilled water. The absorbance at 510 nm was measured 15 min later. The total flavonoids content was expressed as μg of quercetin equivalent (QE) per mg extract, and as mg/g of plant powder.

Total tannin content (TTC) was estimated as follows: for every replicate; 500 μL of plant extract was added to 100 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP) and incubated for 4 h at 4 °C. The tubes were then vortexed and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. Then, 100 μL of the resultant supernatant containing non-tannin phenolics was adjusted to 1 mL with distilled water. Folin-Ciocalteu reagent (1 N, 0.5 mL) was added to each test tube, followed by addition of 2.5 mL of 5 % sodium carbonate. The resultant solution was vortexed and incubated in the dark at room temperature for 40 min. The amount of TTC was expressed as μg of tannic acid equivalent (TAE) per mg of plant extract, and as mg/g of plant powder.

Evaluation of acute toxicity

Oral acute toxicity test was carried out using female Wistar mice ($n = 6$). A single dose of 2000 mg/kg was tested in accordance with the Organization for Economic Development (OECD) guideline no. 425 [9]. The animals were observed individually during 14 days for any clinical signs of toxicity.

In vivo anti-inflammation test

This test was performed to evaluate anti-inflammatory potential of the plant extract. The mice were divided into four groups ($n = 6$), and pre-treated orally as follows: group 1 (negative control) received 0.9 % NaCl at a dose of 10 ml/kg, p.o.; group 2 (reference) was given indomethacin at a dose of 20 mg/kg, i.p., while groups 3 and 4 received n-butanol extract of *Centaurea tougourensis* at doses of 200 and 400 mg/kg, respectively, p.o. After 30 min of the pre-treatment, right hind paw edema was induced in each mouse using sub-plantar injection of 0.1 mL of 1 % carrageenan. The diameter of the edema was measured using a digital caliper before, and at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 h after the injection of carrageenan [10].

In addition, the percentage inhibition of inflammation was calculated using Eq 1.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(VC - VT)}{VC} \right] \times 100 \dots (1)$$

where VC represents the mean edema volume in the control group at a given time, while VT is the mean edema volume in the group treated with the vehicle or extract at the same time.

Anti-ulcer studies

Ethanol-induced ulcer model was used to determine the effect of the extract on gastric mucosal damage. After a fasting period of 12 h, the mice were divided into five experimental groups ($n = 6$) and pre-treated orally as follows: Groups 1 and 2 served as negative control and received 0.9 % NaCl at a dose of 10 ml/kg, p.o.; group 3 (positive control) received omeprazole at a dose of 20 mg/kg, i.p., while groups 4 and 5 received n-butanol extract of *C. tougourensis* at doses of 200 and 400 mg/kg, respectively, p.o. After 1 h of ulcer induction with administration of 90 % ethanol at a dose of 10 ml/kg, p.o., the animals were sacrificed and their stomachs were removed and examined, first macroscopically, and later microscopically [11].

Histological examination

Paws and stomachs were fixed in formaldehyde solution (10 %) and dehydrated with a gradient mixture of ethanol and xylene, followed by paraffin embedding. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, and were statistically analyzed with one-way ANOVA for comparison amongst groups. The GraphPad Prism (version 8) software was used for data analysis. Values of $p < 0.05$ were considered indicative of statistical significance.

RESULTS

Phytochemical profile and phenolic contents

Different fractions were obtained after extractions with 1.58 % n-butanol, 1.03 % ethyl acetate and 0.42 % n-hexane. Phytochemical screening of *C. tougourensis* revealed the presence of several classes of secondary metabolites namely tannins, flavonoids, anthocyanins, triterpenes, quinones, saponins and mucilages. Alkaloids were also present but at low levels. These results are presented in Table 1. The quantitative results presented in Table 2 indicate that n-BuOH extract of *C. tougourensis* contained high amounts of polyphenols (1.34 ± 0.06 mg/g of plant powder). However, the tannin content in this fraction (51.87 ± 0.02 μg tannic acid

Table 1: Phytochemical profile of *C. tougourensis* aerial extract

Phytochemical	Test	Result
Tannins	Ferric chloride test	+++
Steroids	Liebermann Burchard test	-
Flavonoids	Shinoda's test	+++
Anthocyanins	Bornträger test	++
Triterpenes	Liebermann Burchard test	+++
Alkaloids	Dragendorff test	+
Quinones	NaOH test	++
Saponins	Foam test	+++
Mucilages	Ethanol test	+++
Cyanogenic compounds	Guignard sodium picrate test	-
Cardiotonic glycosides	Keller Kiliani test	-

Key: - = absent; + = low level; ++ = moderate level; +++ = high level

Table 2: Phenolic contents of n-BuOH extract of *C. tougourensis*

Total polyphenol content		Flavonoid content		Total tannin content	
(μ g GAE/mg extract)	(mg/g plant powder)	(μ g QE/mg extract)	(mg/g plant powder)	(μ g TAE/mg extract)	(mg/g plant powder)
85.44 \pm 3.89	1.34 \pm 0.06	25.55 \pm 1.11	0.40 \pm 0.01	51.87 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01

All values are expressed as mean \pm SD (n = 3)

equivalent/mg of extract) was higher than the flavonoid content (25.55 \pm 1.11 μ g quercetin equivalent/mg of extract). In terms of mg/g of plant powder, the tannin and flavonoid contents were 0.81 \pm 0.01 and 0.40 \pm 0.01, respectively.

Acute toxicity

During the two weeks of observation, no signs of toxicity or death were recorded. The locomotor activity, and feed and water intake per day of each mouse were regular. There were no allergic reactions or loss of fur. These results suggest the non-toxic nature of *C. tougourensis*.

In vivo anti-inflammation activity

Table 3 showed that during the early phase and precisely 1 h after carrageenan injection, there was a significant increase in mouse paw edema in all treated groups. This was followed immediately by a gradual decrease in paw edema. This decrease was highly significant for almost all treated groups, when compared to control group ($p < 0.001$).

During the late phase (4 – 24 h), the inhibition of paw edema by the plant extract was good at both doses (200 and 400 mg/kg), but was slightly higher at the dose of 400 mg/kg. The n-BuOH extract of *C. tougourensis* at doses of 200 and 400 mg/kg showed the highest percentage inhibition of paw edema 24 h after carrageenan injection (53.15 % inhibition for the dose of 200

mg/kg, and 55.26 % inhibition for the dose of 400 mg/kg), while indomethacin group had 60 % reduction in paw edema within the same period. The indomethacin group showed a slight increase in paw circumference (0.1 mm) 24 h after carrageenan injection, while non-negligible decreases in paw edema were produced by the two doses of n-BuOH extract (1.78 \pm 0.04 mm and 1.7 \pm 0.03 mm for 200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively).

The histopathological investigation using hematoxylin & eosin staining showed that the groups of mice pre-treated with indomethacin or n-BuOH extract of *C. tougourensis* at a dose of 400 mg/kg did not present any signs of inflammation, as shown in Figure 1 C and Figure 1 E, respectively. Several sections showed keratinized skin with squamous epithelium resting on dermis composed of annexal structures with normal morphology. In addition, there were bundles of striated muscles and bone trabeculae surrounding the medullary spaces which contained hematopoietic elements of normal richness. Hyperkeratosis was observed in the group treated with n-BuOH extract of *C. tougourensis* at a dose 200 mg/kg (Figure 1 D), probably due to inflammatory response. In contrast, vascular congestion was observed in the carrageenan-control group (Figure 1 B), which suggested onset of inflammatory response reaction. However, this congestion could also have resulted from trauma due to cutting of the paw.

Table 3: Effect of oral administration of n-BuOH extract of *C. tougourensis* and indomethacin on mice paw thickness

Treatment	Dose (mg/kg)	Before treatment	Paw diameter (mm)						
			After treatment						
			1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h
Control	-	1.75 ± 0.06	3.35 ± 0.14	3.78 ± 0.25	3.99 ± 0.19	4.29 ± 0.24	4.68 ± 0.09	4.02 ± 0.12	3.8 ± 0.13
Indomethacin	20 mg/kg	1.69 ± 0.03 ^{ns}	2.12 ± 0.03 ^{***} (36.71%)	1.91 ± 0.05 ^{***} (49.47%)	1.7 ± 0.04 ^{***} (57.39%)	1.59 ± 0.1 ^{***} (62.93%)	1.4 ± 0.02 ^{***} (70.08%)	1.42 ± 0.06 ^{***} (64.67%)	1.52 ± 0.02 ^{***} (60%)
n-BuOH extract	200 mg/kg	1.74 ± 0.02 ^{ns}	3.1 ± 0.14 ^{ns} (7.46%)	2.96 ± 0.09 ^{**} (21.69%)	2.66 ± 0.06 ^{***} (33.33%)	2.46 ± 0.08 ^{***} (42.65%)	2.29 ± 0.05 ^{***} (51.06%)	2.13 ± 0.05 ^{***} (47.01%)	1.78 ± 0.04 ^{***} (53.15%)
n-BuOH extract	400 mg/kg	1.72 ± 0.03 ^{ns}	2.79 ± 0.1 ^{**} (16.71%)	2.73 ± 0.12 ^{***} (27.77%)	2.53 ± 0.04 ^{***} (36.59%)	2.39 ± 0.05 ^{***} (44.28%)	2.27 ± 0.04 ^{***} (51.49%)	2.09 ± 0.04 ^{***} (48%)	1.7 ± 0.03 ^{***} (55.26%)

Values are mean ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, followed by multiple Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with control group. ^{ns} Not significant. Values given in parentheses represent percentage inhibition of paw edema

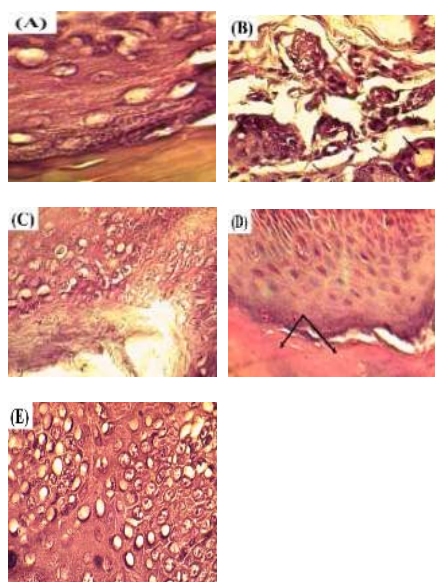


Figure 1: Histopathologic features of mouse paw tissues after sub-plantar injection of carrageenan (H&E stain, ×100). (A) Normal control, (B) carrageenan control, (C) indomethacin-treated group (20 mg/kg), (D) n-BuOH extract-treated group (200 mg/kg), (E) n-BuOH extract-treated group (400 mg/kg)

Anti-ulcer effect of *Centaurea tougourensis*

Macroscopic (Figure 2) and histopathological (Figure 3) results revealed that except for the control group (Figure 3B) which showed visible vascular congestion and tissues lesions, almost all treated groups did not present any sign of ulcer.

DISCUSSION

Previous phytochemical studies on *Centaurea*

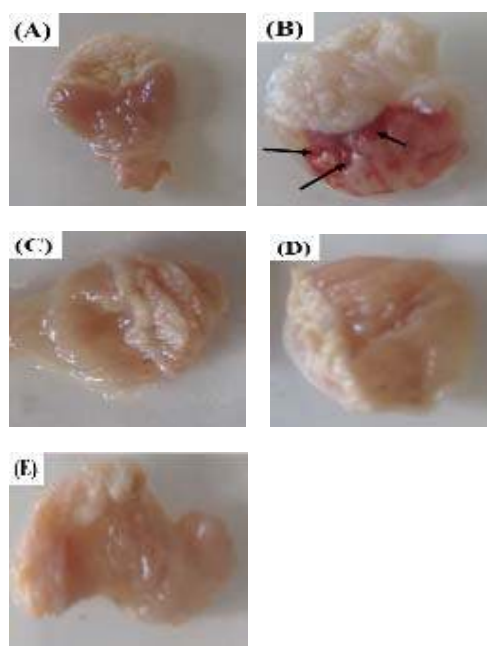


Figure 2: Effect of n-BuOH extract of *Centaurea tougourensis* on the macroscopic appearance of gastric mucosa in EtOH-induced ulcer in mice; (A) normal control, (B) ulcer-control, (C) omeprazole-treated group (20 mg/kg), (D) n-BuOH extract-treated group (200 mg/kg), (E) n-BuOH extract-treated group (400 mg/kg)

species reported high levels of tannins, flavonoids, polyphenols and terpenes in these species. This finding is consistent with the results obtained in this study. Similar results were reported by Zengin *et al* [12].

These researchers correlated the pharmacological potential of eight *Centaurea* species with their high contents of polyphenols, flavonoids

and tannins, especially in *C. triumfettii*, *C. patula* and *C. pulchella*. Qualitative and quantitative analyses of n-BuOH fraction of *Centaurea choulettiana* Pomel revealed high levels of phenolic compounds and flavonoids [13]. On the other hand, Joujeh *et al* [14] demonstrated dose-effect relationship between phenolic content of *Centaurea iberica* and anti-hemolytic effect.

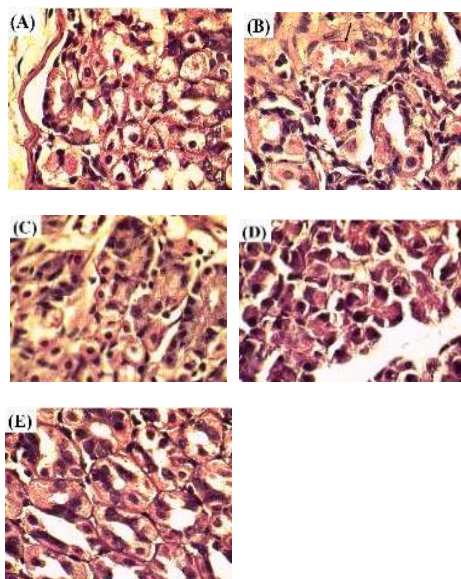


Figure 3: Histopathologic examination of mice stomach tissues after EtOH-induced ulcer (H&E stain, $\times 100$); (A) normal control, (B) ulcer-control, (C) omeprazole-treated group (20 mg/kg), (D) n-BuOH extract-treated group (200 mg/kg), (E) n-BuOH extract-treated group (400 mg/kg)

Carrageenan-induced paw edema in a rodent experimental model is a well-known test used to determine the anti-inflammatory potential of plant extracts. The test occurs in two phases. The increase in paw edema during the first phase could be explained by the huge release of histamine and serotonin, resulting in release of bradykinin and increase in vascular permeability [15]. The results obtained in this study indicate a possible anti-inflammatory effect of *C. tougourensis*, and they are in agreement with the established fact that reduction in edema take place in the second and third hours after carrageenan injection [16]. The decrease in paw edema in *C. tougourensis* groups during the late phase could be due to a strong inhibition exerted by the n-BuOH extract on prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO) which are the principle pro-inflammatory mediators, by inhibiting the expressions of nitric oxide synthetase (iNOS) and cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) [2]. This could also imply blockage of the recruitment of key cytokine (IL-1 β) which is

normally involved in the second phase, thereby blocking the appearance of this phase [17]. The indomethacin group showed a slight increase in paw diameter 24 h after carrageenan injection, probably due to slight reactivation of inflammatory process [10].

Saponins exert remarkable anti-inflammatory effects by directly blocking inflammation [18]. They decrease neutrophil infiltration, thereby lowering inflammatory response based on immunity. Recent research involving triterpenes suggested that these compounds have significant anti-inflammatory properties e.g., wound healing by accelerating the involvement of several mediators called 'cascade of healing' at cellular and molecular levels. These events result in reduction of wound closure time.

The results of this study suggest that a high dose of n-BuOH extract of *C. tougourensis* may block the inflammatory process due to its appreciable phenolic and tannin contents. Indeed, previous work showed that high tannin content may be responsible for pharmacological effects such as significant disabling of macro- and micro-vascular complications [20].

The anti-ulcer effects seen in this study are in agreement with results of other research works involving murine models which showed significant anti-ulcer effects of some *Centaurea* species via prevention of formation of gastric mucosa lesions due to their high phenolic and flavonoid contents [21]. These compounds reduce the risk of developing inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease, by suppressing the JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling pathways [22]. A study by Pirvu *et al* demonstrated that polysaccharides may act in synergy with polyphenols to enhance the gastroprotective effects of *Centaurea cyanus* [23]. This could be explained by the fact that polysaccharides provide a protective layer that consolidates the gastric mucous layer.

Mucilages have been shown to be useful in the treatment of several gastrointestinal diseases. A study on ulcerated rat groups showed that mucilages significantly reduced the acidity in the gastric juice and increased the gastric pH [23]. This suggests that mucilages may act as barriers that protect the digestive tract from the various digestive enzymes and excess gastrointestinal acidity [24]. In this study, it was found that *C. tougourensis* contained high levels of mucilage,

and the procedure used in extract preparation favored the extraction of these molecules.

CONCLUSION

This study has demonstrated the phytochemical and pharmacological potentials of *Centaurea* species. Further investigations are required for better understanding of the chemical composition and the full potentials of *Centaurea tougourensis*.

DECLARATIONS

Acknowledgement

The authors wish to express thanks to Prof. Bachir Oudjehih of the Agronomy Department of the University of Batna-1 (Algeria) for identifying the plant, and to Dr Souad Bensaci from Anapathology unit of the University Hospital Center of Batna (Algeria) for histological analysis. The authors also thank DGRSDT of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, DGRSDT).

Conflicts of interest

No conflict of interest is associated with this work.

Contribution of authors

We declare that this work was done by the authors named in this article, and all liabilities pertaining to claims relating to the content of this article will be borne by the authors. Mohamed Sabri Bensaad performed the in vivo experiments and wrote the manuscript. Saliha Dassamiour wrote the manuscript and conducted data analysis. Leila Hambaba supervised the work. Mohamed Amine Kahoul and Mohammed Benhoula carried out the phytoscreening aspect of the work.

Open Access

This is an Open Access article that uses a funding model which does not charge readers or their institutions for access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) and the Budapest Open Access Initiative (<http://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>), which permit unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

REFERENCES

- Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmborg JP. *Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing the Epidemic of Chronic Diseases*. *Front Med* 2018; 5: 316.
- Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. *Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation*. *J Autoimmun* 2015; 60: 1-11.
- Mejia A, Kraft WK. *Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment*. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2009; 2(3): 295-314.
- Fabricant DS, Farnsworth NR. *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. *Environ Health Perspect* 2001; 109 (S1): 69-75.
- Escher GB, Santos JS, Rosso ND, Marques MB, Azevedo L, do Carmo MAV. *Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of Centaurea cyanus L. petals aqueous extract*. *Food Chem Toxicol* 2018; 118: 439-453.
- Ozsoy N, Kultur S, Yilmaz-Ozden T, Ozbek Celik B, Can A, Melikoglu G. *Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acetylcholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Activities of Turkish Endemic Centaurea antiochiavar. Praealta*. *J Food Biochem* 2015; 39(6): 771-776.
- National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press 2010.
- Makkar HPS. *Measurement of Total Phenolics and Tannins Using Folin-Ciocalteu Method. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Springer Dordrecht 2003; 49-51.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). *Test no. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure*. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* 2008; 4: 1-2.
- Lu TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC, Peng WH. *Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from Glycine tomentella root in mice*. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(1): 142-148.
- Li Q, Hu X, Xuan Y, Ying J, Fei Y, Rong J, Zhang Y, Zhang J, Liu C, Liu Z. *Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2018; 50(3): 246-253.
- Zengin G, Locatelli M, Carradori S, Mocan A, Aktumsek A. *Total Phenolics, Flavonoids, Condensed Tannins Content of Eight Centaurea Species and Their Broad Inhibitory Activities against Cholinesterase, Tyrosinase, α -Amylase and α -Glucosidase*. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 2016; 44(1): 195-200.
- Azzouzi D, Bioud K, Demirtas I, Gul F, Sarri D, Benayache S, Benayache F, Mekkiou R. *Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Centaurea choulettiana Pomel (Asteraceae) Extracts*. *Comb Chem High Throughput Screen* 2016; 19(10): 841-846.

14. Joujeh R, Zaid S, Mona S. Phytochemical analysis, total phenolic content, hemolytic and antihemolytic activities of *Centaurea iberica* (Asteraceae), *Sci J King Faisal Univ* 2020; 35-43.
15. Jiang L, Lu Y, Jin J, Dong L, Xu F, Chen S, Wang Z, Liang G, Shan X. *n*-Butanol extract from *Folium isatidis* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in macrophages and protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 5601-5609.
16. Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NU, Karaalp C. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athena*. *Pharm Biol* 2014; 52(6): 775-781.
17. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tolusso B, De Benedetti F. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2010; 16(11-12): 552-557.
18. Kim HS, Jang CG, Oh KW, Oh S, Rhee HM, Rhee GS, Seong YH, Park WK. Effects of ginseng total saponin on morphine-induced hyperactivity and conditioned place preference in mice. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(1): 33-42.
19. Ghiulai R, Roşca OJ, Antal DS, Mioc M, Mioc A, Racoviceanu R, Macaşoi I, Olariu T, Dehelean C, Creţu OM et al. Tetracyclic and Pentacyclic Triterpenes with High Therapeutic Efficiency in Wound Healing Approaches. *Molecules* 2020; 25(23): 5557.
20. Mota ML, Thomas G, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol* 1985; 13(3): 289-300.
21. Gürbüz 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; 112(2): 284-291.
22. Hong JY, Chung KS, Shin JS, Park G, Jang YP, Lee KT. Anti-Colitic Effects of Ethanol Extract of *Persea americana* Mill. through Suppression of Pro-Inflammatory Mediators via NF- κ B/STAT3 Inactivation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. *Int J Mol Sci* 2019; 20(1): 177.
23. Pirvu L, Bubueanu C, Panteli M, Petcu L, Coprean D. *Centaurea cyanus* L. Polysaccharides and Polyphenols Cooperation in Achieving Strong Rat Gastric Ulcer Protection. *Open Chem* 2015; 13(1): 910-921.
24. Sharma AL, Bhot MA, Chandra N. Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz *Anc Sci Life* 2014; 33(4): 252-258.

Résumé

Afin de contribuer à l'élaboration d'une pharmacopée algérienne, ainsi qu'à la sauvegarde du patrimoine lié à l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle, ce travail s'est intéressé à l'étude des propriétés chimiques et pharmacologiques d'une espèce de plante de la région des Aurès nommée *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. Sur le plan phytochimique, cette espèce a montré une richesse en diverses classes de métabolites secondaires, avec une teneur en polyphénols élevé pour l'extrait n-BuOH et EA qui était de $(85.44 \pm 3.89 \mu\text{g EAG mg/ d'extrait})$ et $(124.02 \pm 1.57 \mu\text{g EAG mg/ d'extrait})$ respectivement. L'analyse par HPLC-DAD a révélé au niveau de ces deux extraits la présence de 13 composés qui étaient principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques. L'analyse par GC-MS a permis d'identifier 45 composés dans l'extrait n-BuOH et 23 composés dans l'extrait EA de *C. tougourensis*.

Sur le plan pharmacologique, l'extrait n-BuOH a montré de meilleurs résultats par rapport à l'extrait EA et les résultats ont évolué d'une manière dose-dépendante. Les différents tests antioxydants ont montré de bonnes valeurs d'IC₅₀ et d'A_{0.5} pour l'extrait n-BuOH, qui se rapprochaient pour certains tests des valeurs des standards. Ces valeurs étaient de $0.72 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ pour le test DPPH, $8.04 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ pour le test ABTS, $4.46 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ pour le test de la phénanthroline, $4.25 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ pour le test GOR, $11.16 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$ pour le test FRAP et inférieur à $3.125 \mu\text{g/mL}$ pour le test CUPRAC. Cet extrait a accéléré le temps de coagulation avec un pourcentage maximal de (86.71%) pour la concentration testée de 4 mg/mL. L'activité neuroprotectrice de l'extrait n-BuOH était également considérable avec des valeurs IC₅₀ de $9.8 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$ pour le test d'inhibition de l'acétylcholinestérase et de $173.53 \pm 0.04 \mu\text{g/MI}$ pour le test d'inhibition de la butyrylcholinestérase. L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* a été testée par deux tests, le test de stabilisation des membranes des globules rouges, qui a révélé une valeur EC₅₀ de l'extrait n-BuOH de $154.15 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ et le test de dénaturation des protéines ayant révélé des valeurs EC₅₀ pour le même extrait, qui était de $335 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ pour le test BSA et $120.81 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ pour celui de l'œuf de poule. L'inhibition de l'activité de l'alpha amylase a également été évaluée et les deux extraits n-BuOH et EA semblent avoir un effet d'inhibition comparable sur cette enzyme. Les valeurs IC₅₀ étaient de $711.5 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait n-BuOH et 962 ± 0.02 pour EA. L'extrait n-BuOH a montré un facteur de protection solaire maximal de (56.035). Concernant l'activité antimicrobienne, l'extrait EA a été plus actif et a montré des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 0.00625 mg/mL contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et 0.0125 mg/mL contre *Escherichia coli* pathogène.

La partie *in-vivo* a été réalisée avec l'extrait n-BuOH, le test de toxicité aiguë n'a révélé aucun signe de toxicité de la plante et ceci même pour la dose testée de 2000 mg/kg. Les divers résultats obtenus suggèrent que *C. tougourensis* posséderait une bonne activité analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique, antiulcéreuse, hépatoprotectrice et cicatrisante et ceci pour les deux concentrations testées (200 et 400 mg/kg) mais les résultats ont été considérés meilleurs avec la concentration de 400 mg/kg. Cette plante a également montré une bonne activité antidiabétique, que ce soit pour le test de tolérance au glucose (OGTT) ou bien du diabète induit par la streptozotocine. Les divers examens histologiques ont appuyé les résultats obtenus, ainsi que l'analyse des paramètres biochimiques et hématologiques.

Ces résultats encourageants montrent le potentiel pharmacologique des espèces *Centaurea* et indiquent que *C. tougourensis* pourrait avoir des effets thérapeutiques prometteurs dans le traitement de plusieurs maladies chroniques associées à l'inflammation et au diabète.

Mots clés : *Centaurea tougourensis*, phytochimie, activités biologiques, paramètres biochimiques, paramètres hématologiques, histologie.