



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



جامعة 20 أوت 1955 سكيكدة

Université du 20 Août 1955 Skikda

Faculté des sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

(LMD)

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

**Intitulé :**

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antidiabétique et  
d'autres activités biologiques de *Centaurea papposa* et *Myrtus  
communis***

**Présenté et soutenu**

Le 11/06/2025

**Par**

BOUNAAS Jihane

**Membres de jury :**

**Présidente :** Pr. ZAIDI Nedjoua (Professeur- Université de Skikda)

**Examinatrice :** Pr. SLIMANI Souheila (Professeur- Université de Skikda)

**Examinatrice :** Dr. BENMAKHOUL Zebida (MCA- Centre Universitaire Mila)

**Directeur de thèse :** Pr. BASLI Abdelkader (Professeur- Université de Skikda)

**Co-directrice de thèse :** Dr. BENZAZIA Samia (MCA- Université de Skikda)

**Année universitaire :2024/2025**

## **Remerciement**

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Dieu, qui m'a insufflé la force et la persévérance indispensables à l'achèvement de ce projet de thèse.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme la Présidente du jury, ZAIDI Nedjoudja, Professeur à l'université de 20 Aout 1955, pour avoir accepté de présider ce jury et pour le temps précieux qu'elle a consacré à l'évaluation de ce travail.*

*J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury, Mme SLIMANI Souheila, Professeur à l'université de 20 Aout 1955, Skikda, et Mme BENMAKHLOUF Zebida, Docteur au Centre Universitaire de Mila, pour leur évaluation attentive ainsi que pour le temps précieux qu'elles m'ont consacré.*

*Je tiens à remercier ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur BASLI Abdelkader, pour son encadrement rigoureux, ses conseils éclairés ainsi que pour sa disponibilité constante. Son expertise et son soutien ont été déterminants dans la réussite de cette recherche.*

*Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude à ma co-directrice, le Dr BENZAZIA Samia, pour son soutien précieux tout au long de ce travail.*

*Je tiens à remercier également Dr. BENSOUICI Chawki, Pr. AOUICHAT Bouguerra Souhila, Pr. OZEN Tevfik, Pr. ERENLER Ramazan, et Dr. RAHAL Sarah pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée tout au long de ma pratique.*

*Enfin, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes collègues OUNISSI Ismahan et DERBAL Saïd, ainsi qu'à ma famille, pour leur soutien indéfectible tout au long de ce parcours.*

## Résumé

Cette étude a pour un objectif d'évaluer *in vitro* les activités antioxydantes, anticancéreuses, antibactériennes, l'inhibition enzymatique et le facteur de protection solaire (SPF) des extraits hydrométhanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et N-butanolique des feuilles de *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*. La composition phytochimique des extraits a été analysée par LC-ESI-MS/MS, tandis que le Docking moléculaire a permis d'étudier les interactions entre les composés bioactifs et les sites actifs enzymatiques. Parallèlement, l'activité antidiabétique a été confirmée *in vivo* sur une souche de rats Wistar diabétiques, dont le diabète a été induit par l'administration d'alloxane. Les principaux composés phénoliques détectés par l'analyse LC-ESI-MS/MS chez *M. communis* sont l'acide gallique, la catéchine, l'épigallocatechine, l'acide shikimique et la lutéoline, avec une prédominance de l'acide gallique, et de l'épigallocatechine dans l'extrait d'acétate d'éthyle (1502.228 µg/L et 1204.629 µg/L respectivement), de l'acide shikimique dans l'extrait N-butanolique (2425.644 µg/L) et de la lutéoline dans l'extrait chloroformique (173.749 µg/L µg/L). Chez *C. papposa*, l'acide shikimique, l'acide salicylique, la lutéoline, l'acide vanillique, l'acide protocatechuique et l'acide chlorogénique ont été identifiés. L'acide shikimique dominait dans l'extrait hydrométhanolique (9725.462 µg/L), l'acide vanillique et l'acide protocatechuique dans l'extrait d'acétate d'éthyle (2800.594 µg/L, 2711.204 µg/L, respectivement), l'acide chlorogénique dans l'extrait N-butanolique (2554.06 µg/L), tandis que l'extrait chloroformique était riche en acide salicylique et lutéoline (168.441 µg/L et 160.494 µg/L, respectivement). Les extraits des deux plantes ont montré une activité antioxydante variable, allant d'une activité puissante à quasi inactive selon les tests, avec une activité particulièrement significative observée pour les extraits d'acétate d'éthyle ( $CI_{50} < 10$  µg/mL pour *M. communis* et  $CI_{50}$  comprise entre 5 et 300 µg/mL pour *C. papposa*). Concernant l'inhibition de la cholinestérase, l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* a présenté un effet inhibiteur notable ( $CI_{50} < 23$  µg/mL). Par ailleurs, tous les extraits de *M. communis* ont inhibé de manière significative l' $\alpha$ -amylase ( $CI_{50}$  variant de 10.67 à 28.55 µg/mL) ainsi que l' $\alpha$ -glucosidase ( $CI_{50}$  comprise entre 3.45 et 5.49 µg/mL). En revanche, les extraits de *C. papposa* étaient inactifs. De plus, tous les extraits ont montré un SPF supérieure à 39. D'après les résultats des tests de cytotoxicité réalisés sur les lignées cellulaires Hep2 (dérivée du carcinome laryngé humain) et HCT116 (dérivée du carcinome colorectal humain), l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. papposa* a montré une inhibition significative sur les deux lignées cellulaires ( $CI_{50} < 38$  µg/mL). En ce qui concerne l'activité antibactérienne, l'extrait chloroformique de *C. papposa* a présenté la meilleure activité contre *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*, avec une CMI de 62.5 µg/mL et une zone d'inhibition de 20 mm. Les extraits d'acétate d'éthyle de *C. papposa* et *M. communis* ont été efficace contre *Proteus mirabilis* (22 et 20 mm, 62.5 µg/mL). Pour *Klebsiella pneumoniae*, l'extrait hydrométhanolique de *C. papposa* a montré une inhibition de 20 mm et une CMI de 62.5 µg/mL. L'étude de Docking a montré que la majorité des composés étudiés présentent une bonne stabilité dans le site actif des enzymes. L'extrait hydrométhanolique de *M. communis* a démontré un effet hypoglycémiant, une amélioration des troubles lipidiques, une modulation hormonale et hématologique, ainsi qu'une capacité régénérative des tissus endommagés, soulignant son potentiel thérapeutique contre le diabète et ses complications. En conclusion, ces deux espèces présentent une activité antioxydante significative, offrant un potentiel prometteur pour prévenir les maladies liées au stress oxydatif et pour développer des traitements anticancéreux, antidiabétique et antibactériens.

**Mot clés :** *Myrtus communis*, *Centaurea papposa*, LC-ESI-MS/MS, Activités biologiques, Docking moléculaire.

## Abstract

This study aims to evaluate in vitro the antioxidant, anticancer, antibacterial activities, enzymatic inhibition, and sun protection factor (SPF) of hydromethanolic, chloroform, ethyl acetate, and N-butanolic extracts from the leaves of *Myrtus communis* and *Centaurea papposa*. The phytochemical composition of the extracts was analyzed by LC-ESI-MS/MS, while molecular Docking was employed to investigate the interactions between bioactive compounds and enzymatic active sites. Concurrently, the antidiabetic activity was confirmed in vivo using a diabetic Wistar rat strain induced by alloxan administration. The main phenolic compounds detected by LC-ESI-MS/MS analysis in *M. communis* are gallic acid, catechin, epigallocatechin, shikimic acid and luteolin with a predominance of gallic acid and epigallocatechin in the ethyl acetate extract (1502.228  $\mu\text{g/L}$  and 1204.629  $\mu\text{g/L}$  respectively), shikimic acid in the N-butanol extract (2425.644  $\mu\text{g/L}$ ) and luteolin in the chloroformic extract (173.749  $\mu\text{g/L}$   $\mu\text{g/L}$ ). In *C. papposa*, shikimic acid, salicylic acid, luteolin, vanillic acid, protocatechuic acid and chlorogenic acid were identified. Shikimic acid dominated in the hydromethanolic extract (9725.462  $\mu\text{g/L}$ ), vanillic acid and protocatechuic acid in the ethyl acetate extract (2800.594  $\mu\text{g/L}$ , 2711.204  $\mu\text{g/L}$ , respectively), chlorogenic acid in the N-butanol extract (2554.06  $\mu\text{g/L}$ ), while the chloroformic extract was rich in salicylic acid and luteolin (168.441  $\mu\text{g/L}$  and 160.494  $\mu\text{g/L}$ , respectively). The extracts from both plants exhibited variable antioxidant activity, ranging from strong to nearly inactive depending on the assays performed, with particularly significant activity observed for the ethyl acetate extracts ( $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  for *M. communis* and  $\text{IC}_{50}$  between 5 and 300  $\mu\text{g/mL}$  for *C. papposa*). Regarding cholinesterase inhibition, the hydromethanolic extract of *M. communis* showed a notable inhibitory effect ( $\text{IC}_{50}$  of  $22.82 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$  against AChE and  $10.70 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$  against BChE). Moreover, all *M. communis* extracts significantly inhibited  $\alpha$ -amylase ( $\text{IC}_{50}$  ranging from 10.67 to 28.55  $\mu\text{g/mL}$ ) as well as  $\alpha$ -glucosidase ( $\text{IC}_{50}$  between 3.45 and 5.49  $\mu\text{g/mL}$ ). The extracts of *C. papposa* were inactive against these enzymes. Additionally, all extracts demonstrated a sun protection factor (SPF) greater than 39. According to cytotoxicity tests conducted on Hep2 (derived from human laryngeal carcinoma) and HCT116 (derived from human colorectal carcinoma) cell lines, the ethyl acetate extract of *C. papposa* showed significant inhibition on both cell lines ( $\text{IC}_{50} < 38 \mu\text{g/mL}$ ). Concerning the antibacterial activity, the chloroform extract of *C. papposa* exhibited the strongest activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 62.5  $\mu\text{g/mL}$  and an inhibition zone of 20 mm.

The ethyl acetate extracts of both *C. papposa* and *M. communis* were effective against *Proteus mirabilis* (inhibition zones of 22 and 20 mm, MIC of 62.5 µg/mL). For *Klebsiella pneumoniae*, the hydromethanolic extract of *C. papposa* showed a 20 mm inhibition zone and an MIC of 62.5 µg/mL. The Docking studies revealed that most studied compounds demonstrated good stability within the active site of enzymes. The hydromethanolic extract of *M. communis* demonstrated a hypoglycemic effect, improvement of lipid disorders, hormonal and hematological modulation, as well as regenerative capacity of damaged tissues, highlighting its therapeutic potential against diabetes and its complications. In conclusion, these two species exhibit significant antioxidant activity, offering promising potential for the prevention of oxidative stress-related diseases and for the development of anticancer, antidiabetic, and antibacterial treatments.

**Keywords:** *Myrtus communis*, *Centaurea papposa*, LC-ESI-MS/MS, Biological Activities, Molecular Docking.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم مضادات الأكسدة والسرطان والبكتيريا، والتثبيط الإنزيمي، وعامل الحماية من أشعة الشمس للمستخلصات الهيدروميثانولية، الكلوروفورمية، الأستات الإيثيلية والبيوتانولية من أوراق نباتي *Myrtus communis* و *Centaurea papposa*. تم تحليل التركيب الكيميائي النباتي للمستخلصات بواسطة LC-ESI-MS/MS، بينما تم استخدام الالتحام الجزيئي لدراسة التفاعلات بين المركبات العضوية والمواقع الفعالة للإنزيمات. إلى جانب ذلك، تم تأكيد النشاط المضاد لمرض السكري في الجسم الحي باستخدام سلالة من الفئران Wistar المصابة بمرض السكري عن طريق إعطائها ألوكان. بالنسبة لـ *M. communis*، كشفت تحليلات LC-ESI-MS/MS أن المستخلص الهيدروميثانولي يحتوي على تركيزات عالية من حمض الغاليك (278.150 ميكروغرام/لتر) واللوتولين (112.214 ميكروغرام/لتر). كان مستخلص أسيتات الإيثيل يتكون أساساً من حمض الغاليك (1502.228 ميكروغرام/لتر) وإبيغالوكتشين (1204.629 ميكروغرام/لتر) وكاتشين (410.925 ميكروغرام/لتر). في المستخلص-N بوتانوليك، كانت المركبات الرئيسية هي حمض الشيكيميك (2425.644 ميكروغرام/لتر) وحمض الغاليك (220.417 ميكروغرام/لتر). أخيراً، كان اللوتولين (173.749 ميكروغرام/لتر) هو المركب الرئيسي في المستخلص الكلوروفورمي. بالنسبة لـ *C. papposa*، أظهر المستخلص الهيدروميثانولي تركيزاً عالياً من حمض الشيكيميك (9725.462 ميكروغرام/لتر). كان المستخلص الكلوروفورمي يتكون بشكل أساسي من حمض الساليسيليك (168.441 ميكروغرام/لتر) واللوتولين (160.494 ميكروغرام/لتر). في مستخلص أسيتات الإيثيل، كانت المركبات الرئيسية هي حمض الفانيليك وحمض البيروتوكاتيك وحمض الكلوروجينيك وحمض الشيكيميك، بتركيزات 2800.594 ميكروغرام/لتر و2711.204 ميكروغرام/لتر و1548.760 ميكروغرام/لتر و1474.868 ميكروغرام/لتر على التوالي. في مستخلص-N بوتانوليك، كانت المركبات السائدة هي حمض الشيكيميك (8388.38 ميكروغرام/لتر) وحمض الكلوروجينيك (2554.06 ميكروغرام/لتر). أظهرت المستخلصات من كلا النباتين نشاطاً مضاداً للأكسدة متغيراً، يتراوح من قوي إلى شبه غير نشط اعتماداً على الاختبارات التي أجريت، مع ملاحظة نشاط كبير لمستخلصات أسيتات الإيثيل ( $IC_{50} < 10$  ميكروغرام/مل لـ *M. communis* و  $IC_{50}$  بين 5 و 300 ميكروغرام/مل لـ *C. papposa*). فيما يتعلق بتثبيط الكولين إستراز، أظهر المستخلص الهيدروميثانولي من *M. communis* تأثيراً تثبيطياً ملحوظاً ( $IC_{50}$  من  $0.05 \pm 22.82$  ميكروغرام/مل ضد AChE و  $10.70 \pm 0.22$  ميكروغرام/مل ضد BChE). علاوة على ذلك، أظهرت جميع مستخلصات *M. communis* تثبيطاً كبيراً لإنزيم  $\alpha$  amylase بقيمة تتراوح بين 10.67 و 28.55 ميكروغرام/مل وكذلك إنزيم  $\alpha$  glucosidase ( $IC_{50}$  بين 3.45 و 5.49 ميكروغرام/مل). كانت مستخلصات *C. papposa* غير فعالة ضد هذه الإنزيمات. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع المستخلصات عامل حماية من أشعة الشمس (SPF) أكبر من 39. وفقاً لاختبارات السمية الخلوية التي أجريت على خطوط الخلايا Hep2 (المشتقة من سرطان الحنجرة البشري) و HCT116 (المشتقة من سرطان القولون والمستقيم البشري)، أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل من *C. papposa* تثبيطاً كبيراً على كلا الخطين الخلويين ( $IC_{50}=38$  ميكروغرام/مل) فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا، أظهر مستخلص الكلوروفورم من *C. papposa* أقوى نشاط ضد *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، مع تركيز تثبيط أدنى (MIC) يبلغ 62.5 ميكروغرام/مل ومنطقة تثبيط تبلغ 20 ملم. كانت مستخلصات أسيتات الإيثيل لكل من *C. papposa* و *M. communis* فعالة ضد *Proteus mirabilis* (مناطق تثبيط 22 و 20 مم،  $MIC = 62.5$  ميكروغرام/مل) بالنسبة لـ *Klebsiella pneumoniae*، أظهر مستخلص هيدروميثانوليك *C. papposa* منطقة تثبيط 20 مم و  $MIC = 62.5$

ميكروغرام/ مل. كشفت دراسة الالتحام أن معظم المركبات المدروسة أظهرت ثباتاً جيداً داخل المواقع الفعالة للإنزيمات . أظهر المستخلص الهيدروميثانولي من *M. communis* تأثيراً خافضاً للسكر في الدم، وتحسناً في اضطرابات الدهون، وتعديلاً هرمونياً ودموياً، بالإضافة إلى قدرة على تجديد الأنسجة التالفة، مما يسلب الضوء على إمكاناته العلاجية ضد مرض السكري ومضاعفاته. في الختام، يُظهر هذان النوعان نشاطاً مضاداً للأكسدة كبيراً، مما يوفر إمكانات واعدة للوقاية من الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي وتطوير علاجات مضادة للسرطان والسكري والبكتيريا.

**الكلمات المفتاحية:** *Myrtus communis*، *Centaurea papposa*، LC-ESI-MS/MS ، الأنشطة البيولوجية، الالتحام الجزيئي.

## Résumés

## Sommaire

### Liste des figures

### Listes des tableaux

### Liste des abréviations

## Introduction générale..... 1

### Chapitre 1 : Données bibliographiques

1. Famille des Myrtaceae .....	4
2. Genre Myrtus .....	4
3. <i>Myrtus communis</i> .....	4
3.1. Description botanique.....	4
3.2. Classification taxonomique .....	6
3.3. Usage en médecine traditionnelle.....	6
3.4. Activités biologiques .....	7
1. Famille des Asteraceae .....	8
2. Genre Centaurea .....	9
3. <i>Centaurea papposa</i> .....	11
3.1. Description botanique.....	11
3.2. Position systématique .....	12
3.3. Activités biologiques .....	12
1. Stress oxydatif .....	13
2. Diabète sucré (diabète mellitus) .....	13
2.1. Diabète de type 1 .....	13
2.2. Diabète de type 2 .....	14
2.3. Diabète monogénique .....	15
2.4. Diabète gestationnel .....	16

3. Relation entre le diabète et le stress oxydatif .....	16
3.1. Stress oxydatif comme conséquence du diabète.....	16
3.2. Stress oxydatif dans l'aggravation du diabète .....	17

## **Chapitre II : Section expérimentale**

1. Matériel végétale .....	19
2. Préparation des extraits.....	19
1.1. Extraction par ultrasons .....	19
1.2. Extraction liquide-liquide .....	20
3. Dosage des polyphénols .....	21
4. Analyse par LC-ESI-MS/MS.....	22
5. Tests des activités antioxydantes .....	23
5.1. Activité antiradicalaire au DPPH'.....	23
5.2. Activité antiradicalaire par piégeage de l'ABTS <sup>+</sup> .....	24
5.3. Test de pouvoir réducteur (FRAP) .....	25
5.4. Test de Silver nanoparticule (SNP) .....	26
5.5. Test de Phénanthroline .....	26
6. Teste enzymatiques.....	27
6.1. Inhibition des cholinestérases .....	27
6.2. Inhibition de l'alpha amylase .....	27
6.3. Inhibition de l'alpha glucosidase .....	28
6.4. Inhibition de l'uréase .....	28
6.5. Inhibition de la Tyrosinase .....	28
7. Facteur de protection solaire (SPF) .....	29
8. Cytotoxicité.....	29
9. Activité antibactérienne .....	31
9.1. Détermination de la zone d'inhibition .....	31

9.2. Détermination de la concentration inhibitrice minimale (CIM) .....	31
10. Docking moléculaire.....	32
10.1. Étude par Docking moléculaire de l'activité inhibitrice des enzymes .....	32
10.2. Étude par Docking moléculaire de l'activité antibactérienne.....	33
11. Etude in vivo de l'activité antidiabétique .....	33
11.1. Elevage .....	34
11.2. Induction du diabète et traitement .....	35
11.3. Sacrifice et prélèvement de sang .....	36
11.4. Prélèvement d'organes .....	38
Analyse statistique.....	39

### **Chapitre III: Résultats et discussion**

1. Etude phytochimique .....	40
1.1. Rendement d'extraction.....	40
1.2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes .....	40
1.3. Identification des constituants phytochimiques par LC-ESI-MS/MS .....	42
2. Evaluation des activités biologiques in vitro .....	54
2.1. Activity antioxydante .....	54
2.2. Inhibition de l'activité enzymatique .....	60
2.3. Facteur de protection solaire.....	66
2.4. Cytotoxicité .....	67
2.5. Activité antibactérienne .....	69
3. Docking moléculaire.....	72
3.1. Étude par Docking moléculaire de l'activité inhibitrice des enzymes .....	72
3.2. Étude par Docking moléculaire de l'activité antibactérienne.....	78
4. Etude in Vivo de l'activité antidiabétique .....	83

4.1. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique de la plant <i>Myrtus communis</i> sur les paramètres physiologiques .....	83
4.2. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur les paramètres biochimiques.....	86
4.3. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur le taux de testostérone.....	92
4.4. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur le nombre de globules rouges et de globules blancs .....	93
4.5. Comparaison des poids des différents organes (rein, foie, et pancréas) entre les groupes.....	95
4.6. Etude histologique .....	97
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>102</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>105</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Espèce <i>Myrtus communis</i> .....	5
<b>Figure 2.</b> Distribution du <i>Myrtus communis</i> .....	6
<b>Figure 3.</b> Principaux groupes des STL. ....	9
<b>Figure 4.</b> Répartition mondiale du genre <i>Centaurea</i> .....	10
<b>Figure 5.</b> Espèce <i>Centaurea papposa</i> .....	11
<b>Figure 6.</b> Physiopathologie du diabète de type 1.....	14
<b>Figure 7.</b> Protocole expérimental .....	18
<b>Figure 8.</b> Localisation des régions de Sidi Mezghiche et du Cap de Garde.....	19
<b>Figure 9.</b> Extractions par ultrasons.....	20
<b>Figure 10.</b> Courbes d'étalonnage de l'acide gallique (A) et de la quercétine (B). ....	22
<b>Figure 11.</b> Réduction de DPPH par un antioxydant .....	23
<b>Figure 12.</b> Formation du radical cation ABTS <sup>•+</sup> à partir de l'ABTS.....	24
<b>Figure 13.</b> Réduction du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant .....	24
<b>Figure 14.</b> Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant. ....	25
<b>Figure 15.</b> Réduction de l'Ag <sup>+</sup> par un antioxydant .....	26
<b>Figure 16.</b> Principe de test de coloration.....	30
<b>Figure 17.</b> Protocole expérimental in vivo. ....	34
<b>Figure 18.</b> Chromatogrammes des extraits hydrométhanolique (A), chloroformique (B), acétate d'éthyle (C), et N-butanolique (D) de la plante <i>M. communis</i> .....	43
<b>Figure 19.</b> Chromatogrammes des extraits hydrométhanolique (A), chloroformique (B), acétate d'éthyle (C), et N-butanolique (D) de la plante <i>C. papposa</i> . ....	48
<b>Figure 20.</b> Positionnement de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l'AChE. ....	74
<b>Figure 21.</b> Mode de liaison de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l'AChE. ....	74
<b>Figure 22.</b> Mode de liaison de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de la BChE. ....	75
<b>Figure 23.</b> Positionnement de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans la poche active de la BChE. ....	75
<b>Figure 24.</b> Positionnement de l'acarbose (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -amylase.....	76
<b>Figure 25.</b> Mode de liaison de l'acarbose (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -amylase.....	77

<b>Figure 26.</b> Positionnement de l'acarbose (A) et de l'acide gallique (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase. ....	77
<b>Figure 27.</b> Mode de liaison de l'acarbose (A) et de l'acide gallique (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase. ....	78
<b>Figure 28.</b> Re-Docking du ligand Co-cristallisé.....	79
<b>Figure 29.</b> Positions 3D et 2D de l'acide salicylique (vert) dans la cavité DHPS .....	81
<b>Figure 30.</b> Positions 3D et 2D de l'acide shikimique (orange) dans la cavité DHPS .....	81
<b>Figure 31.</b> Positions 3D et 2D de l'acide gallique (violet) dans la cavité DHPS .....	81
<b>Figure 32.</b> Positions 3D et 2D de l'acide protocatéchuique (jaune) dans la cavité DHPS.....	82
<b>Figure 33.</b> Positions 3D et 2D de l'acide vanillique (rose) dans la cavité DHPS .....	82
<b>Figure 34.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de <i>M. communis</i> sur le poids corporel.....	84
<b>Figure 35.</b> Influence de l'alloxane et l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur la consommation de l'eau (A) et de la nourriture (B).....	85
<b>Figure 36.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le taux de la glycémie. ....	87
<b>Figure 37.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d'urée (A), et de créatinine (B) dans le sang.....	89
<b>Figure 38.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d'ASAT (A), d'ALAT (B), et de bilirubine (C) dans le sang.....	90
<b>Figure 39.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d'HDL (A), de cholestérol (B) et de TG (C) dans le sang. ....	92
<b>Figure 40.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le taux de testostérone.....	93
<b>Figure 41.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le nombre de globules rouges (A) et de globules blancs (B).....	94
<b>Figure 42.</b> Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le poids relatif du foie (A), du rein (B), et du pancréas (C). ....	96
<b>Figure 43.</b> Photomicrographies du tissu hépatique .....	98
<b>Figure 44.</b> Photomicrographies du tissu rénal .....	99
<b>Figure 45.</b> Photomicrographies du tissu pancréatique.....	100

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Position systématique de la plante <i>Myrtus communis</i> . .....	6
<b>Tableau 2.</b> Position systématique de la plante <i>Centaurea papposa</i> . .....	12
<b>Tableau 3.</b> Valeurs de EE × I utilisées pour le calcul du SPF.....	29
<b>Tableau 4.</b> Poids et rendement de chaque extrait. ....	40
<b>Tableau 5.</b> Contenu total en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits de <i>Myrtus communis</i> et <i>Centaurea papposa</i> . .....	42
<b>Tableau 6.</b> Profil phytochimique des extraits de <i>Myrtus communis</i> .....	44
<b>Tableau 7.</b> Profil phytochimique des extraits de <i>Centaurea papposa</i> .....	49
<b>Tableau 8.</b> Activité antioxydante des extraits de <i>Myrtus communis</i> . ....	55
<b>Tableau 9.</b> Activité antioxydante des extraits de <i>Centaurea papposa</i> . ....	56
<b>Tableau 10.</b> Corrélation de Pearson (r). ....	56
<b>Tableau 11.</b> Inhibition enzymatique par les extraits de <i>Myrtus communis</i> et <i>Centaurea papposa</i> .....	61
<b>Tableau 12.</b> Facteur de protection solaire des extraits de <i>Myrtus communis</i> . ....	66
<b>Tableau 13.</b> Facteur de protection solaire des extraits de <i>Centaurea papposa</i> . ....	66
<b>Tableau 14.</b> Activité cytotoxique des extraits de <i>Centaurea Papposa</i> .....	68
<b>Tableau 15.</b> Activité antibactérienne des extraits. ....	70
<b>Tableau 16.</b> Scores énergétiques de six composés majeurs dérivés de l'extrait de <i>Myrtus communis</i> avec les enzymes AChE, BChE, $\alpha$ -amylase et $\alpha$ -glucosidase. ....	73
<b>Tableau 17.</b> Score de Docking des molécules et du ligand Co-cristallisé. ....	79
<b>Tableau 18.</b> Poids des reins, du foie et du pancréas au moment du sacrifice. ....	95

## Liste des Abréviations

### -A-

<b>ABCG 1</b>	Transporteur membranaire ATP-binding cassette G1
<b>AGE</b>	Produit de glycation avancée
<b>AK</b>	Amikacine
<b>AKT</b>	Protéine Kinase B
<b>AMC</b>	Amoxicilline + Acide clavulanique
<b>AMPK</b>	Protéine kinase AMP-dépendante
<b>AP-1</b>	Protéine Activatrice 1

### -B-

<b>Bak</b>	Antagoniste/tueur homologue de Bcl-2
<b>Bax</b>	Protéine Bcl-2-associated X
<b>Bcl-2</b>	Lymphome à cellules B

### -C-

<b>CAS</b>	Site anionique catalytique
------------	----------------------------

### -D-

<b>DHPP</b>	Dihydroptéridine pyrophosphate
<b>DHPS</b>	Dihydroptéroate synthétase
<b>DMEM</b>	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

### -E-

<b>ERO</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
------------	--------------------------------

### -G-

<b>GLUT2</b>	Transporteur de glucose 2
<b>GLUT4</b>	Transporteur de glucose 4
<b>GM</b>	Gentamicine
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène synthase kinase-3 bêta

### -H-

<b>Hpl</b>	Lactogène placentaire humain
------------	------------------------------

### -I-

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukine 1 bêta
<b>IL-6</b>	Interleukine 6

<b>IPM</b>	Imipenem
<b>IRS-1</b>	Substrat 1 du récepteur de l'insuline
<b>-J-</b>	
<b>JAK</b>	Janus kinases
<b>-M-</b>	
<b>MRM</b>	Surveillance des réactions multiples
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
<b>mTOR</b>	Protéine cible de la rapamycine chez les mammifères
<b>-N-</b>	
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Facteur nucléaire kappa B
<b>-P-</b>	
<b>PABA</b>	Acide para-aminobenzoïque
<b>PAS</b>	Site anionique périphérique
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PTPm</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
<b>-R-</b>	
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>-S-</b>	
<b>SREBP-1c</b>	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
<b>SRB 1</b>	Scavenger receptor class B type 1
<b>STL</b>	Lactone Sesquiterpénique
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>-T-</b>	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale alpha
<b>-V-</b>	
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

# *Introduction générale*



## **Introduction générale**

Les plantes médicinales font partie intégrante de la santé et du bien-être humains depuis des milliers d'années, constituant le fondement de nombreux systèmes de médecine traditionnelle à travers le monde. Elles sont définies comme des espèces contenant des composés bioactifs aux propriétés thérapeutiques, pouvant être utilisés dans la prévention et le traitement de diverses maladies (**Chabrier, 2010**). Leurs utilisations remontent à des civilisations très anciennes, où de nombreuses espèces végétales ont été identifiées et utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques. Ces connaissances traditionnelles, transmises au fil des générations, ont largement contribué au développement de la phytothérapie moderne, qui continue d'explorer et d'exploiter les bienfaits des plantes pour la santé (**Petrovska, 2012**).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale utilise encore les plantes médicinales comme alternative naturelle aux médicaments synthétiques (**Jamshidi-Kia et al., 2017**). Elles occupent une place importante dans la recherche grâce à diverses applications : elles peuvent être employées directement, modifiées pour produire des composés semi-synthétiques, ou utilisées comme base pour créer de nouvelles substances synthétiques aux caractéristiques similaires, plus efficaces ou plus faciles à synthétiser en grandes quantités (**Gurib-Fakim, 2006**).

Elles sont riches en divers composés bioactifs, tels que les flavonoïdes, les polyphénols, les terpénoïdes et les alcaloïdes, qui contribuent à leurs propriétés thérapeutiques. Ces composés jouent un rôle crucial dans la lutte contre le stress oxydatif et les maladies qui y sont associées (**Rudrapal et al., 2022**). Ils peuvent améliorer l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes endogènes, renforçant les mécanismes de défense antioxydante de l'organisme (**Mannino et al., 2022**), inhibant les enzymes favorisant le stress oxydatif (pro-oxydantes). Cette inhibition contribue à réduire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'autres sous-produits nocifs associés aux dommages oxydatifs (**Hunyadi, 2019**). Par ailleurs, ils exercent un effet anti-inflammatoire en inhibant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (**Khursheed et al., 2023**), ce qui aide à renforcer l'immunité cellulaire et à réduire les réponses inflammatoires inappropriées (**Gangwar et al., 2021**). De plus, ces composés sont capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et d'induire leur mort en ciblant plusieurs voies spécifiques impliquées dans la progression du cancer (**H. Yang et Ping Dou, 2010**). Ils présentent des effets neuroprotecteurs importants qui peuvent aider à prévenir ou atténuer les maladies

neurodégénératives grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, protégeant ainsi le cerveau de la perte neuronale et de la neurodégénérescence (Mohd Sairazi et Sirajudeen, 2020). En plus de ces effets, ces composés bioactifs ont été étudiés pour leur potentiel antidiabétique : ils imitent les effets de l'insuline, améliorant la captation du glucose et réduisant le taux de glycémie (Tran *et al.*, 2020). Par ailleurs, les polyphénols ont suscité un intérêt considérable pour leurs propriétés antibactériennes. Ils ont montré un potentiel prometteur dans la lutte contre les agents pathogènes bactériens, offrant ainsi des alternatives aux antibiotiques traditionnels où la résistance aux antibiotiques est de plus en plus répandue (Chinemerem Nwobodo *et al.*, 2022). La poursuite des recherches sur ces composés pourrait permettre de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et d'améliorer leur application en médecine moderne.

Les plantes médicinales possèdent un potentiel important pour des applications thérapeutiques, mais beaucoup restent encore sous-explorées, ce qui nécessite des études approfondies pour élucider leurs activités biologiques et leurs usages médicaux. Le but de cette recherche est d'étudier l'activité biologique de deux espèces, *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*, en particulier leurs propriétés antioxydantes, anti-diabétique, anticholinestérase, anticancéreuse, antibactérienne, ainsi que leur facteur de protection solaire. Cette étude inclut également la caractérisation des constituants phytochimiques des extraits de ces deux plantes à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS). Ce travail se compose principalement des parties suivantes :

Première partie : données bibliographiques

- Une présentation approfondie des familles botaniques Myrtaceae et Asteraceae, mettant en lumière leurs caractéristiques générales, leur classification, ainsi que leur importance pharmacologique. Une attention particulière sera portée aux espèces spécifiques *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*.
- Une revue théorique sur le diabète, et son lien avec le stress oxydatif.

Deuxième partie : section expérimentale

- Préparation des extraits,
- Quantification de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes,
- Caractérisation phytochimique par LC-ESI-MS/MS,

- Evaluation in vitro de l'activité antioxydante, de la propriété inhibitrice des enzymes (alpha amylase, alpha glucosidase, cholinestérases, tyrosinase et uréase), de l'activité anticancéreuse, de l'activité antibactérienne, ainsi que du facteur de protection solaire,
- Docking moléculaire,
- Evaluation in vivo de l'activité antidiabétique

Troisième partie : discussion des résultats et conclusion.



# *Chapitre I*

## *Données bibliographiques*

## Chapitre 1 : Données bibliographiques

### 1. Famille des Myrtaceae

La famille des Myrtaceae est composée d'environ 3 500 à 4 000 espèces d'arbustes et d'arbres, réparties en plus de 100 genres. Parmi elles, la tribu des Myrteae, appartenant à la sous-famille Myrtoideae, est particulièrement riche, regroupant environ 51 genres et près de 2 500 espèces, soit près de la moitié de la diversité de la famille. Les Myrtaceae se rencontrent principalement dans les régions tropicales et subtropicales du globe, avec une forte concentration en Australie, en Amérique tropicale et en Asie (Stefanello *et al.*, 2011).

Elle est classée en sous-familles en fonction des caractéristiques de leurs fruits (Johnson et Briggs, 1984) :

- Myrtoideae : Principalement présente dans les régions tropicales et subtropicales, cette sous-famille regroupe des espèces aux feuilles opposées et aux fruits bacciformes charnus (Silva *et al.*, 2012).
- Leptospermoideae : Cette sous-famille, que l'on trouve principalement en Australie et en Polynésie, comprend des espèces à feuilles alternées ou opposées, ainsi que des fruits secs, généralement sous forme de capsules loculicides (Silva *et al.*, 2012).

Les espèces de la famille des Myrtaceae sont des plantes aromatiques riches en substances phytochimiques, telles que les acides organiques, les sucres, les vitamines, les polysaccharides, les polyphénols et les minéraux (de Paulo Farias *et al.*, 2020).

### 2. Genre Myrtus

Le genre *Myrtus* comprend deux espèces principales : *Myrtus communis*, ou myrte vrai, cultivé dans la région méditerranéenne, et *Myrtus nivellei*, ou myrte saharien, présent dans le Sahara central. Les deux espèces sont présentes en Algérie (Bouzabata *et al.*, 2016).

### 3. *Myrtus communis*

#### 3.1. Description botanique

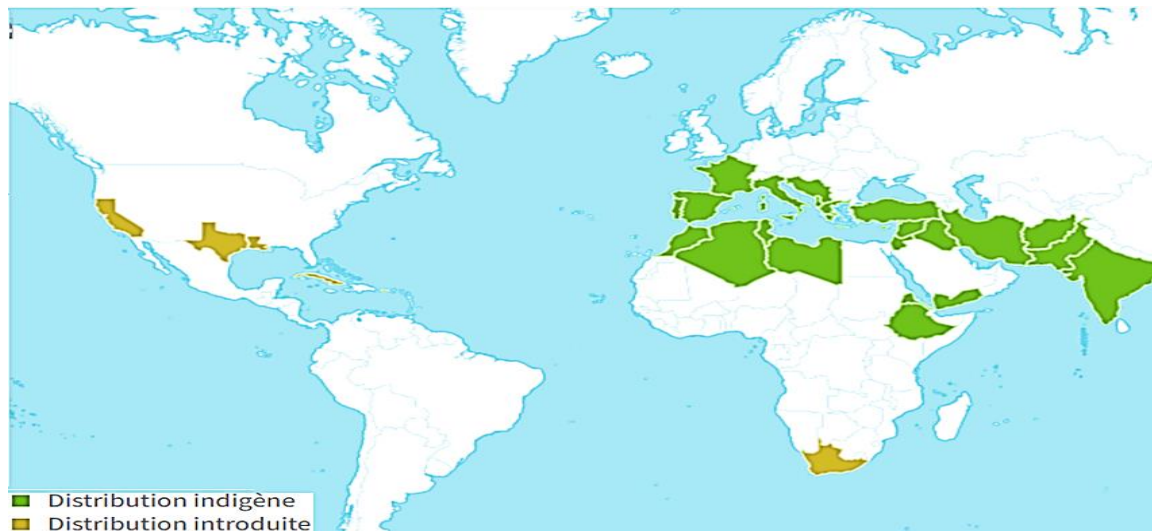
*M. communis* (الريحان، أس شائع) est un arbuste atteignant généralement une hauteur de 1 à 3 mètres. Ses feuilles, disposées de manière opposée, sont épaisses, lisses et ovales-lancéolées, c'est-à-dire allongées et se rétrécissant vers l'extrémité, évoquant la forme d'une lance. Elles mesurent entre 2 et 5 cm de longueur (Figure 1). La plante produit des fleurs

blanches en forme d'étoile, composées de cinq pétales et cinq sépales, qui fleurissent généralement de juin à septembre. Après la floraison, elle développe des fruits décrits comme des baies subglobuleuses à ellipsoïdes. Ces baies changent de couleur au cours de leur maturation, passant du bleuâtre-noir, dans de rares cas, un jaunâtre-blanc vers le mois de novembre (Özkan et Güray, 2009).



**Figure 1.** Espèce *Myrtus communis* (photo personnelle).

*M. communis* est une plante sauvage typique des régions méditerranéennes. Cette plante pousse naturellement à la lisière des forêts, ainsi que dans les garrigues et maquis rocaillieux bordant la Méditerranée, notamment en Europe du Sud, en Afrique du Nord et au Moyen-Orient, notamment en Iran. En tant qu'espèce indigène, elle joue un rôle essentiel dans la biodiversité locale et s'adapte aisément aux conditions climatiques de ces zones. En dehors de son aire de répartition naturelle, elle est également cultivée dans d'autres régions (Figure 2), grâce à sa résistance à la sécheresse et à sa capacité d'adaptation à divers types de sols (Zilkah et Goldschmidt, 2014).



**Figure 2.** Distribution du *Myrtus communis* fournit par : UICN, Liste rouge (2024).

### 3.2. Classification taxonomique

La position taxonomique de *M. communis* est exposée dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Position systématique de la plante *Myrtus communis*.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Myrtales
<b>Famille</b>	Myrtaceae
<b>Genre</b>	Myrtus
<b>Espèce</b>	<i>Myrtus communis</i>

### 3.3. Usage en médecine traditionnelle

Traditionnellement, le myrte est utilisé pour traiter les problèmes digestifs tels que la diarrhée, les ulcères peptiques, la constipation et un manque d'appétit, souvent par des décoctions ou des infusions de ses feuilles et fruits. Il est également utilisé pour les affections respiratoires comme la bronchite, la sinusite et la toux, ainsi que pour les maladies de peau, y compris l'eczéma, les plaies, la gale et l'acné, où les applications topiques de poudres de feuilles ou de décoctions sont courantes. Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de myrte et les cataplasmes sont spécifiquement utilisés pour soulager les hémorroïdes en réduisant l'enflure, les saignements, la douleur et les démangeaisons. De plus, le myrte est utilisé pour les problèmes de santé des femmes tels que les menstruations irrégulières et les saignements utérins. Ses effets calmants sont exploités dans certaines cultures pour soulager le stress et l'anxiété, avec du thé en feuilles consommé

quotidiennement en Turquie. L'huile essentielle et les extraits ont été appliqués pour les infections buccales, la candidose et comme adjuvants dans le traitement de l'insomnie. Dans l'ensemble, *Myrtus communis* reste apprécié en médecine traditionnelle pour ses rôles multiformes dans la gestion des troubles gastro-intestinaux, respiratoires, cutanés, inflammatoires et gynécologiques (Alipour *et al.*, 2014; Goyal *et al.*, 2022; M. Mir, 2023).

### 3.4. Activités biologiques

Les données disponibles indiquent que *M. communis* exerce des effets anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux (Alipour *et al.*, 2014; Hennia *et al.*, 2018; M. A. Mir *et al.*, 2024) :

- Antioxydantes : les extraits de *M. communis* ont démontré une capacité significative à piéger les radicaux libres, un mécanisme essentiel dans la prévention des maladies liées au stress oxydatif. Cet effet antioxydant est principalement attribué à la présence de composés phénoliques capables de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs.
- Anti-inflammatoire et analgésiques : *M. communis* a démontré sa capacité à inhiber les processus inflammatoires en supprimant la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes, médiateurs clés de l'inflammation et de la douleur. Cette activité anti-inflammatoire est principalement attribuée à des composés tels que la myrtucommulone, qui a montré une efficacité notable dans la réduction de l'inflammation,
- Effet cytotoxique : *Myrtus communis* présente des propriétés anticancéreuses significatives, notamment par sa capacité à induire l'apoptose dans diverses lignées cellulaires cancéreuses tout en affichant une toxicité minimale envers les cellules normales. Plusieurs études ont montré que les extraits de *M. communis* inhibent efficacement la prolifération de cellules cancéreuses, notamment les lignées du sein (MCF-7), du foie (HepG2), du col utérin (HeLa) et du côlon (HCT116), suggérant un potentiel thérapeutique prometteur pour le développement de traitements anticancéreux.

## 1. Famille des Asteraceae

La famille des Asteraceae, également appelée famille du tournesol ou des marguerites, est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, regroupant environ 1100 genres et 19000 espèces à travers le monde, ce qui en fait l'une des familles végétales les plus diversifiées. Ses membres occupent une grande variété d'habitats sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique, et se développent dans des environnements allant des forêts tropicales humides aux déserts et régions semi-arides. La majorité des espèces d'Asteraceae sont des plantes herbacées, mais la famille comprend également des arbustes, des lianes et des arbres. Elle présente une grande diversité de formes de croissance et inclut des espèces annuelles, bisannuelles ou pérennes (**Chibuzo et al., 2023; Panero et Crozier, 2012**).

Une caractéristique distinctive de la famille des Asteraceae est la présence de capitules, inflorescences composées de nombreuses fleurs individuelles appelées fleurons. Ces fleurons peuvent être de deux types : des fleurs tubulaires (en forme de disque) ou des fleurs ligulées (en forme de rayons). Les fleurs sont généralement bisexuées ou unisexuées. Les sépales sont souvent réduits à un pappus, une structure modifiée facilitant la dissémination des fruits. Les feuilles peuvent être alternes ou opposées, souvent lobées ou dentelées, tandis que les tiges varient de dressées à prostrées et peuvent sécréter du latex ou présenter des structures modifiées pour le stockage des réserves nutritives. Le fruit est typiquement un cypsèle, un fruit achénoïde contenant une seule graine avec peu ou pas d'endosperme (**Beentje, 2010; McKenzie et al., 2005**).

Sur le plan économique, les Asteraceae comprennent des cultures majeures telles que *Helianthus annuus* (tournesol), *Lactuca sativa* (laitue) et *Cynara scolymus* (artichaut), ainsi que des plantes ornementales populaires comme les chrysanthèmes et les zinnias. Cependant, plusieurs membres de cette famille sont également considérés comme des mauvaises herbes envahissantes, susceptibles d'avoir un impact négatif sur l'agriculture en concurrençant les cultures et en réduisant les rendements (**González-Castejón et al., 2012; Panda et Luyten, 2018**).

La famille des Asteraceae est particulièrement riche en substances bioactives, notamment en lactones sesquiterpéniques (STL), reconnues pour leurs diverses propriétés médicinales, telles que les activités antitumorales, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antidépressives, antidiabétiques et antioxydantes (**Karadeniz et al., 2021**). Bien que plusieurs sous-types existent, les lactones sesquiterpéniques (STL) sont principalement classées en

quatre groupes structuraux en fonction de leur squelette carbocyclique : les eudesmanolides, les germacranolides, les guaianolides et les pseudoguaianolides (Figure 3). Les études suggèrent que leurs propriétés pharmacologiques découlent principalement du groupe fonctionnel méthylène- $\gamma$ -lactone, lequel interagit avec des cibles moléculaires clés, telles que les enzymes ou les récepteurs, via une liaison covalente. Cette interaction modifie l'activité des protéines cibles, expliquant leurs effets anti-inflammatoires, cytotoxiques et antimicrobiens (Schmidt, 2006).

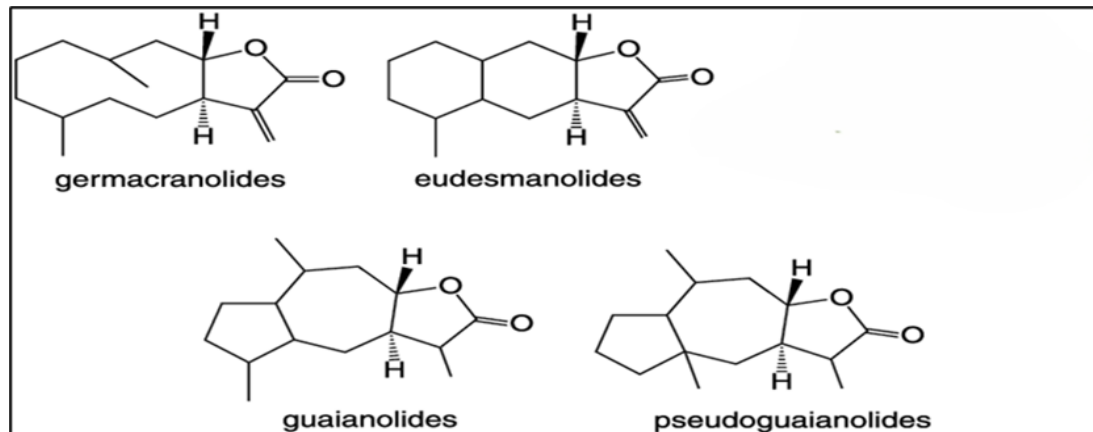
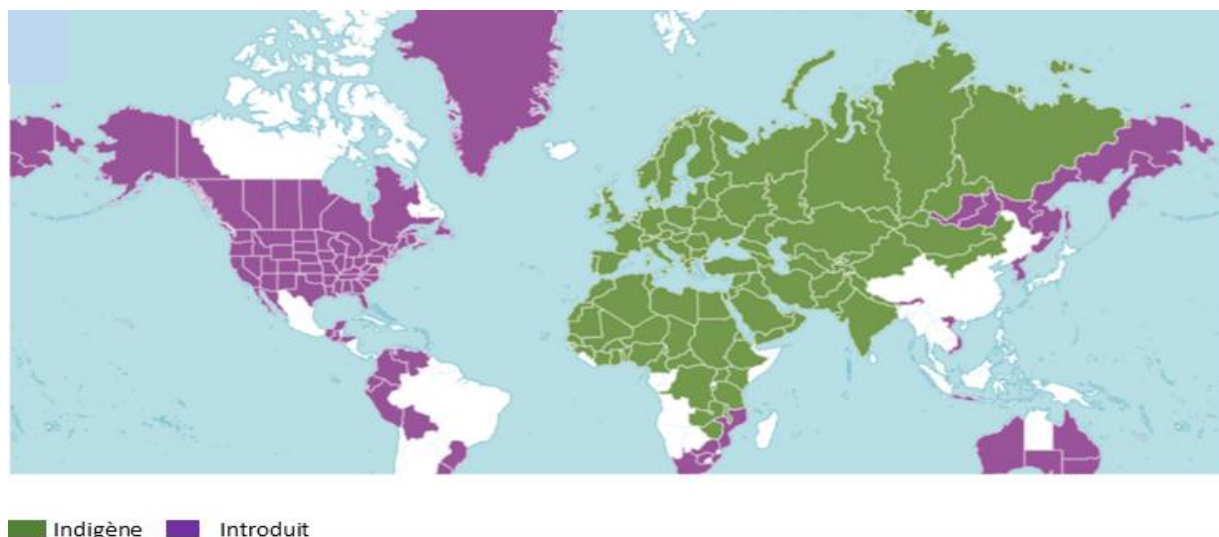


Figure 3. Principaux groupes des STL.

## 2. Genre Centaurea

Centaurea est un genre de plantes à fleurs appartenant à la famille des Asteraceae, communément appelées centaurees ou fleurs en panier. Ce genre comprend plus de 500 espèces de plantes herbacées, souvent similaires aux chardons, principalement réparties dans l'hémisphère nord, en particulier dans la région méditerranéenne et certaines parties de l'Asie (Figure 4) (Hilpold *et al.*, 2014).



**Figure 4.** Répartition mondiale du genre *Centaurea* (web 1).

Les espèces du genre *Centaurea* varient généralement en taille, allant de 20 cm à plus d'un mètre. Elles se caractérisent par des feuilles généralement non armées, souvent lobées ou profondément disséquées. Les inflorescences sont composées de nombreuses petites fleurs, pouvant être violettes, bleues, roses ou jaunes. Ces fleurs sont regroupées en capitules (têtes florales) entourés de bractées involucreales. Les fruits sont typiquement des cypsèles, des akènes secs, souvent munis d'un pappus facilitant leur dispersion par le vent. Les plantes de ce genre peuvent être annuelles, bisannuelles ou pérennes, et certaines espèces adoptent une forme de croissance arbustive (**Hilpold *et al.*, 2014**).

Ce genre est connu pour un large spectre d'activités biologiques, largement attribué à sa riche teneur en composés bioactifs tels que les lactones de sesquiterpène, les flavonoïdes et les polyphénols. Traditionnellement, diverses espèces de *Centaurea* ont été utilisées en médecine populaire comme agents anti-inflammatoires, antimicrobiens, et cicatrisants. Ils sont utilisés pour traiter des affections telles que les problèmes d'estomac, les douleurs abdominales, les rhumes, la fièvre et les maux de tête. Des études modernes ont confirmé plusieurs de ces effets, mettant en évidence des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes notables. De plus, ces extraits modulent les cytokines inflammatoires comme IL-1 $\alpha$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  et réduisent les facteurs angiogéniques tels que le VEGF, indiquant une capacité à influencer l'inflammation liée à la tumeur et l'angiogenèse. Les autres effets biologiques incluent l'activité antioxydante, les effets anti-ulcérogènes et l'inhibition des enzymes, telles que l'inhibition de la tyrosinase et de la collagénase, ce qui soutient leur utilisation traditionnelle

dans la cicatrisation et les troubles cutanés (ALPER & GÜNEŞ, 2019; Koca *et al.*, 2009; Shikov *et al.*, 2014; Teneva *et al.*, 2024).

### 3. *Centaurea papposa*

#### 3.1. Description botanique

*Centaurea papposa* est une espèce sauvage présente en Algérie et en Tunisie, appartenant à la section *Centaurea*, sous-section *Acrolophus* (Grafakou *et al.*, 2018). Cette plante présente une base ligneuse et une tige élancée atteignant une hauteur de 80 à 100 cm. Sa surface est couverte de poils courts et denses, lui conférant une apparence grisâtre. Les feuilles, légèrement charnues, sont vertes sur la face supérieure et blanc-grisâtre sur la face inférieure, avec des feuilles anciennes persistant à la base (Figure 5). La floraison intervient en mai, produisant de petites fleurs roses regroupées en capitules compacts (Catoni et Gratani, 2013).



**Figure 5.** Espèce *Centaurea papposa* (photo personnelle)

### 3.2. Position systématique

La classification systématique est la suivante :

**Tableau 2.** Position systématique de la plante *Centaurea papposa*.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Tracheophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Asterales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Genre</b>	Centaurea
<b>Espèce</b>	<i>Centaurea papposa</i>

### 3.3. Activités biologiques

Les recherches sur cette plante restent encore limitées. Les résultats relatifs à ces activités seront présentés en détail dans la section Discussion.

## 1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif désigne un déséquilibre dans notre corps entre les substances nocives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les substances bénéfiques appelées antioxydants. Un bon équilibre entre ces deux types de molécules est essentiel au bon fonctionnement de nos systèmes biologiques. Si cet équilibre est rompu, cela peut causer des dommages aux cellules et contribuer à l'apparition de diverses maladies, y compris le cancer, le diabète sucré (DM), et les maladies neurodégénératives (**Betteridge, 2000**).

## 2. Diabète sucré (diabète mellitus)

Le diabète sucré est un groupe complexe de troubles métaboliques caractérisés par une hyperglycémie chronique, qui résulte soit d'un défaut dans la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas, soit d'une altération de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles (muscle, foie, tissu adipeux), ou encore d'une combinaison des deux phénomènes (American Diabetes Association, 2011).

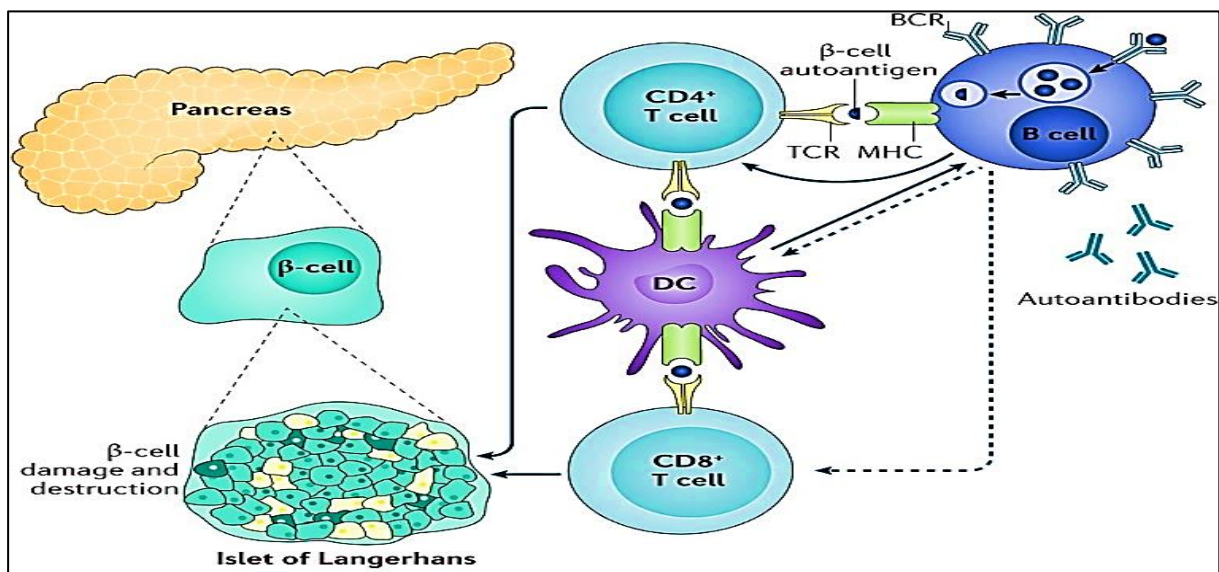
L'insuline est une hormone anabolisante clé dans la régulation du métabolisme glucidique. Elle favorise l'absorption du glucose par les cellules, notamment musculaires et adipocytaires, en activant la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane cellulaire (**Ijuin et Takenawa, 2012**). Elle inhibe également la production hépatique de glucose par néoglucogenèse et glycogénolyse (**Hatting et al., 2018**).

Un défaut de sécrétion d'insuline conduit donc à une incapacité à réduire la glycémie après un repas, tandis qu'une résistance à l'insuline empêche les tissus de répondre efficacement à cette hormone, maintenant ainsi une hyperglycémie.

### 2.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 représente que 5 à 10 % des diabétiques. Ce type est causé par une destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas, responsables de la production d'insuline (Figure 6). Le mécanisme pathologique principal repose sur une réponse immunitaire inappropriée dans laquelle le système immunitaire adaptatif cible les cellules bêta comme s'il s'agissait d'éléments étrangers. Cette réaction auto-immune est initiée par la reconnaissance erronée d'autoantigènes exprimés par les cellules bêta, notamment l'insuline elle-même, par les lymphocytes T. Plus précisément, les lymphocytes T auxiliaires CD4 (Th) reconnaissent ces autoantigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes via le

complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Cette activation des CD4 stimule la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires qui amplifient l'inflammation locale et recrutent d'autres cellules immunitaires. Parallèlement, les lymphocytes T cytotoxiques CD8 reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les cellules bêta elles-mêmes via le CMH de classe I et induisent leur destruction directe. La destruction cellulaire s'effectue par la libération de molécules cytotoxiques telles que la perforine, qui forme des pores dans la membrane des cellules cibles, et les granzymes, qui pénètrent dans la cellule et déclenchent l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée. L'apoptose des cellules bêta conduit à une diminution progressive de la capacité du pancréas à produire de l'insuline, provoquant ainsi l'hyperglycémie caractéristique du diabète de type 1. Enfin, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes T activés (comme l'interféron-gamma, le TNF-alpha) contribuent à l'aggravation des lésions tissulaires en favorisant une inflammation chronique, ce qui amplifie la destruction des cellules bêta et perturbe davantage la fonction pancréatique (DiMeglio *et al.*, 2018; Knip et Siljander, 2008).



**Figure 6.** Physiopathologie du diabète de type 1, en mettant l'accent sur la destruction auto-immune des cellules bêta et ses conséquences (Knip et Siljander, 2008).

## 2.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 représente 90 à 95 % des diabétiques. Il se caractérise par deux anomalies majeures : la résistance à l'insuline et une sécrétion insuffisante d'insuline par les cellules bêta du pancréas. Dans le diabète de type 2, les cellules des tissus périphériques, notamment les muscles squelettiques et le tissu adipeux, présentent une diminution de leur

capacité à répondre à l'insuline. Normalement, l'insuline facilite l'entrée du glucose dans ces cellules via le transporteur GLUT4, mais dans la résistance à l'insuline, cette signalisation est altérée. Cette altération est souvent liée à l'obésité, en particulier à l'accumulation de graisse viscérale. Le tissu adipeux viscéral sécrète des cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6) qui perturbent les voies de signalisation intracellulaire de l'insuline, notamment la phosphorylation des substrats du récepteur de l'insuline, ce qui réduit la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire. Cette perturbation entraîne une réduction de l'absorption du glucose par les tissus, provoquant une hyperglycémie. Pour compenser cette résistance, les cellules bêta du pancréas augmentent initialement la sécrétion d'insuline. Cependant, cette surcharge fonctionnelle chronique conduit progressivement à leur dysfonctionnement. Ce dernier est caractérisé par une diminution de la capacité des cellules bêta à sécréter de l'insuline en réponse à une hyperglycémie persistante. Plusieurs mécanismes contribuent à ce dysfonctionnement : La glycotoxicité, due à l'exposition prolongée à des concentrations élevées de glucose, qui altère la fonction cellulaire et induit un stress oxydatif. La lipotoxicité, liée à l'accumulation excessive d'acides gras libres, qui endommage les cellules bêta par des mécanismes similaires. L'effet délétère des cytokines inflammatoires, issues du tissu adipeux et des macrophages infiltrés, qui induisent une inflammation locale et favorisent l'apoptose des cellules bêta (Galicia-Garcia *et al.*, 2020 ; Lu *et al.*, 2024).

### 2.3. Diabète monogénique

Le diabète monogénique représente une catégorie distincte de diabète ayant des fondements génétiques spécifiques qui influencent la production et l'action de l'insuline. Les mutations génétiques peuvent entraîner le dysfonctionnement des protéines qui sont essentielles à la synthèse et à la libération normale de l'insuline. Par exemple, le gène HNF1A code pour la protéine facteur nucléaire hépatocyte 1 alpha (HNF-1 $\alpha$ ), un facteur de transcription essentiel qui régule l'expression de plusieurs gènes, dont celui de l'insuline. Une mutation dans HNF1A perturbe donc la capacité de la cellule bêta pancréatique à exprimer correctement le gène de l'insuline, entraînant une diminution de la production d'insuline. Un autre exemple est celui des mutations du gène de la glucokinase, une enzyme qui agit comme un capteur de glucose dans les cellules bêta du pancréas. La glucokinase catalyse la phosphorylation du glucose, première étape clé pour détecter la concentration de glucose sanguin. Une mutation de ce gène modifie la sensibilité au glucose, ce qui perturbe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, conduisant à une régulation inadéquate de la glycémie (Serbis *et al.*, 2024; Tallapragada *et al.*, 2015; H. Zhang *et al.*, 2021).

## 2.4. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se manifeste par une résistance à l'insuline combinée à une altération de la sécrétion d'insuline, phénomène qui survient spécifiquement pendant la grossesse. Cette résistance à l'insuline est induite par un ensemble d'hormones placentaires et maternelles produites en quantité accrue durant cette période, notamment le lactogène placentaire humain (hPL), le cortisol, la progestérone et les œstrogènes. Ces hormones interfèrent avec les voies de signalisation de l'insuline au niveau des cellules cibles, telles que les adipocytes et les myocytes. Par exemple, le hPL agit en inhibant la phosphorylation du substrat-1 du récepteur de l'insuline (IRS-1), une étape cruciale dans la cascade de signalisation insulinaire. Normalement, l'insuline se lie à son récepteur membranaire, ce qui active la tyrosine kinase du récepteur et entraîne la phosphorylation de l'IRS-1. Cette phosphorylation est essentielle pour recruter et activer diverses protéines intracellulaires qui facilitent la translocation des transporteurs de glucose (comme GLUT4) vers la membrane plasmique, permettant ainsi l'absorption du glucose par les tissus périphériques. Lorsque le hPL diminue la phosphorylation de l'IRS-1, cette cascade est perturbée, ce qui réduit la capacité des cellules à capter le glucose en réponse à l'insuline, contribuant ainsi à la résistance à l'insuline. Les autres hormones de la grossesse, telles que le cortisol et la progestérone, modulent également la sensibilité à l'insuline en influençant les récepteurs et les voies métaboliques, exacerbant cette résistance (**Berberoglu, 2019; Sharma et al., 2022**). En plus de cela, les cellules  $\beta$  du pancréas doivent s'adapter à une demande accrue d'insuline pendant la grossesse. Une compensation inadéquate liée à une altération de la fonction des cellules  $\beta$  peut résulter d'une exposition chronique à des niveaux élevés de glucose ou d'acides gras, entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline (**Plows et al., 2018**).

## 3. Relation entre le diabète et le stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être à la fois une conséquence et un facteur contribuant dans la physiopathologie du diabète.

### 3.1. Stress oxydatif comme conséquence du diabète

Dans le diabète, l'hyperglycémie chronique, caractéristique du diabète sucré, induit une production excessive de radicaux libres, principalement des espèces réactives de l'oxygène (ROS), par plusieurs mécanismes biochimiques spécifiques (**Caturano et al., 2023; Rais et al., 2024**) :

- Auto-oxydation du glucose : en présence d'une concentration élevée de glucose, celui-ci peut subir une auto-oxydation non enzymatique, générant des radicaux libres tels que le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ce processus est favorisé par la présence de métaux de transition qui catalysent la formation de radicaux hydroxyles très réactifs.
- Voie polyol : le glucose est converti en sorbitol par l'enzyme aldose réductase, consommant du NADPH, un cofacteur essentiel pour la régénération du glutathion réduit, un antioxydant majeur. Cette consommation entraîne une diminution des défenses antioxydantes cellulaires et favorise la production de ERO. De plus, l'accumulation de sorbitol modifie l'osmolarité cellulaire, contribuant au stress cellulaire,
- Glycation des protéines : Il s'agit d'une réaction chimique non enzymatique où le glucose, se lie directement aux acides aminés des protéines. Cette étape initiale forme des produits appelés produits de glycation précoce. Ces derniers subissent ensuite une série de modifications chimiques qui les transforment en produits de glycation avancée (AGE). Ces AGE sont des molécules stables et souvent toxiques qui s'accumulent dans les tissus. Ils peuvent se lier à des récepteurs spécifiques à leur surface, appelés RAGE (Receptors for Advanced Glycation End-products). Cette interaction déclenche des cascades de signalisation intracellulaire, augmentant la production de molécules pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

### 3.2. Stress oxydatif dans l'aggravation du diabète

Après la production des ERO par ces voies, celles-ci stimulent l'activation de facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) et la protéine activatrice-1 (AP-1). Ces facteurs favorisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Une fois activés, ils induisent la transcription de gènes codant pour des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6). Une fois synthétisées, ces cytokines pro-inflammatoires sont libérées dans la circulation sanguine et les tissus locaux. TNF- $\alpha$  et IL-6 inhibent la signalisation des récepteurs de l'insuline, ce qui entraîne une diminution de l'absorption du glucose par les cellules et jouent un rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire, ce qui entraîne une nouvelle dysrégulation métabolique, y compris une résistance à l'insuline. La présence continue de ces cytokines crée un état d'inflammation chronique dans les tissus adipeux, ce qui favorise la production de ERO par les cellules immunitaires, créant un cercle où l'inflammation et le stress oxydatif se stimulent mutuellement (Chanda *et al.*, 2023; Weinberg Sibony *et al.*, 2024).

## *Chapitre II*

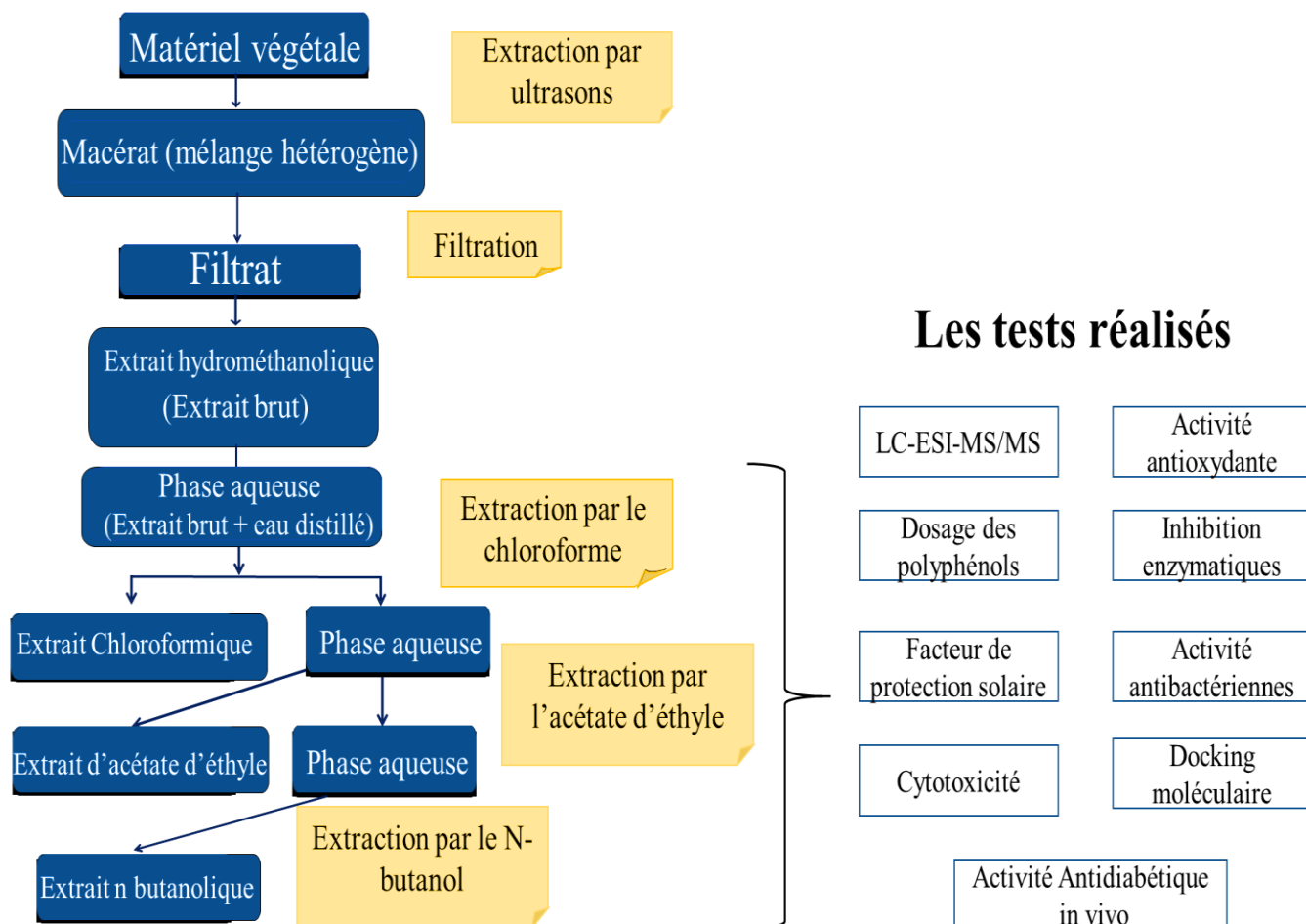


*Section expérimentale*

**Chapitre II : Section expérimentale**

Ce travail a été réalisé dans : le laboratoire de biochimie du Centre de recherche en biotechnologie (CRBT) à Constantine, Algérie ; le département de chimie de l'université Ondokuz Mayıs à Samsun, Turquie ; le laboratoire de physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'université des sciences et technologies Houari Boumediene à Alger, Algérie ; le laboratoire de biochimie appliquée et microbiologie (LABM) de l'université Badji Mokhtar Annaba, Algérie ; le centre de pratique et de recherche de l'université d'Igdir, Igdir, Turquie ; et le Laboratoire de recherche en interaction, biodiversité, écosystèmes et biotechnologie de l'université 20 Août 1955 à Skikda, Algérie.

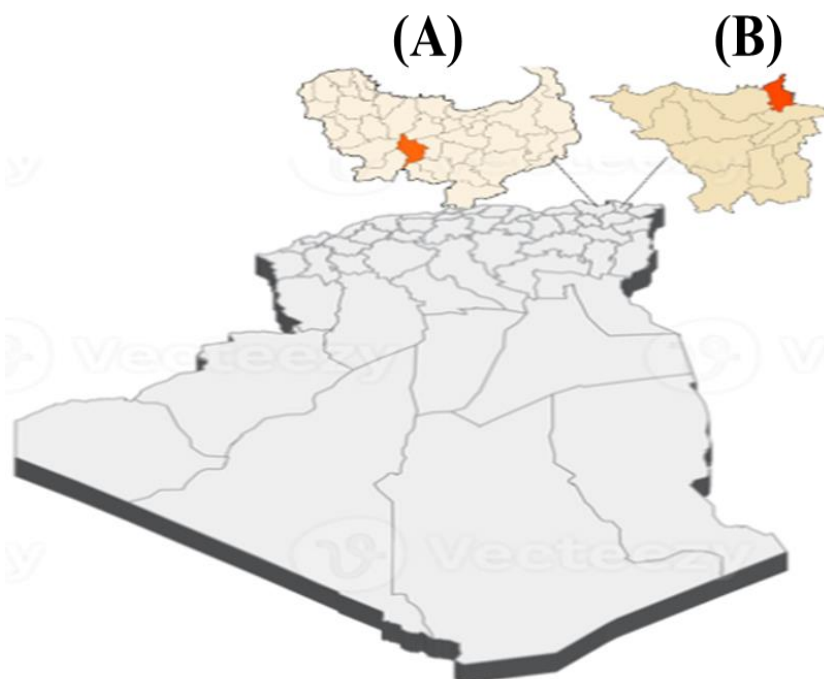
Le schéma ci-dessous (Figure 7) illustre les différentes étapes du protocole expérimental que nous avons suivi.



**Figure 7.** Protocole expérimental

## 1. Matériel végétale

Notre étude porte sur des extraits de deux plantes médicinales : *Myrtus communis*, récoltée en octobre 2021 dans la région de Sidi Mezghiche (36°41'00"N 6°43'00"E), une commune de la wilaya de Skikda, et *Centaurea papposa*, récoltée en mai 2022 dans la région de Cap de Garde, Annaba (36°57'28"N ; 007°46'10"E) (Figure 8).



**Figure 8.** Localisation des régions de Sidi Mezghiche (A) et du Cap de Garde (B) (web 2).

Les différents essais ont été effectués sur les feuilles de ces plantes. Celles-ci ont été nettoyées, puis séchées à l'abri de la lumière, dans un endroit aéré et à température ambiante. Les feuilles sèches ont ensuite été broyées.

## 2. Préparation des extraits

### 1.1. Extraction par ultrasons

La poudre des feuilles a été extraite avec un mélange méthanol/eau distillée (70/30, v/v). Pour cela, l'extraction a été réalisée par ultrasons (Vibra-Cell™ USA) pendant 30 minutes, avec une amplitude de 60 %. La procédure a été répétée trois fois en renouvelant le solvant à chaque fois. Le mélange obtenu a ensuite été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman (taille des pores : 2 µm) puis évaporé à 39 °C.



**Figure 9.** Extractions par ultrasons.

### 1.2. Extraction liquide-liquide

Les extraits ont été obtenus à l'aide de solvants organiques classés par polarité croissante : le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le N-butanol. Chaque solvant a été mis en contact avec la phase aqueuse dans une ampoule à décanter, permettant ainsi la séparation et la récupération distincte des phases organique et aqueuse.

- Préparation de la phase aqueuse : un volume de 100 mL d'eau distillée a été ajouté à l'extrait brut (extrait hydrométhanolique). Après un temps de 24 heures, le mélange a été agité à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré afin de récupérer la phase aqueuse.
- Extrait chloroformique : la phase aqueuse et 100 mL de chloroforme ont été introduits dans une ampoule à décanter. Après avoir soigneusement scellé l'ampoule, celle-ci a été agitée vigoureusement (sept à dix cycles), avec des dégazages réguliers pour libérer l'excès de pression. Le bouchon a ensuite été retiré, permettant à l'émulsion de reposer afin de favoriser la décantation et la séparation des phases, atteignant ainsi l'équilibre de partage. Les deux phases ont été récupérées séparément. Cette opération a été répétée trois fois, en ajoutant 100 mL de solvant à chaque fois. Après la dernière décantation, la phase chloroformique a été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à 39 °C.
- Extrait d'acétate d'éthyle : un volume de 100 mL d'acétate d'éthyle, un solvant de polarité supérieure à celle du solvant précédent, a été ajoutée à la phase aqueuse. Après une agitation soignée, le mélange a été laissé à décanter. Une fois que les deux couches étaient clairement séparées, les phases ont été récupérées séparément. Cette procédure a été répétée trois fois. La phase d'acétate d'éthyle a été séchée à 39 °C.
- Extrait N-butanolique : la manipulation a été réalisée conformément au protocole antérieur, en utilisant une phase aqueuse combinée à 100 mL de N-butanol. Cette

opération a été répétée trois fois afin d'assurer une extraction optimale. Une fois l'extraction terminée, les deux phases ont été récupérées. La phase organique a ensuite été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à 45 °C.

Les extraits obtenus après l'évaporation sont pesés pour déterminer le rendement. Le rendement d'un extrait « R » est défini comme suite :

$$R (\%) = M / M_0 \times 100$$

Où :

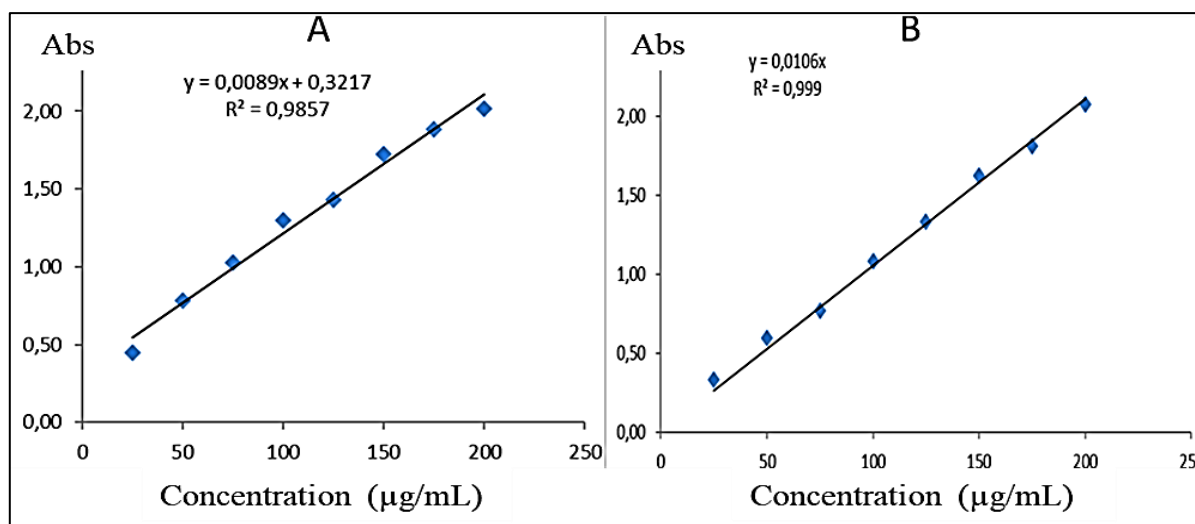
R (%) : Rendement exprimé en %, M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant, M<sub>0</sub> : Masse en gramme du matériel végétal.

### 3. Dosage des polyphénols

La teneur totale en acide phénolique a été déterminée par la méthode de **Müller *et al.* (2010)**. En résumé, 20 µL d'échantillons ont été appliqués à 100 µL de Folin Ciocalteu dilué (1:10) et 80 µL de carbonate de sodium (7.5 %). Ensuite, la microplaque de 96 puits a été incubée pendant 2 heures dans l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 765 nm.

La méthode de **Topçu *et al.* (2007)** a été utilisée pour déterminer les flavonoïdes totaux. Les étapes de la procédure sont résumées comme suit : 50 µL d'échantillons ont été mélangés à 130 µL de MeOH, 10 µL d'acétate de potassium (CH<sub>3</sub>COOK) et 10 µL de nonahydrate de nitrate d'aluminium (Al (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 9H<sub>2</sub>O). La microplaque a été incubée pendant 40 min, puis l'absorbance a été mesurée à 415 nm.

Le total des polyphénols a été exprimé en mg d'acide gallique équivalent par gramme de poids sec (mg GAE/g DW) en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 10A), tandis que le contenu total en flavonoïdes a été exprimé en mg d'équivalent quercétine par gramme de poids sec (mg QE/g DW) en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure 10B).



**Figure 10.** Courbes d'étalonnage de l'acide gallique (A) et de la quercétine (B).

#### 4. Analyse par LC-ESI-MS/MS

50 mg de chaque extrait ont été ajoutés à 1 mL de méthanol, puis 1 mL d'hexane. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 9000 rpm pendant 10 minutes. Puis, 100 µL de la phase méthanol ont été prélevés et dilués avec 450 µL d'eau et 450 µL de méthanol. Enfin, la solution a été filtrée à l'aide de filtres de 0.22 µm avant injection.

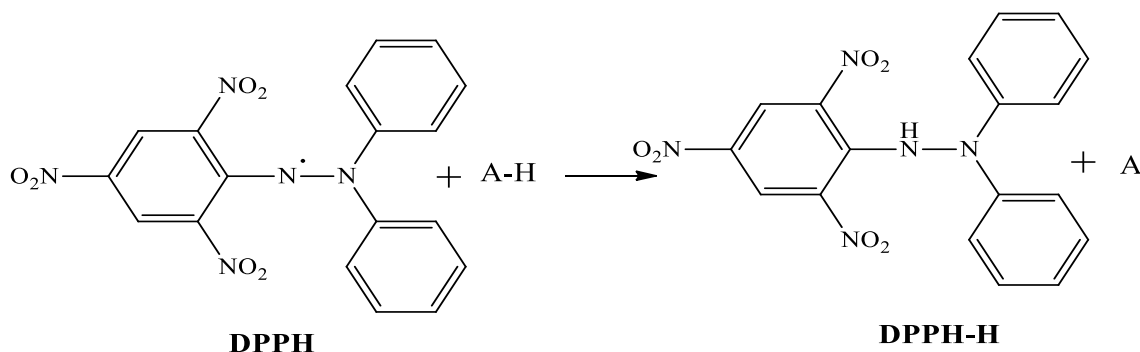
Le système HPLC LC-MS/MS Agilent 1260 Infinity, couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle Agilent 6460 (USA), a été utilisé. La séparation a été réalisée sur une colonne Agilent Poroshell 120 SB-C18 (3\*100 mm, 2.7 µm), un type de colonne à phase inversée. La séparation en chromatographie liquide (LC) a été réalisée par élution en gradient, avec une phase mobile composée d'eau (A) et de méthanol (B), contenant tous deux 0.1 % d'acide formique et 5 mM de formiate d'ammonium. Le profil d'élution du gradient était le suivant : à 3 min, A = 75 %, B = 25 % ; à 12 min, A = 50 %, B = 50 % ; à 16 min, A = 10 %, B = 90 % ; à 21 min, A = 10 %, B = 90 % ; et à 24 min, A = 97.5 %, B = 2.5 %. Le volume d'injection était de 5.12 µL, le débit de 0.4 mL/min et la température maintenue à 40 °C. Les composés séparés ont été introduits dans un spectromètre de masse, qui détecte et identifie les composés cibles en fonction de leur rapport masse-charge (m/z). Les systèmes LC-MS/MS utilisent souvent l'ionisation par électrospray (ESI) comme méthode d'ionisation, en mode ionisation positive et négative. Le débit de N<sub>2</sub> du gaz de nébuliseur était de 8 L/min et la température capillaire de 300 °C pendant l'analyse LC-MS/MS (Atalar *et al.*, 2023). Les standards utilisés pour cette analyse sont présentés dans les Tableaux 6 et 7. Le mode de surveillance par réactions multiples (MRM) du spectromètre de masse a été employé pour la quantification des analytes.

## 5. Tests des activités antioxydantes

L'activité antioxydante de différents extraits a été évaluée à l'aide de plusieurs méthodes : le piégeage des radicaux libres DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et ABTS<sup>•+</sup> (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), ainsi que les tests FRAP (ferric reducing antioxidant power), SNP (particules d'argent nanométriques) et phénanthroline.

### 5.1. Activité antiradicalaire au DPPH<sup>•</sup>

Le DPPH<sup>•</sup> est un radical libre stable qui confère à la solution une teinte violet foncé, identifiable par une bande d'absorption située entre 515 nm et 517 nm. Ce composé est utilisé pour évaluer l'activité antioxydante à travers un mécanisme de transfert d'électrons. Lorsqu'une solution de DPPH<sup>•</sup> est mélangée avec une substance capable de fournir un atome d'hydrogène (AH), la forme réduite, DPPH-H, se forme (Figure 11). Ce processus entraîne une décoloration de la solution. Le DPPH<sup>•</sup>, de couleur violette à l'état initial, se réduit en DPPH-H, caractérisé par une teinte jaune pâle (Molyneux, 2004). Plus la substance est antioxydante, plus la coloration violette initiale va disparaître.



**Figure 11.** Réduction de DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004).

Le protocole expérimental utilisé pour examiner l'activité de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> est celui décrit par Blois (1958). 40 µL d'échantillons ont été mélangés avec 160 µL de DPPH<sup>•</sup>. Par la suite, la microplaque a été incubée pendant 30 minutes dans l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

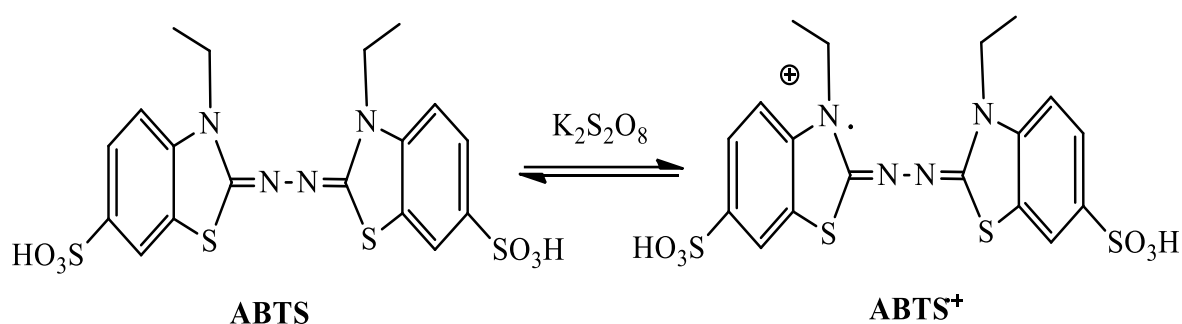
$$\% \text{ INHIBITION} = 100 \times (\text{ABS du controle} - \text{ABS de l'extract}) / \text{ABS du controle}$$

Les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque concentration ont permis de tracer la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, à partir de

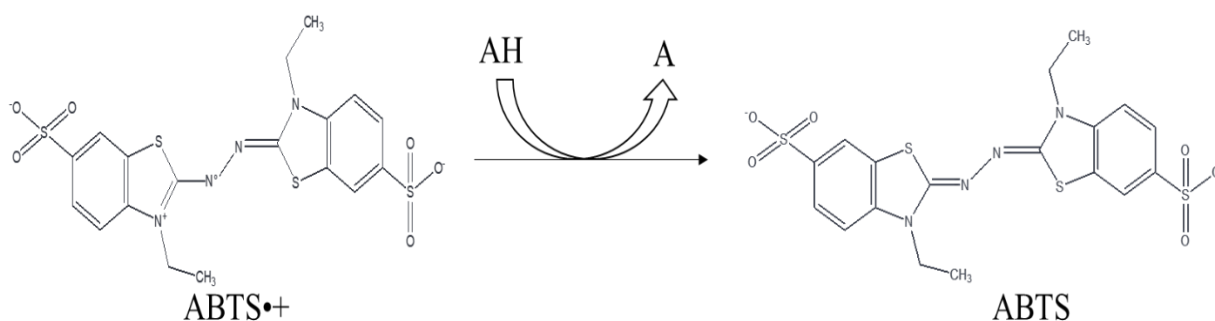
laquelle la  $CI_{50}$  a été déterminée. Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards de références.

## 5.2. Activité antiradicalaire par piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>

Dans ce test, l'activité antioxydante est évaluée en fonction de la capacité à inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup>. Ce radical cationique est généré par l'oxydation de l'ABTS, qui est initialement incolore, à l'aide de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). Ce processus produit une solution de couleur vert-bleu (Figure 12). L'ajout d'un composé antioxydant provoque la réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> en ABTS<sup>+</sup> (Figure 13), entraînant ainsi une décoloration et une diminution de l'absorption mesurée à 734 nm (Re *et al.*, 1999).



**Figure 12.** Formation du radical cation ABTS<sup>•+</sup> à partir de l'ABTS (Sarr *et al.*, 2015).



**Figure 13.** Réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant (Sarr *et al.*, 2015).

Le procédé utilisé pour mesurer l'activité antioxydante à l'aide du test ABTS<sup>•+</sup> est celui décrit par Re *et al.* (1999). Ce processus consiste à faire réagir une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium (2.45 mM) pour générer le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup>. Le mélange est ensuite laissé au repos dans l'obscurité, à température ambiante, pendant 12 à 16 heures avant d'être utilisé. La solution obtenue est ensuite diluée avec de l'éthanol, de l'eau ou du méthanol, afin d'atteindre une absorbance d'environ  $0.7 \pm 0.020$  à 734 nm. L'activité antioxydante est mesurée comme suite : 40  $\mu$ L de chaque échantillon a été

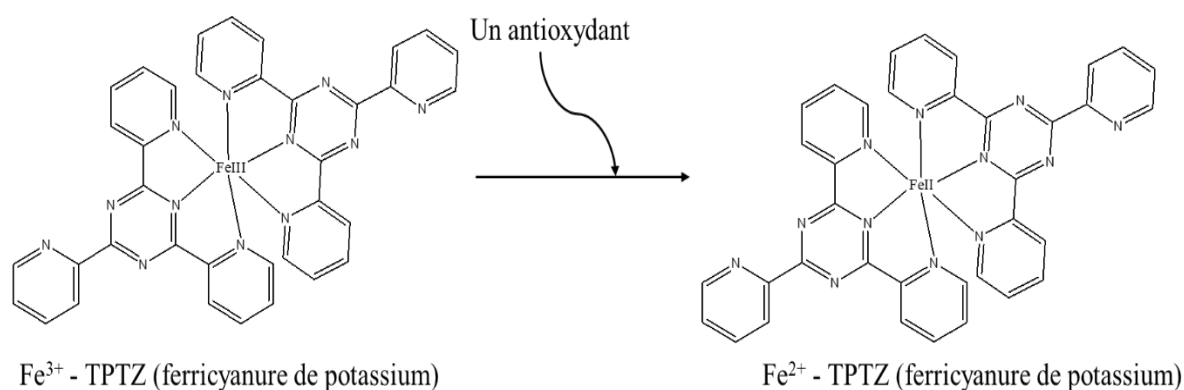
ajouté à 160  $\mu\text{L}$   $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Le mélange a été incubé 10 min dans l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ INHIBITION} = 100 \times (\text{ABS du controle} - \text{ABS de l'extrait}) / \text{ABS du controle}$$

Les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque concentration ont permis de tracer la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, à partir de laquelle la  $\text{CI}_{50}$  a été déterminée. Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards de références.

### 5.3. Test de pouvoir réducteur (FRAP)

Le FRAP est un test qui mesure la capacité des antioxydants à transformer le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Figure 14). Ce processus implique un échange d'électrons. Pour évaluer cette transformation, on mesure l'intensification de la coloration bleue (appelée bleu de Prusse) dans le mélange, à une longueur d'onde de 700 nm (**Chung *et al.*, 2002**).

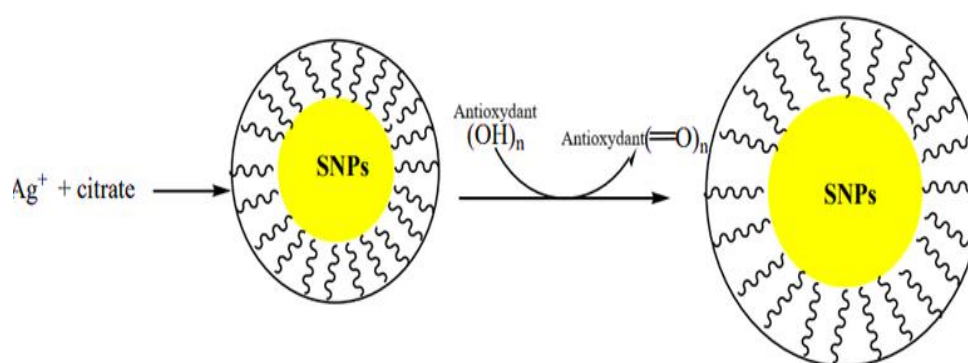


**Figure 14.** Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant (**Chung *et al.*, 2002**).

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. 10  $\mu\text{L}$  d'échantillons ont été mélangés avec 40  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (pH 6.6) et 50  $\mu\text{L}$  de ferricyanure de potassium (1 %). La microplaque a été incubée à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50  $\mu\text{L}$  d'acide tricarboxylique (10 %), 40  $\mu\text{L}$  d'eau et 10  $\mu\text{L}$  de chlorure ferrique (0.1 %) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards. Pour le test FRAP, les résultats ont été exprimés en valeurs d' $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), qui représente la concentration produisant une absorbance de 0.5.

#### 5.4. Test de Silver nanoparticule (SNP)

La méthode SNP est fondée sur le principe de réduction des ions argent ( $\text{Ag}^+$ ) en nanoparticules d'argent par l'action des antioxydants. Le processus se déroule comme suit : les antioxydants présents dans la solution agissent pour réduire les ions  $\text{Ag}^+$  en nanoparticules d'argent sphériques (Figure 15). Pour stabiliser la formation des nanoparticules, des graines d'argent stabilisées au citrate sont ajoutées. Lorsqu'elles sont formées, ces nanoparticules génèrent une bande d'absorption plasmonique de surface très intense, qui se manifeste par une couleur spécifique dans la solution. Cette absorption est mesurée à 423 nm (Özyürek *et al.*, 2012).



**Figure 15.** Réduction de l' $\text{Ag}^+$  par un antioxydant (Özyürek *et al.*, 2012).

Le test SNP a été réalisé selon la méthode décrite par Özyürek *et al.* (2012). Pour cela, 20  $\mu\text{L}$  d'échantillons ont été mélangés avec 130  $\mu\text{L}$  de solution SNP, composée de nitrate d'argent (1 mM) et de citrate de tri-sodium (1%), ainsi que 50  $\mu\text{L}$  d'eau. Après une incubation de 30 min à 25°C, l'absorbance a été mesurée à 423 nm. Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), la quercétine et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards. Pour le test SNP, les résultats ont été exprimés en valeurs d' $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), qui représente la concentration produisant une absorbance de 0.5.

#### 5.5. Test de Phénanthroline

Les antioxydants présents dans la solution agissent en transférant des électrons aux ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ce qui les réduit en ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Une fois que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont formés, ils se lient à la 1,10-phénanthroline, un agent chélatant. Ce complexe, appelé ferroïne, est coloré et présente une absorption maximale à 510 nm. La couleur rouge-orange du complexe permet une évaluation visuelle et spectrophotométrique. L'intensité de cette absorbance est proportionnelle à la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$ , qui à son tour reflète l'activité antioxydante de l'échantillon testé. Plus l'absorbance est élevée, plus la capacité réductrice est importante.

Le dosage par la méthode de la phénanthroline a été réalisé selon le protocole de **Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008)**. Dans une microplaque à 96 puits, 10 µL d'échantillons ont été mélangés avec 50 µL de chlorure ferrique (0.2 %), 30 µL de Phénanthroline (0.5 %) et 110 µL de méthanol. La plaque a été incubée à 30 °C pendant 20 min et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), la quercétine et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards. Pour le test Phénanthroline, les résultats ont été exprimés en valeurs d' $A_{0.50}$  (µg/mL), qui représente la concentration produisant une absorbance de 0.5.

## 6. Teste enzymatiques

L'activité inhibitrice des enzymes a été testée contre six enzymes : l'acétylcholinestérase (AChE), la butyrylcholinestérase (BChE), l'alpha amylase, l'alpha glucosidase, la tyrosinase et l'uréase.

### 6.1. Inhibition des cholinestérases

Les échantillons testés ont été évalués selon la méthode établie par **Ellman *et al.* (1961)**. 150 µL de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8.0), 10 µL de l'échantillon d'essai et 20 µL d'AChE ou de BChE ont été mélangés. Le mélange a été incubé à 25°C pendant 15 min. 10 µL de DTNB (5,5'-dithiobis (acide 2-nitro-benzoïque) et 10 µL d'iodure d'acétylthiocholine (substrat à 0.71 mM, AChE) ou d'iodure de butyrylthiocholine (substrat à 0.2 mM, BChE) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 412 nm au temps 0 min et après 15 min. La galantamine a été utilisée comme standard. Le pourcentage d'inhibition (I %) a été mesuré en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition AChE (BChE)} = \frac{[(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance d'extrait}) / \text{absorbance du contrôle}] \times 100}{}$$

### 6.2. Inhibition de l'alpha amylase

La méthode de **Yang *et al.* (2012)** a été utilisée pour déterminer l'activité inhibitrice de l'α-amylase. Les étapes sont résumées comme suit : 82 µL d'extrait ont été ajoutés à 10 µL d'α-amylase (1U). Après 10 min d'incubation à 37°C, 8 µL d'amidon (1%) ont été ajoutés. La microplaque a été incubée à nouveau à 37°C pendant 10 min. Ensuite, 50 µL de HCl (10%), 15 µL d'iodure de potassium iodé (IKI) et 50 µL d'H<sub>2</sub>O ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 630 nm. L'acarbose a été utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\%INH=1-[(Ac-Ae)-(As-Ab)/ (Ac-Ae)]$$

Ac : Absorbance [Amidon+ IKI+ HCl+ solvant de l'extrait+ tampon].

Ae : Absorbance [enzyme+ amidon+ IKI+ HCL+ solvant de l'extrait].

As : Absorbance [enzyme+ extrait+ amidon+ IKI+ HCl].

Ab : Absorbance [Extrait+ IKI+ tampon].

### 6.3. Inhibition de l'alpha glucosidase

Les étapes de la procédure sont résumées comme suit : 10 µL d'échantillon ont été ajoutés à 25 µL d'α-glucosidase (0.2 U/mL), 25 µL de 4-nitrophényl β-D-glucopyranoside (PNPG, 0.5 Mm) et 50 µL de tampon phosphate (20 mM, PH 6.9). La microplaque a été incubée à 37 °C pendant 10 min. Ensuite, 100 µL de carbonate de sodium (NaCO<sub>3</sub>, 0.2 M) ont été ajoutés (Mayur *et al.*, 2010). L'absorbance a été mesurée à 410 nm. L'acarbose a été utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{abs de l'extrait-abs de blanc}) / \text{abs de control} \times 100$$

Control : Enzyme + Substrat + Solvant de l'extrait.

Blanc : Substrat + Extrait + Tampon de l'enzyme.

### 6.4. Inhibition de l'uréase

Selon la méthode décrite par Taha *et al.* (2018), l'activité inhibitrice de l'uréase a été évaluée comme suit : 25 µl d'uréase, 50 µl d'urée, 45 µl de réactif phénol et 70 µl de réactifs basiques ont été ajoutés à 10 µl d'échantillon. La microplaque a été incubée à 30°C pendant 50 min, puis l'absorbance a été mesurée à 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'activité uréase a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (Ac-Ae / Ac) \times 100$$

Ac : l'absorbance du contrôle, Ae : l'absorbance en présence de l'extrait.

### 6.5. Inhibition de la Tyrosinase

Selon la méthode de Deveci *et al.* (2018), l'inhibition de la tyrosinase a été évaluée comme suit : 150 µL de tampon phosphate a été mélangé avec 10 µL d'échantillon et 20 µL de tyrosinase. Après 10 min d'incubation à 37°C, 20 µL de L-Dopa ont été ajoutés. Le mélange a été incubé de nouveau pendant 10 min à 37 °C avant que l'absorbance soit mesurée

à 475 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'activité tyrosinase a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Ac-Ae} / \text{Ac}) \times 100$$

Ac : l'absorbance du contrôle, Ae : l'absorbance en présence de l'extrait.

## 7. Facteur de protection solaire (SPF)

Le facteur de protection solaire (SPF) des extraits a été mesuré selon la méthode de **Mansur *et al.* (1986)**. La procédure est résumée comme suit : 2 mg d'échantillons ont été dilués dans 1 mL de méthanol. L'absorbance a été mesurée tous les 5 nm dans la plage de 290 à 320 nm. Les constantes  $EE \times I$ , déterminées par **Sayre *et al.* (1979)** (voir Tableau 3), ont été utilisées pour calculer le SPF des extraits à l'aide de l'équation suivante :

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

CF : facteur de correction (= 10) ; EE : spectre d'effet érythémal ; I : spectre d'intensité solaire ; Abs : l'absorbance de l'extrait.

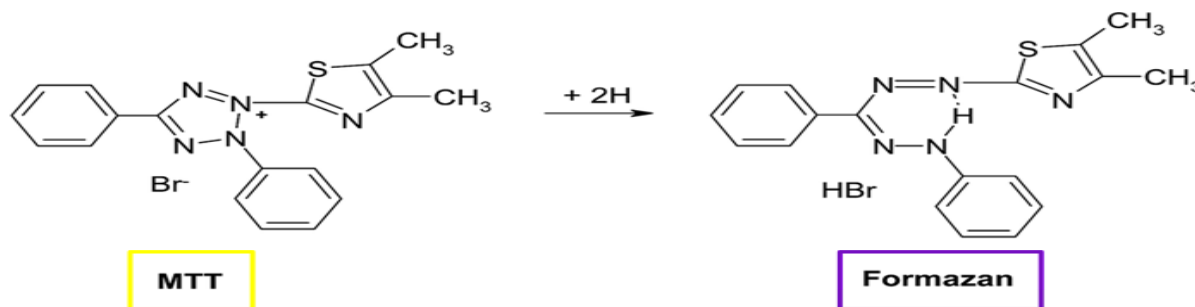
**Tableau 3.** Valeurs de  $EE \times I$  utilisées pour le calcul du SPF.

Longueur d'onde $\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ )x I( $\lambda$ )
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0837
320	0.0180
<b>Total</b>	1

## 8. Cytotoxicité

Pour évaluer l'activité anticancéreuse de la plante *C. papposa*, nous avons utilisé le test MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium bromide]. Le test évalue la viabilité cellulaire. Les cellules vivantes possèdent des enzymes capables de réduire le sel de tétrazolium (MTT) en un composé coloré appelé formazan (Figure 16). Ce processus se produit principalement dans les mitochondries des cellules actives. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Plus le nombre de cellules vivantes est élevé, plus la quantité de formazan formée augmente, ce qui se traduit par une coloration violette intense. Après incubation, le formazan insoluble doit être solubilisé dans

un solvant tel que le DMSO ou l'isopropanol, ce qui permet de mesurer l'absorbance à 590 nm (Kumar *et al.*, 2018).



**Figure 16.** Principe de test de coloration (Ebada *et al.*, 2008).

Les cellules HTC116 et Hep2, dérivées du carcinome colorectal humain et du carcinome laryngé humain, respectivement, sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM ; Gibco, USA). Ce milieu a été complété avec : 10 % de sérum pour veau foetal (SVF ; SIGMA, USA), 5 µg/ml de streptomycine, 50 UI/ml de pénicilline et glutamine à 200 mM (Gibco, USA). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère contenant 95 % d'air et 5 % de CO<sub>2</sub>. A confluence, les cellules cancéreuses (Hep2 et HCT116) sont trypsinisées (0.1%) puisensemencées dans des plaques à 96 puits à raison de (0.01x10<sup>6</sup> cellules/puits), dans du RPMI supplémenté de 10 % de SVF, puis incubées à 37°C. A confluence, les cellules sont traitées avec l'extraits hydrométhanolique aux concentrations suivantes : 150, 120, 90.88, 50, et 20 µg/mL ; avec l'extrait chloroformique aux concentrations de 600, 400, 300.08, 100, et 50 µg/mL ; et avec l'extrait d'acétate d'éthyle aux concentrations de 80, 40, 27.93, 10, et 5 µg/mL. Après 24 h de traitement, le milieu est éliminé, puis 20 µl de MTT à 5 mg/mL sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 3h et 30 min à 37°C. Au terme de la période d'incubation, le surnageant est éliminé puis remplacé par 150 µL de DMSO afin de solubiliser et homogénéiser les cristaux de formazan formés. Les plaques sont placées à l'obscurité sous agitation magnétique pendant 15 minutes. La mesure d'absorbance est effectuée à 590 nm, avec un filtre à 620 nm, à l'aide d'un lecteur ELISA. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé comme suit :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{ABS EXTRAIT}}{\text{ABS CONTROLE}} \times 100$$

ABS extrait : l'absorbance des cellules traitées par l'extrait, ABS contrôle : l'absorbance des cellules non traitées par l'extrait.

Les pourcentages de viabilité obtenus pour chaque concentration ont permis de tracer la courbe de viabilité cellulaire en fonction de la concentration, à partir de laquelle la  $CI_{50}$ , correspondant à la concentration réduisant la viabilité de 50 %, a été déterminée.

## 9. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de plantes a été explorée sur cinq souches bactériennes d'origine cliniques : *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif), *Escherichia coli* (Gram négatif), *Proteus mirabilis* (Gram négatif). Cette étude a été effectuée au sein du laboratoire de biochimie appliquée et microbiologie (LABM) de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

### 9.1. Détermination de la zone d'inhibition

Les souches bactériennes ont été cultivées dans des bouillons nutritifs et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les suspensions bactériennes ajustées à une concentration de  $10^8$  cellules/mL ont été étalées sur la surface de l'agar M-H (Mueller-Hinton). Au moyen d'un perforateur stérile, des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés et chaque puits a été rempli avec 100  $\mu$ L de l'extrait à tester. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, elles ont été examinées afin de déterminer la présence d'une zone d'inhibition autour des disques (Bhattacharya et Chandra, 2014). Le diamètre de ces zones est mesuré en millimètres. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif, tandis que les antibiotiques amoxicilline + acide clavulanique (AMC30), amikacine (AK10), gentamicine (GM10) et imipénème (IPM10) ont été utilisés comme contrôles positifs.

### 9.2. Détermination de la concentration inhibitrice minimale (CIM)

200  $\mu$ L de milieu Muller Hinton liquide a été déposés dans une microplaque à 96 puits, puis 200  $\mu$ L d'extraits ont été ajoutés au premier puits. Après cela, 200  $\mu$ L du mélange ont été prélevés et dilués dans le puits suivant, continuant ce processus pour obtenir une gamme de concentration de notre extrait allant de 2000  $\mu$ g/mL à 31.25  $\mu$ g/mL. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 18 heures (Wikaningtyas et Sukandar, 2016). Les antibiotiques auxquels les souches étaient sensibles ont été utilisés comme témoins de référence antibactériens.

## 10. Docking moléculaire

### 10.1. Étude par Docking moléculaire de l'activité inhibitrice des enzymes

Une étude de Docking moléculaire a été réalisée sur six composés clés des extraits de *M. communis* afin d'évaluer leurs affinités de liaison et d'étudier leurs modes d'interaction au sein des sites actifs de l'AChE, de la BChE, de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase. Les structures cristallines de ces enzymes ont été obtenues à partir de la banque de données des protéines, en utilisant les ID suivants du PDB : 4M0E pour AChE, 2XQF pour BChE, 4GQR pour  $\alpha$ -amylase et 3L4X pour  $\alpha$ -glucosidase. Le processus a été effectué à l'aide du logiciel LeadIT 2.1.8 (disponible sur [www.biosolveit.com](http://www.biosolveit.com)). Cette préparation a impliqué l'élimination des cofacteurs, des hétéroatomes et des molécules d'eau, à l'exception de ceux qui se trouvent dans les poches actives (Bouhissa *et al.*, 2021). Par la suite, les atomes manquants ont été ajoutés, les charges formelles calculées, et les sites actifs définis en sélectionnant les résidus situés dans un rayon de 6.5 Å autour de l'inhibiteur dans la structure cristalline (Djihiche *et al.*, 2024). Cette sélection a été affinée en incluant des résidus au-delà de 6.5 Å qui étaient critiques pour maintenir la continuité de la cavité (Ikhlef *et al.*, 2024). Les états de protonation et les orientations des chaînes latérales pour chaque acide aminé dans les sites actifs ont ensuite été examinés, et les structures résultantes ont été entièrement minimisées et exportées sous forme de fichiers mol2 (Srief *et al.*, 2023).

Les coordonnées tridimensionnelles des composés étudiés ont été extraites de la base de données PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) puis préparées pour l'amarrage à l'aide de l'outil LigPrep version 11.3 du logiciel Maestro de Schrodinger (Maestro, 2015). Lors de la phase de préparation, nous avons généré tous les tautomères, états de protonation (à un pH physiologique de 7.4) et énantiomères possibles pour chaque composé, assurant ainsi une exploration complète de leur diversité chimique (Mokrani *et al.*, 2022). Par la suite, des simulations de docking moléculaire ont été réalisées à l'aide de FlexX 2.1.8 (Rarey *et al.*, 1996), qui applique une stratégie de construction incrémentale pour modéliser avec précision la liaison des ligands. Le processus de fixation a été guidé par la fonction de notation FlexX, qui classe les composés en fonction de leur énergie libre de liaison ( $\Delta G$ ) exprimée en kJ/mol. Pour valider le protocole de mise en place, le ligand Co-cristallisé de chaque enzyme a été réancré dans son site actif, obtenant un écart carré moyen (DSMR) inférieur à 2 Å, ce qui confirme la fiabilité du montage de mise en place. Une fois validés, les mêmes paramètres de

docking ont été utilisés pour évaluer les affinités de liaison des molécules étudiées (**Hioual et al., 2014**).

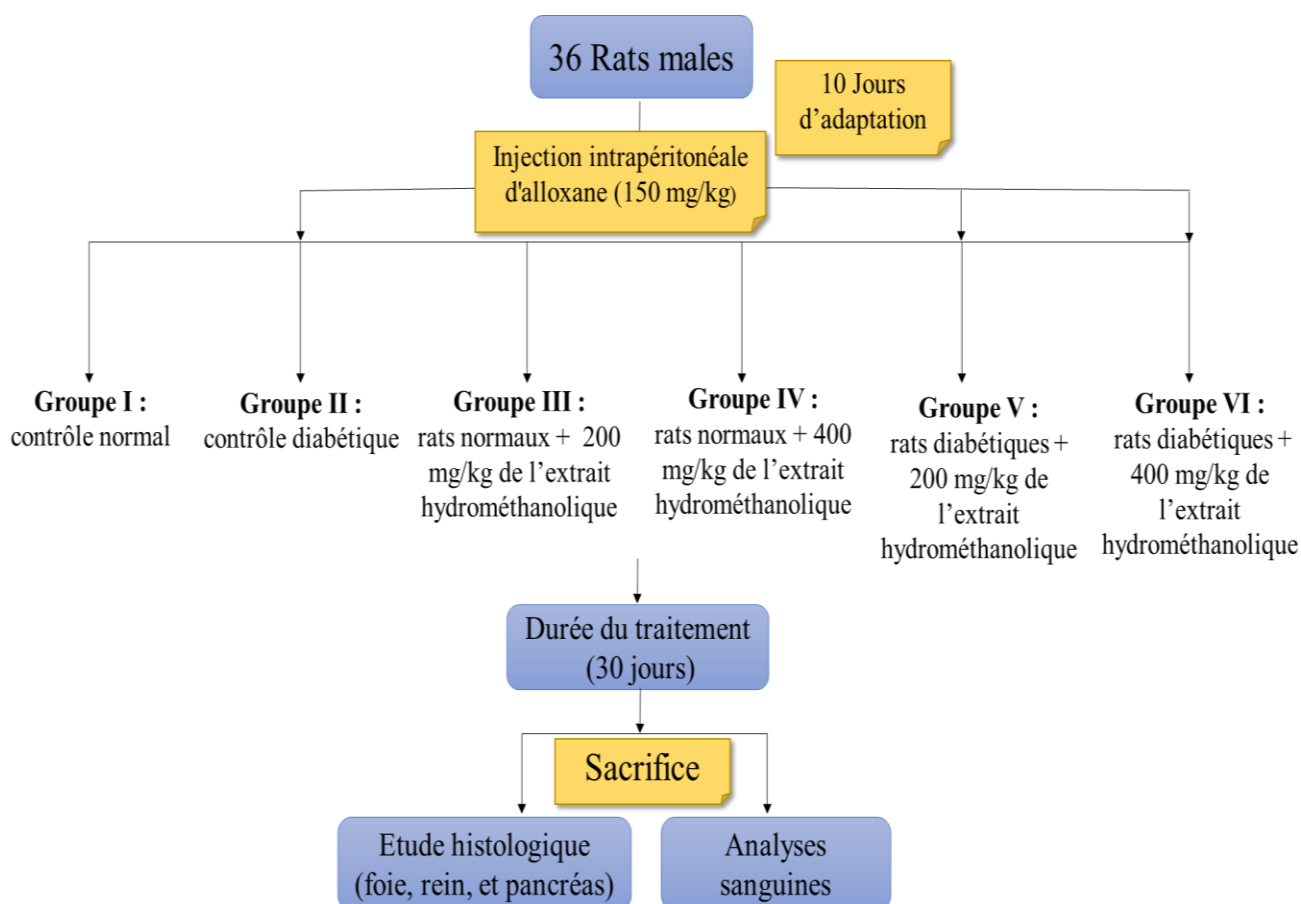
## 10.2. Étude par Docking moléculaire de l'activité antibactérienne

La structure 3D de la dihydroptéroate synthase (DHPS) (PDB ID : 3TZF) (**Yun et al., 2012**) a été extraite de la banque de données des protéines du RCSB (<http://www.pdb.org>) et choisie comme cible pour des études d'ancrage moléculaire. La structure des protéines a été préparée et réduite au minimum en termes d'énergie à l'aide de l'assistant de préparation des protéines de la suite Schrödinger (**Sastry et al., 2013**), ce qui permet de corriger les problèmes structurels et d'optimiser la géométrie.

Les ligands ont été préparés à l'aide de LigPrep 3.8 (**Release, 2015**), qui a attribué des états de protonation appropriés à un pH de  $7.4 \pm 1.0$ , corrigé les ordres de liaison et les types d'atomes, et ajouté des atomes d'hydrogène si nécessaire. La grille de fixation pour 3TZF a été générée à l'aide du protocole Glide Grid Generation dans MAESTRO (**Friesner et al., 2004**), le ligand Co-cristallisé servant de centroïde. Pour introduire la flexibilité, un facteur d'échelle de 0.8 a été appliqué aux rayons de van der Waals des atomes récepteurs non polaires, tandis que les autres paramètres ont été conservés aux réglages par défaut. Des simulations de Docking flexibles ont été effectuées en mode simple précision pour garantir des prévisions fiables et efficaces (**Friesner et al., 2006**).

## 11. Etude in vivo de l'activité antidiabétique

Le schéma ci-dessous (Figure 17) illustre les différentes étapes du protocole expérimental in vivo que nous avons suivi.



**Figure 17.** Protocole expérimental in vivo.

Nous avons travaillé sur 36 rats blancs mâles de la souche Wistar albinos, provenant de l'Institut Pasteur (Centre d'élevage, El Kouba). A leur arrivée, ces rats pesaient entre 70 et 100 g. Leur prise en charge a été assurée conformément aux normes éthiques définies dans le manuel de soins et d'utilisation des animaux de laboratoire

### 11.1. Elevage

Les rats sont logés dans des enclos en plastique dotés d'un couvercle en acier inoxydable. Chaque cage regroupe 6 rats. Ils ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rats ont d'abord été adaptés pendant 10 jours dans l'animalerie, où ils ont été maintenus à une température constante de  $22 \pm 2$  °C, avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures, respectant ainsi leur rythme biologique naturel.

- Groupe I : contrôle normal ;
- Groupe II (Dia) : contrôle diabétique ;
- Groupe III (PD1) : des rats normaux reçoivent quotidiennement par gavage gastrique une dose de 200 mg/kg de l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* pendant 30 jours ;

- Groupe IV (PD2) : des rats normaux reçoivent quotidiennement par gavage gastrique une dose de 400 mg/kg de l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* pendant 30 jours ;
- Groupe V (DiaPD1) : des rats diabétiques reçoivent quotidiennement par gavage gastrique une dose de 200 mg/kg de l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* pendant 30 jours ;
- Groupe VI (DiaPD2) : des rats diabétiques reçoivent quotidiennement par gavage gastrique une dose de 400 mg/kg de l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* pendant 30 jours.

## 11.2. Induction du diabète et traitement

Après une période nocturne de jeûne, le diabète a été induit chez les rats (groupes diabétiques) par une injection intrapéritonéale unique de monohydrate d'alloxane, dissous dans une solution saline à 0.9 % à une dose de 150 mg/kg (**Ighodaro et al., 2017**). Suite à l'administration d'alloxane, les bouteilles d'eau ont été remplacées par une solution de glucose à 5 % pendant 24 heures afin de prévenir l'hypoglycémie initiale résultant de la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas et de la libération massive d'insuline, qui pourrait être fatale pour les animaux (**Fröde et Medeiros, 2008**). Après 48 heures d'injection, le diabète a été confirmé en mesurant la glycémie à jeun. La mesure de la glycémie est réalisée sur la queue des rats. Après avoir nettoyé la queue avec de l'alcool, une fine aiguille est utilisée pour prélever une goutte de sang, qui est ensuite déposée sur une bandelette pour une lecture de la glycémie à l'aide d'un glucomètre Bionime. Seuls les rats dont le taux de glycémie était supérieur à 1.5 g/L ont été considérés comme diabétiques et sélectionnés pour cette expérience.

Le traitement avec l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* commence 48 heures après la confirmation du diabète et a été administré pendant 30 jours, à deux doses distinctes de 200 mg/kg et 400 mg/kg.

La glycémie a été mesurée chaque semaine pendant une période de 30 jours, tandis que le traitement était administré quotidiennement. Les poids des rats ont été déterminés quotidiennement à l'aide d'une balance, à partir du premier jour jusqu'à la fin de l'expérimentation.

### 11.3. Sacrifice et prélèvement de sang

Après 30 jours de traitement, les six groupes ont été anesthésiés par inhalation de chloroforme, puis sacrifiés. Le sang est prélevé au niveau de cœur. Les échantillons ont été analysés au Laboratoire d'Analyses Médicales EL-FAYCAL (Skikda).

#### 11.3.1. Détermination des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques plasmatiques a été réalisé sur l'automate BECKMAN COULTER AU480 à l'aide des Kit Biomaghreb.

- **Dosage de l'activité de l'Alanine Aminotransférase (ALAT) et l'Aspartate Aminotransférase (ASAT) :** L'ALAT catalyse le transfert du groupement aminé de l'alanine vers le 2-oxoglutarate, produisant ainsi du pyruvate et du glutamate. L'ajout de la phosphatase de pyridoxal au mélange réactionnel optimise l'activité catalytique maximale de l'ALAT. Ensuite, la LDH catalyse la conversion du pyruvate en lactate en utilisant le NADH, qui est oxydé en NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance à 340 nm, liée à la consommation de NADH, est mesurée et reflète directement l'activité enzymatique présente dans l'échantillon (**Thomas, 1998**). Le dosage de l'ASAT repose sur une méthode conforme aux recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC). Dans ce procédé, l'ASAT catalyse la transamination de l'aspartate et du 2-oxoglutarate, produisant du L-glutamate et de l'oxaloacétate. L'ajout de phosphate de pyridoxal au mélange réactionnel permet à l'ASAT d'atteindre son activité catalytique maximale. L'oxaloacétate est ensuite réduit en L-malate par la malate déshydrogénase (MDH), avec une conversion simultanée du NADH en NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance à 340 nm, liée à la consommation de NADH, est mesurée et reflète directement l'activité de l'ASAT dans l'échantillon (**Thomas, 1998**).
- **Dosage de la bilirubine totale :** Le dosage de la bilirubine repose sur une méthode colorimétrique où la bilirubine réagit avec un réactif diazoïque pour former un complexe coloré. L'absorbance de ce complexe est ensuite mesurée par spectrophotométrie, et la concentration de bilirubine est déterminée en la comparant à celle d'un étalon de référence (**Westwood, 1991**).
- **Dosage de l'urée :** L'urée est hydrolysée en présence d'eau et d'uréase, ce qui entraîne la formation d'ammoniaque et de dioxyde de carbone. L'ammoniaque ainsi produit réagit avec le 2-oxoglutarate et le NADH en présence de la glutamate déshydrogénase (GLDH) pour former du glutamate et du NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance du NADH par

unité de temps est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon (**Thomas, 1998**).

- **Dosage de la créatinine** : Dans un milieu alcalin, la créatinine réagit avec l'acide picrique pour former un complexe de couleur jaune orangé. L'intensité de l'absorbance mesurée entre 520 et 800 nm est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (**David et al., 2001**).
- **Dosage des paramètres du profil lipidique** : Le bilan lipidique est un test sanguin qui permet de quantifier les principaux lipides présents dans le sang. Il inclut la mesure du cholestérol total, des triglycérides, ainsi que des lipoprotéines HDL (lipoprotéines de haute densité). Le dosage des triglycérides repose sur une méthode enzymatique colorimétrique dans laquelle les triglycérides sont d'abord hydrolysés par une lipase en glycérol et acides gras libres. Le glycérol est ensuite phosphorylé en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase, puis oxydé par la glycérol-3-phosphate oxydase, produisant du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier réagit avec un chromogène en présence de la peroxydase pour former un composé coloré dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie à environ 505 nm, est proportionnelle à la concentration en triglycérides de l'échantillon (**Klotzsch & McNamara, 1990**). Le dosage du cholestérol HDL repose généralement sur une méthode directe homogène utilisant des détergents sélectifs qui solubilisent les lipoprotéines autres que les HDL (LDL, VLDL, chylomicrons), libérant leur cholestérol libre. Ce cholestérol est ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène, qui, en présence de peroxydase et d'un chromogène, produit un composé coloré mesuré par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de cholestérol HDL dans l'échantillon (**Riesen, 1998**). La mesure du taux de cholestérol dans un échantillon repose sur une méthode enzymatique. Lors de cette procédure, les esters de cholestérol sont d'abord hydrolysés par la cholestérol estérase (CHE), libérant du cholestérol libre. Ce cholestérol est ensuite oxydé par la cholestérol oxydase (CHO), ce qui génère du cholestène-3-one et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec la 4-aminophénazone (4-AA) et le phénol pour former un composé chromogène, la quinonéimine, dont l'augmentation d'absorbance à une longueur d'onde comprise entre 540 et 600 nm est mesurée par spectrophotométrie et reflète la concentration de cholestérol dans l'échantillon (**Allain, 1974**).

### 11.3.2. Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone repose sur des techniques immuno-enzymatiques, telles que l'ELISA, dans lesquelles l'hormone se fixe à des anticorps spécifiques conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec un substrat chromogène génère une coloration dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la concentration de testostérone présente dans l'échantillon (Mistretta *et al.*, 2009).

### 11.3.3. Numération formule sanguine (NFS)

L'analyse des globules rouges et blancs est réalisée principalement par la numération formule sanguine (NFS), un examen automatisé qui compte et analyse les cellules sanguines à partir d'un prélèvement veineux. Le sang recueilli dans les tubes EDTA est analysé sur un analyseur automatique (modèle sysmex XS500i)

## 11.4. Prélèvement d'organes

Suite à la dissection des rats, les organes (foie, pancréas et reins) ont été récupérés en vue d'une analyse histologique. Après rinçage avec une solution saline physiologique à 0.9 %, les organes ont été pesés pour calculer le poids relatif :

$$\text{Poids relatif \%} = (\text{poids de l'organe} / \text{poids de l'animal}) \times 100$$

Par la suite, les échantillons ont été placés dans des flacons contenant du formol à 10 %. Les coupes histologiques ont été réalisées à l'Établissement hospitalier spécialisé en urologie et néphrologie de Constantine-Daksi, au sein du service d'anatomie pathologique. Cette étude comprend les étapes suivantes :

- Fixation des échantillons : les organes sont sectionnés à l'aide d'un couteau tranchant, puis les spécimens obtenus sont placés dans des cassettes spécifiques à parois perforées, permettant ainsi le passage des liquides.
- Déshydratation : les cassettes contenant les organes sont ensuite soumises à une déshydratation minimale de 12 heures pour éliminer l'eau des tissus et pour les rendre aptes à l'inclusion en paraffine. Cette étape implique le traitement des tissus dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes (70 %, 80 %, 90 % et 100 %) afin d'assurer une déshydratation progressive.
- Inclusion : les cassettes sont ensuite immergées dans des bains de paraffine liquide. Une fois que la paraffine a solidifié par refroidissement, elle forme un bloc rigide qui

encapsule le prélèvement. Grâce à un microtome, il est possible de réaliser des coupes très minces, de quelques microns d'épaisseur. Ces coupes sériées sont assemblées en rubans, qui sont ensuite étalés sur des lames en verre, où ils sont dépliés et fixés à l'aide d'eau chauffée.

- Coloration : lors de cette étape, deux colorants principaux sont employés : l'hématoxyline et l'éosine. Initialement, les lames subissent un déparaffinage et une hydratation à l'eau de robinet, suivie d'un rinçage à l'eau distillée. Par la suite, elles sont plongées dans un bain d'hématoxyline de Harris pendant 15 min, ce qui colore les structures basophiles, telles que les noyaux, en une teinte bleu-violacée. Les lames sont ensuite différenciées dans un mélange d'éthanol acide (100 mL éthanol à 70 % + 50 mL HCl), puis rincées à l'eau de robinet, avant d'être bleuies dans un bain d'eau ammoniacale. Ensuite, elles sont colorées par un bain d'éosine qui met en évidence les structures acidophiles comme le cytoplasme. Finalement, après des lavages intermédiaires à l'eau de robinet, les lames sont recouvertes d'une lamelle de verre, maintenue en place par la résine (un agent de fixation).
- Lecture microscopique : la lecture a été examinée au microscope euromex® équipé d'une caméra et du logiciel Image Focus Plus V2.

### **Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart-type (SD) calculés à partir de trois mesures, puis soumis à une analyse de variance à un facteur (ANOVA) à l'aide du logiciel IBM SPSS v.22 suivi par le test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ( $p < 0.05$ ). Le coefficient de corrélation ( $r$ ) entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques totaux a été évalué à l'aide du test de corrélation de Pearson, réalisé avec le logiciel SPSS.

## *Chapitre III*



*Résultat et discussion*

## Résultats et discussion

### 1. Etude phytochimique

#### 1.1. Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction, résumés dans le Tableau 4, varient entre 0.387 % et 33.77 % pour la plante *M. communis*, et entre 0.21 % et 21.90 % pour *C. papposa*. Le rendement le plus élevé est observé avec les extraits hydrométhanoliques, tandis que les extraits chloroformiques présentent le rendement le plus faible.

**Tableau 4.** Poids et rendement de chaque extrait.

Matière végétale	Plantes	Extraits	Poids (g)	Rendement (%)
100 g	<i>M. communis</i>	Hydrométhanol	33.77	33.77
		Chloroforme	0.387	0.387
		Acétate d'éthyle	2.342	2.342
		N-Butanol	11.37	11.37
	<i>C. papposa</i>	Hydrométhanol	21.90	21.90
		Chloroforme	0.21	0.21
		Acétate d'éthyle	1.20	1.20
		N-Butanol	9.65	9.65

#### 1.2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. Selon les résultats de la plante *M. communis*, l'extrait d'acétate d'éthyle présentait la teneur la plus élevée en composés phénoliques et flavonoïdes, suivi par l'extrait hydrométhanolique, l'extrait N-butanolique, puis l'extrait chloroformique. Les résultats obtenus pour la plante *C. papposa* ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté la plus forte teneur en polyphénols et en flavonoïdes, suivie de l'extrait N-butanolique, de l'extrait hydrométhanolique, puis l'extrait chloroformique.

Les résultats de notre étude sur les deux espèces indiquent que les extraits polaires présentent une concentration en polyphénols significativement supérieure à celle des extraits non polaires. Ce phénomène pourrait être attribué à l'influence du solvant utilisé pour l'extraction, comme l'ont suggéré **Lefebvre et al. (2021)**.

Concernant l'espèce *Myrtus communis*, des résultats similaires ont été rapportés par **Bouaziz et al. (2015)**. Dans une étude de **Şafak et al. (2023)** sur divers extraits de feuilles de *M. communis* provenant de Silifke, Turquie, a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle présentait une teneur élevée en polyphénol, suivie par le N-butanol, le méthanol, l'eau, puis le dichlorométhane. L'extrait méthanolique présentait la teneur en flavonoïdes la plus élevée, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle, les extraits N-butanolique, dichlorométhane et l'extrait aqueux. Inversement, les études antérieures d'**Amensour et al. (2010)** ainsi que de **Bouyahya et al. (2016)**, ont démontré que l'extrait d'acétate d'éthyle présentait les rendements les plus faibles en composés phénoliques et en flavonoïdes. Dans l'étude de **Bouaoudia-Madi et al. (2019)**, une extraction assistée par ultrasons avec de l'éthanol à 70 % (v/v), réalisée à une amplitude de 30 % pendant 7 min, a permis d'obtenir une teneur totale en composés phénoliques de  $241.66 \pm 12.77$  mg GAE/g DW, légèrement inférieure à celle de notre extrait hydrométhanolique. En revanche, la teneur en flavonoïdes ( $18.99 \pm 1.3$  mg QE/g) était relativement faible.

Concernant l'espèce *Centaurea papposa*, les résultats obtenus dans notre recherche ne sont pas compatibles avec ceux rapportés par **Souilah et al. (2021)**, qui ont constaté que l'extrait non polaire présentait une teneur élevée en polyphénol et en flavonoïde, dichlorométhane, avec une valeur de  $213.14 \pm 17.86$  mg GAE/g DW et  $64.16 \pm 0.21$  mg QE/g DW, respectivement. L'extrait d'acétate d'éthyle avait le niveau le plus bas de teneur en polyphénol et en flavonoïdes avec une valeur de  $156.5 \pm 17.71$  mg GAE/g DW et  $48.4 \pm 0.16$  mg QE/g DW, respectivement.

En conséquence, tous nos extraits démontrent un potentiel significatif en tant que sources de composés phénoliques et flavonoïdes. Toutefois, des variations dans les valeurs et le classement des extraits ont été observées. Ces divergences pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment les paramètres géographiques, climatiques et génétiques, le stade de maturité des plantes, ainsi que les méthodes et conditions d'extraction utilisées (**Ksouri et al., 2008**).

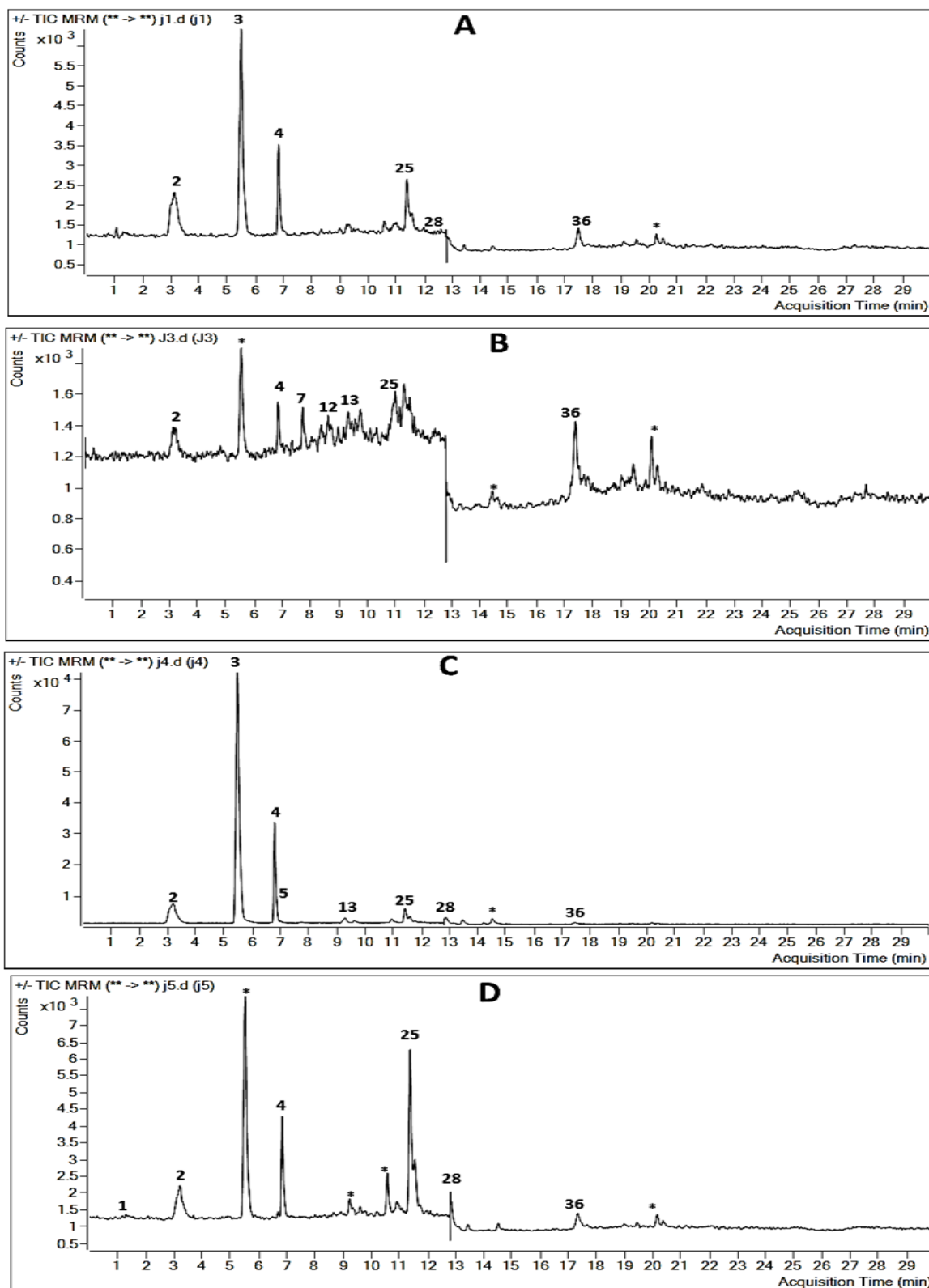
**Tableau 5.** Contenu total en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits de *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*.

Plantes	Extrais	Total phénolique (mg GAE/g DW)	Flavonoïde (mg QE/g DW)
<i>M. communis</i>	Hydrométhanol	370.83 ± 8.30 <sup>b</sup>	79.05 ± 7.00 <sup>b</sup>
	Chloroforme	67.23 ± 1.01 <sup>d</sup>	41.94 ± 1.17 <sup>d</sup>
	Acétate d'éthyle	400.75 ± 2.94 <sup>a</sup>	116.13 ± 7.20 <sup>a</sup>
	N-butanol	254.76 ± 3.37 <sup>c</sup>	62.16 ± 1.60 <sup>c</sup>
<i>C. papposa</i>	Hydrométhanol	96.67 ± 0.90 <sup>c</sup>	21.28 ± 0.40 <sup>c</sup>
	Chloroforme	72.81 ± 0.56 <sup>d</sup>	16.03 ± 0.20 <sup>d</sup>
	Acétate d'éthyle	174.20 ± 2.59 <sup>a</sup>	45.37 ± 1.66 <sup>a</sup>
	N-butanol	163.15 ± 2.21 <sup>b</sup>	40.25 ± 0.46 <sup>b</sup>

GAE : équivalent acide gallique, QE : équivalent quercétine, DW : poids sec. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les valeurs dans la même colonne et la même plante avec des indices différents (a, b, c, et d) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

### 1.3. Identification des constituants phytochimiques par LC-ESI-MS/MS

Les résultats de l'analyse LC-ESI-MS/MS de la plante *M. communis* sont résumés dans le Tableau 6 et la Figure 18. L'extrait hydrométhanolique a révélé des concentrations élevées d'acide gallique (278.150 µg/L) et de lutéoline (112.214 µg/L). Par ailleurs, l'extrait d'acétate d'éthyle présentait des niveaux significatifs d'acide gallique (1502.228 µg/L), d'épigallocatechine (1204.629 µg/L) et de catéchine (410.925 µg/L). Les composés les plus abondants, occupant le second rang, étaient l'isoquercitrine (185.706 µg/L) et la lutéoline (128.384 µg/L). Dans l'extrait N-butanolique, les principaux constituants identifiés étaient l'acide shikimique (2425.644 µg/L) et l'acide gallique (220.417 µg/L). De plus, la lutéoline (167.736 µg/L), l'isoquercitrine (157.823 µg/L) et l'épigallocatechine (114.458 µg/L) figuraient parmi les composés secondaires les plus abondants. Enfin, l'extrait chloroformique présentait des concentrations de composés phénoliques nettement inférieures comparées aux autres extraits, avec la lutéoline comme principal constituant (173.749 µg/L). Les autres composés affichaient des concentrations comprises entre 9 et 49 µg/L.



**Figure 18.** Chromatogrammes des extraits hydrométhanolique (A), chloroformique (B), acétate d'éthyle (C), et N-butanolique (D) de la plante *M. communis*. 1 : acide shikimique, 2 : acide gallique, 3 : acide protocatéchique, 4 : épigallocatechine, 5 : catéchine, 7 : hydroxybenzaldéhyde, 12 : vanilline, 13 : acide o-coumarique, 25 : isoquercitrine, 28 : Kaempférol 3-glucoside 36 : lutéoline, \* : composés non présents dans les standards.

Tableau 6. Profil phytochimique des extraits de *Myrtus communis*.

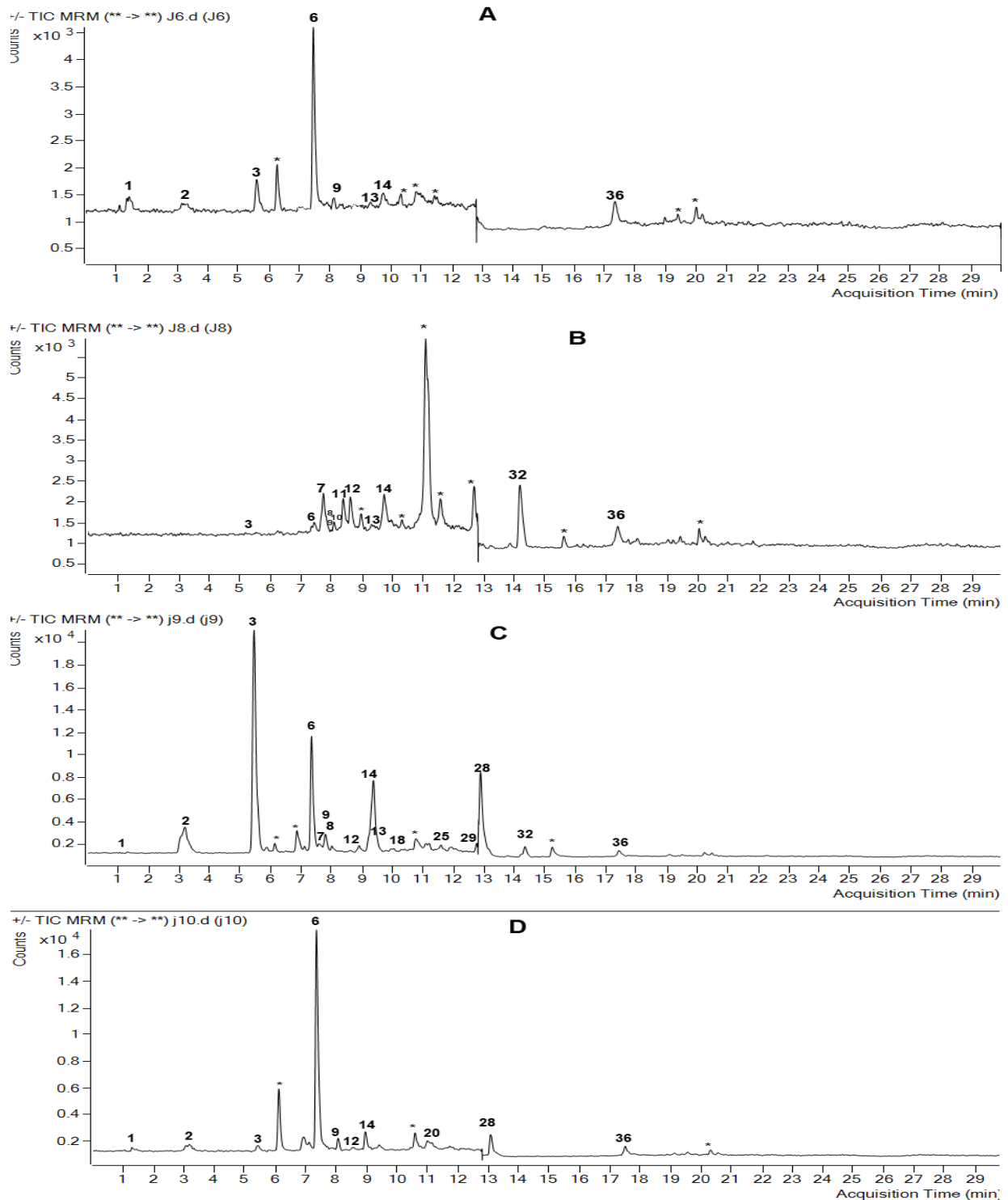
No	Analyte	RT	Source d'ion	Transition d'ion	Mode d'ion	R2	LOQ (ug/L)	LOD (ug/L)	Plage de linéarité (ug/L)	Concentration (µg/L)			
										Hydro Méthanol	Chloroforme	Ethyle acétate	N-Butanol
1	Acide shikimique	1.297	ESI	173.0 -> 93.1	-	0.9978	50.40	15.70	1250-20000	ND	ND	ND	2425.6444
2	Acide gallique	3.182	ESI	169.0 -> 125.1	-	0.9986	18.5862	7.1674	31.25-500	278.1500	49.2339	1502.2283	220.4170
3	Acide protocatéchuique	5.451	ESI	153.0 -> 109.0	-	0.9969	13.1729	3.1564	15.625-250	19.6337	ND	52.8493	ND
4	Epigallocatechine	6.792	ESI	307.0 -> 139.0	+	0.9995	3.8750	2.0903	12.5-200	85.4930	12.4713	1204.6290	114.4585
5	Catéchine	6.896	ESI	288.9 -> 245.1	-	0.9946	7.5013	1.7055	343.750-5500	ND	ND	410.9252	ND
6	Acide chlorogénique	7.349	ESI	353.0 -> 191.0	-	0.9981	25.9023	11.5890	31.25-500	ND	ND	ND	ND
7	Hydroxy benzaldéhyde	7.728	ESI	121.0 -> 92.0	-	0.9993	12.8651	4.9742	15.625-250	ND	15.7353	ND	ND
8	Acide vanillique	7.750	ESI	167.0 -> 151.8	-	0.9958	1424.2132	219.0421	1250-20000	ND	ND	ND	ND
9	Acide caféique	7.804	ESI	178.9 -> 135.1	-	0.9994	24.1620	6.9205	31.25-500	ND	ND	ND	ND
10	Acide syringique	8.469	ESI	197.1 -> 181.8	-	0.9990	857.338	358.5000	1250-20000	ND	ND	ND	ND
11	Caféine	8.380	ESI	195.0 -> 137.9	+	0.9986	15.4959	6.8099	18.75-300	ND	ND	ND	ND
12	Vanilline	8.607	ESI	153.0 -> 125.0	+	0.9949	40.5411	14.5885	62.5-1000	ND	13.6566	ND	ND
13	Acide o-coumarique	9.307	ESI	163.0 -> 119.1	-	0.9996	7.9973	4.0164	15.625-500	ND	13.7517	40.8321	ND
14	Acide salicylique	9.386	ESI	137.0 -> 93.1	-	0.9981	82.9646	47.6695	112.5-1800	ND	ND	ND	ND

15	Taxifoline	9.733	ESI	304.8 -> 258.9	+	0.9938	23.5110	11.0294	37.5-600	ND	ND	ND	ND
16	Resvératrol	9.866	ESI	229.0 -> 107.0	+	0.9910	13.5575	4.5806	18.75- 300	ND	ND	ND	ND
17	Polydatine	9.068	ESI	390.9 -> 228.9	+	0.9987	1.8411	1.1471	7.8125- 125	ND	ND	ND	ND
18	Acide trans-férulique	10.041	ESI	193.1 -> 133.9	-	0.9950	11.5276	6.1184	31.25- 1000	ND	ND	ND	ND
19	Acide sinapique	10.197	ESI	223.1 -> 208.0	-	0.9972	4.9652	1.9437	125-2000	ND	ND	ND	ND
20	Scutellarine	11.007	ESI	462.8 -> 286.8	+	0.9978	4.0013	3.1346	9.375- 300	ND	ND	ND	ND
21	Acide p-coumarique	11.513	ESI	163.0 -> 119.0	-	0.9987	17.5416	3.5348	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
22	Coumarine	11.267	ESI	147.1 -> 103.2	+	0.9974	20.703	6.0077	62.5- 1000	ND	ND	ND	ND
23	Ethyle ester de l'acide protocatéchuïque	11.887	ESI	181.0 -> 107.9	-	0.9996	24.9201	14.5610	15.625- 1000	ND	ND	ND	ND
24	Hespéridine	11.718	ESI	611.0 -> 302.9	+	0.9957	17.6753	4.1396	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
25	Isoquercitrine	11.414	ESI	464.9 -> 302.8	+	0.9982	11.2680	9.9382	18.75- 300	48.8140	9.3670	185.7064	157.8232
26	Rutin	12.281	ESI	611.0 -> 302.8	+	0.9980	240.672	59.559	125-2000	ND	ND	ND	ND
27	Quercétine-3-xyloside	12.441	ESI	432.7 -> 299.5	-	0.9900	69.4059	18.7126	125-2000	ND	ND	ND	ND
28	Kaempférol-3- glucoside	12.887	ESI	448.8 -> 286.9	+	0.9997	4.5238	1.1609	7.8125- 125	5.6396	ND	20.1936	12.9198
29	Fiséatine	12.872	ESI	287.0 -> 137.0	+	0.9954	44.3662	10.8961	15.625- 250	ND	ND	ND	ND
30	Baicaline	13.662	ESI	446.8 -> 270.9	+	0.9991	3.0988	0.5276	15.625- 250	ND	ND	ND	ND
31	Chrysine	14.423	ESI	254.9 -> 153.0	+	0.9989	0.1338	0.0737	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND

32	Acide trans-cinnamique	14.163	ESI	149.0 -> 131.1	+	0.9999	22.0279	11.1853	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
33	Morine	15.862	ESI	302.8 -> 153.0	+	0.9981	0.5284	0.1253	1.5625- 50	ND	ND	ND	ND
34	Kaempférol	16.464	ESI	284.9 -> 116.9	-	0.9997	5.4004	1.8683	312.5- 10000	ND	ND	ND	ND
35	Baicaléine	17.101	ESI	271.0 -> 123.0	+	0.9988	0.9631	0.5955	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND
36	Lutéoline	17.454	ESI	285.0 -> 133.1	+	0.9962	21.453	20.000	31.25- 500	112.2145	173.7488	128.3841	167.7363
37	Quercétine	14.282	ESI	300.8 -> 151.0	-	0.9964	16.912	4.6558	27.5-440	ND	ND	ND	ND
38	Biochanine A	17.691	ESI	284.9 -> 151.9	+	0.9963	0.7333	0.1475	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND
39	Naringénine	15.176	ESI	270.9 -> 119.1	-	0.9960	0.4575	1.3694	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
40	Hespérétine	15.899	ESI	300.9 -> 164.0	-	0.9966	0.649	0.3008	31.25- 500	ND	ND	ND	ND

ND : Non détecté, RT : temps de rétention, LOQ\LOD : limite de quantification\ limite de détection, R<sup>2</sup> : coefficient de détermination.

Le Tableau 7 et la Figure 19 présentent les résultats de l'analyse LC-ESI-MS/MS des extraits de la plante *C. papposa*. L'extrait hydrométhanolique a montré une forte concentration de l'acide shikimique (9725.462 µg/L), et acide chlorogénique (494.509 µg/L), tandis que la lutéoline, l'acide salicylique et l'acide protocatéchuique ont présenté des concentrations modérées (150.151 µg/L, 95.448 µg/L, et 84.964 µg/L respectivement). En revanche, le groupe des faibles concentrations comprend l'acide gallique, et l'acide caféique. En ce qui concerne l'extrait chloroformique, les concentrations modérées sont représentées par les composés acide salicylique et lutéoline, avec des concentrations de 168.441 µg/L et 160.494 µg/L, respectivement. L'hydroxybenzaldéhyde (50.887 µg/L), l'acide chlorogénique (43.485 µg/L), la vanilline (37.948 µg/L) et l'acide trans-cinnamique (26.031 µg/L) entrent dans la catégorie des concentrations mineures. Concernant l'extrait d'acétate d'éthyle, 16 composés ont été détectés, le groupe des concentrations élevées comprend l'acide vanillique, l'acide protocatéchuique, l'acide chlorogénique, l'acide shikimique, l'acide salicylique, l'acide trans férulique et l'acide gallique avec des concentrations de 2800.594 µg/L, 2711.204 µg/L, 1548.760 µg/L, 1474.8690 µg/L, 828.183 µg/L, 523.800 µg/L, et 519.933 µg/L respectivement. Le groupe de concentration modérée comprend le kaempférol-3-glucoside, la lutéoline, l'acide caféique et l'acide o-coumarique, avec des concentrations allant de 90 à 156 µg/mL. Enfin, le groupe des faibles concentrations comprend l'hydroxybenzaldéhyde, l'acide trans cinnamique, l'isoquercitrine et la fisétine. Concernant l'extrait de N-butanolique, le groupe à forte concentration comprend l'acide shikimique et l'acide chlorogénique, avec des concentrations respectives de 8388.38 µg/L et 2554.06 µg/L. Dans la catégorie des concentrations modérées, les résultats révèlent la présence de l'acide salicylique (180.3 µg/L) la lutéoline (128.80 µg/L) et de l'acide gallique (120.13 µg/L). Enfin, le groupe à faible concentration inclut des composés tels que l'acide protocatéchuique, le kaempférol-3-glucoside et la scutellarine, avec des concentrations respectives de 56.96 µg/L, 33.19 µg/L et 12.74 µg/L.



**Figure 19.** Chromatogrammes des extraits hydrométhanolique (A), chloroformique (B), acétate d'éthyle (C), et N-butanolique (D) de la plante *C. papposa*. **1** : acide shikimique, **2** : acide gallique, **3** : acide protocatéchuique, **6** : acide chlorogénique, **7** : hydroxybenzaldéhyde, **8** : acide vanillique, **9** : acide caféique, **11** : Caféine, **12** : vanilline, **13** : acide o-coumarique, **14** : acide salicylique, **18** : acide Trans férulique, **20** : scutellarine, **25** : isoquercitrine, **28** : Kaempférol 3-glucoside, **29** : fisétine, **36** : lutéoline, \* : composés non présents dans les standards.

Tableau 7. Profil phytochimique des extraits de *Centaurea papposa*.

No	Analyte	RT	Ion Source	Ion transition	Ion Mode	R2	LOQ (ug/L)	LOD (ug/L)	Linearity Range (ug/L)	Concentration (µg/L)			
										Hydro methanol	Chloroform	Ethyl acetate	N-Butanol
1	Acide shikimique	1.297	ESI	173.0 -> 93.1	-	0.9978	50.40	15.70	1250-20000	9725.462	ND	1474.868	8388.380
2	Acide gallique	3.182	ESI	169.0 -> 125.1	-	0.9986	18.5862	7.1674	31.25-500	47.531	ND	519.933	120.127
3	Acide protocatéchuique	5.451	ESI	153.0 -> 109.0	-	0.9969	13.1729	3.1564	15.625-250	84.964	13.514	2711.204	56.956
4	Epigallocatechine	6.792	ESI	307.0 -> 139.0	+	0.9995	3.8750	2.0903	12.5-200	ND	ND	ND	ND
5	Catéchine	6.896	ESI	288.9 -> 245.1	-	0.9946	7.5013	1.7055	343.750-5500	ND	ND	ND	ND
6	Acide chlorogénique	7.349	ESI	353.0 -> 191.0	-	0.9981	25.9023	11.5890	31.25-500	494.509	43.485	1548.760	2554.056
7	Hydroxy benzaldéhyde	7.728	ESI	121.0 -> 92.0	-	0.9993	12.8651	4.9742	15.625-250	ND	50.887	17.116	ND
8	Acide vanillique	7.750	ESI	167.0 -> 151.8	-	0.9958	1424.2132	219.0421	1250-20000	ND	Tr	2800.594	ND
9	Acide caféique	7.804	ESI	178.9 -> 135.1	-	0.9994	24.1620	6.9205	31.25-500	37.6818	Tr	122.013	Tr
10	Acide syringique	8.469	ESI	197.1 -> 181.8	-	0.9990	857.338	358.5000	1250-20000	ND	Tr	ND	ND
11	Caféine	8.380	ESI	195.0 -> 137.9	+	0.9986	15.4959	6.8099	18.75-300	ND	14.632	ND	ND
12	Vanilline	8.607	ESI	153.0 -> 125.0	+	0.9949	40.5411	14.5885	62.5-1000	ND	37.948	Tr	Tr
13	Acide o-coumarique	9.307	ESI	163.0 -> 119.1	-	0.9996	7.9973	4.0164	15.625-500	Tr	Tr	90.095	ND
14	Acide salicylique	9.386	ESI	137.0 -> 93.1	-	0.9981	82.9646	47.6695	112.5-1800	95.448	168.441	828.183	180.3

15	Taxifoline	9.733	ESI	304.8 -> 258.9	+	0.9938	23.5110	11.0294	37.5-600	ND	ND	ND	ND
16	Resvératrol	9.866	ESI	229.0 -> 107.0	+	0.9910	13.5575	4.5806	18.75- 300	ND	ND	ND	ND
17	Polydatine	9.068	ESI	390.9 -> 228.9	+	0.9987	1.8411	1.1471	7.8125- 125	ND	ND	ND	ND
18	Acide trans-férulique	10.041	ESI	193.1 -> 133.9	-	0.9950	11.5276	6.1184	31.25- 1000	ND	ND	523.800	ND
19	Acide sinapique	10.197	ESI	223.1 -> 208.0	-	0.9972	4.9652	1.9437	125-2000	ND	ND	ND	ND
20	Scutellarine	11.007	ESI	462.8 -> 286.8	+	0.9978	4.0013	3.1346	9.375- 300	ND	ND	ND	12.743
21	Acide p-coumarique	11.513	ESI	163.0 -> 119.0	-	0.9987	17.5416	3.5348	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
22	Coumarine	11.267	ESI	147.1 -> 103.2	+	0.9974	20.703	6.0077	62.5- 1000	ND	ND	ND	ND
23	Ethyle ester de l'acide protocatéchuique	11.887	ESI	181.0 -> 107.9	-	0.9996	24.9201	14.5610	15.625- 1000	ND	ND	ND	ND
24	Hespéridine	11.718	ESI	611.0 -> 302.9	+	0.9957	17.6753	4.1396	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
25	Isoquercitrine	11.414	ESI	464.9 -> 302.8	+	0.9982	11.2680	9.9382	18.75- 300	ND	ND	10.012	ND
26	Rutin	12.281	ESI	611.0 -> 302.8	+	0.9980	240.672	59.559	125-2000	ND	ND	ND	ND
27	Quercétine-3-xyloside	12.441	ESI	432.7 -> 299.5	-	0.9900	69.4059	18.7126	125-2000	ND	ND	ND	ND
28	Kaempférol-3-glucoside	12.887	ESI	448.8 -> 286.9	+	0.9997	4.5238	1.1609	7.8125- 125	ND	ND	156.603	33.187
29	Fiséatine	12.872	ESI	287.0 -> 137.0	+	0.9954	44.3662	10.8961	15.625- 250	ND	ND	9.353	ND
30	Baicaline	13.662	ESI	446.8 -> 270.9	+	0.9991	3.0988	0.5276	15.625- 250	ND	ND	ND	ND
31	Chrysin	14.423	ESI	254.9 -> 153.0	+	0.9989	0.1338	0.0737	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND

32	Acide trans-cinnamique	14.163	ESI	149.0 -> 131.1	+	0.9999	22.0279	11.1853	31.25- 500	ND	26.031	10.181	ND
33	Morine	15.862	ESI	302.8 -> 153.0	+	0.9981	0.5284	0.1253	1.5625- 50	ND	ND	ND	ND
34	Kaempférol	16.464	ESI	284.9 -> 116.9	-	0.9997	5.4004	1.8683	312.5- 10000	ND	ND	ND	ND
35	Baicaléine	17.101	ESI	271.0 -> 123.0	+	0.9988	0.9631	0.5955	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND
36	Lutéoline	17.454	ESI	285.0 -> 133.1	+	0.9962	21.453	20.000	31.25- 500	150.151	160.494	147.714	128.798
37	Quercétine	14.282	ESI	300.8 -> 151.0	-	0.9964	16.912	4.6558	27.5-440	ND	ND	ND	ND
38	Biochanine A	17.691	ESI	284.9 -> 151.9	+	0.9963	0.7333	0.1475	1.5625- 25	ND	ND	ND	ND
39	Naringénine	15.176	ESI	270.9 -> 119.1	-	0.9960	0.4575	1.3694	31.25- 500	ND	ND	ND	ND
40	Hespérétine	15.899	ESI	300.9 -> 164.0	-	0.9966	0.649	0.3008	31.25- 500	ND	ND	ND	ND

ND : Non détecté, Tr : trace (< 5 µg/mL), RT : temps de rétention, LOQ\LOD : limite de quantification\ limite de détection, R<sup>2</sup> : coefficient de détermination.

Dans une étude menée par **Romani et al. (2004)**, sur des extraits hydroalcooliques et d'acétate d'éthyle de feuilles de *Myrtus communis* provenant du sud de la Toscane (Italie) des analyses par HPLC/DAD et HPLC/MS ont révélé que les principaux constituants étaient des ellagitanins et des glucosides mono- et di-galloylés, avec une concentration plus élevée de ces composés dans l'extrait hydroalcoolique (10.06 mg/mL). Dans les extraits hydroalcoolique et d'acétate d'éthyle, la myricitrine (0.91 et 2.83 mg/mL respectivement), le myricétine 3-O-galactoside (0.47 et 1.54 mg/mL respectivement), l'acide 3,5-O-di-galloyl quinique (0.64 et 1.49 mg/mL respectivement), le myricétine 3-6''-O-galloylgalactoside (0.33 et 1.07 mg/mL respectivement), l'acide gallique (0.259 et 0.73 mg/mL respectivement), les glycosides de myricétine (0.23 et 0.06 mg/mL, respectivement) et la quercétine (0.02 mg/mL et 0.07 mg/mL respectivement) étaient présents en concentrations plus faibles dans les deux types d'extraits, tandis que l'acide quinique 5-O-galloyl n'était présent qu'à l'état de traces. Une analyse par HPLC/UV/Vis d'un extrait méthanolique de feuilles de *Myrtus communis* récoltées à Nabeul (Tunisie) a révélé une prédominance d'acide gallique (10.22 %) et de gallotannins (79.39 %). Les autres composés identifiés, présents en proportions moindres, incluent le quercétine-3-O-rhamnoside (2.59 %), le myricétine-3-O-galactoside (2.05 %), le quercétine-3-galactoside (1.16 %), la quercétine (0.98 %), le myricétine (0.89 %), l'acide caféique (0.71 %), l'acide syringique (0.71 %), l'acide férulique (0.44 %), le myricétine-3-O-rhamnoside (0.44 %) et l'acide vanillique (0.35 %). La catéchine a été détectée à l'état de traces (**Aidi Wannès et al., 2010**). De plus, l'étude susmentionnée révèle la présence d'acides vanillique et syringique dans leurs extraits, composés que nous n'avons pas détectés dans les nôtres. Par ailleurs, une analyse HPLC réalisée par **Vafadar Shoshtari et al. (2017)** sur un extrait méthanolique de *Myrtus communis* récolté en Iran au cours de trois saisons (printemps, été et automne) a révélé la présence d'acide férulique (85.56 à 168.89 mg/100 g), d'acide p-coumarique (11.73 à 15.24 mg/100 g), de rutine (10.87 à 35.38 mg/100 g), d'apigénine (7.45 à 10.07 mg/100 g) et d'acide gallique (18.79±0.3 mg/100 g en automne) comme composés majoritaires. L'acide gallique et la quercétine étaient également présents en quantités notables, tandis que la lutéoline et l'acide chlorogénique étaient détectés en quantités plus faibles. À l'inverse de ces résultats, nos extraits se caractérisent par une faible concentration de rutine et l'absence d'acide p-coumarique. L'analyse d'un extrait éthanolique de myrte originaire de Blida (Algérie) a révélé les composés suivants : Kaempférol (13.26%), génistéine (29.48%), acétate de pinobanksine-3 (9.18%), méthylquercétine (16.56%), caféate de prényle (6.89%) et naringénine (2.12%)

(Dellaoui et Berroukche, 2019). En contraste avec ces résultats, nous n'avons pas détecté de chrysine ni de Kaempférol.

Une étude portant sur la partie aérienne de *C. papposa* a permis d'identifier la présence d'acide vanillique, d'acide férulique et d'acide caféique dans chacun des extraits analysés (dichlorométhane, acétate d'éthyle et N-butanol). Cependant, la même étude indique que la lutéoline, l'acide o-coumarique et la quercétine n'étaient présents dans aucun de leurs extraits (Mawahib *et al.*, 2019). Selon Boğa *et al.* (2016), la rutin et l'acide p-coumarique ont été identifiés dans des extraits méthanoliques de *Centaurea balsamita*, *Centaurea depressa* et *Centaurea lycopifolia*. L'hesperidine dans *C. depressa* et *C. lycopifolia*, la naringénine dans *C. balsamita*, *C. depressa*, et l'hespéretin dans *C. balsamita*. La chrysine a également été identifiée dans ces espèces, mais sa concentration s'est révélée extrêmement faible (< 8 µg/g). Dans une étude sur les extraits méthanolique de *C. aksoyi* et *C. amaena*, a révélé des concentrations importantes de quercétine, de quercétine-3-β-D-glucoside et d'acide protocatéchuique dans les deux espèces (Albayrak *et al.*, 2017). Dans la même étude, la rutine, l'acide p-coumarique et l'acide syringique ont été détectés chez *C. amaena*. Tandis que l'acide caféique était absent chez les deux espèces. Une autre étude sur *Centaurea cyanus* a signalé la présence d'acide p-coumarique, d'acide chlorogénique, d'acide caféique, d'isoquercitrine, de coumarine et d'acide férulique (Escher *et al.*, 2018).

Les extraits polaires, en particulier l'extrait d'acétate d'éthyle de deux plantes, avait des concentrations élevées de polyphénols par rapport à l'extrait non polaire. La différence de concentration entre les extraits polaires et non polaire est principalement due à l'affinité des molécules pour le solvant utilisé (Lefebvre *et al.*, 2021). Les résultats de l'analyse LC-MS/MS ont révélé des composés phénoliques majeurs, tels que l'acide shikimique, l'acide gallique, l'acide protocatéchuique, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide salicylique, l'acide trans-férulique, la lutéoline, le kaempérol-3-glucoside, la catéchine, et l'acide caféique. Ces composés possèdent une vaste gamme d'activités biologiques, notamment l'inhibition des espèces réactives, la protection contre le stress oxydatif, la réduction de l'inflammation, ainsi que des effets neuroprotecteurs, anticancéreux et antimicrobiens (Alrumaihi *et al.*, 2024; Bao *et al.*, 2023; Hadidi *et al.*, 2024; Rabelo *et al.*, 2015).

## 2. Evaluation des activités biologiques in vitro

### 2.1. Activity antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante de la plante *M. communis* sont illustrés dans le Tableau 8. Pour le test DPPH, les extraits ont été classés selon leur efficacité, l'extrait d'acétate d'éthyle apparaissant comme le plus performant, suivi du BHT, de l'extrait N-butanolique, de l'extrait hydrométhanolique, de l'acide ascorbique, du BHA, puis de l'extrait chloroformique. Les résultats de l'essai ABTS, indiquent que les extraits, en particulier l'acétate d'éthyle, possèdent une forte activité de nettoyage des radicaux libres ( $CI_{50} = 1.10 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ ), suivis du BHT, du BHA, de l'extrait butanolique, de l'acide ascorbique, de l'extrait hydrométhanolique, et enfin de l'extrait chloroformique. Le pouvoir réducteur des extraits de *Myrtus communis* est résumé dans le Tableau 8. Tous les extraits ont montré une capacité importante à réduire le fer  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . L'extrait d'acétate d'éthyle s'est révélé le plus efficace avec un  $A_{0.5}$  de  $5.25 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ , presque équivalent à celui du BHA ( $5.60 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ), et plus efficace que l'acide ascorbique et le BHT. Les extraits N-butanolique, hydrométhanolique et chloroformique étaient légèrement inférieurs à ceux du BHA et de l'acide ascorbique. Selon les résultats du test SNP, les extraits ont été classés en fonction de leur niveau d'efficacité, l'activité la plus efficace étant : l'extrait d'acétate d'éthyle, suivi de l'extrait butanolique, de la quercétine, de l'extrait hydrométhanolique, de l'extrait chloroformique, et enfin du BHA. Le Tableau 8 présente les résultats de la phénanthroline. La quercétine s'est révélée être la plus efficace, suivie de l'extrait de N-butanol, de l'extrait d'acétate d'éthyle, du BHA, du BHT, de l'extrait hydrométhanolique, de l'extrait chloroformique, et enfin de l'acide ascorbique.

**Tableau 8.** Activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis*.

CI <sub>50</sub> (µg/mL), A <sub>0.5</sub> (µg/mL)						
	Extraits	DPPH•	ABTS•+	FRAP	SNP	Phénanthroline
<i>M. communis</i>	Hydrométhanol	2.35±0.28 <sup>a</sup>	5.37±0.50 <sup>d</sup>	8.72±0.21 <sup>abc</sup>	17.65 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.57 ± 0.12 <sup>d</sup>
	Chloroforme	13.70±0.32 <sup>c</sup>	21.99±0.65 <sup>e</sup>	16.55±0.55 <sup>c</sup>	73.28±3.82 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.21 <sup>e</sup>
	Acétate d'éthyle	1.23±0.12 <sup>a</sup>	1.10±0.10 <sup>a</sup>	5.25±0.10 <sup>a</sup>	9.07 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.06 <sup>ab</sup>
	N-butanol	2.08±0.03 <sup>a</sup>	2.28±0.57 <sup>b</sup>	7.72±0.16 <sup>ab</sup>	10.22±0.08 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>ab</sup>
Standards	BHA	9.11±0.89 <sup>b</sup>	1.55±0.26 <sup>ab</sup>	5.60 ± 0.05 <sup>a</sup>	73.47 ± 0.88 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.08 <sup>bc</sup>
	BHT	1.60±0.36 <sup>a</sup>	1.31±0.06 <sup>ab</sup>	14.48± 0.07 <sup>bc</sup>	>200	2.20 ± 0.04 <sup>cd</sup>
	Acide ascorbique	2.69±0.22 <sup>a</sup>	4.04±0.02 <sup>c</sup>	6.77±1.15 <sup>ab</sup>	>200	8.30 ± 0.76 <sup>f</sup>
	Quercétine	NT	NT	NT	11.25 ± 0.78 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>a</sup>

NT : Non testé, BHT : hydroxytoluène butyle, BHA : hydroxyanisole butyle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les valeurs dans la même colonne avec des indices différents (a, b, c, d, e, f) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

Les résultats de l'activité antioxydante de la plante *C. papposa* sont illustrés dans le Tableau 9. Les extraits et les standards ont été classés selon leur puissance anti-DPPH', en commençant par le plus efficace : le BHT, l'acide ascorbique, le BHA, l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait N-butanolique, l'extrait d'hydrométhanol, puis l'extrait chloroformique. Les résultats du test ABTS ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle présentait une activité supérieure par rapport aux autres extraits. L'efficacité a été classée dans l'ordre suivant : le BHT, le BHA, l'acide ascorbique, l'acétate d'éthyle, le N-butanol, le chloroforme et puis l'extrait hydrométhanolique. Concernant le test FRAP, tous les standards utilisés présentaient une activité significativement plus élevée que celle des extraits. L'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait N-butanolique ont révélé une activité significative, tandis que l'extrait hydrométhanolique et l'extrait chloroformique ont présenté une activité limitée. Les résultats du test SNP indiquent que les extraits possédaient une capacité faible ou étaient inactifs par rapport à la quercétine. Les résultats de l'analyse de la phénanthroline ont montré que les extraits étaient capables de réduire le fer ferrique en fer ferreux, la quercétine étant la plus efficace, suivie du BHA, du BHT, de l'extrait N-butanolique, de l'extrait d'acétate d'éthyle, de l'extrait chloroformique, puis de l'extrait hydrométhanolique.

**Tableau 9.** Activité antioxydante des extraits de *Centaurea papposa*.

CI <sub>50</sub> (µg/mL), A <sub>0.5</sub> (µg/mL)						
	Extraits	DPPH•	ABTS•+	FRAP	SNP	Phénanthroline
<i>C. papposa</i>	Hydrométhanol	90.81 ±1.39 <sup>d</sup>	62.25±1.7 <sup>d</sup>	192.92±5.35 <sup>e</sup>	>800	29.53 ± 0.33 <sup>f</sup>
	Chloroforme	301.08±6.12 <sup>e</sup>	59.66±4.09 <sup>d</sup>	169.88±5.53 <sup>d</sup>	NA	12.61 ± 0,59 <sup>d</sup>
	Acétate d'éthyle	27.83±0.24 <sup>b</sup>	16.35±0.21 <sup>b</sup>	65.02±1.02 <sup>c</sup>	302.92±22.51 <sup>b</sup>	5.20 ± 0.12 <sup>c</sup>
	N-butanol	40.25±3.80 <sup>c</sup>	21.98±0.41 <sup>c</sup>	62.72 ±1.02 <sup>c</sup>	>800	27.37 ± 0.06 <sup>e</sup>
Standards	BHA	9.13±0.89 <sup>a</sup>	1.55±0.26 <sup>a</sup>	5.60 ±0.05 <sup>a</sup>	NT	1.49 ± 0.08 <sup>ab</sup>
	BHT	1.63±0.36 <sup>a</sup>	1.31±0.06 <sup>a</sup>	14.48±0.07 <sup>b</sup>	NT	2.20 ± 0.04 <sup>b</sup>
	Acide ascorbique	2.62±0.22 <sup>a</sup>	4.04±0.02 <sup>a</sup>	6.77±1.15 <sup>ab</sup>	NT	NT
	Quercétine	NT	NT	NT	11.25 ± 0.78 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les valeurs dans la même colonne avec des exposants variés (a, b, c, d, e ou f) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ). NA : non actif, NT : non testé, BHA : butylhydroxyanisole, BHT : butylhydroxytoluène.

### 2.1.1. Corrélation de Pearson (r) entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante

Les polyphénols, les flavonoïdes et les tests antioxydants de deux plantes ont fait l'objet d'une analyse de corrélation (r). Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

**Tableau 10.** Corrélation de Pearson (r).

	Polyphénols	Flavonoïdes	DPPH	ABTS	FRAP	SNP	Phénanthroline
Polyphénols	1	0.928 <sup>a</sup>	-0.548 <sup>a</sup>	-0.760 <sup>a</sup>	-0.651 <sup>a</sup>	-0.397	-0.536 <sup>a</sup>
Flavonoïdes	0.928 <sup>a</sup>	1	-0.625 <sup>a</sup>	-0.813 <sup>a</sup>	-0.758 <sup>a</sup>	-0.456 <sup>b</sup>	-0.623 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> :  $p < 0.01$ , <sup>b</sup> :  $p < 0.05$ .

Les composés phénoliques et les flavonoïdes totaux ont révélé une corrélation positive très significative, avec un coefficient de corrélation de  $r = 0.928$  et une valeur de  $p < 0.01$ . En outre, une forte corrélation négative a été observée entre les polyphénols et les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ABTS et FRAP avec des coefficients supérieurs ou égale à  $-0.6$  ( $p < 0.01$ ), indiquant que l'augmentation des niveaux de polyphénols est associée à une diminution de leur activité. De même, une forte corrélation négative a été notée entre les flavonoïdes et les tests DPPH, ABTS, FRAP, et phénanthroline, avec un coefficient  $r \geq -0.6$ . Une corrélation négative modérée a été établie entre les polyphénols et les tests DPPH, et phénanthroline, avec un coefficient de  $-0.548$  et  $-0.536$  ( $p < 0.01$ ), respectivement et entre les

flavonoïdes et le test SNP ( $r = -0.456$ ,  $p < 0.05$ ), ce qui suggère que l'augmentation des polyphénols et des flavonoïdes est également liée à une diminution modérée de l'activité de ces radicaux. Enfin, une faible corrélation a été notée entre les polyphénols et le test SNP, ce qui indique que les niveaux de composés phénoliques n'ont pas un impact significatif sur l'activité antioxydante mesurée par ce test.

Les antioxydants peuvent piéger les radicaux libres et les stabiliser, réduisant ainsi leur potentiel à causer des dommages. Cela se fait soit par le transfert d'un atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un électron, soit en chélatant des ions métalliques pro-oxydants (**Lü et al., 2010**).

Selon nos résultats, tous les extraits des feuilles de *M. communis* ont montré une activité puissante contre tous les tests utilisés. En ce qui concerne l'activité antiradicalaire mesurée par le test DPPH, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bouaziz et al. (2015)** et **Şafak et al. (2023)**. Nos résultats indiquent que les extraits présentent une activité antiradicalaire significative contre le DPPH\*. L'extrait d'acétate d'éthyle se distingue par une efficacité supérieure à celle des standards de référence utilisés dans cette étude, ainsi que des valeurs rapportées par **Al-Maharik et al. (2023)** et **Moein et al. (2015)**. Bien que l'extrait non polaire (chloroforme) ait présenté une efficacité inférieure aux standards de référence utilisés, il a démontré une activité significativement supérieure à celle de l'extrait chloroformique ( $CI_{50} = 111.14 \pm 11.1 \mu\text{g/mL}$ ) de **Moein et al. (2015)**. Dans le test ABTS, les extraits ont démontré une activité significative de piégeage des radicaux libres. L'extrait d'acétate d'éthyle ( $CI_{50} = 1.10 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ ) s'est avéré plus efficace que les standards de référence, tandis que l'activité de l'extrait chloroformique était légèrement inférieure. Cette observation est cohérente avec les observations rapportées dans l'étude de **Bouaziz et al. (2015)**. Contrairement à nos résultats, **Amensour et al. (2010)** ont rapporté une faible activité de l'extrait d'acétate d'éthyle contre l'ABTS<sup>•+</sup>, avec un taux d'inhibition maximal de 80 % observé à une concentration de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . L'analyse par le test FRAP a révélé que tous les extraits de *Myrtus communis* présentent une capacité réductrice significative du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . L'extrait d'acétate d'éthyle s'est avéré le plus actif, avec une valeur  $A_{0.5}$  de  $5.25 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ , comparable à celle du BHA ( $5.60 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ) et supérieure à celles de l'acide ascorbique et du BHT. Les autres extraits polaires ont démontré une efficacité comparable à celle du BHA et de l'acide ascorbique, tandis que l'extrait chloroformique présentait une activité réductrice comparable à celle du BHT. Ces résultats concernant l'activité FRAP sont cohérents avec les données rapportées par **Bouaziz et al. (2015)** et supérieures à ceux mentionnés par **Moein et**

*al.* (2015) et *Yangui et al.* (2021). Les résultats du test phénanthroline indiquent que les extraits, sont capables de réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . L'extrait N-butanolique, avec une valeur  $A_{0.5}$  de  $0.70 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ , présente une activité comparable à celle de la quercétine ( $0.65 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ ). Lors du test SNP, l'extrait chloroformique a révélé une activité modérée. En revanche, les extraits polaires ont montré une activité significative, comparable à celle de la quercétine, l'extrait d'acétate d'éthyle affichant une activité légèrement supérieure.

Concernant l'espèce *Centaurea papposa*, les extraits d'acétate d'éthyle et de N-butanol ont démontré une activité significative contre les tests DPPH, ABTS, FRAP et phénanthroline. Alors que tous les extraits ont montré une efficacité inférieure à celle des standards utilisés dans cette étude. Les résultats observés dans les essais DPPH, ABTS et FRAP pour les extraits d'acétate d'éthyle et de N-butanol étaient légèrement inférieurs à ceux rapportés par *Mawahib et al.* (2019), où les extraits polaires de la partie aérienne de la plante ont des valeurs  $\text{IC}_{50}/A_{0.5}$  de  $18.1 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$  pour l'acétate d'éthyle et de  $17.0 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$  pour le N-butanol contre le DPPH<sup>\*</sup>,  $11.7 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$  pour l'acétate d'éthyle et  $22.6 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$  pour le N-butanol contre le ABTS<sup>\*\*</sup> ; et  $22.9 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$  pour l'acétate d'éthyle et  $42.1 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$  pour le N-butanol contre le FRAP. Contrairement à l'étude précédente, notre extrait chloroformique était plus efficace que leur extrait de dichlorométhane. La différence entre les résultats peut être attribuée à divers facteurs tels que la partie de la plante utilisé, la méthode d'extraction et le solvant choisi (*Borges et al.*, 2020; *Stankovic et al.*, 2011). Une autre étude sur les extraits polaires de *C. tougourensis* a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle présentait une efficacité inférieure à la nôtre contre les essais ABTS et FRAP avec des valeurs  $\text{CI}_{50}/A_{0.5}$  de  $51.00 \pm 0.15$  et  $138.33 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Alors que leur extrait de N-butanol a une activité antioxydante plus élevée que la nôtre avec des valeurs de  $8.04 \pm 0.21$  et  $11.16 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$ , respectivement (*Bensaad et al.*, 2021). En outre, notre extrait hydrométhanolique a montré une activité modérée contre les tests DPPH et FRAP, il était notablement supérieur à celui de *Centaurea pseudoscabiosa* ( $670.59 \pm 19.43 \mu\text{g/mL}$  contre DPPH<sup>\*</sup>,  $736.86 \pm 8.49 \mu\text{g/mL}$  contre FRAP), *Centaurea pulcherrima* ( $187.42 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$  contre DPPH<sup>\*</sup>,  $200.95 \pm 4.99 \mu\text{g/mL}$  contre FRAP), *Centaurea salicifolia* ( $284.46 \pm 3.07 \mu\text{g/mL}$  contre DPPH<sup>\*</sup>,  $276.11 \pm 2.98 \mu\text{g/mL}$  contre FRAP) et *Centaurea babylonica* ( $464.23 \pm 9.36 \mu\text{g/mL}$  contre DPPH<sup>\*</sup>,  $440.57 \pm 24.14 \mu\text{g/mL}$  contre FRAP) (*Aktumsek et al.*, 2013). Une autre étude a révélé que l'extrait méthanolique de *C. patula*, *C. pulchella* et *C. tchihatchfeii* présentait une activité antioxydante significative contre le test DPPH avec une valeur  $\text{CI}_{50}$  de 41.49, 36.33 et 55.70  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. En revanche, lors de l'essai FRAP, leurs

extraits méthanolique ont montré une faible capacité réductrice, avec une  $CI_{50}$  supérieure à 900  $\mu\text{g/mL}$  (Zengin *et al.*, 2010). Les résultats du test SNP ont montré que l'extrait chloroformique était inactive, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle présentait une faible activité et que l'extrait hydrométhanolique et le N-butanolique avaient une valeur élevée de  $A_{0.5}$  ( $> 800 \mu\text{g/mL}$ ). Cela indique que, dans l'ensemble, les extraits testés n'ont pas démontré une forte capacité à neutraliser les ions  $\text{Ag}^+$ . Selon les résultats de la phénanthroline, les extraits ont montré la meilleure capacité à chélater le fer. L'extrait d'acétate d'éthyle était le plus efficace. Ce résultat est incompatible avec une étude sur *C. tougourensis*, où la fraction d'acétate d'éthyle a montré une activité modérée avec une valeur de  $A_{0.5}$  de  $139.07 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  (Bensaad *et al.*, 2021).

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits issus de ces deux plantes a révélé des résultats variés, allant d'une activité puissante à l'inactivité. Notre étude a mis en évidence une corrélation significative entre l'efficacité de l'extrait contre les  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ , FRAP et leur richesse en polyphénols, ce qui suggère que plus la teneur en polyphénol d'un extrait est élevée, plus il est probable qu'il ait un effet positif sur l'activité antioxydante. Ces résultats sont conformes aux études antérieures (Dalar *et al.*, 2015; Salachna *et al.*, 2021), qui ont également démontré une forte corrélation entre le polyphénol et l'activité antioxydante. Cependant, nos résultats révèlent une faible corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le test SNP et une corrélation modérée avec le test phénanthroline et le DPPH $\cdot$ . Bien que la quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes est souvent considérée comme un déterminant majeur de l'activité antioxydante, ces divergences suggèrent que l'activité antioxydante des extraits dépend de la composition chimique spécifique de chaque extrait et de la présence de divers groupes fonctionnels, dont le groupe carboxyle ( $-\text{COOH}$ ), hydroxyle ( $-\text{OH}$ ), méthoxy ( $-\text{OCH}_3$ ), phénolique ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) et la position et le nombre de ces groupes fonctionnels sur les anneaux aromatiques, ainsi que la concentration des composés, d'autres substances non phénoliques et les effets synergiques des constituants (J. Chen *et al.*, 2020; Gulcin, 2020; Munteanu et Apetrei, 2021).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la différence observée entre nos résultats et les résultats mentionnés précédemment. Outre la région, les saisons et les facteurs climatiques, l'efficacité des extraits peut également être influencée par la méthode d'extraction, les protocoles employés pour évaluer la capacité antioxydante, ainsi que par les conditions expérimentales telles que le pH et la concentration des réactifs et des échantillons (Di Majo *et al.*, 2011; Munteanu et Apetrei, 2021). Bien que ces méthodes d'évaluation de la capacité

antioxydante nous aient permis de tirer des conclusions sur la puissance des extraits, il est important de noter que certains de ces tests peuvent être artificiels et ne rendent pas compte de la complexité du stress oxydatif dans les aliments ou les organismes vivants (**Munteanu et Apetrei, 2021**). Ces extraits peuvent donc être puissants lors d'un test en laboratoire, mais ils pourraient également être moins efficaces, voire inactifs, dans des conditions biologiques. Des tests supplémentaires, utilisant d'autres méthodes, ainsi que des études ex vivo et in vivo sont nécessaires pour confirmer l'efficacité des extraits.

## 2.2. Inhibition de l'activité enzymatique

Le Tableau 11 résume l'activité inhibitrice des extraits de deux plantes sur les enzymes BChE, AChE, uréase, tyrosinase,  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase.

Tous les extraits de *C. papposa* n'ont révélé aucune activité inhibitrice significative sur les enzymes ciblées, confirmant leur inactivité.

En ce qui concerne l'inhibition de la BChE, les extraits de *M. communis* ont été classés par ordre d'efficacité, l'extrait hydrométhanolique présentant la plus forte activité, suivi de l'extrait N-butanolique, de l'extrait d'acétate d'éthyle, de l'extrait chloroformique, puis de la galantamine. Pour l'inhibition de l'AChE par les extraits de la plante *M. communis*, la galantamine a montré la meilleure efficacité, suivie de l'extrait hydrométhanolique, de l'extrait d'acétate d'éthyle, de l'extrait N-butanolique, puis de l'extrait chloroformique.

En ce qui concerne l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par *M. communis*, l'extrait N-butanolique s'est révélé le plus performant, avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $10.67 \pm 0.58 \mu\text{g/mL}$ , légèrement inférieure à celle de l'acarbose ( $10.52 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ). Les autres extraits de la plante *M. communis* ont également montré une activité significative contre l' $\alpha$ -amylase. Concernant l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, tous les extraits ont montré une activité notable, avec des valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 3.45 et 5.49  $\mu\text{g/mL}$ .

Les extraits de la plante *M. communis* n'ont présenté aucune activité inhibitrice significative sur l'uréase. En ce qui concerne la tyrosinase, l'activité inhibitrice a été très faible, avec des valeurs de  $CI_{50}$  dépassant 600  $\mu\text{g/mL}$ , voire une absence d'activité pour certains extraits.

**Tableau 11.** Inhibition enzymatique par les extraits de *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*.

	Extraits	CI <sub>50</sub> (µg/mL)					
		AChE	BChE	Tyrosinase	Uréase	α-amylase	α-glucosidase
<i>M. communis</i>	Hydrométhanol	22.82 ±0.05 <sup>b</sup>	10.70±0.22 <sup>a</sup>	NA	NA	28.55±0.22 <sup>c</sup>	5.05 ±0.20 <sup>b</sup>
	Chloroforme	170.35±0.21 <sup>e</sup>	34.61±2.00 <sup>c</sup>	NA	NA	18.24±0.14 <sup>b</sup>	5.49 ±0.42 <sup>b</sup>
	Acétate d'éthyle	35.71 ± 0.30 <sup>c</sup>	24.58±1.30 <sup>b</sup>	>600	NA	18.66±0.49 <sup>b</sup>	3.45 ±0.36 <sup>a</sup>
	N-butanol	41.71 ±0.07 <sup>d</sup>	22.07±0.61 <sup>b</sup>	>600	NA	10.67±0.58 <sup>a</sup>	4.86 ±0.09 <sup>b</sup>
<i>C. papposa</i>	Hydrométhanol	NA	NA	>800	NA	NA	NA
	Chloroforme	NA	NA	>800	NA	NA	>400
	Acétate d'éthyle	NA	NA	>800	NA	>400	>400
	N-butanol	NA	NA	>800	NA	NA	NA
Standards	Galantamine	4.66 ± 0.42 <sup>a</sup>	34.75±1.99 <sup>c</sup>	NT	NT	NT	NT
	Acarbose	NT	NT	NT	NT	10.52±0.02 <sup>a</sup>	5.24 ±0.06 <sup>b</sup>
	Acide Kojique	NT	NT	25.23±0.77	NT	NT	NT
	Thiourée	NT	NT	NT	11.57±0.67	NT	NT

NT : Non testé ; NA : non actif ; AChE : acétylcholinestérase ; BChE : butyrylcholinestérase. Les résultats sont rapportés en moyenne ± SD. Les valeurs dans la même colonne avec des exposants variés (a, b, c, d, e) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

La cholinestérase se présente sous deux formes : la butyrylcholinestérase et l'acétylcholinestérase. Toutes deux sont extrêmement importantes car elles contribuent à la régulation des niveaux d'acétylcholine (ACh), ce qui est vital pour la neurotransmission cholinergique. D'autre part, lors d'une activité élevée de cholinestérase, les niveaux d'ACh deviennent faibles. Cette diminution des niveaux d'ACh entraîne des problèmes de mémoire et de concentration qui sont des symptômes de la maladie d'Alzheimer (Z.-R. Chen *et al.*, 2022). L'inhibition du cholinestérase est l'une des stratégies qui pourrait aider à retarder ou à prévenir la progression de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études examinent le potentiel des plantes médicinales dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Dans notre étude, les extraits du *Myrtus communis* ont montré un effet inhibiteur intéressant contre l'AChE ; cependant, ils étaient moins efficaces que la galantamine (4.66±0.42 µg/mL). Les

extraits polaires présentés la plus forte inhibition de la BChE, allant de 10.70 à 24.58  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui était plus efficace que la galantamine ( $\text{CI}_{50} = 34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$ ). L'extrait chloroformique ( $\text{CI}_{50} = 34.61 \pm 2.00 \mu\text{g/mL}$ ) a présenté une activité similaire à celle de la galantamine contre la BChE. Dans une étude réalisée par **Begum et al. (2012)**, l'extrait hydrométhanolique et ses fractions (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et N-butanol) de la partie aérienne de *Myrtus communis* récoltée au Khyber Pukhtoonkhwa (Pakistan) ont montré que toutes les fractions, ainsi que l'extrait hydrométhanolique, présentaient une activité inhibitrice significative, en particulier ce dernier, qui a donné un pourcentage de 91.2 % contre l'AChE et 99.1 % contre la BChE, suivi de la fraction d'acétate d'éthyle, avec 90 % d'inhibition contre l'AChE et 92.5 % d'inhibition contre la BChE, la fraction de N-butanol, avec 88 % d'inhibition contre l'AChE et 90.1 % d'inhibition contre la BChE, l'extrait d'hexane a présenté 80 % d'inhibition pour l'AChE et la BChE, suivi de l'extrait de chloroforme, avec 72.5 % d'inhibition contre l'AChE et 85 % d'inhibition contre la BChE. Contrairement à nos résultats, notre extrait de chloroforme a montré une activité modérée contre AChE ( $\text{CI}_{50} = 170.35 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ ). Dans l'étude de **Ouchemoukh et al. (2014)** sur l'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* récoltées à Bejaia, Algérie, il a été observé que cet extrait démontrait une forte inhibition contre l'AChE, avec une valeur  $\text{CI}_{50}$  de 30  $\mu\text{g/mL}$ . La similarité de nos résultats suggère que ces extraits pourraient avoir des applications thérapeutiques potentielles dans le traitement des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer. Cependant, dans une autre étude menée par **Tumen et al. (2012)** sur les extraits méthanolique, dichlorométhane, acétate d'éthyle et acétone des feuilles de *M. communis* récoltées à Mersin (Turquie) tous les extraits ont montré une inhibition modérée contre l'AChE. En revanche, les extraits n'ont montré aucun effet significatif sur la BChE. Dans une étude distincte réalisée par **Hussein et al. (2023)**, les feuilles de *M. communis* récoltées à Bagdad (Irak) ont montré que l'extrait méthylique présentait une faible inhibition contre l'AChE et la BChE, avec des valeurs de 37.33 % et 19 %, respectivement. La différence entre nos résultats pourrait être attribuée à l'origine géographique, aux facteurs environnementaux et à la méthode d'extraction, qui peuvent tous influencer la production de métabolites secondaires. De nombreuses études mettent en évidence les alcaloïdes comme composés clés responsables de l'inhibition de la cholinestérase (**Tamfu et al., 2021**). Selon la littérature, la feuille de *Myrtus communis* ne contient pas de quantités significatives d'alcaloïdes (**Dellaoui et Berroukche, 2019; Mahmoudvand et al., 2015; Sisay et al., 2017**). Cependant, ces extraits ont toujours montré une inhibition significative de la cholinestérase. Cela suggère que d'autres composés bioactifs présents dans l'extrait

pourraient jouer un rôle essentiel dans cette activité. Les composés phénoliques peuvent inhiber la cholinestérase, et leur efficacité dépend du nombre ainsi que de la position des groupes méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) et hydroxyle libre (-OH) présents sur le cycle phénolique. D'autre part, les flavonoïdes peuvent altérer la structure de la cholinestérase, empêchant l'accès au site actif (**Tamfu et al., 2021**).

Les glucides complexes sont des biomolécules dégradées par l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase. L'inhibition de ces deux enzymes permet de contrôler le niveau de glucose (**Tiwari et Rao, 2002**). Plusieurs études ont examiné les effets des produits naturels et leur potentiel en tant qu'alternatives pour inhiber ces enzymes. En ce qui concerne l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase, l'extrait de N-butanol de *M. communis* s'est révélé le plus efficace (CI<sub>50</sub> = 10.67  $\pm$  0.58  $\mu$ g/mL), avec une activité légèrement inférieure à celle de l'acarbose (10.52  $\pm$  0.02  $\mu$ g/mL). Pour l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, tous les extraits de la plante *M. communis* ont montré une activité intéressante avec des valeurs CI<sub>50</sub> allant de 3.45 à 7.78  $\mu$ g/mL. Dans une étude par **Şafak et al. (2023)**, L'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *M. communis* a également montré une forte activité contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase, avec une inhibition de 96 % à une concentration de 0.5 mg/mL, contrairement à nos résultats, leur extrait de N-butanol a révélé une activité constamment faible contre la même enzyme (35.52 % à 1 mg/L). Une autre étude par **GHOLAM et al. (2008)**, les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de *M. communis* provenant de Kerman (Iran) ont montré une activité inhibitrice puissante contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase, avec des valeurs de 97 $\pm$ 3 % et 99 $\pm$ 3 %, respectivement. **Al-Maharik et al. (2023)** ont analysé l'extrait méthanolique des feuilles de *Myrtus communis* provenant de deux sites différents en Palestine (Jénine et Jéricho). Ils ont révélé que l'extrait méthanolique de Jéricho n'avait pas d'effet significatif sur l' $\alpha$ -amylase, tandis que celui de Jénine montrait une faible activité, avec une valeur CI<sub>50</sub> de 795.43 $\pm$ 1.88  $\mu$ g/mL. Nos résultats indiquent que les extraits de *M. communis* ont un potentiel pour améliorer le contrôle glycémique, suggérant la nécessité de recherches supplémentaires sur leur application dans la prise en charge du diabète.

Les inhibiteurs d'uréase représentent une classe thérapeutique d'intérêt majeur en raison de leur capacité à moduler l'activité de l'uréase, une enzyme impliquée dans la conversion de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone. La neutralisation de cette activité enzymatique permet d'atténuer l'inflammation gastrique et de limiter le risque d'ulcérations duodénales, constituant ainsi une approche thérapeutique prometteuse contre les pathologies induites par des micro-organismes pathogènes dépendants de l'uréase (**M. Kumar et al., 2021**). Nos

extraits de *M. communis* ont été évalués pour leur capacité à inhiber l'uréase. Les résultats révèlent une absence totale d'inhibition de l'uréase par les extraits, quelles que soient les concentrations testées. En comparaison, le contrôle positif (thiouree) a montré une inhibition de  $11.57 \pm 0.67$   $\mu\text{g/mL}$  dans les mêmes conditions. Nos observations diffèrent de celles d'**Alsenaidi et al. (2023)**, qui ont rapporté que les extraits aqueux et N-butanolique des fruits de *M. communis* présentaient une inhibition modérée de l'uréase, avec des valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de 146.87 et 194.97  $\mu\text{g mL}$ , respectivement.

La tyrosinase est une enzyme clé dans la mélanogénèse, un processus biochimique complexe qui catalyse la synthèse de mélanine à partir de la tyrosine. La mélanine, un pigment naturel, est ensuite distribuée dans la peau et les cheveux, où elle assure la pigmentation et offre une photoprotection contre les dommages induits par les rayonnements ultraviolets (UV). Une activité excessive de la tyrosinase peut entraîner une surproduction de mélanine, conduisant à des troubles d'hyperpigmentation cutanée (**Casanola-Martin et al., 2014**). Les extraits polaires de la plante *M. communis* testés ont montré une activité inhibitrice de la tyrosinase limitée, avec des valeurs  $\text{CI}_{50}$  supérieures à 600  $\mu\text{g/mL}$ . En revanche, l'extrait hydrométhanolique et l'extrait chloroformique n'ont présenté aucune activité inhibitrice dans les conditions de l'essai. L'activité observée est considérablement plus faible que celle de l'acide kojique, dont la  $\text{CI}_{50}$  est de  $25.23 \pm 0.77$   $\mu\text{g/mL}$ . Nos résultats rejoignent ceux de **Tumen et al. (2012)**, qui n'ont pas observé d'inhibition notable de la tyrosinase. Néanmoins, cette conclusion contraste avec l'étude d'**Uysal et al. (2023)**, qui rapporte une activité inhibitrice de la tyrosinase avec des extraits méthanolique de *M. communis*. Cette divergence pourrait être attribuable à des différences dans la méthode et les conditions d'extraction, la partie de la plante, etc.

Par rapport aux standards, les extraits de *Centaurea papposa* présentaient soit des valeurs  $\text{CI}_{50}$  plus élevées ou étaient inactifs, ce qui met en évidence leur efficacité réduite comme inhibiteur enzymatique. Il apparaît que la concentration des composants présents dans l'extrait hydrométhanolique, et l'extrait chloroformique ne permettent pas d'obtenir l'effet inhibiteur attendu. Dans notre étude, nous avons identifié sept composés clés dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. papposa*, chacun étant associé à une activité inhibitrice enzymatique. Par exemple, l'acide gallique combiné à l'acarbose améliore considérablement l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase (**Oboh et al., 2016**). Une étude *in silico* a montré que l'acide gallique indique une forte affinité beaucoup plus favorable que l'acarbose pour le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase, en formant huit liaisons hydrogènes et deux molécules d'eau

(Bounaas *et al.*, 2024). une étude menée par Cao *et al.* (2023) a identifié que l'acide shikimique se lie au site non actif (inhibition non compétitive) sur l'alpha-amylase, affectant sa conformation structurelle. Dans une étude in vitro, l'acide shikimique et l'acide férulique ont montré une inhibition significative de la cholinestérase (Srividya *et al.*, 2024). Une étude a montré que l'acide chlorogénique a un effet neuroprotecteur en inhibant l'activité de l'AChE dans l'hippocampe et le cortex frontal des rats traités avec la scopolamine (Kwon *et al.*, 2010). Les acides vanillique et salicylique ont été signalés comme des substances efficaces pour réduire l'activité de la tyrosinase dans les cellules de mélanome B16F10 (Liu *et al.*, 2019, 2021). De plus, la simulation in silico a révélé une interaction favorable entre l'acide vanillique et la tyrosinase, par la formation de liaisons hydrogène et d'interaction hydrophobique avec les résidus d'histidine (Chatatikun *et al.*, 2023). Une étude a montré que l'acide chlorogénique inhibe l'uréase d'une manière non concurrentielle (Y. Li *et al.*, 2024). Une autre étude rapportée par Hassan et Švajdlenka (2017) a constaté que l'activité anti-uréase de l'acide protocatéchuique est associée à la présence du groupe hydroxyle. Bien que ces composants soient présents en fortes concentrations dans l'extrait d'acétate d'éthyle, il ne montre aucune activité inhibitrice. Différents composés peuvent interagir entre eux et leurs effets combinés ne se traduisent pas nécessairement par une inhibition enzymatique. Certaines substances peuvent masquer ou inhiber l'activité d'autres composés actifs présents dans l'extrait (Quradha *et al.*, 2024), suggère que l'activité inhibitrice est le résultat d'interactions complexes entre plusieurs composants du mélange, plutôt qu'être causée par un ou deux composés majeurs. Ceci suppose que les effets synergiques ou antagonistes entre les différents composés bioactifs jouent un rôle crucial dans l'activité globale des extraits (Ćavar Zeljković *et al.*, 2021). Une étude antérieure sur des plantes du genre *Centaurea* a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. tougourensis* présentait une inhibition importante contre l'AChE, avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $43.27 \pm 0.12$   $\mu\text{g/mL}$ , alors qu'il était inactif contre la BChE (Bensaad *et al.*, 2021). Une autre étude effectuée par Yirtici *et al.* (2022) sur l'extrait méthanolique de *C. sivasica* a montré une activité inhibitrice remarquable contre la tyrosinase avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $81.62 \pm 1.10$   $\mu\text{g/mL}$ . D'autre part, l'activité de cet extrait contre l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase était faible avec des valeurs  $> 200$   $\mu\text{g/mL}$ . Autre recherche sur l'extrait méthanolique de *C. cadmea* contre la tyrosinase, l'uréase, l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase a montré une activité notable avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $46.02 \pm 1.60$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $26.66 \pm 1.42$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $82.48 \pm 1.91$   $\mu\text{g/mL}$  et  $69.15 \pm 1.84$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Kisa *et al.*, 2024). Il faudra peut-être mener d'autres études pour explorer

d'autres méthodes d'extraction qui pourraient améliorer l'efficacité inhibitrice des extraits de *C. papposa*.

### 2.3. Facteur de protection solaire

Conformément aux lignes directrices de l'Union européenne (**European, 2006**), le SPF est généralement classé en quatre classes : faible si les valeurs de SPF sont comprises entre 6 et 10, modérée si les valeurs de SPF sont comprises entre 15 et 25, élevée si les valeurs de SPF sont comprises entre 30 et 50, et très élevée si la valeur de SPF est supérieure à 50. Les résultats concernant la valeur de SPF sont présentés dans le Tableau 12 et 13. Notre étude a révélé que tous les extraits de *M. communis* et *C. papposa* ont affiché un SPF supérieur à 39.

**Tableau 12.** Facteur de protection solaire des extraits de *Myrtus communis*.

$\lambda$ (nm)	Hydrométhanol		Chloroforme		Acétate d'éthyle		N-butanol	
	Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF
<b>290</b>	4.59±0.00	0.68±0.00	4.27±0.27	0.64±0.04	4.59±0.00	0.68±0.00	4.59±0.00	0.68±0.00
<b>295</b>	4.49±0.17	3.67±0.14	4.26±0.35	3.48±0.28	4.59±0.00	3.75±0.00	4.59±0.00	3.75±0.00
<b>300</b>	4.39±0.17	12.62±0.49	4.59±0.00	13.20±0.00	4.59±0.00	13.20±0.00	4.39±0.17	12.62±0.49
<b>305</b>	4.59±0.00	15.06±0.00	3.82±0.11	12.54±0.38	3.89±0.00	12.77±0.00	3.76±0.11	12.32±0.38
<b>310</b>	4.39±0.17	8.19±0.32	4.26±0.35	7.94±0.65	4.26±0.57	7.94±1.07	4.59±0.00	8.56±0.00
<b>315</b>	4.49±0.17	3.77±0.14	4.29±0.52	3.60±0.43	4.59±0.00	3.85±0.00	3.96±0.30	3.32±0.25
<b>320</b>	4.01±0.50	0.72±0.09	3.85±0.24	0.69±0.04	4.59±0.00	0.82±0.00	3.97±0.55	0.71±0.10
<b>Total</b>	44.74 ± 0.47 <sup>a</sup>		42.12 ± 0.71 <sup>b</sup>		43.05 ± 1.08 <sup>ab</sup>		42.00 ± 0.83 <sup>b</sup>	

$\lambda$ : longueur d'onde (nm); Abs : absorbance. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les valeurs dans la même ligne avec des exposants variés (a, b) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

**Tableau 13.** Facteur de protection solaire des extraits de *Centaurea papposa*.

$\lambda$ (nm)	Hydrométhanol		Chloroforme		Acétate d'éthyle		N-butanol	
	Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF
<b>290</b>	4.10±0.50	0.61±0.07	4.27±0.27	0.64±0.04	4.43±0.27	0.66±0.04	4.21±0.66	0.63±0.09
<b>295</b>	4.29±0.52	3.50±0.42	3.76±0.11	3.07±0.09	4.19±0.45	3.42±0.37	4.26±0.35	3.48±0.28
<b>300</b>	4.49±0.17	12.91±0.49	3.57±0.26	10.26±0.74	4.12±0.40	11.86±1.15	4.26±0.35	12.24±1.00
<b>305</b>	4.06±0.47	13.31±1.55	4.26±0.35	13.96±1.14	3.78±0.19	12.39±0.64	3.81±0.43	12.49±1.42
<b>310</b>	4.21±0.42	7.85±0.79	3.77±0.10	7.04±0.19	3.82±0.11	7.13±0.21	4.21±0.42	7.85±0.79
<b>315</b>	4.36±0.40	3.65±0.33	4.01±0.53	3.36±0.44	3.76±0.11	3.14±0.09	4.26±0.35	3.56±0.29
<b>320</b>	3.95±0.55	0.71±0.09	4.27±0.27	0.76±0.04	3.91±0.17	0.70±0.03	4.59±0.00	0.82±0.00
<b>Total</b>	42.57 ± 0.99 <sup>a</sup>		39.12 ± 1.11 <sup>a</sup>		39.34 ± 1.68 <sup>a</sup>		41.10 ± 2.00 <sup>a</sup>	

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD.  $\lambda$  : Longueur d'onde (nm), Abs: absorbance. Les valeurs dans la même ligne avec des indices superscripts variés (a) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

La lumière solaire est une source majeure de vitamine D et joue un rôle bénéfique dans le traitement de certaines affections cutanées (**Jarrett et Scragg, 2017**). Cependant, elle peut être nocive en émettant des rayonnements électromagnétiques tels que les ultraviolets A (UVA) et B (UVB). Les rayons UV causent des dommages importants à la peau, provoquant une dermatite, le vieillissement de la peau et entraînant des changements dans la pigmentation de la peau, etc. (**L. Li et al., 2023**). Bien qu'il soit largement recommandé d'utiliser un écran solaire pour protéger la peau contre les expositions excessives au soleil, des préoccupations ont été exprimées quant à l'innocuité de certains ingrédients de protection solaire, tels que l'actinolate, l'avobenzone et l'oxybenzone (**Suh et al., 2020**). De nombreuses études soutiennent l'inclusion d'ingrédients naturels dans les écrans solaires en raison de la présence de polyphénols, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins et plus encore. Leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et leur capacité à absorber les UV en font des candidats prometteurs pour des écrans solaires plus naturels et efficaces (**L. Li et al., 2023**). Nos résultats concernant la valeur SPF sont présentés dans les tableaux 10 et 15. Notre étude a montré que les extraits de *Centaurea papposa* et *Myrtus communis* présentaient des propriétés de protection solaire élevées au-dessus de 39, et cela pourrait être dû à la composition des composés phénoliques présents dans les extraits (**Lahmadi et al., 2022**). Les résultats obtenus dans cette étude concernant *C. papposa* sont cohérents avec ceux de **BENSAID et al. (2024)**, qui ont également observé une valeur SPF élevée avec l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. acaulis* ( $40.20 \pm 0.11$ ). Bien que les résultats obtenus par **Azzouzi et al. (2024)** pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. dimorpha* ( $12.30 \pm 0.001$ ) soient inférieurs aux nôtres, ils restent précieux en raison de la faible concentration utilisée (0.1 mg/mL). En ce qui concerne l'espèce *M. communis*, aucune étude n'a encore été réalisée sur le facteur de protection solaire.

#### 2.4. Cytotoxicité

Les résultats obtenus montrent une variation significative entre les extraits de *C. papposa* et indiquent que la cytotoxicité est liée à la concentration (Tableau 14). L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité cytotoxique significativement plus élevée sur les deux lignes. L'extrait hydrométhanolique a montré une activité modérée contre Hep2, alors qu'il était inactif contre HCT116. D'autre part, l'extrait chloroformique a montré une très faible cytotoxicité sur les deux lignées cellulaires.

**Tableau 14.** Activité cytotoxique des extraits de *Centaurea Papposa*.

Hydrométhanol			Chloroforme			Acétate d'éthyle		
Conc (µg/mL)	Viabilité cellulaire (%)		Conc (µg/mL)	Viabilité cellulaire (%)		Conc (µg/mL)	Viabilité cellulaire (%)	
	Hep 2	HCT 116		Hep 2	HCT 116		Hep 2	HCT 116
150	47.97±0.06 <sup>a</sup>	93.12±0.00	600	29.30±0.15 <sup>a</sup>	64.63±0.20 <sup>a</sup>	80	13.66±0.00 <sup>a</sup>	6.67±0.18 <sup>a</sup>
120	75.27±0.01 <sup>b</sup>	95.50±0.01	400	62.60±0.04 <sup>b</sup>	88.98±0.00 <sup>b</sup>	40	23.09±1.30 <sup>b</sup>	52.94±0.05 <sup>b</sup>
90.88	77.53±0.01 <sup>c</sup>	95.56±0.00	300.08	62.73±0.00 <sup>c</sup>	92.71±0.02 <sup>c</sup>	27.93	31.00±0.00 <sup>c</sup>	66.46±0.08 <sup>c</sup>
50	85.75±0.00 <sup>d</sup>	94.93±0.06	100	78.57±0.01 <sup>d</sup>	92.72±0.00 <sup>d</sup>	10	61.65±0.00 <sup>d</sup>	72.68±0.04 <sup>d</sup>
20	91.81±0.00 <sup>e</sup>	96.35±0.00	50	93.30±0.00 <sup>e</sup>	96.27±0.00 <sup>e</sup>	5	81.26±0.03 <sup>e</sup>	73.95±0.00 <sup>e</sup>
CI <sub>50</sub> (µg/mL)	173.68±0.14	NA	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	439.18±0.52	>900	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	23.02±0.27	37.56±1.12

Conc : concentration. NA : non actif. Les valeurs dans la même colonne avec des exposants variés (a, b, c, d, e) sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

De nombreuses thérapies contre le cancer, comme la radiothérapie et la chimiothérapie, manquent de spécificité et attaquent également les cellules saines, ce qui entraîne des effets secondaires indésirables, notamment une neurotoxicité, une toxicité gastro-intestinale, une néphrotoxicité et une hépatotoxicité (van den Boogaard *et al.*, 2022). Il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des plantes comme traitement potentiel du cancer, mais il est important de noter qu'il n'existe pas encore de recherche clinique solide. Actuellement, les plantes sont utilisées principalement pour soulager les effets secondaires des thérapies conventionnelles plutôt que comme traitements directs contre le cancer. Des études ont montré que certaines herbes peuvent avoir des propriétés anticancéreuses. Cependant, leur efficacité en tant que traitement anticancéreux doit être démontrée par des essais cliniques (Khan *et al.*, 2022; Liju *et al.*, 2023). Dans cette étude, nous avons examiné l'activité cytotoxique des extraits de *C. papposa* sur deux lignées cellulaires : Hep2, dérivé du carcinome laryngé humain, et HCT116, dérivé du carcinome colorectal humain. Parmi les extraits testés, l'extrait d'acétate d'éthyle a significativement diminué la viabilité des cellules Hep2 avec une valeur de CI<sub>50</sub> égale à 23.02±0.27 µg/mL et les cellules HCT116 avec CI<sub>50</sub> de 37.56±1.12 µg/mL. Les substances phytochimiques présentes dans l'extrait peuvent contribuer à son effet cytotoxique. Les principaux polyphénols détectés dans l'extrait d'acétate d'éthyle ont une activité anticancéreuse. Pour citer un exemple, une étude a montré que l'acide gallique inhibe la multiplication de NSCLC A549 (cancer du poumon) et provoque leur apoptose en réduisant le Bcl2 (lymphome 2 à cellules B), tout en stimulant l'expression de Bax ((Bcl2)-associée au X) (T. Zhang *et al.*, 2019). Dans une étude réalisée

par **Guneidy et al. (2024)** a montré que l'acide protocatéchuique induisait une cytotoxicité sur les cellules MCF7 (cancer du sein humain) et améliorait l'efficacité du tamoxifène. Une autre étude menée par **Yıldız (2024)** a montré que l'acide protocatéchuique induisait des effets apoptotiques significatifs dans les cellules Caco-2 (adénocarcinomes colorectaux humains), avec une augmentation des marqueurs d'apoptose et une diminution des niveaux de stress oxydatif. Des études ont mentionné le rôle de l'acide vanillique comme agent anticancéreux, provoquant l'apoptose des cellules tumorales, inhibant la prolifération cellulaire, et bloquant plusieurs voies de signalisation, dont NF- $\kappa$  B, PI3K/AKT/mTOR et JAK/STAT, tout en augmentant le niveau de superoxyde dismutase. En outre, il a été démontré que l'acide vanillique inhibe la métastase et l'invasion tumorale (**Hao et al., 2025**). En résumé, les polyphénols avec leurs propriétés antioxydantes pourraient réduire le risque de cancer en neutralisant les radicaux libres. De plus, les polyphénols peuvent inhiber la carcinogenèse en réduisant la prolifération des cellules tumorales et en inhibant les enzymes impliquées dans cette prolifération, induisant l'apoptose, modulant les voies de signalisation cellulaire et empêchant la formation de ruptures d'ADN monocaténaire (**Basli et al., 2017**).

Selon la littérature, les plantes classées dans la famille des Asteraceae produisent des lactones sesquiterpéniques. Il a été démontré que ces derniers ont des effets anticancéreux en raison de son mécanisme d'action qui semble impliquer l'induction de l'apoptose (**Hsu et al., 2024**), modifier les voies de signalisation (**Fateh et al., 2022**), et modulant l'inflammation (**Paço et al., 2022**). Une étude de **Grafakou et al. (2022)** a montré que trois lactones sesquiterpéniques (9, 8 et 4) isolés de *Centaurea papposa* ont des propriétés anticancéreuses contre les cellules HepG2, SK-MEL-28 et HeLa avec une  $CI_{50} < 10 \mu M$ .

La forte cytotoxicité observée chez cette plante, suggère qu'elle pourrait être un ingrédient principal dans le développement d'un médicament anticancéreux. D'autres études peuvent examiner les effets synergiques de ces extraits lorsqu'ils sont combinés. En outre, les recherches devraient se concentrer sur l'élucidation du composé bioactif spécifique responsable de cet effet et explorer le mécanisme d'action par une étude in vivo.

## 2.5. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits contre les cinq souches bactériennes est présentée dans le Tableau 15. Les résultats ont été analysés selon des critères qui considèrent qu'un halo d'inhibition d'un diamètre de 10 mm indique une activité antibactérienne (**Usman et al., 2009**). L'activité antibactérienne est classée selon les valeurs

de CMI comme suit : les CMI inférieures à 10 µg/mL sont considérées comme très fortes, celles comprises entre 11 et 100 µg/mL comme fortes, celles comprises entre 101 et 500 µg/mL comme modérées et celles situées entre 501 et 1000 µg/mL comme faibles. Enfin, les valeurs de CMI supérieures à 1000 µg/mL indiquent une inactivité (Vieira *et al.*, 2024).

Les résultats ont montré une variabilité significative. Les extraits étaient plus efficaces que les antibiotiques utilisés. Concernant *C. papposa*, les résultats ont indiqué que l'extrait hydrométhanolique était le plus efficace contre *Klebsiella pneumoniae*. En outre, il a eu la plus faible efficacité contre *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*, avec une zone d'inhibition de 12 et 14 mm, respectivement, et était inactif contre *Staphylococcus aureus*. En revanche, l'extrait chloroformique était le plus efficace contre le *Staphylococcus aureus*. La souche *Proteus mirabilis* était la plus sensible à l'extrait d'acétate d'éthyle, avec une zone d'inhibition égale à 22 mm. L'extrait chloroformique et l'extrait d'acétate d'éthyle ont tous deux montré une inhibition significative envers *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, avec une zone d'inhibition égale à 20 mm. Les valeurs de CMI pour chaque extrait sont résumées dans le Tableau 15. Selon les critères de CMI mentionnés ci-dessus, l'extrait de chloroforme et l'extrait d'acétate d'éthyle ont montré une activité forte ou modérée envers toutes les souches bactériennes, avec des CMI de 62.5 et 125 µg/mL. Cependant, l'extrait hydrométhanolique a montré une activité élevée ou modérée contre toutes les souches bactériennes, à l'exception de *Staphylococcus aureus* qui n'était pas actif. Nos résultats sont en accord avec les études sur des plantes du genre *Centaurea* (Naeim *et al.*, 2020; Yıldırım *et al.*, 2022).

**Tableau 15.** Activité antibactérienne des extraits.

		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>Hydrométhanol</b> ( <i>C. papposa</i> )	Zone d'inhibition (mm)	NA	18	20	12	14
	CMI (µg/mL)	NA	125	62.5	62.5	62.5
<b>Chloroforme</b> ( <i>C. papposa</i> )	Zone d'inhibition (mm)	20	20	15	20	15
	CMI (µg/mL)	62.5	62.5	62.5	62.5	125
<b>Acétate d'éthyle</b> ( <i>C. papposa</i> )	Zone d'inhibition (mm)	15	20	18	20	22
	CMI (µg/mL)	125	62.5	125	62.5	62.5

<b>Hydrométhanol</b> ( <i>M. communis</i> )	Zone d'inhibition (mm)	18	15	13	12	15
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	125	62.5	125	62.5	125
<b>Chloroforme</b> ( <i>M. communis</i> )	Zone d'inhibition (mm)	15	20	18	17	18
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	250	62.5	125	62.5	125
<b>Acétate d'éthyle</b> ( <i>M. communis</i> )	Zone d'inhibition (mm)	20	18	15	18	20
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	125	62.5	62.5	62.5	62.5
<b>GM10</b>	Zone d'inhibition (mm)	R	R	R	R	R
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	R	R	R	R
<b>AK10</b>	Zone d'inhibition (mm)	R	18	R	R	R
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	250	R	R	R
<b>AMC30</b>	Zone d'inhibition (mm)	R	R	R	R	R
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	R	R	R	R
<b>IPM10</b>	Zone d'inhibition (mm)	22	R	R	R	R
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	500	R	R	R	R

NA : non actif, MIC : la concentration inhibitrice minimale, R : Résistant, AMC30 : amoxicilline + acide clavulanique, AK10 : amikacine, GM10 : gentamicine 10, IPM10 : Imipenem.

Concernant l'espèce *M. communis* (Tableau 15), les résultats montrent que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne variable selon la souche bactérienne. En général, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré les zones d'inhibition les plus larges et les plus faibles CMI, notamment contre *Staphylococcus aureus* (20 mm, 125  $\mu\text{g/mL}$ ), *Klebsiella pneumoniae* (15 mm, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), *Escherichia coli* (18 mm, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ) et *Proteus mirabilis* (20 mm, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), suggérant une meilleure efficacité relative par rapport aux autres extraits. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, l'extrait chloroformique a présenté la plus grande zone d'inhibition (20 mm) avec une faible CMI (62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), indiquant une bonne sensibilité de cette souche à cet extrait. L'extrait hydrométhanol a montré une activité légèrement moindre contre cette souche (15 mm, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Nos résultats sont en accord

avec ceux de **Mansouri et al. (2001)**, mais différent de ceux de **Bouyahya et al. (2016)** qui ont trouvé que l'extrait d'acétate était inactif contre *E. coli* et *P. aeruginosa*, ce qui pourrait s'expliquer par des différences dans la méthode d'extraction ou encore l'origine géographique de la plante, qui influence la composition chimique des extraits (**Djahra et al., 2015**).

Nos résultats sont particulièrement encourageants, car ils suggèrent que les composés bioactifs présents dans ces deux plantes pourraient être une alternative viable aux antibiotiques traditionnels, et ceci est basé sur leur capacité à interférer avec des processus bactériens vitaux, qui peuvent perturber la synthèse ou le fonctionnement de composants essentiels des bactéries, en outre, les propriétés antibactériennes des composés bioactifs peuvent agir en contournant les mécanismes de résistance développés par les bactéries (**Abdallah et al., 2023**). Des études ont mentionné que les polyphénols peuvent empêcher la formation de biofilm, perturber la matrice extracellulaire, réduire l'expression des pompes d'efflux, bloquer le mécanisme de transport qui nécessite l'ATP et inactiver certaines enzymes bactériennes telles que l'ADN gyrase, et la topoisomérase I; réduisant ainsi la capacité des bactéries à se lier et à se multiplier (**Abdallah et al., 2023; Duan et al., 2014; Khameneh et al., 2015; Nassarawa et al., 2023**). Bien que les extraits de chloroforme de deux plantes contenant une faible concentration de polyphénols aient démontré une activité antibactérienne significative, leur efficacité élevée pourrait s'expliquer par la présence d'autres composés bioactifs (phénolique ou non phénolique) agissant en synergie, ce qui renforce l'activité globale (**Vaou et al., 2022**).

### 3. Docking moléculaire

#### 3.1. Étude par Docking moléculaire de l'activité inhibitrice des enzymes

Des études de Docking moléculaire ont été réalisées pour estimer les affinités de liaison et le mode d'interaction de six composés majeurs des extraits de *Myrtus communis* avec les sites actifs de l'AChE, de la BChE, de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase. La galantamine a été utilisée comme référence pour l'AChE et la BChE, tandis que l'acarbose a servi de référence pour l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase.

Comme le montre le Tableau 16, l'acide gallique présente l'énergie de liaison la plus favorable envers l' $\alpha$ -glucosidase, soulignant son potentiel significatif en tant qu'inhibiteur puissant de cette enzyme. À l'inverse, la catéchine affiche des énergies de liaison plus élevées pour l'AChE, la BChE et l' $\alpha$ -amylase, mettant en évidence son efficacité inhibitrice plus étendue sur plusieurs enzymes. Sur la base de ces résultats prometteurs, ces deux composés

ont été sélectionnés pour un examen plus approfondi de leurs mécanismes d'interaction au sein des sites actifs des enzymes respectives.

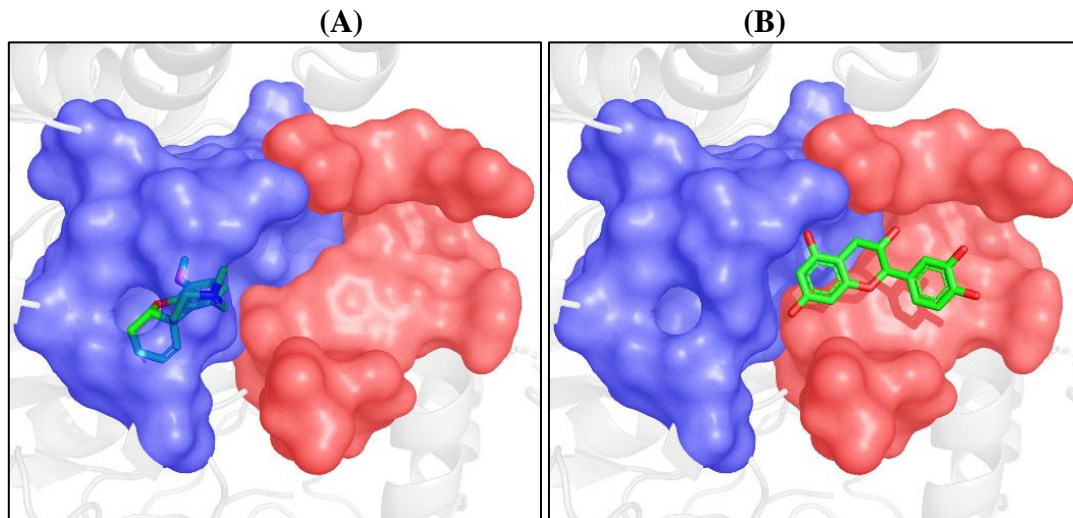
**Tableau 16.** Scores énergétiques de six composés majeurs dérivés de l'extrait de *Myrtus communis* avec les enzymes AChE, BChE,  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase.

Composants	Energie de liaison (KJ/mol)			
	AChE	BChE	$\alpha$ -amylase	$\alpha$ -glucosidase
Acide shikimique	-16.75	-16.05	-20.12	-25.45
Acide gallique	-22.97	-23.95	-20.83	-28.26
Epigallocatechine	-35.17	-32.83	-23.69	-20.91
Catéchine	-36.48	-35.58	-25.24	-23.43
Isoquercitrin	-28.59	-31.89	-16.09	-23.07
Lutéoline	-27.57	-30.48	-24.61	-23.90
Galantamine	-21.03	-23.66	NT	NT
Acarbose	NT	NT	-20.46	-13.30

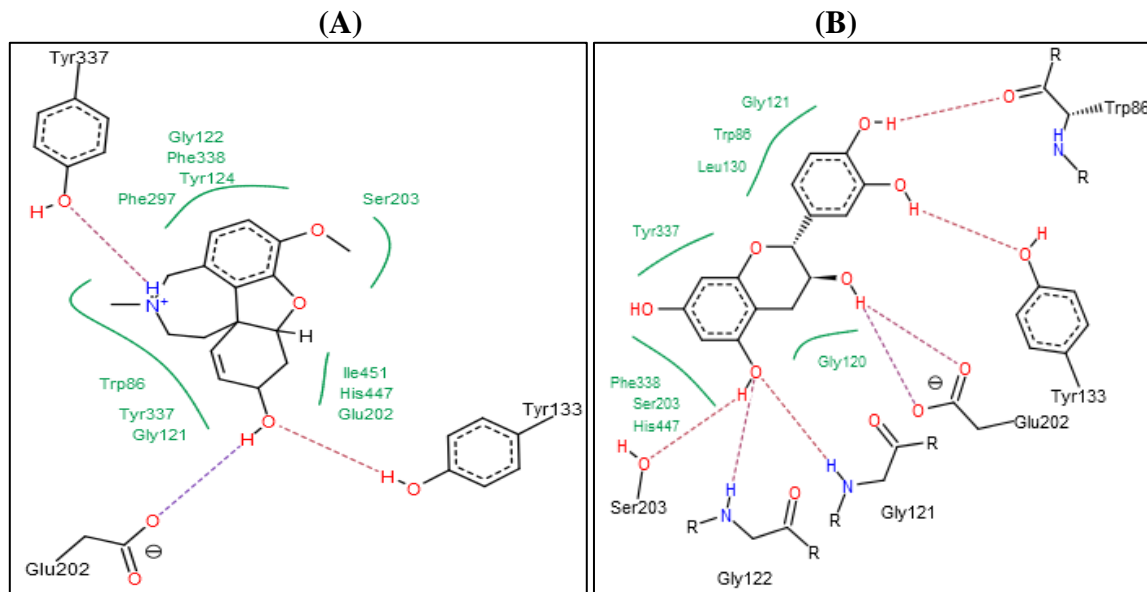
NT : non testé.

Comme le montre la Figure 20, l'analyse de docking moléculaire a révélé que la catéchine se lie à la fois au site anionique catalytique (CAS) et au site anionique périphérique (PAS) de l'AChE, contrairement à la galantamine, qui n'interagit qu'avec le CAS. Cette liaison double est significative, car les inhibiteurs de l'AChE les plus efficaces récemment développés ciblent simultanément le CAS et le PAS, de la même manière que la catéchine (Mokrani *et al.*, 2019). De plus, la catéchine forme sept liaisons hydrogène avec des résidus clés, y compris Trp86, Gly121, Gly112, Tyr133, Glu202 et Ser203. Notamment, Ser203 fait partie de la triade catalytique AChE, essentielle pour la fonction de l'enzyme (Cheung *et al.*, 2013). Le vaste réseau de liaisons hydrogène formé par la catéchine peut contribuer à son pouvoir inhibiteur supérieur contre l'AChE comparativement à la galantamine, qui ne crée que trois liaisons d'hydrogènes avec Tyr133, Glu202 et Tyr337 (Figure 21). Le complexe BChE-catéchine a montré une énergie de liaison de -35,58 kJ/mol et formé six liaisons hydrogène avec des résidus clés, y compris Trp82, Gly116, Gly117, Glu197 et Ser198, ce dernier faisant partie de la triade catalytique BChE (Wandhammer *et al.*, 2011). La différence de puissance inhibitrice de la BChE entre la catéchine et la galantamine peut être attribuée à la disparité du nombre d'hydrogènes qui se lient chaque forme de composé avec l'enzyme (Figure 22). En effet, la catéchine établit six liaisons hydrogène, alors que la galantamine ne forme que trois avec Trp82, Trp430 et Tyr440. De plus, la catéchine se lie à la

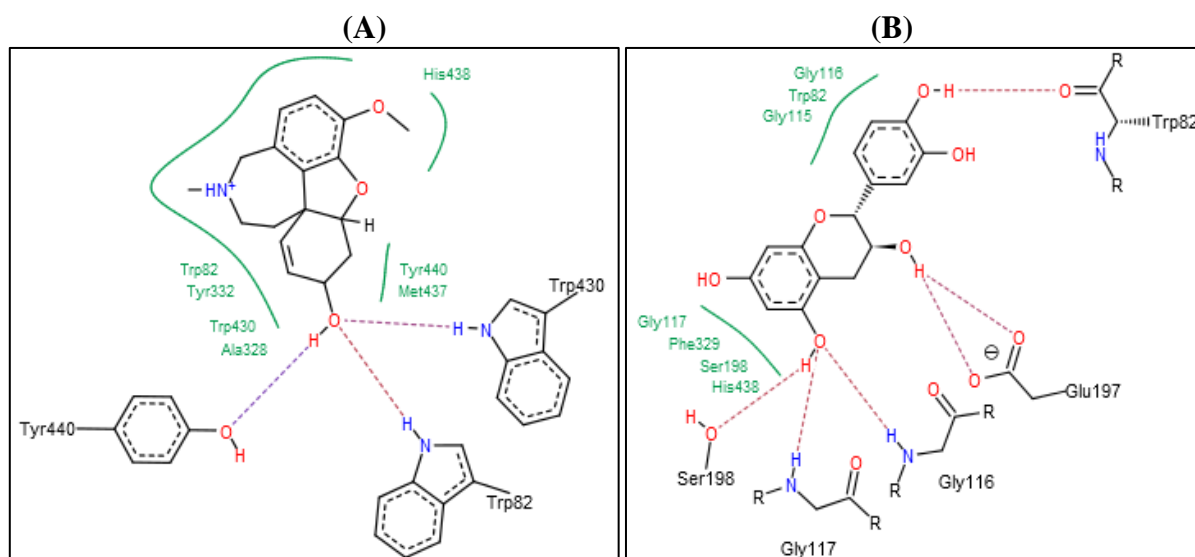
fois aux CAS et au PAS du site actif du BChE, tandis que la galantamine n'interagit qu'avec le CAS (Figure 23).



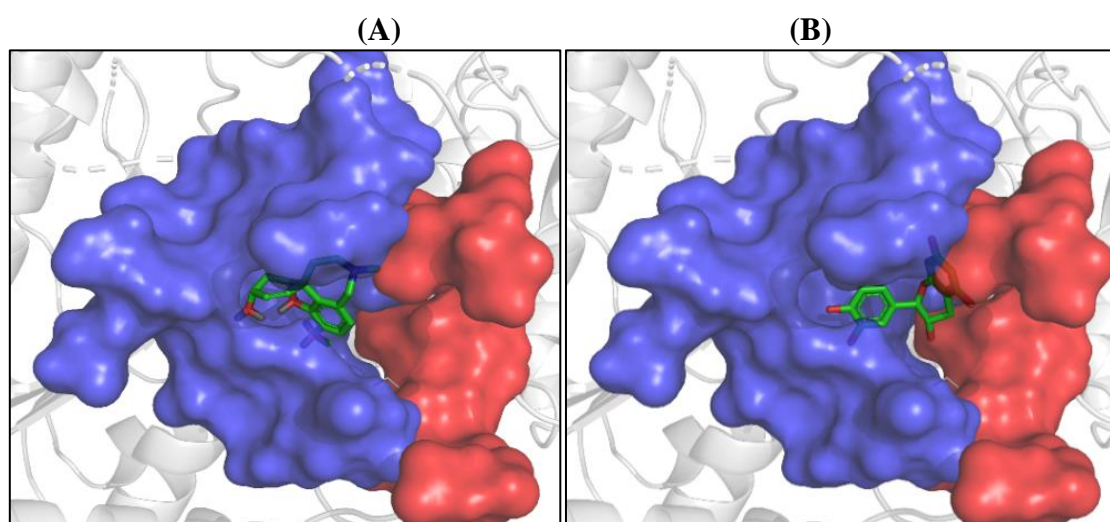
**Figure 20.** Positionnement de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l'AChE. La région CAS de la cavité est représentée en bleu et la PAS en rouge. Le code de couleur des atomes de ligand est le suivant : carbone en vert, oxygène en rouge et azote en bleu.



**Figure 21.** Mode de liaison de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l'AChE. Les lignes violettes montrent les liaisons hydrogène et la zone verte les interactions hydrophobes.



**Figure 22.** Mode de liaison de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de la BChE. Les lignes violettes cassées montrent les liaisons hydrogène et la zone verte les interactions hydrophobes.

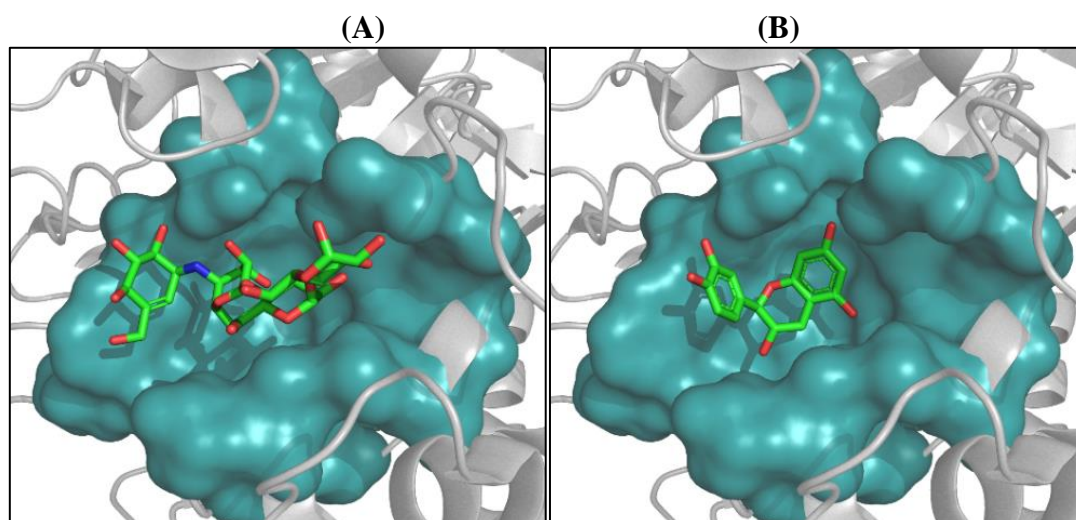


**Figure 23.** Positionnement de la galantamine (A) et de la catéchine (B) dans la poche active de la BChE. Le code de couleur des atomes du ligand est le suivant : carbone en vert, oxygène en rouge et azote en bleu.

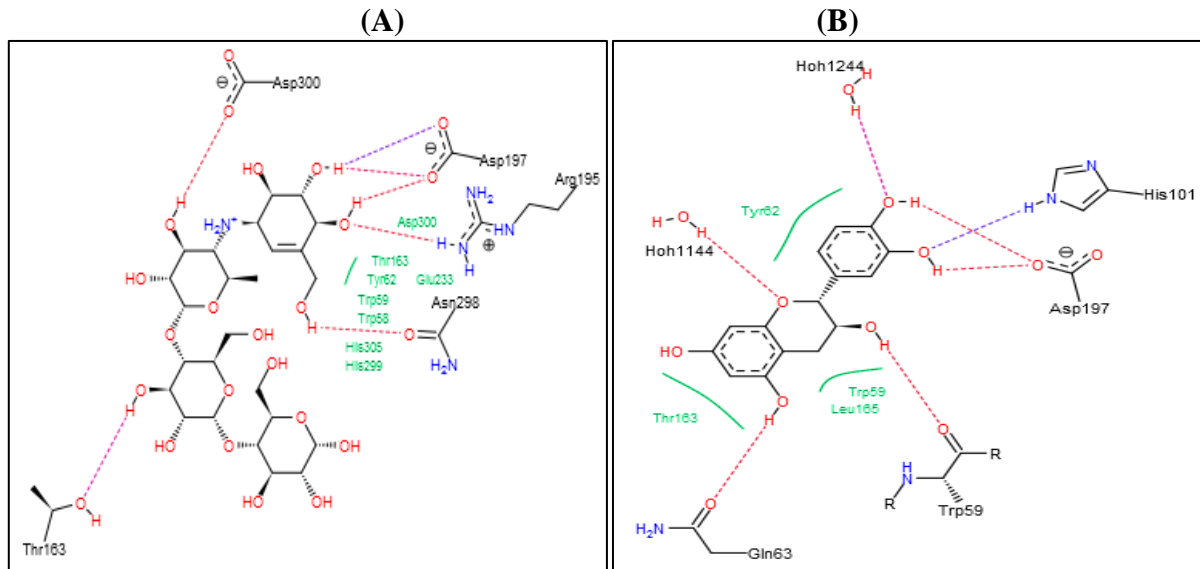
L'étude de docking moléculaire a montré que la catéchine est bien adaptée au site actif de l' $\alpha$ -amylase (Figure 24), formant sept liaisons hydrogène avec des résidus comme His101, Asp197, Trp59, Gln63 et deux molécules d'eau dans le site actif. Ce vaste réseau de liaisons hydrogène joue probablement un rôle clé dans le fort effet inhibiteur de la catéchine. En comparaison, bien que l'acarbose forme également sept liaisons hydrogènes, il interagit avec un ensemble différent de résidus (Asp300, Arg195, Asn298 et Thr163), mettant en évidence les stratégies inhibitrices distinctes employées par la catéchine et l'acarbose (Figure 25).

D'autre part, l'acide gallique a démontré une énergie de liaison significativement favorable de -28,26 kJ/mol, surpassant à l'acarbose, l'inhibiteur standard, qui a enregistré une énergie de liaison de -13,30 kJ/mol. Cette forte affinité pour le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase, couplée à sa capacité à former huit liaisons d'hydrogène avec des résidus clés tels que Asp203, Arg526 et Asp542, ainsi qu'avec deux molécules d'eau dans le site actif, met en évidence le potentiel de l'acide gallique comme composé prometteur pour le développement thérapeutique (Figures 26 et 27). Le pouvoir inhibiteur plus élevé de l'acide gallique par rapport à l'acarbose peut être dû à sa capacité à former plus de liaisons hydrogène avec l'enzyme.

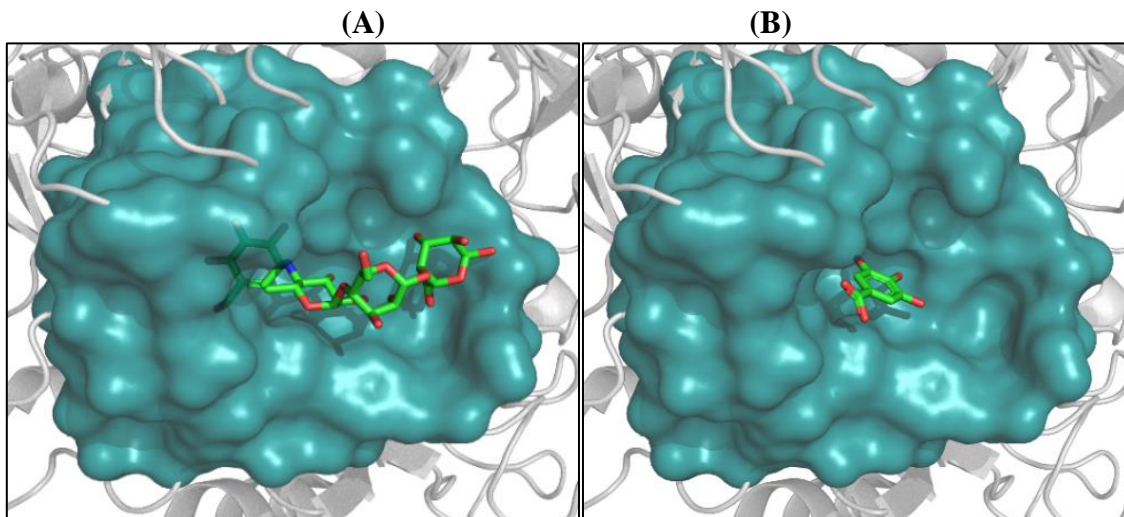
La présence de catéchine pourrait expliquer l'effet significatif de l'extrait d'acétate éthyle contre la cholinestérase et l' $\alpha$ -amylase. Même en l'absence de catéchine, les autres extraits de la plante *M. communis* ont néanmoins montré un effet notable, ce qui suggère que cette activité pourrait être attribuée à la synergie entre l'ensemble des composés.



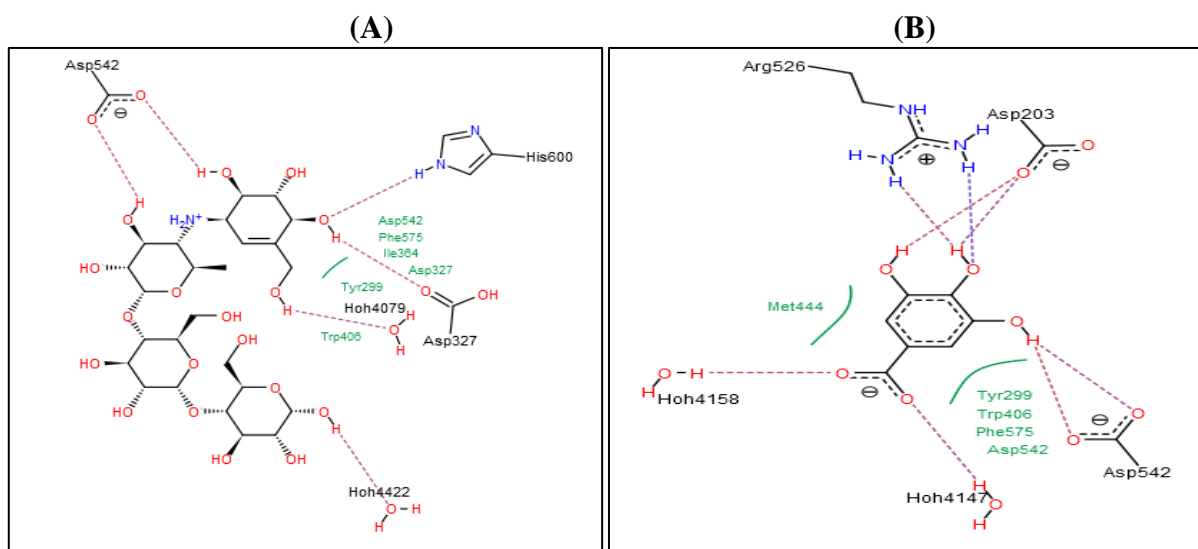
**Figure 24.** Positionnement de l'acarbose (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -amylase. La poche active est représentée en cyan alors que les atomes de ligand sont codés comme suit : carbone en vert, oxygène en rouge et azote en bleu.



**Figure 25.** Mode de liaison de l'acarbose (A) et de la catéchine (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -amylase. Les lignes violettes cassées montrent les liaisons hydrogène et la zone verte les interactions hydrophobes.



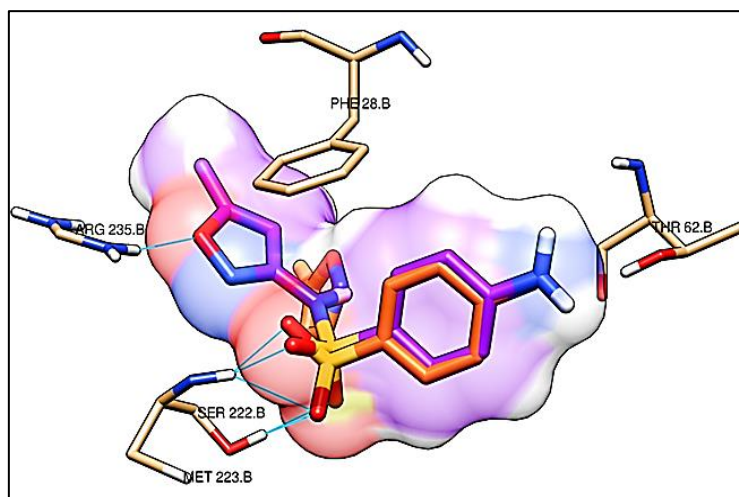
**Figure 26.** Positionnement de l'acarbose (A) et de l'acide gallique (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase. Le code de couleur est le suivant : carbone en vert, oxygène en rouge et azote en bleu.



**Figure 27.** Mode de liaison de l'acarbose (A) et de l'acide gallique (B) dans le site actif de l' $\alpha$ -glucosidase. Les lignes violettes cassées montrent les liaisons hydrogène et la zone verte les interactions hydrophobes.

### 3.2. Étude par Docking moléculaire de l'activité antibactérienne

La dihydroptéroate synthase (DHPS) est une enzyme clé dans la voie de synthèse de l'acide folique chez les bactéries, qui est essentielle pour la production d'acides aminés. DHPS contient deux poches de liaison distinctes : une qui se lie au pyrophosphate de dihydroptérine (DHPP) et une autre qui se lie à l'acide p-aminobenzoïque (pABA) (**Dekir et al., 2023**). Selon **Zhao et al. (2016)** les résidus d'acides aminés essentiels impliqués dans les interactions avec le groupe ptérine comprennent Asp96, Asn115, Asp185, Lys221 et Arg255, tandis que Phe190, Lys221 et Ser222 sont essentiels pour les interactions avec le groupe pABA. Les sulfonamides sont décrits comme des inhibiteurs de DHPS et sont reconnus comme bioisostères d'acides carboxyliques (**Dekir et al., 2023; Zhao et al., 2016**). Comme la plupart de nos molécules contiennent des groupes d'acide carboxylique, nous avons mené des études de Docking sur l'enzyme DHPS pour étudier le mode de liaison de nos dérivés. La méthode de fixation a été validée en remplaçant le ligand Co-cristallisé, ce qui a été effectué avec un RMSD inférieur à 1 Å (Figure 28).



**Figure 28.** Re-Docking du ligand Co-cristallisé, interactions de liaison hydrogène montrées en ligne cyan.

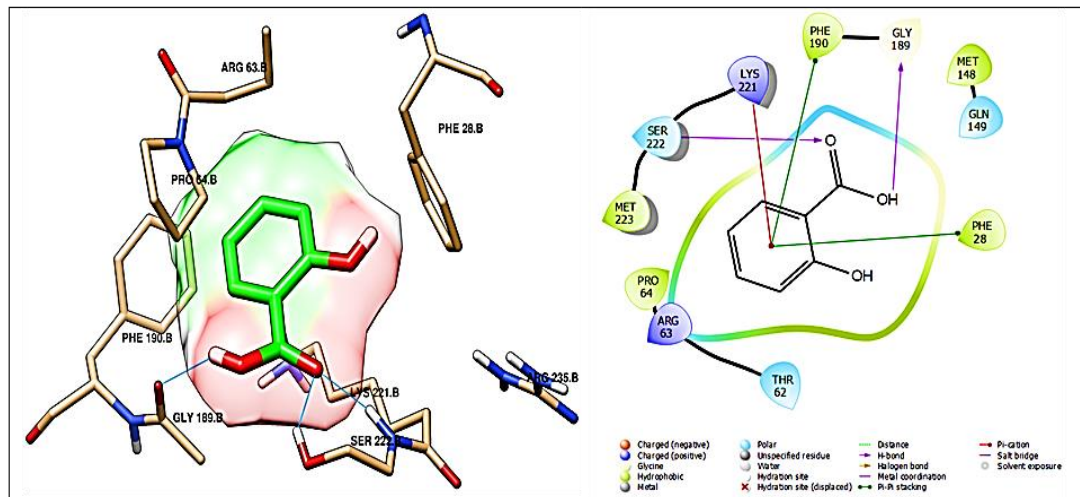
Après avoir effectué une analyse de l'ancrage moléculaire, nous avons observé que la plupart de nos molécules présentaient une bonne stabilité au sein du site actif du DHPS, les valeurs de leur score d'ancrage indiquées dans le Tableau 17. En particulier, les cinq molécules (acide salicylique, acide shikimique, acide gallique, acide protocatéchuique et acide vanillique) présentant les meilleurs scores de docking ont été analysées plus en détail afin d'élucider leurs modes d'interaction.

**Tableau 17.** Score de Docking des molécules et du ligand Co-cristallisé.

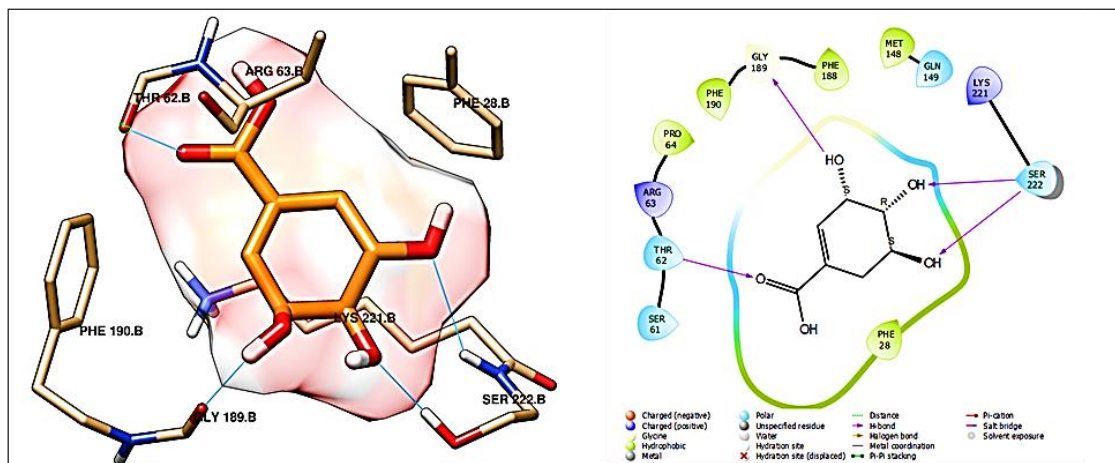
Composés	Score de Docking (kcal/mol)	Composés	Score de Docking (kcal/mol)
Acide salicylique	-6.901	Acide chlorogénique	-5.711
Acide shikimique	-6.699	Acide trans-férulique	-4.645
Acide gallique	-6.657	Lutéoline	-5.861
Acide protocatéchuique	-6.222	Kaempferol-3-glucoside	-5.333
Acide vanillique	-6.208	Acide caféique	-4.781
Ligand Co-cristallisé	-6.100	Catéchine	-4.233

L'acide salicylique est apparu comme le plus stable parmi les autres, démontrant une affinité remarquable, comme en témoigne sa valeur de score de docking (-6.901 kcal/mol) (Tableau 17). Cette stabilité est attribuée à ses interactions avec les résidus de site actif du DHPS. Au total, il a formé six interactions : trois liaisons d'hydrogènes et trois interactions hydrophobes (Figure 29). Une liaison hydrogène a été observée entre GLY189 et l'atome

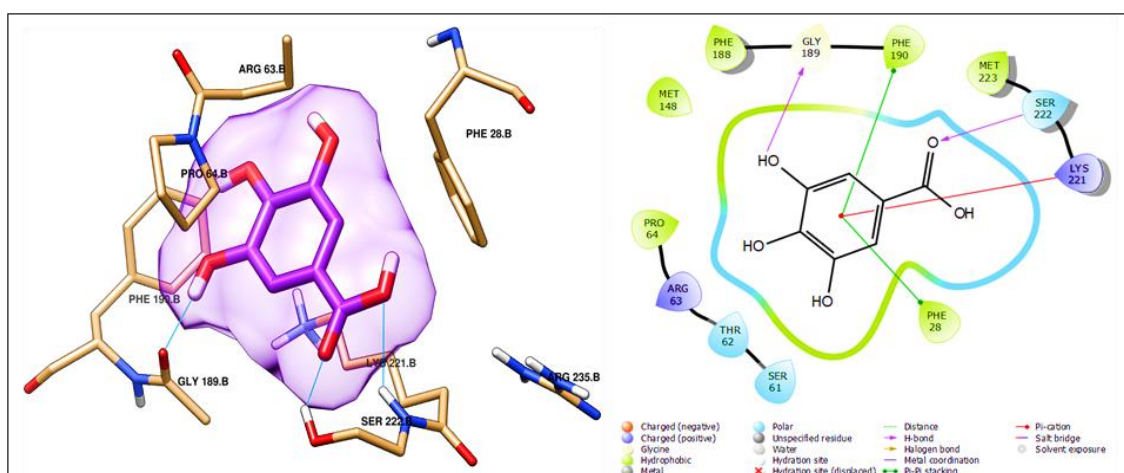
d'oxygène du groupe carbonyle, tandis que deux liaisons hydrogène supplémentaires ont été formées avec SER222 à travers les deux atomes d'oxygène du groupe acide carboxylique. Les interactions hydrophobes comprenaient deux interactions d'empilement  $\pi$ - $\pi$  entre l'anneau aromatique et les résidus PHE190 et PHE28, ainsi qu'une interaction entre le même anneau aromatique et le résidu LYS221. L'acide shikimique a également démontré une excellente stabilité dans la cavité du site actif de l'enzyme, avec une stabilité presque comparable à celle de l'acide salicylique. Sur la base de ses valeurs de score de Docking (-6,699 kcal/mol), ce composé a formé quatre liaisons hydrogènes fortes : trois interactions entre les groupes hydroxyle sur la structure cyclique et les résidus GLY189 et SER222, et une quatrième interaction entre l'atome d'oxygène du groupe carbonyle et le résidu THR62 (Figure 30). L'acide gallique a montré une forte affinité dans la cavité du site actif de l'enzyme, formant un total six interactions : trois liaisons d'hydrogène et trois interactions hydrophobes. Les liaisons hydrogène ont été observées avec les résidus GLY189 et SER222. Les interactions hydrophobes reflétaient celles du composé acide salicylique, impliquant des interactions  $\pi$ - $\pi$  empilées avec les résidus PHE190 et PHE28, ainsi qu'une interaction entre son anneau aromatique et le résidu LYS221 (Figure 31). L'acide protocatéchuique a démontré une stabilité notable au sein du site actif de l'enzyme, formant des interactions similaires à celles de l'acide gallique. Il a établi un total de cinq interactions : trois liaisons d'hydrogène et deux interactions hydrophobes. Les liaisons hydrogène ont été observées avec les résidus GLY189 et SER222 ; cependant, contrairement à l'acide gallique, SER222 a formé une seule liaison hydrogène au lieu de deux. Les interactions hydrophobes incluaient l'empilement de  $\pi$ - $\pi$  avec les résidus PHE190 et PHE28 (Figure 32). Le composé final, l'acide vanillique, a montré une stabilité modérée dans le site actif de l'enzyme. Il a formé deux liaisons hydrogène avec le résidu SER222 et une seule interaction d'empilement  $\pi$ - $\pi$  hydrophobe avec PHE28, contribuant à son affinité de liaison (Figure 33).



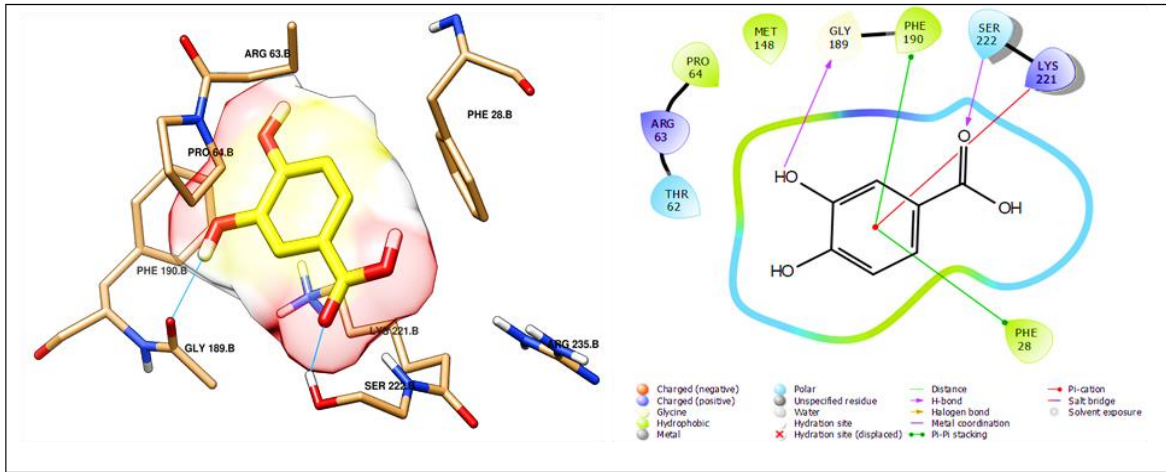
**Figure 29.** Positions 3D et 2D de l'acide salicylique (vert) dans la cavité DHPS ; les liaisons H ont été montrées sous forme de lignes cyan.



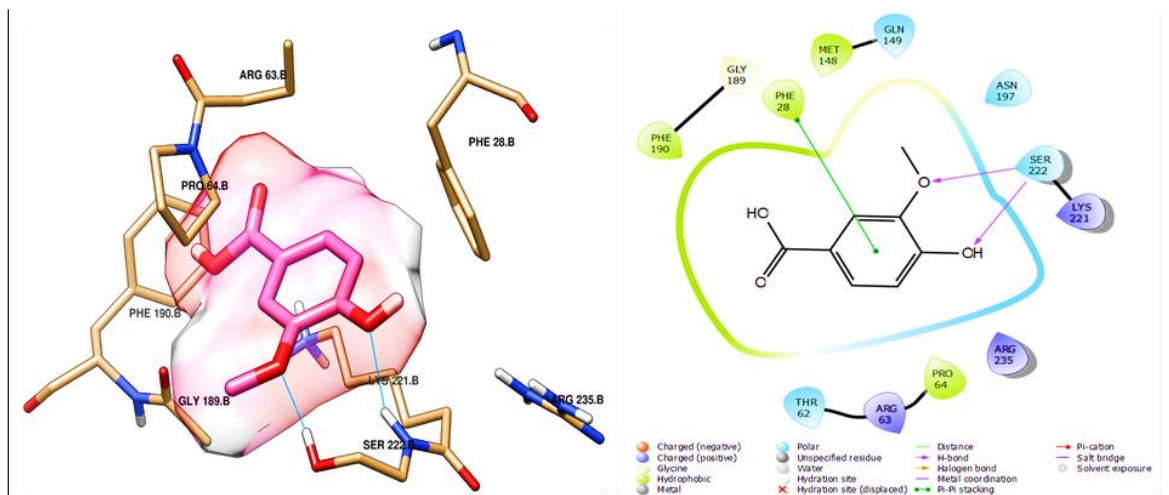
**Figure 30.** Positions 3D et 2D de l'acide shikimique (orange) dans la cavité DHPS ; les liaisons H ont été montrées sous forme de lignes cyan.



**Figure 31.** Positions 3D et 2D de l'acide gallique (violet) dans la cavité DHPS ; les liaisons H ont été montrées sous forme de lignes cyan.



**Figure 32.** Positions 3D et 2D de l'acide protocatéchique (jaune) dans la cavité DHPS ; les liaisons H ont été montrées sous forme de lignes cyanes.



**Figure 33.** Positions 3D et 2D de l'acide vanillique (rose) dans la cavité DHPS ; les liaisons H ont été montrées sous forme de lignes cyan.

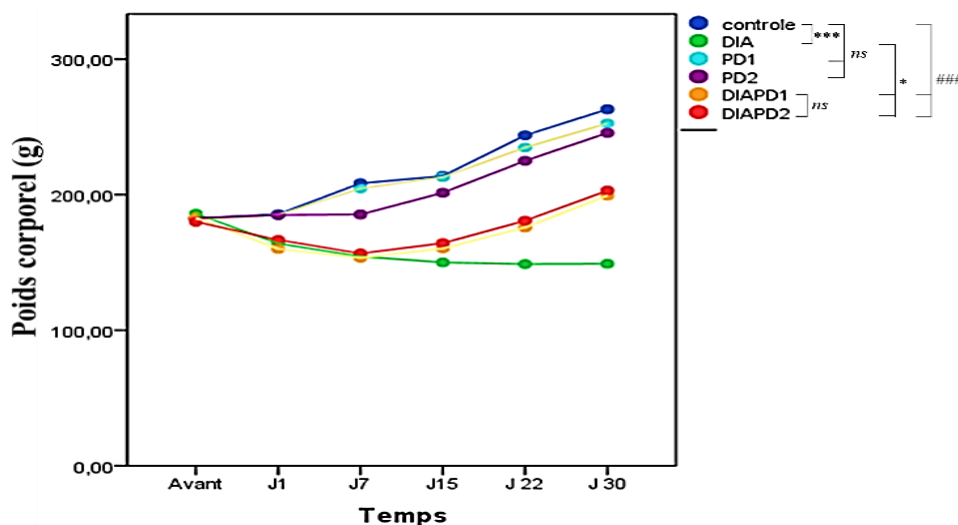
#### 4. Etude in Vivo de l'activité antidiabétique

L'alloxane est un produit chimique largement utilisé pour induire le diabète sucré chez les animaux de laboratoire, en particulier chez les rongeurs comme les rats et les souris. Mécaniquement, l'alloxane fonctionne comme un analogue du glucose, ressemblant étroitement au glucose dans la structure. Il est connu pour sa capacité à inhiber la sécrétion de l'insuline et détruire sélectivement les cellules bêta du pancréas et favorise la production des ERO, conduisant au diabète insulino-dépendant, similaire au diabète de type 1 chez l'homme (Sheriff *et al.*, 2020). L'alloxane inhibe également la glucokinase, une enzyme clé impliquée dans la détection du glucose et la sécrétion d'insuline par les cellules bêta (Lenzen, 2008).

##### 4.1. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique de la plant *Myrtus communis* sur les paramètres physiologiques

L'injection d'alloxane chez les rats a provoqué un diabète manifesté par divers symptômes physiologiques. Parmi ces effets, on observe une perte de poids corporel ainsi qu'une augmentation de la polyurie et de la polydipsie. Selon le résultat exprimé dans la Figure 34, il n'y avait pas de différence significative entre le groupe contrôle normal et les groupes recevant uniquement l'extrait de plante ( $p > 0.05$ ) ce qui suggère que l'extrait seul n'a pas d'effet sur le poids corporel dans un état normal. En revanche, une diminution significative du poids corporel a été observée chez les rats diabétiques par rapport au groupe contrôle normal ( $p < 0.001$ ) ce qui indique l'impact négatif du diabète sur la physiologie des rats. Dans le cas normal, l'insuline joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Elle est sécrétée par le pancréas en réponse à une augmentation du taux de glucose dans le sang et permet au glucose d'entrer dans les cellules pour être utilisé comme énergie ou stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles (Tadashi, 2023). L'alloxane altère la fonction de l'insuline en détruisant les cellules bêta du pancréas, ce qui entraîne une insuffisance insulinique et perturbe le métabolisme normal. Cette perturbation se traduit par une utilisation réduite du glucose, obligeant l'organisme à dépendre davantage des graisses (par l'activation accrue de lipase) et des protéines (par l'activation accrue de protéolyse) pour obtenir de l'énergie plutôt que du glucose, ce qui entraîne une perte de poids malgré un apport alimentaire accru (Ewenighi *et al.*, 2015; Lenzen, 2008). Le groupe diabétique traité avec l'extrait a montré une amélioration significative du poids corporel par rapport au groupe diabétique non traité ( $p < 0.05$ ) suggèrent que l'extrait de plante a un effet bénéfique sur la gestion du poids chez les rats

diabétiques (Ahmed *et al.*, 2010). Cela pourrait indiquer un potentiel pour cet extrait dans le traitement ou la prévention des complications liées au diabète.



**Figure 34.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de *M. communis* sur le poids corporel. Avant : avant l'injection de l'alloxane. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les courbes représentent les différences significatives et non significatives (ns) entre les différents groupes et le groupe diabétique à la fin du traitement (J30). \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns,  $p > 0.05$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

Les résultats présentés dans la Figure 35 démontrent une augmentation significative de la consommation alimentaire et hydrique chez les rats diabétiques comparativement au groupe contrôle sain ( $p < 0.001$ ). L'induction du diabète par l'alloxane induit une hyperglycémie, provoquant une diurèse osmotique accrue qui se traduit par une polyurie. Cette perte hydrique stimule une polydipsie afin de maintenir l'homéostasie hydrique. Par ailleurs, l'hyperphagie observée résulte d'un dysfonctionnement métabolique caractérisé par une incapacité à utiliser efficacement le glucose, conduisant à une augmentation de la prise alimentaire pour compenser le déficit énergétique (Friedman, 1977; Olenovych et Zukow, 2022).

Les groupes recevant uniquement l'extrait de plante ne diffèrent pas significativement du groupe contrôle normal ( $p > 0.05$ ), indiquant que l'extrait seul n'affecte pas de manière notable les paramètres étudiés. De plus, l'analyse des deux doses utilisées n'a révélé aucune différence significative entre elles. Cependant, le traitement des rats diabétiques avec l'extrait de plante, quel que soit la dose, a entraîné une amélioration significative par rapport au groupe diabétique non traité ( $p < 0.001$ ). Ces résultats suggèrent que les composés bioactifs

contenus dans l'extrait hydrométhanolique pourrait avoir un effet bénéfique sur l'équilibre hydrique et nutritionnel des rats diabétiques, en modulant les hormones ou les neurotransmetteurs impliqués dans la faim et la satiété, ce qui inhibe l'appétit précisément pendant des périodes de stress métabolique accru (Hannan *et al.*, 2023). Ils pourraient ainsi abaissant la glycémie, ce qui réduit la soif excessive.

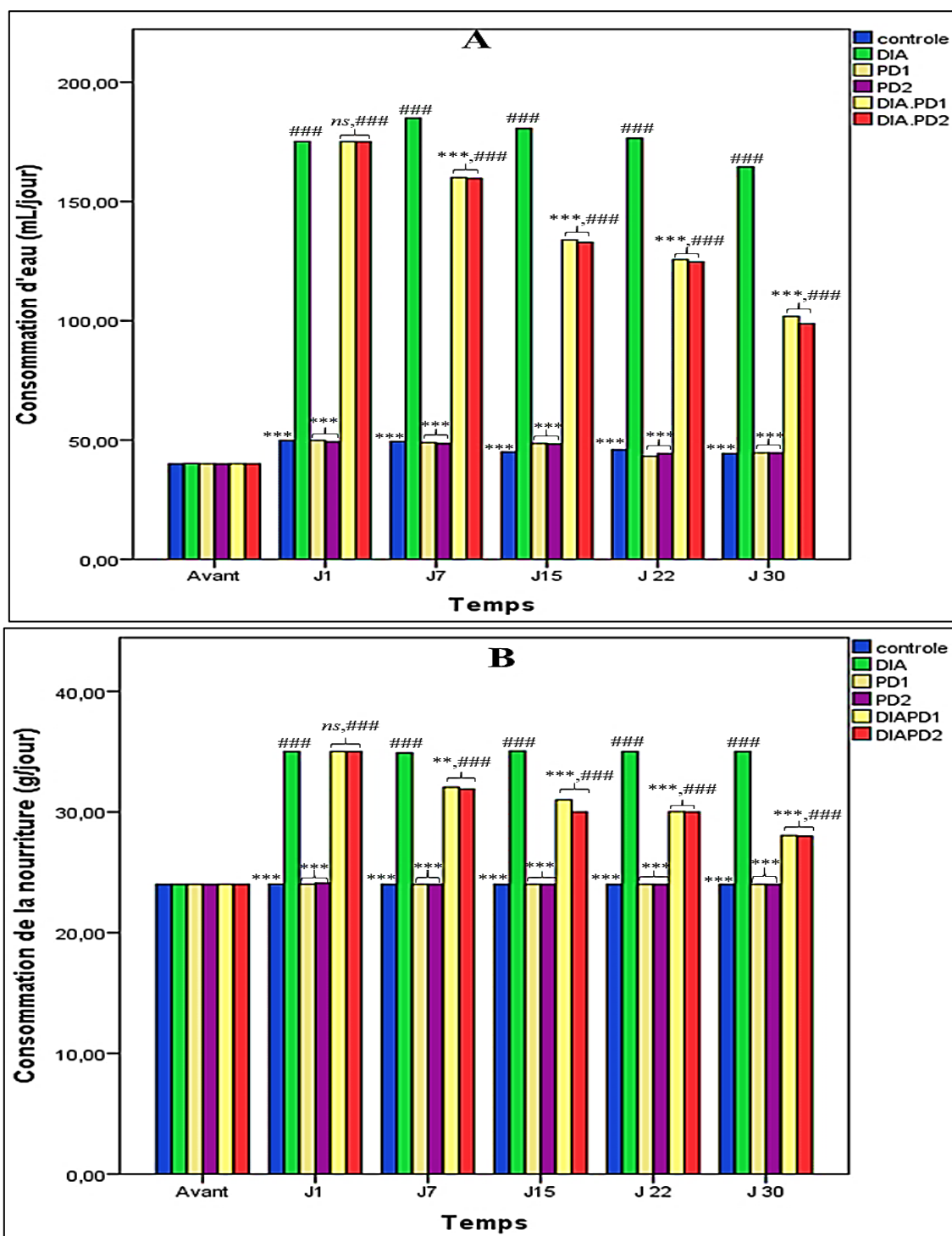


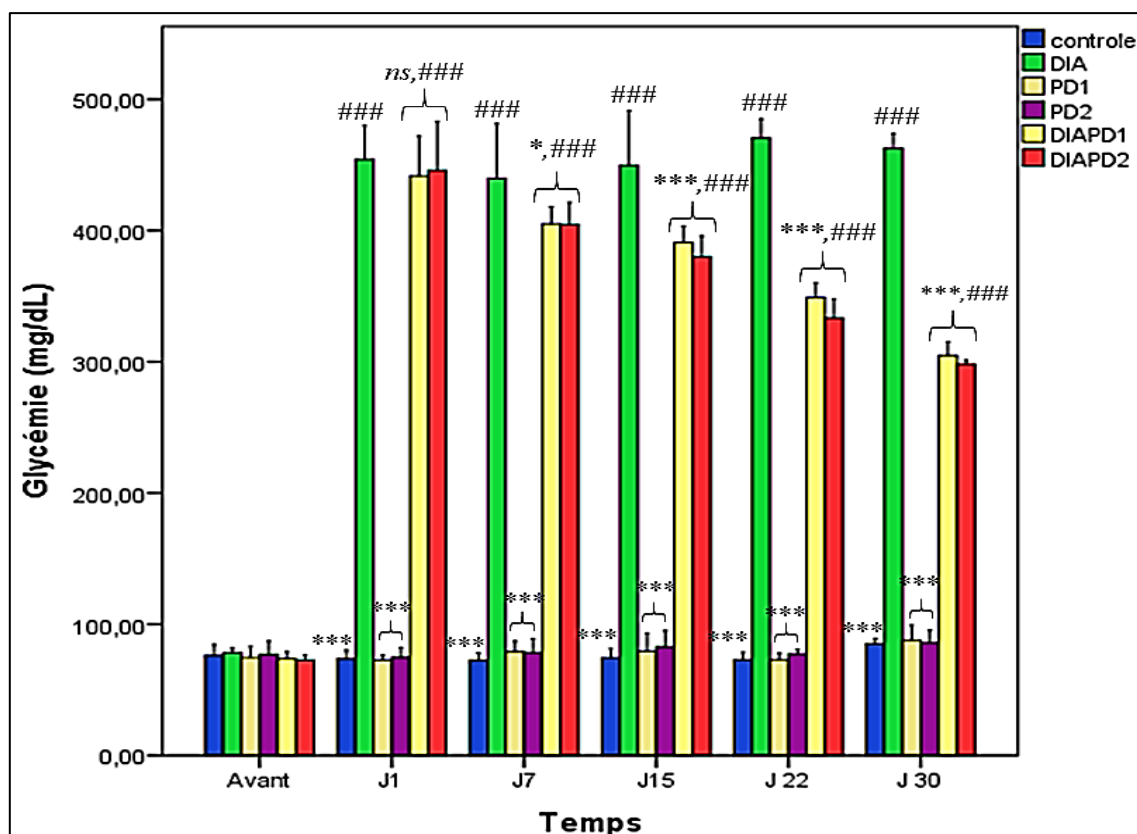
Figure 35. Influence de l'alloxane et l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur la consommation de l'eau (A) et de la nourriture (B). Avant : avant l'injection de

l'alloxane. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives et non significatives (ns) entre les différents groupes et le groupe diabétique. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns,  $p > 0.05$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

#### 4.2. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur les paramètres biochimiques

Selon la Figure 36, l'injection d'alloxane induit une hyperglycémie marquée. Dans le groupe diabétique traité par la plante, une réduction significative de la glycémie est observée dès une semaine de traitement ( $p < 0.05$ ), avec une diminution encore plus marquée à partir de 15 jours ( $p < 0.001$ ). En revanche, le groupe diabétique non traité ne présente aucune diminution notable de la glycémie. Ces résultats suggèrent que la plante exerce un effet hypoglycémiant, ce qui pourrait avoir des implications thérapeutiques potentielles. En outre, aucune différence significative n'a été observée entre les deux doses utilisées.

En effet, l'alloxane induit une hyperglycémie principalement par ses effets toxiques sur les cellules bêta du pancréas. En premier lieu, l'alloxane pénètre dans les cellules bêta via le transporteur de glucose GLUT2, similaire au glucose, en raison de sa ressemblance structurale avec celui-ci. Une fois à l'intérieur des cellules, l'alloxane subit un cycle oxydo-réduction, générant des espèces réactives de l'oxygène, notamment les radicaux superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles. Les radicaux libres produits dans ce processus sont hautement réactifs et causent des dommages importants aux composants cellulaires, y compris l'ADN, les protéines et les lipides. Ce stress oxydatif submerge les défenses antioxydantes des cellules bêta, conduisant à la mort cellulaire. La destruction des cellules bêta entraîne une diminution de la production d'insuline, conduisant à un déficit en insuline et à une hyperglycémie. De plus, l'alloxane inhibe la glucokinase (une enzyme clé impliquée dans la détection du glucose dans les cellules bêta) par l'oxydation du groupe thiol, entraîne la formation d'une liaison disulfure et donc l'inactivation de l'enzyme, nuisant encore davantage à la sécrétion d'insuline (Lal *et al.*, 2020; Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001).

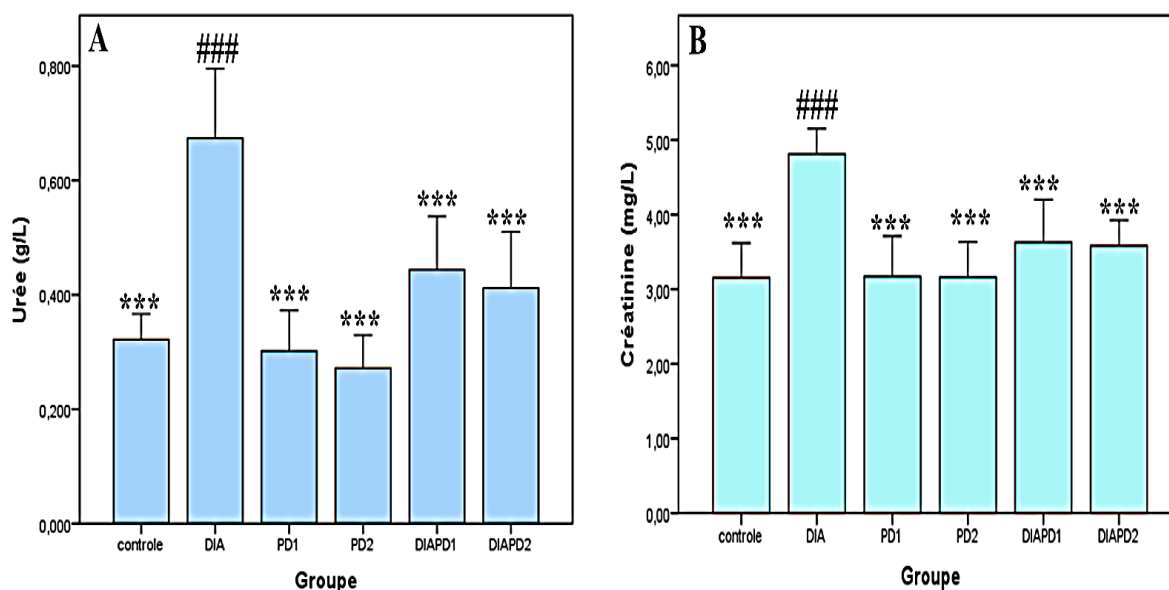


**Figure 36.** Influence de l’alloxane et de l’administration de l’extrait hydrométhanolique de la plante sur le taux de la glycémie. Avant : avant l’injection de l’alloxane. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l’extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l’extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l’extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l’extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique : *ns*,  $p > 0.05$  ; \*,  $p < 0.05$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

Cependant, lorsque on a commencé à traiter avec l’extrait hydrométhanolique, le niveau de glucose dans le sang commence à diminuer. Ce phénomène peut s’expliquer par plusieurs mécanismes, y compris la régénération des cellules bêta endommagées du pancréas, la stimulation de la sécrétion d’insuline par le pancréas, la protection contre le stress oxydatif causé par l’alloxane, la suppression des enzymes qui décomposent les glucides, l’augmentation de l’expression des enzymes régulatrices du glycogène dans le foie, l’augmentation de l’absorption du glucose par les muscles squelettiques et les adipocytes via l’expression des transporteurs de glucose comme GLUT4, et l’inhibition de l’absorption intestinale du glucose (Kimani *et al.*, 2023; Kooti *et al.*, 2016; Muchirah *et al.*, 2024; J. Yin *et al.*, 2024). Ces mécanismes mettent en évidence la façon dont l’extrait de plantes peut contribuer à la gestion du diabète en tirant parti des divers composés bioactifs produits par la plante. Les résultats de l’analyse par LC-ESI-MS/MS de l’extrait hydrométhanolique ont

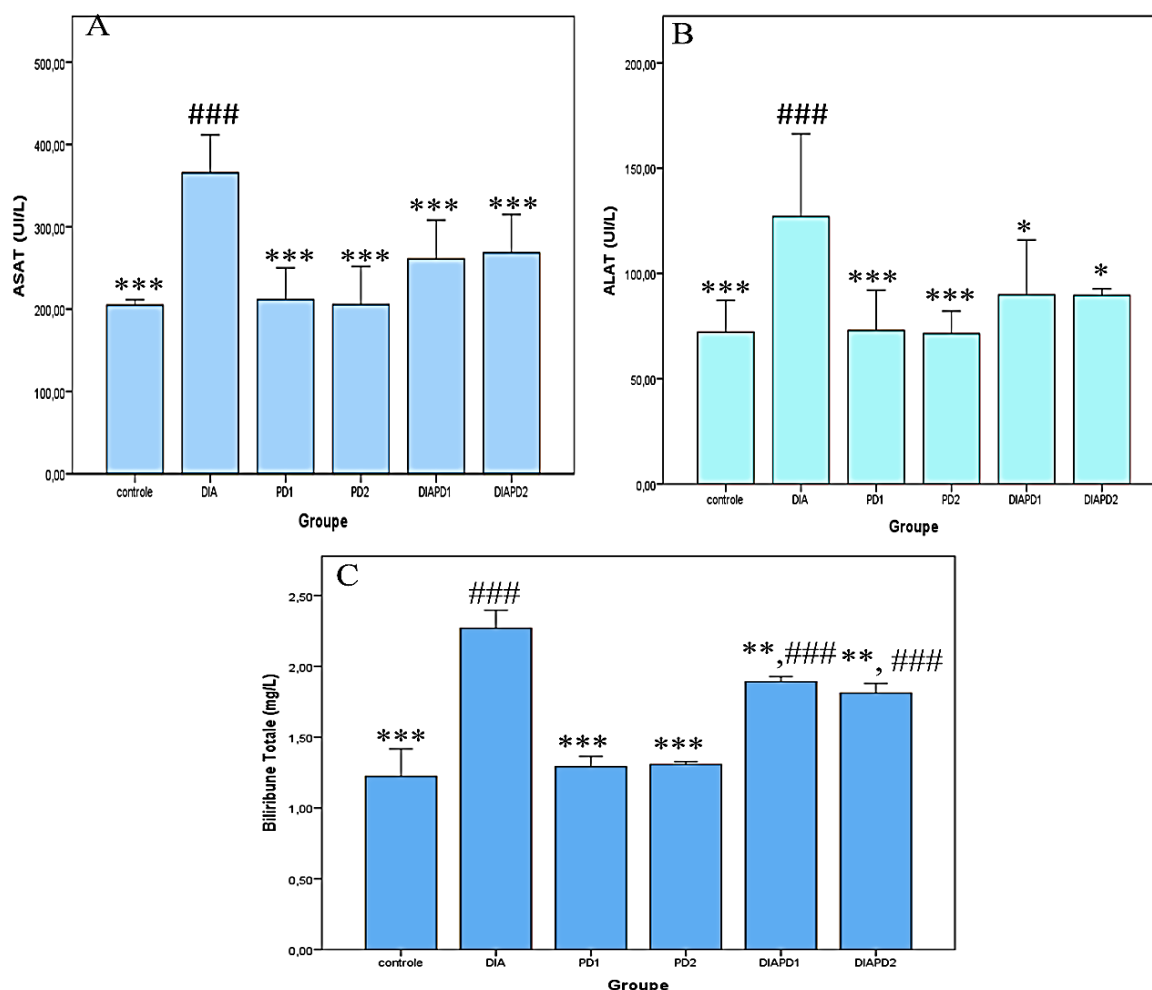
révélé la présence de trois composants majeurs, l'acide gallique, l'épigallocatechine, et la lutéoline, qui ont été préalablement décrits dans la littérature comme ayant des propriétés antidiabétiques. Des études réalisées par **Ibrahim et al. (2018)** et **Variya et al. (2020)** ont révélé que l'acide gallique améliore la sensibilité à l'insuline en activant la voie de signalisation d'Akt, qui joue un rôle crucial dans le métabolisme du glucose et l'action de l'insuline. En outre, il peut activer la voie d'AMPK une fois combiné avec d'autres composés comme l'épicatéchine, améliorant plus la sensibilité à l'insuline. Il augmente également l'expression des transporteurs de glucose comme le GLUT4, ce qui facilite l'absorption du glucose dans les cellules et améliore l'homéostasie du glucose. Une étude menée par **Man et al. (2022)** a démontré que l'épigallocatechine peut inhiber l' $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase, essentielles à la dégradation des glucides, ce qui ralentit leur digestion et réduit l'absorption du glucose (intestin vers le sang), entraînant une diminution des pics glycémiques postprandiaux. De plus, la lutéoline améliore la sensibilité à l'insuline en modulant les voies de signalisation telles que AKT/GSK 3 $\beta$  et AKT/PKB, qui facilitent l'absorption du glucose dans les cellules et en favorisant la translocation des transporteurs de glucose (GLUT4) (**Sangeetha, 2019**).

D'après les résultats présentés dans la Figure 37, les rats diabétiques présentent une augmentation significative des taux d'urée et de créatinine par rapport aux témoins sains ( $p < 0.001$ ). Chez les diabétiques, le catabolisme des protéines augmente, ce qui conduit à des taux élevés d'ammoniac, qui est converti en urée dans le foie. Par conséquent, les taux d'urée dans le sang augmentent. De plus, l'alloxane favorise le stress oxydatif et l'inflammation, provoquant souvent des lésions rénales en endommageant les barrières de filtration glomérulaires ainsi que les tubules rénaux. Ces altérations affecte la capacité du rein à excréter les déchets tels que l'urée et la créatinine (**Abdel Aziz et al., 2017; Chidinma et al., 2024; Pourghasem et al., 2014**). D'après la Figure 38, les rats diabétiques présentent une augmentation significative des taux de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) par rapport aux témoins sains ( $p < 0.001$ ). Une élévation de ces enzymes hépatiques indique une lésion hépatocellulaire (**Gamde et al., 2023**). De plus, Les rats diabétiques présentent une augmentation significative des taux de bilirubine totale par rapport aux rats sains ( $p < 0.001$ ). Cette élévation traduit par une altération de la fonction hépatique, qui ne parvient plus à métaboliser correctement la bilirubine (**Aslam, 2022**).



**Figure 37.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d'urée (A), et de créatinine (B) dans le sang. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives et non significatives (ns) entre les différents groupes et le groupe diabétique. \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ####,  $p < 0.001$ .

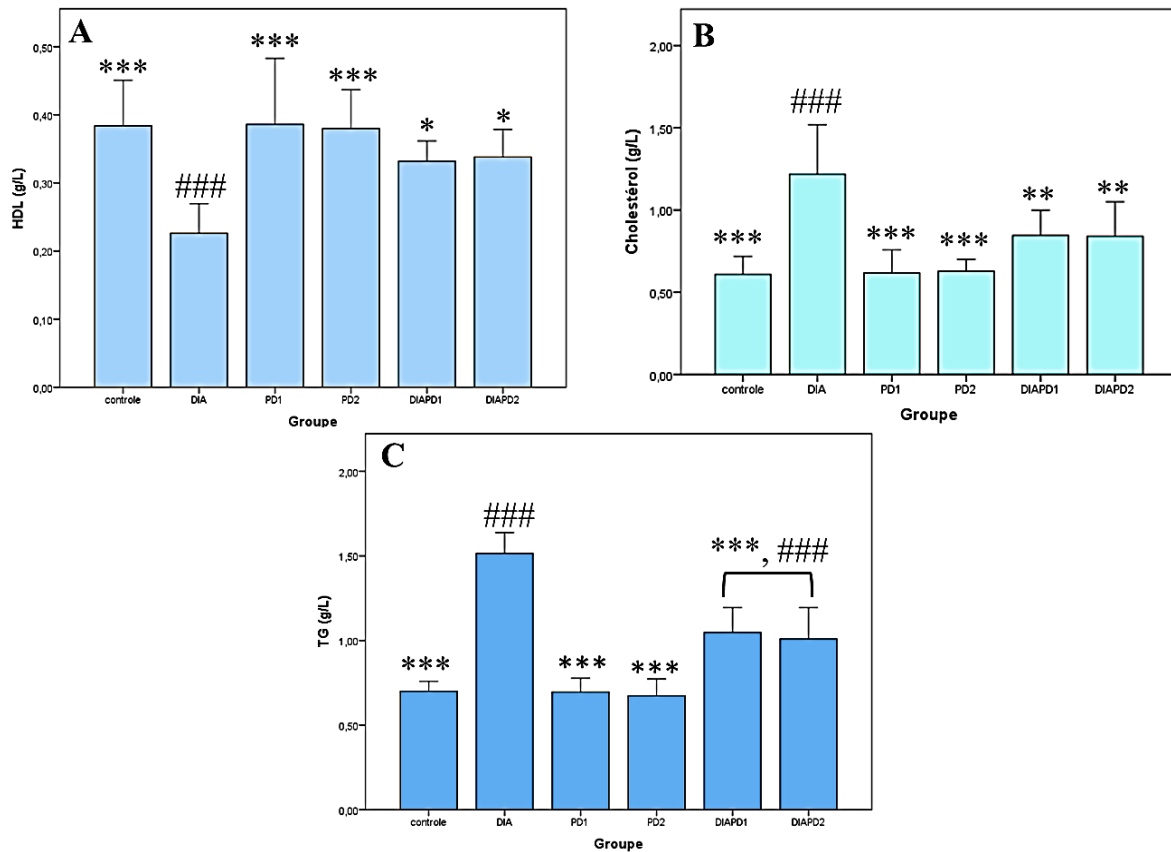
Le traitement par l'extrait de plante induit une réduction significative des niveaux de créatinine ( $p < 0.001$ ), d'urée ( $p < 0.001$ ), de bilirubine totale ( $p < 0.01$ ), d'ASAT ( $p < 0.001$ ) et d'ALAT ( $p < 0.05$ ) chez les rats diabétiques traités, probablement grâce à ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, ainsi qu'aux activités néphroprotectrices et hépatoprotectrices de l'extrait, contribuant ainsi à la restauration des fonctions rénale et hépatique (Ighodaro *et al.*, 2017).



**Figure 38.** Influence de l’alloxane et de l’administration de l’extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d’ASAT (A), d’ALAT (B), et de bilirubine (C) dans le sang. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l’extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l’extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l’extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l’extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique. \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

La Figure 39 montre que les rats diabétiques ont des taux plus élevés de cholestérol et de triglycérides (TG), mais un taux de lipoprotéines de haute densité (HDL) réduit. Le mécanisme par lequel l’alloxane augmente les taux de triglycérides (TG) et de cholestérol repose principalement sur son effet destructeur des cellules bêta pancréatiques, induisant une carence en insuline. L’absence de l’insuline va activer la lipolyse dans le tissu adipeux, ce qui entraîne la dégradation des TG en acide gras libre (AG) et glycérol qui sont libérés dans le sang (Rajaei *et al.*, 2015). Les AG sont captés par le foie où ils sont transformés en cholestérol et en TG et emballés avec des apolipoprotéines en lipoprotéines de très basse densité (VLDL), qui sont sécrétées par la suite dans la circulation sanguine, ce qui augmente

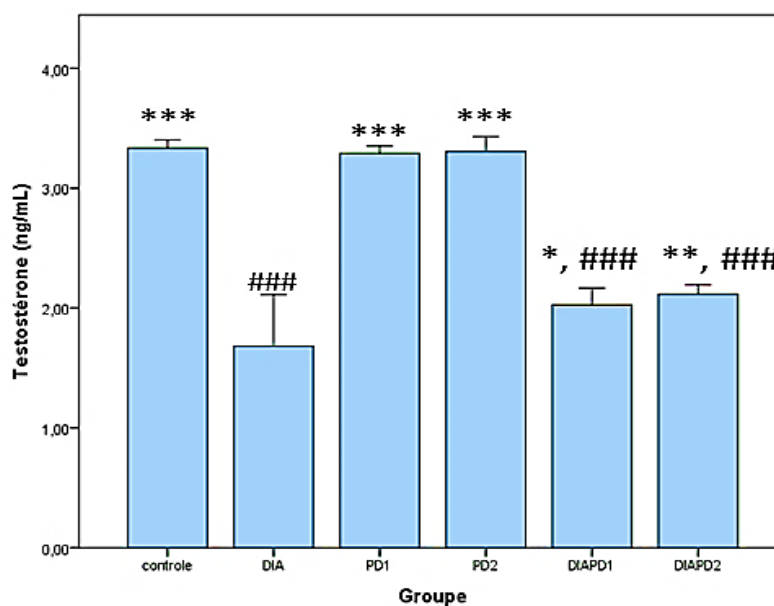
les taux sériques de triglycérides et de cholestérol (**Banda et al., 2018**). La diminution du cholestérol HDL est associée à une altération du métabolisme des lipides chez les diabétiques, en partie due à l'augmentation du catabolisme et à la diminution de la production de HDL (**P. Yin et al., 2018**). La diminution des triglycérides ( $p < 0.001$ ) et du taux de cholestérol ( $p < 0.01$ ) ainsi que l'augmentation du HDL ( $p < 0.05$ ) observée chez les rats diabétiques traités avec l'extrait de plante peuvent être expliquées par plusieurs mécanismes liés aux composés bioactifs présents dans l'extrait. Des études ont démontré que les plantes stimulent la régénération des cellules bêta du pancréas, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline. L'amélioration des taux d'insuline aide à normaliser le métabolisme des lipides en inhibant la lipolyse dans les tissus adipeux et en favorisant l'absorption et le stockage des lipides, réduisant ainsi la TG circulante et le cholestérol (**Gobinath et al., 2022**). L'acide gallique, et la lutéoline, deux composants majeurs identifiés dans l'extrait hydrométhanolique, sont reconnus pour leur capacité à améliorer le profil lipidique. Concernant la lutéoline, elle a démontré une capacité à diminuer les triglycérides dans le sérum et le foie en inhibant les gènes liés à la synthèse lipidique tels que SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) et la synthase d'acide gras (fatty acid synthase, FAS) (**Zang et al., 2016**). La lutéoline stimule l'expression du récepteur hépatique X alpha ( $LXR\alpha$ ), une protéine nucléaire régulant les gènes liés au cholestérol. Une fois activé,  $LXR\alpha$  induit l'expression de deux transporteurs clés, ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1) qui facilite l'export du cholestérol vers les HDL, et SRB1 (Scavenger receptor class B member 1) qui permet la capture des HDL par le foie pour éliminer l'excès de cholestérol (**Park et al., 2020**). Cette régulation entraîne une diminution du cholestérol sanguin. D'autres études rapportent les effets de l'acide gallique sur les profils lipidiques. Une étude menée par **Chao et al. (2021)** indique que l'acide gallique améliore l'homéostasie lipidique en favorisant la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la cétogenèse, ce qui aide à réduire l'accumulation de lipides dans le foie. Il a été démontré que l'acide gallique inhibe l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé dans le métabolisme des acides gras, et active l'AMPK ce qui réduit la synthèse des acides gras et augmente leur dégradation (**X.-L. Zhao et al., 2025**).



**Figure 39.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur les taux d'HDL (A), de cholestérol (B) et de TG (C) dans le sang. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

#### 4.3. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur le taux de testostérone

Selon les données présentées dans la Figure 40, on observe une diminution significative du taux de testostérone chez les rats diabétiques par rapport aux rats non diabétiques ( $p < 0.001$ ), ce qui s'explique par le fait que l'alloxane provoque le diabète, entraînant une déficience en insuline et une hyperglycémie. Cet état affecte la fonction des cellules de Leydig, qui sont responsables de la production de testostérone dans les testicules (**Parlar Köprülü et al., 2023**).



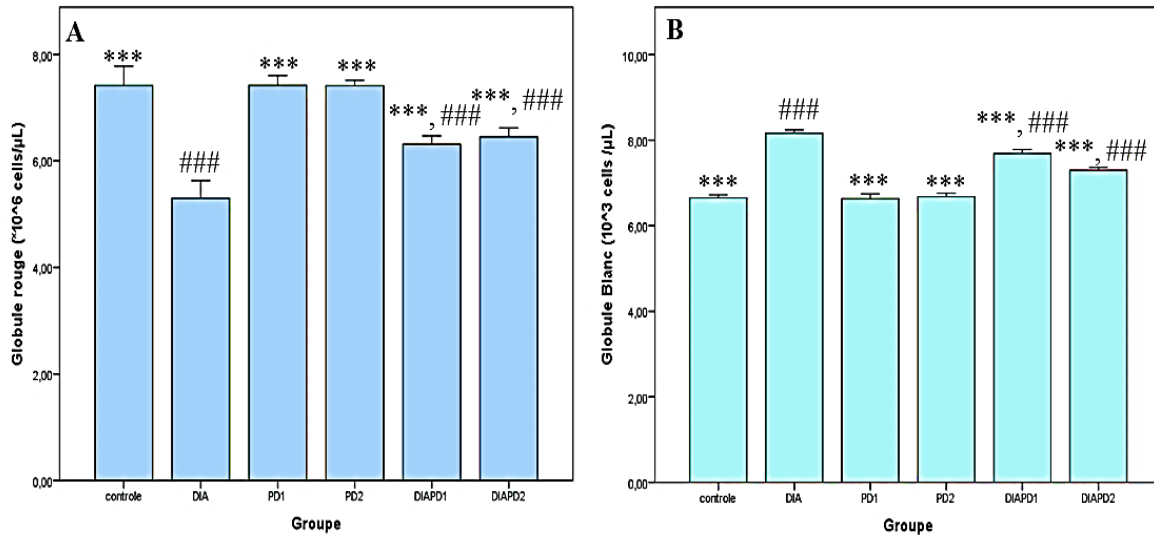
**Figure 40.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le taux de testostérone. Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique : \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

Dans le groupe diabétique traité avec l'extrait hydrométhanolique, nous avons observé une augmentation significative du taux de testostérone par rapport aux rats diabétiques non traités, avec des résultats statistiquement significatifs pour la dose 1 ( $p < 0.05$ ) et la dose 2 ( $p < 0.01$ ). Ces résultats suggèrent que l'extrait pourrait augmenter les niveaux de testostérone en stimulant les voies de production hormonale et en réduisant les dommages oxydatifs des cellules productrices de testostérone (Ebrahim et Pool, 2010; Smith *et al.*, 2020).

#### 4.4. Effet de l'alloxane et de l'extrait hydrométhanolique sur le nombre de globules rouges et de globules blancs

Selon la Figure 41, le nombre de globules rouges était significativement plus faible chez les rats diabétiques comparativement au groupe témoin sain ( $p < 0.001$ ), probablement en raison d'un stress oxydatif induit par l'alloxane causant une hémolyse, glycation de l'hémoglobine et une altération de l'érythropoïèse (Muhammad *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2023). Cependant, l'administration d'un extrait de plante a amélioré cette réduction, avec des rats diabétiques traités présentant des taux de globules rouges comparables à ceux des témoins non diabétiques. Cette récupération est attribuée aux propriétés antioxydantes de l'extrait, qui

atténuent les dommages causés par les espèces d'oxygène réactives aux globules rouges, ainsi qu'à son potentiel pour stimuler l'érythropoïèse et réduire la glycation de l'hémoglobine induite par l'hyperglycémie, améliorant ainsi la production des globules rouges (Dallatu *et al.*, 2010; Mbaka et Ogonnia, 2017).



**Figure 41.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le nombre de globules rouges (A) et de globules blancs (B). Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique : \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  \*\*\*,  $p < 0.001$ , et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ .

Comme illustré dans la Figure 41, les rats diabétiques induits par l'alloxane présentaient un nombre significativement accru de globules blancs (GB) par rapport au groupe témoin sain ( $p < 0.001$ ), suggérant une réponse inflammatoire et un stress oxydatif accru (Hashim *et al.*, 2023). Le traitement par l'extrait hydrométhanolique a entraîné une diminution progressive du nombre de globules blancs, approchant les niveaux observés chez les témoins sains, probablement en raison des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de l'extrait (Essiet *et al.*, 2020).

#### 4.5. Comparaison des poids des différents organes (rein, foie, et pancréas) entre les groupes

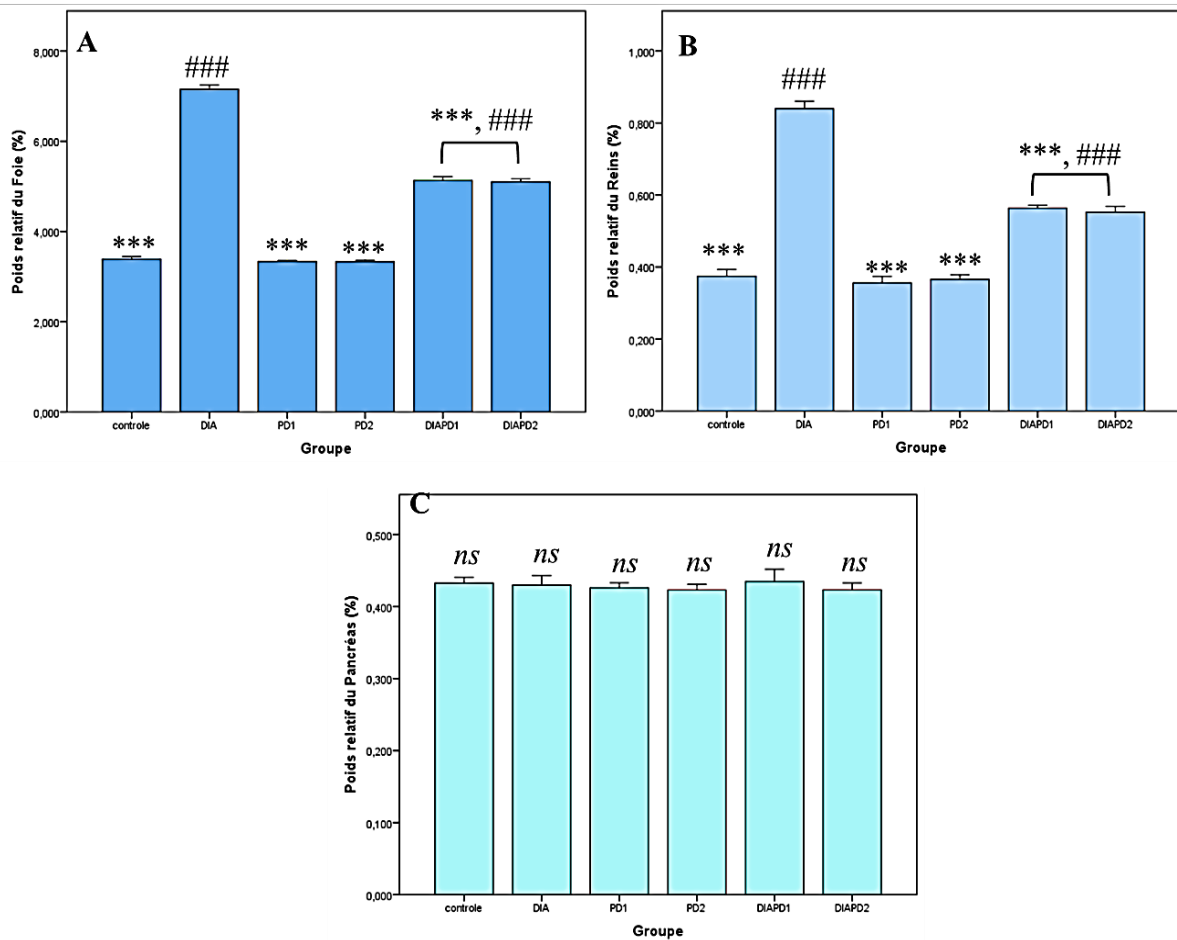
Selon le Tableau 18, L'administration d'alloxane a induit une augmentation significative du poids hépatique et rénal chez les rats diabétiques comparativement au groupe témoin ( $p < 0.001$ ), tandis que le poids du pancréas a été significativement réduit dans le groupe diabétique. Selon la Figure 42, le groupe diabétique non traité présente un poids relatif du foie significativement plus élevé que celui du groupe diabétique traité ( $p < 0.01$ ) ainsi que du groupe témoin normal ( $p < 0.001$ ). De même, le poids relatif des reins est significativement augmenté dans le groupe diabétique non traité par rapport au groupe diabétique traité et au groupe témoin ( $p < 0.001$ ). En ce qui concerne le poids relatif du pancréas, il reste quasiment identique entre les groupes, sans différence statistiquement significative ( $p > 0.05$ ), ce qui est cohérent avec certaines études (Zafar et Naeem-ul-Hassan Naqvi, 2010; Zidi, 2010).

En revanche, le traitement par l'extrait de plante a permis de normaliser ces paramètres, avec une réduction du poids hépatique et rénal ainsi qu'une restauration partielle du poids pancréatique, rapprochant ces valeurs de celles observées chez les rats non diabétiques.

**Tableau 18.** Poids des reins, du foie et du pancréas au moment du sacrifice.

Organe (g)	Contrôle	Dia	PD1	PD2	DiaPD1	DiaPD2
<b>Foie</b>	7.89±0.02 <sup>a</sup>	12.02±0.05 <sup>c</sup>	7.84±0.01 <sup>a</sup>	7.86±0.02 <sup>a</sup>	10.02±0.04 <sup>b</sup>	9.27±0.2 <sup>b</sup>
<b>Reins</b>	0.86±0.02 <sup>a</sup>	1.41±0.01 <sup>c</sup>	0.83±0.02 <sup>a</sup>	0.86±0.01 <sup>a</sup>	1.1±0.00 <sup>b</sup>	1.08±0.01 <sup>b</sup>
<b>Pancréas</b>	0.99±0.1 <sup>a</sup>	0.72±0.01 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	0.99±0.01 <sup>a</sup>	0.85±0.01 <sup>b</sup>	0.83±0.01 <sup>b</sup>

Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les valeurs dans la même ligne avec des exposants variés (a, b, et c) sont significativement différentes ( $p < 0.001$ ).



**Figure 42.** Influence de l'alloxane et de l'administration de l'extrait hydrométhanolique de la plante sur le poids relatif du foie (A), du rein (B), et du pancréas (C). Dia : groupe diabétique, PD1 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 200 mg/kg, PD2 : groupe normale traité par l'extrait à la dose de 400 mg/kg, DiaPD1 : groupe diabétique + 200 mg/kg de l'extrait, DiaPD2 : groupe diabétique + 400 mg/kg de l'extrait. Les histogrammes représentent des différences significatives entre les différents groupes et le groupe diabétique : \*\*\*,  $p < 0.001$ , ns,  $p > 0.05$  et entre les groupes diabétiques (traités et non traité) et le contrôle : ###,  $p < 0.001$ , ns,  $p > 0.05$ .

L'administration d'alloxane induit une réduction significative du poids pancréatique chez les rats diabétiques. Cette atrophie pancréatique s'explique principalement par la réduction de la taille et du nombre des îlots. Cette perte de cellules  $\beta$  entraîne une diminution de la production d'insuline et provoque des changements morphologiques tels que la vacuolisation cytoplasmique, la dégradation de la membrane cellulaire, l'œdème et l'infiltration inflammatoire, qui contribuent tous à endommager le tissu pancréatique et à l'atrophie. En plus, l'augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique exacerbe davantage les lésions tissulaires, ce qui conduit collectivement à une réduction marquée du poids pancréatique chez les rats traités à l'alloxane (Klyueva *et al.*, 2020; Shah et Khan,

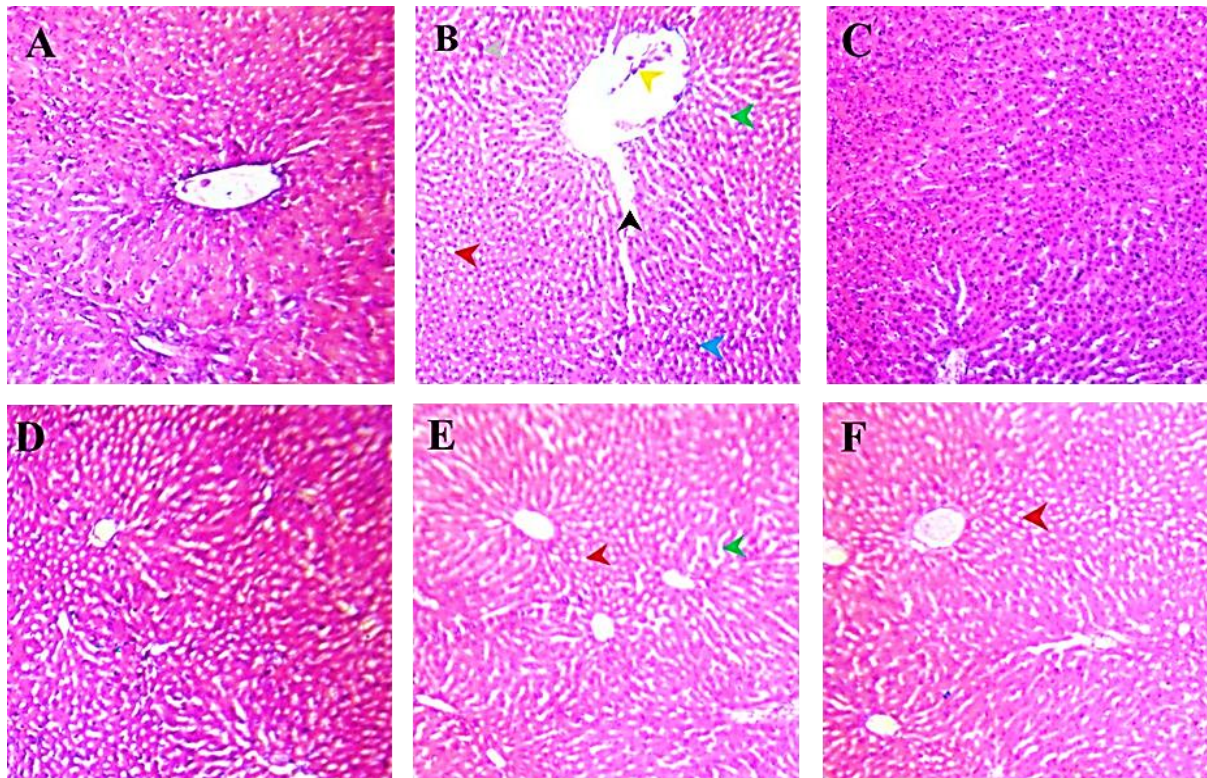
**2014**). La manque d'insuline causée par l'alloxane perturbe aussi le métabolisme des graisses, ce qui libère trop d'acides gras libres dans les tissus adipeux. Le foie absorbe ces acides gras, mais il n'arrive pas à les transformer en triglycérides pour les exporter correctement à cause d'un problème dans la signalisation de l'insuline, ce qui entraîne une accumulation des graisse (stéatose) accompagnée d'une inflammation, et d'une fibrose, ce qui provoque une hypertrophie hépatique (**Eluehike et Onoagbe, 2018; Lucchesi et al., 2015**). Concernant les reins, l'hyperglycémie induit une hyperfiltration glomérulaire associée à une vasodilatation, une augmentation de la circulation sanguine et de la pression capillaire. Cette augmentation du flux sanguin est la cause principale des troubles structurels et fonctionnels ; De plus, la formation en excès de produits de glycation avancée (AGEs) altère les tissus rénale, ce qui entraîne une augmentation du poids rénal (**Pourghasem et al., 2014**).

L'utilisation de l'extrait hydrométhanolique permet de ramener presque à la normale le poids du pancréas, du foie et des reins. Les composés bioactifs contenus dans cet extrait stimulent la sécrétion d'insuline, abaissent significativement la glycémie et corrigent les altérations du métabolisme lipidique et glucidique. Par ailleurs, en réduisant le stress oxydatif et l'inflammation, cet extrait contribue à prévenir l'hypertrophie des organes (**Tehseen et al., 2022; C. Zhang et al., 2017**).

#### **4.6. Etude histologique**

##### **A. Foie**

La structure histologique normale du foie a été observée dans le groupe contrôle sain (Figure 43-A) ainsi que dans les groupes de rats sains traités avec 200 mg/kg d'extrait de plante (Figure 43-C) et 400 mg/kg d'extrait de plante (Figure 43-D). Le groupe de rats diabétiques non traités a révélé plusieurs lésions microscopiques, notamment une légère destruction du parenchyme hépatique, une dilatation des veines centrales accompagnée de congestion, ainsi que des altérations des cordons hépatiques et une dilatation sinusoidale. De plus, certains hépatocytes présentaient une dégénérescence hydropique et une nécrose, avec la présence de cellules binucléées (Figure 43-B). Les rats diabétiques traités avec 200 mg/kg d'extrait de plante ont montré une légère dilatation des sinusoides et une rare présence de dégénérescence hydropique des hépatocytes (Figure 43-E). Chez les rats diabétiques traités avec 400 mg/kg d'extrait de plante, seule une dégénérescence hydropique rare des hépatocytes a été observée (Figure 43-F).

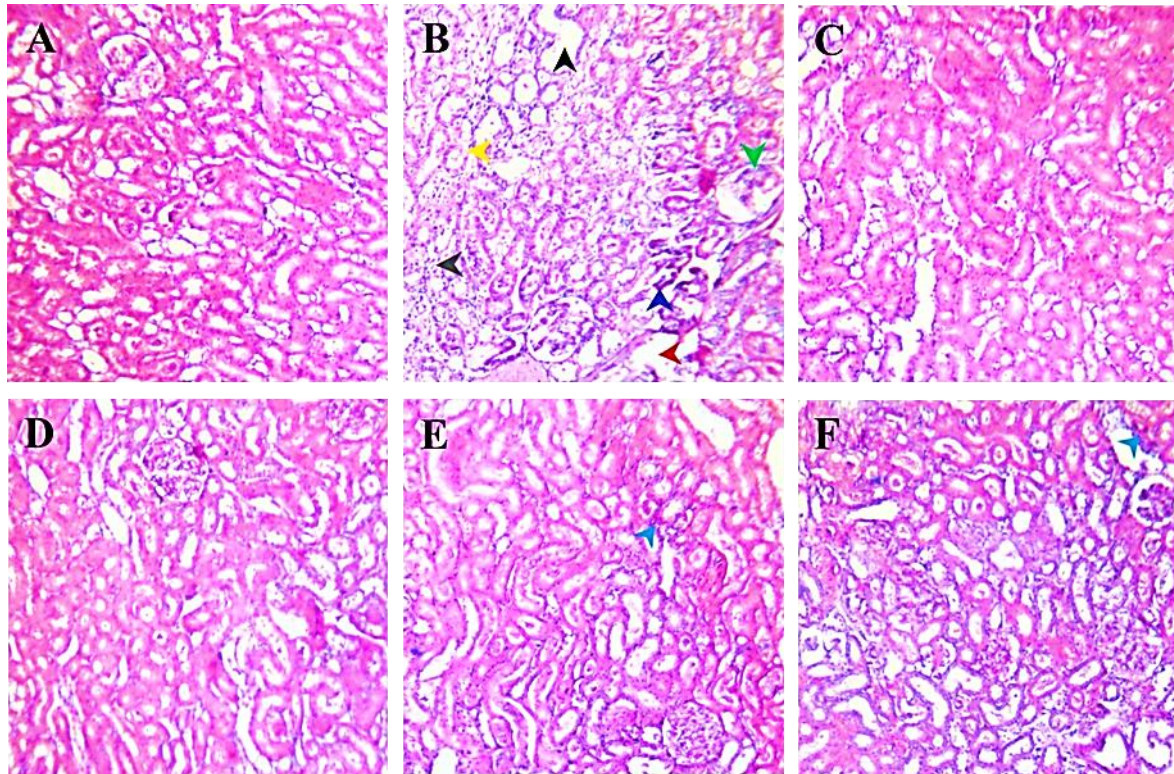


**Figure 43.** Photomicrographies du tissu hépatique : **A**, Groupe témoin sain (Contrôle) montrant un parenchyme hépatique et des hépatocytes normaux. **B**, Groupe diabétique non traité (DIA) révélant une légère destruction du parenchyme hépatique (tête de flèche noire), une dilatation des veines centrales avec congestion (tête de flèche jaune), une dilatation sinusoïdale (tête de flèche verte), une dégénérescence hydropique des hépatocytes (tête de flèche rouge), une nécrose des hépatocytes (tête de flèche grise) et des hépatocytes binucléés (tête de flèche bleue). **C**, Groupe sain traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (PD1) montrant un parenchyme hépatique et des hépatocytes normaux. **D**, Groupe sain traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (PD2) montrant un parenchyme hépatique et des hépatocytes normaux. **E**, Groupe diabétique traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD1) montrant une légère dilatation des sinusoides (tête de flèche verte) et une dégénérescence hydropique des hépatocytes (tête de flèche rouge). **F**, Groupe diabétique traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD2) montrant une dégénérescence hydropique des hépatocytes (tête de flèche rouge), (Coloration H&E, grossissement 10×).

## B. Rein

Le groupe témoin sain (Contrôle) ainsi que les groupes sains traités avec 200 mg/kg et 400 mg/kg d'extrait de plante présentaient une morphologie rénale normale (Figure 44-**A**, **C**, **D**). En revanche, dans les reins des rats du groupe diabétique non traité (DIA), plusieurs lésions microscopiques ont été observées, notamment une destruction du parenchyme rénal, une dilatation des tubules, ainsi qu'une dégénérescence hydropique et une nécrose des cellules épithéliales tubulaires. De plus, des infiltrats inflammatoires focaux ont été notés dans les zones inter-tubulaires, accompagnés d'un rétrécissement des glomérules et d'une adhérence de

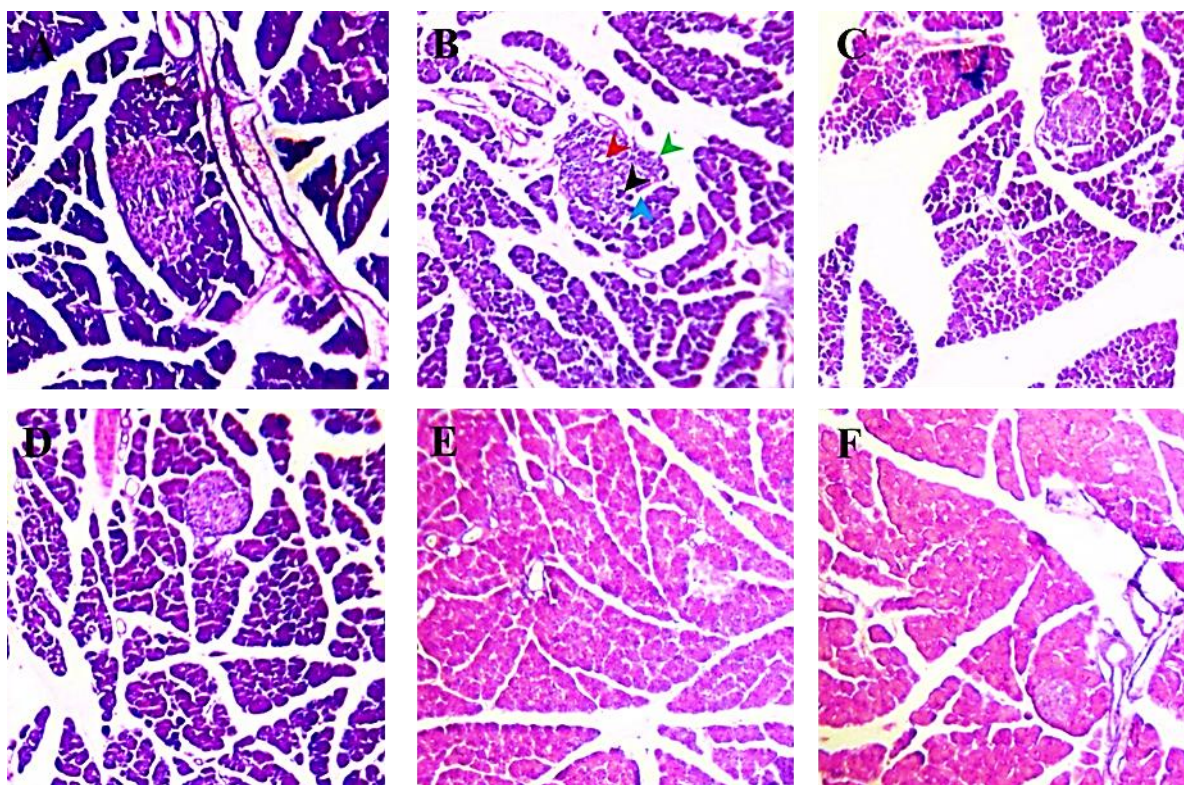
l'épithélium à la membrane basale glomérulaire (Figure 44-**B**). L'histopathologie associée au diabète était significativement atténuée dans les reins des rats du groupe diabétique traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD1), bien qu'une légère nécrose ait été observée dans les cellules épithéliales tubulaires (Figure 44-**E**). Une légère nécrose a également été détectée dans certaines cellules épithéliales tubulaires chez les rats du groupe diabétique traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD2). Toutefois, les tubules et les glomérules de ces derniers étaient généralement comparables à ceux du groupe témoin (Figure 44-**F**).



**Figure 44.** Photomicrographies du tissu rénal : **A**, Groupe témoin sain (Contrôle) montrant des tubules et un tissu interstitiel normaux. **B**, Groupe diabétique non traité (DIA) révélant une destruction du parenchyme rénal (tête de flèche rouge), une dilatation des tubules (tête de flèche noire), une dégénérescence hydropique des cellules épithéliales tubulaires (tête de flèche jaune), une nécrose des cellules épithéliales tubulaires (tête de flèche bleue), une infiltration de cellules inflammatoires (tête de flèche grise) et un rétrécissement des glomérules avec adhérence de l'épithélium à la membrane basale glomérulaire (tête de flèche verte). **C**, Groupe sain traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (PD1) montrant des tubules et un tissu interstitiel normaux. **D**, Groupe sain traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (PD2) présentant des tubules et un tissu interstitiel normaux. **E**, Groupe diabétique traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD1) montrant une légère nécrose des cellules épithéliales tubulaires (tête de flèche bleue). **F**, Groupe diabétique traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD2) révélant également une légère nécrose des cellules épithéliales tubulaires (tête de flèche bleue). (Coloration H&E, grossissement 10×).

### C. Pancréas

La structure histologique du pancréas était normale dans le groupe contrôle sain (Figure 45-A) ainsi que dans les groupes de rats sains traités avec 200 mg/kg et 400 mg/kg d'extrait de plante (Figures 45-C, D). En revanche, le groupe diabétique non traité présentait des modifications dégénératives et nécrotiques au niveau des îlots de Langerhans, avec une perte cellulaire importante et une atrophie des îlots. Une dégénérescence hydropique et une dégranulation ont été observées dans le cytoplasme des cellules  $\beta$  dégénérées des îlots de Langerhans (Figure 45-B). Une récupération significative a été observée dans les îlots de Langerhans des groupes diabétiques traités avec 200 mg/kg et 400 mg/kg d'extrait de plante, où les altérations des îlots causées par la toxicité de l'alloxane ont été prévenues (Figures 45-E, F).



**Figure 45.** Photomicrographies du tissu pancréatique : **A**, Groupe témoin sain (contrôle) montrant une structure histologique normale du pancréas. **B**, Groupe diabétique non traité (DIA) révélant une nécrose dans les îlots de Langerhans (tête de flèche noire), une perte cellulaire dans les îlots (tête de flèche bleue), une atrophie des îlots (tête de flèche verte), et une dégénérescence des cellules  $\beta$  des îlots avec dégranulation hydropique (tête de flèche rouge). **C**, Groupe sain traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (PD1) montrant une structure histologique normale du pancréas. **D**, Groupe sain traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (PD2) présentant une structure histologique normale du pancréas. **E**, Groupe diabétique traité avec 200 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD1) montrant une structure histologique normale du pancréas. **F**, Groupe diabétique traité avec 400 mg/kg d'extrait de plante (DiaPD2) révélant

également une structure histologique normale du pancréas. (Coloration H&E, grossissement 10×).

Au cours de l'expérimentation, trois rats sont décédés. Cependant, les deux doses utilisées ont produit des effets comparables sur les paramètres étudiés, sans indication d'effet toxique. Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec les observations précédemment rapportées sur la même plante. Citons l'étude de **Tas et al. (2018)**, qui a mis en évidence une activité similaire : ils ont démontré que l'extrait hydroalcoolique du fruit de *Myrtus communis* possède un effet hypoglycémiant, hypolipidémiant et une activité inhibitrice du stress oxydatif chez des rats diabétiques induits par le streptozotocine (STZ). De même, **Talebianpoor et al. (2019)** ont observé des effets comparables en utilisant l'extrait hydroalcoolique des fruits de *M. communis*.

## *Conclusion et Perspectives*



## **Conclusion et Perspectives**

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis d'évaluer le potentiel pharmacologique des extraits de deux plantes médicinales, *Myrtus communis* et *Centaurea papposa*, à travers une approche combinant l'analyses phytochimiques, l'études in vitro, la modélisation moléculaire et l'évaluations in vivo.

Les objectifs de cette thèse ont été les suivants :

- Réaliser une caractérisation phytochimique de deux plantes médicinales, désignées *Centaurea papposa* et *Myrtus communis*, afin d'identifier leurs principaux composés bioactifs.
- Évaluer in vitro des activités biologiques des extraits de ces plantes, incluant leur potentiel antioxydant, leur capacité à inhiber diverses enzymes (alpha-amylase, alpha-glucosidase, cholinestérases, tyrosinase et uréase), leur activité antibactérienne, ainsi que leur efficacité en tant que facteur de protection solaire.
- Étudier l'activité anticancéreuse spécifique de la plante *Centaurea papposa*.
- Mener des études de docking moléculaire pour explorer les interactions potentielles entre les composés détectés et leurs cibles enzymatiques.
- Effectuer une évaluation in vivo de l'activité antidiabétique de la plante *Myrtus communis* afin de confirmer ses effets pharmacologiques dans un modèle biologique pertinent.

Selon nos résultats, les extraits de *Myrtus communis* ont démontré des activités antioxydantes et antibactériennes significatives ainsi qu'une inhibition notable des enzymes cholinestérases. Par ailleurs, ils ont révélé une capacité marquée à inhiber les enzymes clés impliquées dans la digestion des glucides, notamment l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase. Ces observations suggèrent que *Myrtus communis* constitue une source naturelle prometteuse d'antioxydants et pourrait être envisagée comme complément alimentaire potentiel, contribuant à la prévention ou à l'atténuation des pathologies liées au stress oxydatif et aux désordres métaboliques.

Parallèlement, l'étude des extraits de *Centaurea papposa* n'a pas présenté d'activité inhibitrice significative sur les enzymes étudiées, mais a révélé une activité antioxydante puissante, particulièrement marquée dans les extraits polaires, ainsi qu'une activité antibactérienne notable, surtout pour l'extrait chloroformique. De plus, l'extrait d'acétate de

cette plante a démontré une activité anticancéreuse puissante sur deux lignées cellulaires, ouvrant des perspectives intéressantes pour le développement de nouveaux agents anticancéreux d'origine naturelle.

En outre, les extraits de *Myrtus communis* et *Centaurea papposa* ont également montré une activité significative en tant qu'agents de protection solaire, suggérant leur intérêt potentiel dans le développement de formulations cosmétiques visant à protéger la peau contre les dommages induits par les rayons ultraviolets.

Afin de mieux comprendre les interactions moléculaires à l'origine de ces effets enzymatiques et bactériennes, une étude de docking moléculaire a été réalisée sur les principaux composés identifiés dans les deux plantes en ciblant l'alpha-amylase, l'alpha-glucosidase, les cholinestérases, et la dihydroptéroate synthase (DHPS). Cette modélisation a permis de confirmer l'affinité et la stabilité des liaisons entre ces composés bioactifs et les sites catalytiques des enzymes, renforçant ainsi l'hypothèse de leurs rôle inhibiteur et leurs potentiel pharmacologique.

Par ailleurs, l'évaluation *in vivo* de l'activité antidiabétique de l'extrait hydrométhanoliques de *Myrtus communis* a révélé une amélioration significative du profil biochimique, notamment une réduction des concentrations sanguines de glucose et une modulation favorable du bilan lipidique. Ces effets bénéfiques ont été confirmés par les analyses histopathologiques, qui ont mis en évidence une restauration partielle des structures des organes affectés par le diabète chez les animaux traités. Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de *Myrtus communis* dans la gestion du diabète et de ses complications associées.

Ces résultats s'inscrivent dans le cadre des recherches actuelles valorisant les plantes médicinales comme sources prometteuses de composés thérapeutiques. Toutefois, il serait pertinent de prolonger cette étude en envisageant les axes de recherche suivants :

- L'application de techniques d'extraction innovantes afin d'optimiser le rendement et la diversité des composés bioactives,
- L'isolement, la purification et la caractérisation structurale des molécules bioactives responsables des activités biologiques observées,
- L'évaluation approfondie *in vivo* des effets de ces deux plantes sur le stress oxydatif,

- L'exploration des mécanismes d'action moléculaires impliqués, afin de mieux comprendre leur mode d'efficacité,
- L'étude de la toxicité et de la sécurité d'emploi des extraits et des composés isolés afin de garantir leur innocuité pour une utilisation thérapeutique.

# *Références Bibliographiques*



Références Bibliographiques

- Abdallah, E. M., Alhatlani, B. Y., de Paula Menezes, R., and Martins, C. H. G. (2023).** Back to Nature: Medicinal Plants as Promising Sources for Antibacterial Drugs in the Post-Antibiotic Era. *Plants*. 12(17): 3077. <https://doi.org/10.3390/plants12173077>
- Abdel Aziz, M. A., Badary, D. M., and Hussein, M. R. A. (2017).** Renal damage following Alloxan-induced diabetes is associated with generation of reactive oxygen species, alterations of p53, TGF- $\beta$ 1, and extracellular matrix metalloproteinases in rats. *Cell Biology International*. 41(5): 525-533. <https://doi.org/10.1002/cbin.10752>
- Ahmed, M. F., Kazim, S. M., Ghori, S. S., Mehjabeen, S. S., Ahmed, S. R., Ali, S. M., and Ibrahim, M. (2010).** Antidiabetic Activity of *Vinca rosea* Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Endocrinology*. 2010: 841090. <https://doi.org/10.1155/2010/841090>
- Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Ben Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E., and Marzouk, B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *Italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*. 48(5): 1362-1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., and Duran, A. (2013).** Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chemistry*. 141(1): 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.092>
- Albayrak, S., Atasagun, B., and 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. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.06.010>

- Alipour, G., Dashti, S., and Hosseinzadeh, H. (2014).** Review of Pharmacological Effects of *Myrtus communis* L. and its Active Constituents : *MYRTUS COMMUNIS* L. and its active constituents. *Phytotherapy Research.* 28(8): 1125-1136. <https://doi.org/10.1002/ptr.5122>
- Allain, C. (1974).** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 20: 470-475.
- Al-Maharik, N., Jaradat, N., Al-Hajj, N., and Jaber, S. (2023).** Myrtus communis L. : Essential oil chemical composition, total phenols and flavonoids contents, antimicrobial, antioxidant, anticancer, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 10(1): 41. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00417-4>
- 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.* 16(3): 273-281. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.27146>
- Alrumaihi, F., Almatroodi, S. A., Alharbi, H. O. A., Alwanian, W. M., Alharbi, F. A., Almatroudi, A., and Rahmani, A. H. (2024).** Pharmacological Potential of Kaempferol, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis via Modulation of Inflammation and Other Biological Activities. *Molecules.* 29(9): 2007. <https://doi.org/10.3390/molecules29092007>
- Alsenaidi, W. A., Amush, H. A., Ullah, S., Baniorabe, N. S., Khan, A., Al Touby, S. S., Rehman, N. U., Al-Harrasi, A., and Weli, A. M. (2023).** Pharmacology and Enzyme Inhibitory Potentials of *Myrtus communis* L. Fruits Grown in Oman. *Trends in Medical Research.* 18(1): 197-204. <https://doi.org/10.3923/tmr.2023.143.151>

- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Pérez-Alvarez, J. A., and Fernández-López, J. (2010).** Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts  
Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de myrtus. *CyTA - Journal of Food.* 8(2): 95-101.  
<https://doi.org/10.1080/19476330903161335>
- American Diabetes Association. (2011).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.  
*Diabetes Care.* 34(Supplement\_1): S62-S69. <https://doi.org/10.2337/dc11-S062>
- Aslam, M. (2022).** Quercetin Ameliorated the Alloxan Mediated Hepatic Injury in Diabetic Wistar Rats. *Journal of Clinical Toxicology.* 12(3): 1-8.  
<https://doi.org/10.35248/2161-0495-22.12.514>
- Atalar, M. N., Erenler, R., Turkan, F., Alma, M. H., Demirtas, I., Baran, A., Irtegun Kandemir, S., Kecec, A. I., and Saltan, F. Z. (2023).** Phytochemical analysis and biological activity of *Corchorus olitorius* L.: Quantitative analysis of bioactive compounds by LC–MS/MS, antibacterial, enzyme inhibition, and cytotoxic activities.  
*European Journal of Integrative Medicine.* 62: 102290.  
<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2023.102290>
- Azzouzi, S., Lefahal, M., Louaar, S., Makhloufi, E.-H., Kamel, M., and Akkal, S. (2024).** Centaurea dimorpha Viv. (Asteraceae) growing in Algeria extracts as a promising natural cosmetic active ingredient : Broad-spectrum photoprotection and antioxidant efficacy. *Journal of Agriculture and Applied Biology.* 6: 1-12.  
<https://doi.org/10.11594/jaab.06.01.01>
- Banda, M., Nyirenda, J., Muzandu, K., Sijumbila, G., and Mudenda, S. (2018).** Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effects of Aqueous Extracts of *Lannea edulis* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology.* 9: 1099.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01099>

- Bao, X., Zheng, Z., Lv, J., Bao, J., Chang, S., Jiang, X., and Xin, Y. (2023).** Shikimic acid (SA) inhibits neuro-inflammation and exerts neuroprotective effects in an LPS-induced in vitro and in vivo model. *Frontiers in Pharmacology*. 14: 1265571. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1265571>
- Basli, A., Belkacem, N., and Amrani, I. (2017).** Health benefits of phenolic compounds against cancers. *Phenolic compounds-biological activity*. 8:193-210.
- Beentje, H. J. (2010).** *The Kew plant glossary: An illustrated dictionary of plant terms*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20103174880>
- Begum, S., Ali, M., Gul, H., Ahmad, W., Alam, S., Khan, M., Khan, M. A., and Ahmad, M. (2012).** In vitro enzyme inhibition activities of *Myrtus communis* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6(14): 1083-1087.
- Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Bensouici, C., and Haba, H. (2021).** In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 9(6): 790-802.
- BENSAID, S. O., BICHA, S., BENMEKHBI, L., BENTAMENE, A., BENSOUICI, C., DEMIRTAS, I., and AKKAL, S. (2024).** Chemical composition and potential pharmacological applications of *Centaurea acaulis* L. *Notulae Scientia Biologicae*. 16(3): 11909-11909.
- Berberoglu, Z. (2019).** *Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus*. *EMJ Diabet.* 7(1): 97-106. <https://doi.org/10.33590/emjdiabet/10313616>
- Betteridge, D. J. (2000).** What is oxidative stress?. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 49(2): 3-8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Bhattacharya, K., and Chandra, G. (2014).** Phagodeterrence, larvicidal and oviposition deterrence activity of *Tragia involucrata* L. (Euphorbiaceae) root extractives against

- vector of lymphatic filariasis *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4: S226-S232. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60444-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60444-8)
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181: 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Boğa, M., Alkan, H., Ertaş, A., Oral, E. V., Yılmaz, M. A., Yeşil, Y., Gören, A. C., Temel, H., and Kolak, U. (2016).** Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 15 (9): 1865-1875.
- Borges, A., José, H., Homem, V., and Simões, M. (2020).** Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics*. 9(2): 48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020048>
- Bouaoudia-Madi, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., Silva, A. M., Dairi, S., Oukhmanou–Bensidhoum, S., and Cardoso, S. M. (2019).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. pericarp. *Antioxidants*. 8(7): 205.
- Bouaziz, A., khennouf, S., zarga, M. A., Abdalla, S., Baghiani, A., and Charef, N. (2015).** Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(1): 19-28. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30165-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30165-9)
- Boulhissa, I., Chikhi, A., Bensegueni, A., Ghattas, M. A., Mokrani, E. H., Alrawashdeh, S., and Obaid, D. E. E. (2021).** Investigation of New Inhibitors of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) by Virtual Screening with

Antibacterial Assessment. *Current Computer-Aided Drug Design*. 17(2): 214-224.  
<https://doi.org/10.2174/1573409916666200213124929>

**Bounaas, J., Abdelkader, B., Mokrani, E., Ounissi, I., Benzazia, S., Özen, T., Sarmad, M., Erenler, R., Yıldız, I., and Bensouici, C. (2024).** Phytochemical analysis of hydromethanolic extract and its fractions of myrtus communis leaves from Skikda, Algeria : LC- MS/MS analysis, antioxidant capacities, in-vitro and in silico assessment of anticholinesterase and antidiabetic activities. *Global NEST Journal*. 27(2): 1-12.  
<https://doi.org/10.30955/gnj.06823>

**Bouyahya, A., Abrini, J., Khay, E.-O., Charfi, S., Boujida, N., EL-Harsal, A., Talbaoui, A., ET-Touys, A., Bakri, Y., and Dakka, N. (2016).** In vitro Antibacterial Activity of Organic Extracts from North-West Moroccan Medicinal Plant Myrtus communis (L.). *Biotechnology Journal International*. 16(4): 1-9.  
<https://doi.org/10.9734/BJI/2016/28500>

**Bouzabata, A., Casanova, J., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., and Tomi, F. (2016).** The Genus Myrtus L. in Algeria : Composition and Biological Aspects of Essential Oils from M. communis and M. nivellei: A Review. *Chemistry & Biodiversity*. 13(6): 672-680. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500342>

**Cao, J., Zhang, J., Cao, R., Li, W., Wang, G., Cui, L., and Sun, L. (2023).** Elucidation of alpha-amylase inhibition by natural shikimic acid derivatives regarding the infrequent uncompetitive inhibition mode and structure–activity relationship. *Food Frontiers*. 4(4): 2058-2069. <https://doi.org/10.1002/fft2.278>

**Casanola-Martin, G. M., Le-Thi-Thu, H., Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J. A., Torrens, F., Rescigno, A., Abad, C., and Khan, M. T. H. (2014).** Tyrosinase enzyme : 1. An overview on a pharmacological target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14(12): 1494-1501. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140523121427>

- Catoni, R., and Gratani, L. (2013).** Morphological and physiological adaptive traits of Mediterranean narrow endemic plants : The case of *Centaurea gymnocarpa* (Capraia Island, Italy). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 208(3): 174-183.
- Caturano, A., D'Angelo, M., Mormone, A., Russo, V., Mollica, M. P., Salvatore, T., Galiero, R., Rinaldi, L., Vetrano, E., Marfella, R., Monda, M., Giordano, A., and Sasso, F. C. (2023).** Oxidative Stress in Type 2 Diabetes : Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Current Issues in Molecular Biology*. 45(8): 6651-6666. <https://doi.org/10.3390/cimb45080420>
- Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., and Tarkowski, P. (2021).** Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected *Mentha* Species. *Plants*. 10(3): 550. <https://doi.org/10.3390/plants10030550>
- Chabrier, J.-Y. (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739123v1>
- Chanda, D., Ha, H., and Lee, I.-K. (2023).** The role of oxidative stress and systemic inflammation in diabetes and chronic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology*. 14: 1272525. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1272525>
- Chao, J., Cheng, H.-Y., Chang, M.-L., Huang, S.-S., Liao, J.-W., Cheng, Y.-C., Peng, W.-H., and Pao, L.-H. (2021).** Gallic Acid Ameliorated Impaired Lipid Homeostasis in a Mouse Model of High-Fat Diet—And Streptozotocin-Induced NAFLD and Diabetes through Improvement of  $\beta$ -oxidation and Ketogenesis. *Frontiers in Pharmacology*. 11: 606759. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.606759>
- Chatatikun, M., Tedasen, A., Pattarangoon, N. C., Palachum, W., Chuaijit, S., Mudpan, A., Pruksaphanrat, S., Sohbenalee, S., Yamasaki, K., and Klangbud, W. K. (2023).** Antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, molecular docking studies,

and molecular dynamic simulation of active compounds found in nipa palm vinegar.

*PeerJ*. 11: e16494. <https://doi.org/10.7717/peerj.16494>

**Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., and Kim, C. K. (2020).** Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*. 10(1): 2611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>

**Chen, Z.-R., Huang, J.-B., Yang, S.-L., and Hong, F.-F. (2022).** Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*. 27(6): 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>

**Cheung, J., Gary, E. N., Shiomi, K., and Rosenberry, T. L. (2013).** Structures of Human Acetylcholinesterase Bound to Dihydrotanshinone I and Territrein B Show Peripheral Site Flexibility. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 4(11): 1091-1096. <https://doi.org/10.1021/ml400304w>

**Chibuzo, A. W., Sylvalyn, A. I., Sussan, E. I., Sunday, O. E. C., Nosike, O. T., and Ubaezuonu, S. T. (2023).** Ecological Studies of *Tridax procumbens* (Linn) and *Ageratum conyzoides* (Linn) and the comparative Studies of Their Phytochemical. *Asian Journal of Research in Crop Science*. 8(4): 240-254.

**Chidinma, I. J., Ugochukwu, N. H., C, N. D., Chukwujindu, O. M., and Ozoemena, O. E. (2024).** Comparative Assessment of Histopathological and Biochemical Indices of Renal Function in Alloxan-induced Male and Female Diabetic Rats. *Asian Journal of Medicine and Health*. 22(8): 106-116. <https://doi.org/10.9734/ajmah/2024/v22i81075>

**Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T. S., Chinedu Ikem, J., Victor Chigozie, U., and Saki, M. (2022).** Antibiotic resistance : The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 36(9): e24655. <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>

- Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., and Chou, S.-T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(8): 2454-2458.
- Dalar, A., Uzun, Y., Mukemre, M., Turker, M., and Konczak, I. (2015).** *Centaurea karduorum* Boiss. from Eastern Anatolia : Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Journal of Herbal Medicine*. 5(4): 211-216.  
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.09.006>
- Dallatu, M. K., Anaja, P. O., Bilbis, L. S., Mojiminiy, F. B. O., Mohammed, A., and Tanko, Y. (2010).** Haematological and Antioxidant Properties of Alloxan-Induced Diabetes Rats Supplemented with Antioxidant Micronutrients. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*. 18(1): 106-111.
- David, J., Newman, C., & Price, P. (2001).** Non protein nitrogen metabolites. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry 5th Edn. Editors. Carl, A., Burtes and Edward R. Ashwood. Philadelphia*, 414-426.
- Dekir, A., Berredjem, M., Benzaid, C., Djouad, S.-E., Iqbal, N., Laichi, Y., Bachari, K., Bhat, A. R., Bouzina, A., Aissaoui, M., and Bouchareb, F. (2023).** Novel N-acetylsulfonamides : Synthesis, in silico prediction, molecular docking dynamic simulation, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 41(19): 9232-9244.  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2148751>
- Dekir, A., Berredjem, M., Rachedi, K. O., Bahadi, R., Djouad, S. E., Bouacida, S., Grib, I., Iqbal, N., Redjemia, R., and Boussaker, M. (2023).** X-ray crystallographic study, molecular docking, molecular dynamics and DFT/ADMET analyses of

- carboxylsulfamides. *Journal of Molecular Structure*. 1289: 135831.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135831>
- Dellaoui, H., and Berroukche, A. (2019).** Analysis of the Chemical Compositions of the Alcoholic Extract and the Essential Oil of the Leaves of the Plant *Myrtus communis* from Blida–Algeria. *Acta Scientific Nutritional Health*. 3(6): 150-155.
- De Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., de Araújo, F. F., and Pastore, G. M. (2020).** A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food Chemistry*. 306: 125630.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125630>
- Deveci, E., Tel-Çayan, G., and Duru, M. E. (2018).** Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *International Journal of Food Properties*. 21(1): 771-783. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>
- Di Majo, D., La Neve, L., La Guardia, M., Casuccio, A., and Giammanco, M. (2011).** The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(2): 265-269.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.09.013>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018).** Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*. 391(10138): 2449-2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Djahra, A. B., Bordjiba, O., and Benkherara, S. (2015).** Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue Des Sciences et de La Technologie*. 24 (1): 29-37.

- Djehiche, C., Benzidane, N., Djeghim, H., Tebboub, M., Mokrani, E. H., Mebrek, S., Messaoudi, M., Bensouici, C., Alsalme, A., Cornu, D., Bechelany, M., Arrar, L., and Barhoum, A. (2024).** Exploring the Therapeutic Potential of *Ammodaucus leucotrichus* Seed Extracts : A Multi-Faceted Analysis of Phytochemical Composition, Anti-Inflammatory Efficacy, Predictive Anti-Arthritic Properties, and Molecular Docking Insights. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 17(3): 385. <https://doi.org/10.3390/ph17030385>
- Duan, F., Li, X., Cai, S., Xin, G., Wang, Y., Du, D., He, S., Huang, B., Guo, X., Zhao, H., Zhang, R., Ma, L., Liu, Y., Du, Q., Wei, Z., Xing, Z., Liang, Y., Wu, X., Fan, C., ... Huang, W. (2014).** Haloemodin as Novel Antibacterial Agent Inhibiting DNA Gyrase and Bacterial Topoisomerase I. *Journal of Medicinal Chemistry*. 57(9): 3707-3714. <https://doi.org/10.1021/jm401685f>
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., and Proksch, P. (2008).** Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 3(12): 1820-1831. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.182>
- Ebrahim, M., and Pool, E. J. (2010).** The effect of *Tulbaghia violacea* extracts on testosterone secretion by testicular cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 132(1): 359-361. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.018>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eluehike, N., and Onoagbe, I. (2018).** Changes in organ and body weight, serum amylase and antidiabetic effects of tannins from *Spondias mombin* on streptozotocin-induced

- diabetic rats. *Journal of Metabolic Health*. 3(1): a40.  
<https://doi.org/10.4102/jir.v3i1.40>
- Escher, G. B., Santos, J. S., Rosso, N. D., Marques, M. B., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., Daguer, H., Molognoni, L., Prado-Silva, L. do, Sant'Ana, A. S., da Silva, M. C., and 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.046>
- Essiet, G. A., Eko, O. W., Udoh, E. S., Umoren, A. I., Anwankwo, M. U., and Okwesileze, C. N. (2020).** Hematological Indices of Diabetic Rats Treated with Crude Extract and Fractions of *Lasianthera Africana* Leaf. *African Journal of Health Sciences*. 33(6): 53-64.
- European Commission. (2006).** Recommendation on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto. *Off J Eur Union*. 265: 39-43.
- Ewenighi, C., Dimkpa, U., Onyeanusi, J., Onoh, L., Onoh, G., and Ezeugwu, U. (2015).** Estimation of glucose level and body weight in Alloxan Induced Diabetic Rat treated with Aqueous extract of *Garcinia Kola* Seed. *THE ULUTAS MEDICAL JOURNAL*. 1(2): 26. <https://doi.org/10.5455/umj.20150507042420>
- Fateh, S. T., Fateh, S. T., Shekari, F., Mahdavi, M., Aref, A. R., and Salehi-Najafabadi, A. (2022).** The Effects of Sesquiterpene Lactones on the Differentiation of Human or Animal Cells Cultured In-Vitro: A Critical Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology*. 13: 862446. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.862446>
- Friedman, M. I. (1977).** Insulin-induced hyperphagia in alloxan-diabetic rats fed a high-fat diet. *Physiology & Behavior*. 19(5): 597-599. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90031-2)

- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., and Shenkin, P. S. (2004).** Glide : A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 47(7): 1739-1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., and Mainz, D. T. (2006).** Extra precision glide : Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49(21): 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
- Fröde, T. S., and Medeiros, Y. S. (2008).** Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 115(2): 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.038>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., and Martín, C. (2020).** Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(17): 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gamde, S. M., Ugwah-Oguejiofor, C. J., Garba, A., Avwioro, G. O., Moronkeji, A., and Jimoh, A. A. (2023).** Histologic and Biochemical Effect of Balanite aegyptiaca Fruit Extract on Alloxan-Induced Diabetes in Wistar Rats. *Ethiopian Journal of Health Sciences*. 33(3): 441-450. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v33i3.7>
- Gangwar, V., Garg, A., Lomore, K., Korla, K., Bhat, S. S., Rao, R. P., Rafiq, M., Kumawath, R., Uddagiri, B. V., and Kareenhalli, V. V. (2021).** Immunomodulatory Effects of a Concoction of Natural Bioactive Compounds—Mechanistic Insights. *Biomedicines*. 9(11): 1522. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111522>

- GHOLAM, H. A., FALAH, H., SHARIFIFAR, F., and MIRTAJ, A. S. (2008).** The inhibitory effect of some Iranian plants extracts on the alpha glucosidase. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 11(1): 1-9.
- Gobinath, R., Parasuraman, S., Sreeramanan, S., Enugutti, B., and Chinni, S. V. (2022).** Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Methanolic Extract of Leaves of *Spondias mombin* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology.* 13: 870399 <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.870399>
- González-Castejón, M., Visioli, F., and Rodriguez-Casado, A. (2012).** Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition reviews.* 70(9): 534-547.
- Goyal, M. R., Birwal, P., & Chauhan, D. N. (2022).** *Herbs, Spices, and Medicinal Plants for Human Gastrointestinal Disorders : Health Benefits and Safety.* Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003189749>
- Grafakou, M.-E., Barda, C., Heilmann, J., and Skaltsa, H. (2022).** In vitro cytotoxic and anti-inflammatory activities of sesquiterpene lactones from *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Natural Product Research.* 36(12): 3211-3215. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1955882>
- Grafakou, M.-E., Djeddi, S., Tarek, H., and Skaltsa, H. (2018).** Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Biochemical Systematics and Ecology.* 76: 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.11.005>
- Gulcin, İ. (2020).** Antioxidants and antioxidant methods : An updated overview. *Archives of Toxicology.* 94(3): 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guneidy, R., Shokeer, A., Abdel Karim, G. S. A., Saleh, N., and Zaki, E. (2024).** Effect of Protocatechuic Acid on Tamoxifen Efficacy and Oxidative Stress in Breast Cancer Cells : Implications for Combination Therapy. *Egyptian Journal of Chemistry.* 67(12): 167-181. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.312360.10195>

- Gurib-Fakim, A. (2006).** Medicinal plants : Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine.* 27(1): 1-93.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hadidi, M., Liñán-Atero, R., Tarahi, M., Christodoulou, M. C., and Aghababaei, F. (2024).** The Potential Health Benefits of Gallic Acid: Therapeutic and Food Applications. *Antioxidants.* 13(8): 1001. <https://doi.org/10.3390/antiox13081001>
- Hannan, J. M. A., Nipa, N., Toma, F. T., Talukder, A., and Ansari, P. (2023).** Acute Anti-Hyperglycaemic Activity of Five Traditional Medicinal Plants in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Frontiers in Bioscience-Scholar.* 15(2): 5.  
<https://doi.org/10.31083/j.fbs1502005>
- Hao, X., Gao, Z., and Hu, M. (2025).** Anti-tumor role and molecular mechanism of vanillic acid. *Discover Oncology.* 16: 20. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01746-6>
- Hashim, W. S., Yasin, Y. S., Muter, E. A., and Khalil, Y. A. (2023).** Stressed Experimental diabetic Rats challenging with Glimpiride. *Advancements in Life Sciences.* 10(1): 72-74.
- Hassan, S. T. S., and Švajdlenka, E. (2017).** Biological Evaluation and Molecular Docking of Protocatechuic Acid from Hibiscus sabdariffa L. as a Potent Urease Inhibitor by an ESI-MS Based Method. *Molecules.* 22(10): 1696.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22101696>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018).** Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1411(1): 21-35. <https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
- Hennia, A., Miguel, M. G., and Nemmiche, S. (2018).** Antioxidant Activity of Myrtus communis L. and Myrtus nivellei Batt. & Trab. Extracts : A Brief Review. *Medicines.* 5(3): 89. <https://doi.org/10.3390/medicines5030089>

- Hilpold, A., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R., and Susanna de la 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: e001. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/collectbot.2013.v33.0011>
- Hioual, K. S., Chikhi, A., Bensegueni, A., Merzoug, A., Boucherit, H., Teniou, S., Mokrani, E. H., and Merabti, B. (2014).** Successful challenge: A key step in infectious diseases treatment using computer-aided drug design. *Int. J. Biol. Sci. App.* 1(1): 11-14.
- Hsu, C.-Y., Rajabi, S., Hamzeloo-Moghadam, M., Kumar, A., Maresca, M., and Ghildiyal, P. (2024).** Sesquiterpene lactones as emerging biomolecules to cease cancer by targeting apoptosis. *Frontiers in Pharmacology*. 15: 1371002. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1371002>
- Hunyadi, A. (2019).** The mechanism(s) of action of antioxidants : From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Medicinal Research Reviews*. 39(6): 2505-2533. <https://doi.org/10.1002/med.21592>
- Hussein, B. A., Karimi, I., and Yousofvand, N. (2023).** Chemo- and bio-informatics insight into anti-cholinesterase potentials of berries and leaves of *Myrtus communis* L., Myrtaceae : An in vitro/in silico study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 23(1): 421. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04241-z>
- Ibrahim, G., Ahmed, O., Abbas, N., and El Fateh, M. (2018).** Evaluation of the anti-diabetic effects of epicatechin and/or gallic acid in STZ/NA- induced diabetic Wister rats. *Research Journal of Applied Biotechnology*. 4(1): 87-104. <https://doi.org/10.21608/rjab.2018.57527>

- Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., and Akinloye, O. A. (2017).** Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 53(6): 365-374.  
<https://doi.org/10.1016/j.medici.2018.02.001>
- Ijuin, T., & Takenawa, T. (2012).** Regulation of Insulin Signaling and Glucose Transporter 4 (GLUT4) Exocytosis by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate (PIP3) Phosphatase, Skeletal Muscle, and Kidney Enriched Inositol Polyphosphate Phosphatase (SKIP). *The Journal of Biological Chemistry*. 287(10): 6991-6999.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335539>
- Ikhlef, S., Lasmari, S., Zendaoui, S. M., Mokrani, E. H., Tebbani, D., Gürbüz, N., Bensouici, C., Boulcina, R., Zouchoune, B., and Özdemir, I. (2024).** Synthesis, Molecular Docking, Anti-cholinesterase Activity, Theoretical Investigation, and Catalytic Effect of New Encumbered N-benzyladamantyl Substituted Imidazolidin-2-ylidene Carbene Pd-PEPSI Complexes. *Current Organic Chemistry*. 28(6): 472-487.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., and Amini-Khoei, H. (2017).** Medicinal plants : Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 7(1): 1-7.  
<https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
- Jarrett, P., and Scragg, R. (2017).** A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 16(3): 283-290.  
<https://doi.org/10.1039/c6pp00406g>
- Johnson, L. A. S., and Briggs, B. G. (1984).** Myrtales and Myrtaceae—A Phylogenetic Analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 71(3): 700-756.  
<https://doi.org/10.2307/2399159>

- Karadeniz, F., Oh, J. H., and Kong, C.-S. (2021).** Sesquiterpene Lactones : A Review of Biological Activities. *Journal of Life Science.* 31(4): 430-441. <https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.4.430>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Ghandadi, M., Atashbeyk, D. G., Bazzaz, B. S. F., and Iranshahi, M. (2015).** Investigation of the antibacterial activity and efflux pump inhibitory effect of co-loaded piperine and gentamicin nanoliposomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 41(6): 989-94 <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.920025>
- Khan, A. W., Farooq, M., Haseeb, M., and Choi, S. (2022).** Role of Plant-Derived Active Constituents in Cancer Treatment and Their Mechanisms of Action. *Cells.* 11(8): 1326. <https://doi.org/10.3390/cells11081326>
- Khursheed, M., Ghelani, H., Jan, R. K., and Adrian, T. E. (2023).** Anti-Inflammatory Effects of Bioactive Compounds from Seaweeds, Bryozoans, Jellyfish, Shellfish and Peanut Worms. *Marine Drugs.* 21(10): 524. <https://doi.org/10.3390/md21100524>
- Kimani, C. N., Reuter, H., Kotzé, S. H., and Muller, C. J. F. (2023).** Regeneration of Pancreatic Beta Cells by Modulation of Molecular Targets Using Plant-Derived Compounds : Pharmacological Mechanisms and Clinical Potential. *Current Issues in Molecular Biology.* 45(8): 6216-6245. <https://doi.org/10.3390/cimb45080392>
- Kisa, D., Çelik, A., and İMamoğlu, R. (2024).** Assessment of Inhibitory Ability Against Medicinally Important Enzymes with Invitro and In Silico Studies : Phenolic Content of Endemic *Centaurea cadmea* subsp. *Pontica*. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım Ve Doğa Dergisi.* 27(1): 14-25. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1294720>
- Klotzsch, S. G., & McNamara, J. R. (1990).** Triglyceride measurements : A review of methods and interferences. *Clinical chemistry.* 36(9): 1605-1613.

- Klyueva, Y., Danilova, I., Emelianov, V., Gette, I., and Trofimova, E. (2020).** Morphofunctional condition of the pancreatic insular apparatus in old rats with alloxan-induced diabetes and its correction with lipoic acid. *BIO Web of Conference*. 22: 02020. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202202020>
- Knip, M., and Siljander, H. (2008).** Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmunity Reviews*. 7(7): 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.04.008>
- Koca, U., and Özçelik, B. (2009).** Antiviral, antibacterial, and antifungal activities of *Centaurea tchihatcheffii* extracts. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6: 125-134.
- Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D., and Asadi-Samani, M. (2016).** The role of medicinal plants in the treatment of diabetes : A systematic review. *Electronic Physician*. 8(1): 1832-1842. <https://doi.org/10.19082/1832>
- Köse, Y. B., İşcan, G., Göger, F., Akalın, G., Demirci, B., and Başer, K. H. C. (2016).** Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri* : New Species from Turkey. *Chemistry & Biodiversity*. 13(10): 1369-1379. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600070>
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., and Abdelly, C. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus. Biologies*. 331(11): 865-873. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.024>
- Kumar, M., Sikri, N., Chahal, S., Sharma, J., Sharma, B., Yadav, P., Bhardwaj, M., Vashishth, D., Kadyan, P., Kataria, S. K., and Dalal, S. (2021).** Urease Inhibitory Kinetic Studies of Various Extracts and Pure Compounds from *Cinnamomum* Genus. *Molecules*. 26(13): 3803. <https://doi.org/10.3390/molecules26133803>

- Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P. D. (2018).** Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(6): 095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kwon, S.-H., Lee, H.-K., Kim, J.-A., Hong, S.-I., Kim, H.-C., Jo, T.-H., Park, Y.-I., Lee, C.-K., Kim, Y.-B., Lee, S.-Y., and Jang, C.-G. (2010).** Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*. 649(1-3): 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001>
- La Liste rouge des espèces menacées de l'UICN (2024).** The World Flora Online: An online flora of all known plants. <http://www.worldfloraonline.org>
- Lahmadi, S., Kechebar, M. S. A., Karoune, S., Bensouici, C., Gali, L., Khattabi, L., Boural, H., Chouh, A., and Saad, S. (2022).** Phytochemical analysis, antioxidant and photoprotective activities of aqueous extract of *Euphorbia retusa* Forssk. Different parts from Algeria. *Acta Agriculturae Slovenica*. 118(3): 1-10. <https://doi.org/10.14720/aas.2022.118.3.2437>
- Lal, S., Kumar, V., Sharma, S. K., and Sardana, M. (2020).** Diabetogenic potential of Alloxan in Albino Mice. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 6(4): 48-55.
- Lefebvre, T., Destandau, E., and Lesellier, E. (2021).** Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques : A review. *Journal of Chromatography A*. 1635: 461770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>
- Lenzen, S. (2008).** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2): 216-226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Li, L., Chong, L., Huang, T., Ma, Y., Li, Y., and Ding, H. (2023).** Natural products and extracts from plants as natural UV filters for sunscreens : A review. *Animal Models and Experimental Medicine*. 6(3): 183-195. <https://doi.org/10.1002/ame2.12295>

- Li, Y., Zou, H., Sun-Waterhouse, D., and Chen, Y. (2024).** Chlorogenic acid, caffeic acid and luteolin from dandelion as urease inhibitors: Insights into the molecular interactions and inhibition mechanism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 104(13): 8079-8088. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13637>
- Liju, V. B., Martin, S., Nath, L. R., Gopinadhan Nair, G. K., and Thayele Purayil, H. (2023).** Plant-based drugs : The potential novel therapeutic intervention against cancer stemness and metastasis. *Frontiers in Pharmacology*. 14: 1283694. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1283694>
- Liu, J., Jiang, R., Zhou, J., Xu, X., Sun, Z., Li, J., Chen, X., Li, Z., Yan, X., Zhao, D., Zheng, Z., and Sun, L. (2021).** Salicylic acid in ginseng root alleviates skin hyperpigmentation disorders by inhibiting melanogenesis and melanosome transport. *European Journal of Pharmacology*. 910: 174458. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174458>
- Liu, J., Xu, X., Jiang, R., Sun, L., and Zhao, D. (2019).** Vanillic acid in Panax ginseng root extract inhibits melanogenesis in B16F10 cells via inhibition of the NO/PKG signaling pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 83(7): 1205-1215. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1606694>
- Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., and Chen, C. (2010).** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants : Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(4): 840-860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Lu, X., Xie, Q., Pan, X., Zhang, R., Zhang, X., Peng, G., Zhang, Y., Shen, S., and Tong, N. (2024).** Type 2 diabetes mellitus in adults: Pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 9(1): 1-25. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01951-9>

- Lucchesi, A. N., Cassettari, L. L., and Spadella, C. T. (2015).** Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. *Journal of Diabetes Research*. 2015: 494578. <https://doi.org/10.1155/2015/494578>
- Maestro, S. (2020).** Maestro. Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020, 682.
- Mahmoudvand, H., Ezzatkah, F., Sharififar, F., Sharifi, I., and Dezaki, E. S. (2015).** Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. *The Korean journal of parasitology*. 53(1): 21.
- Man, Z., Feng, Y., Xiao, J., Yang, H., and Wu, X. (2022).** Structural changes and molecular mechanism study on the inhibitory activity of epigallocatechin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Frontiers in Nutrition*. 9: 948027. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.948027>
- Mannino, G., Serio, G., Asteggiano, A., Gatti, N., Bertea, C. M., Medana, C., and Gentile, C. (2022).** Bioactive Compounds and Antioxidant Properties with Involved Mechanisms of *Eugenia involucrata* DC Fruits. *Antioxidants*. 11(9): 1769. <https://doi.org/10.3390/antiox11091769>
- Mansouri, S., Foroumadi, A., Ghaneie, T., and Najar, A. G. (2001).** Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology*. 39(5): 399-401. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.5.399.5889>
- Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., and Azulay, R. D. (1986).** Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. bras. dermatol.* 40 (3): 121-124.
- Mawahib, C., Nabila, Z., Nabila, S., Chawki, B., and Salah, A. (2019).** LC-MS analysis, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Centaurea papposa* extracts. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 14(4): 159-165.

- Mayur, B., Sandesh, S., Shruti, S., and Sung-Yum, S. (2010).** Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *Journal of medicinal plant research*. 4: 1547-1553.
- Mbaka, G. O., and Ogonnia, S. O. (2017).** Activity of *Raphia hookeri* root extract on blood glucose, lipid profile and glycosylated haemoglobin on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Morphological Sciences*. 29(4): 214-222.
- McKenzie, R. J., Samuel, J., Muller, E. M., Skinner, A. K. W., and Barker, N. P. (2005).** Morphology of cypselae in subtribe Arctotidinae (Compositae-Arctotideae) and its taxonomic implications. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 569-594
- Mir, M. (2023).** *Myrtus Communis* Leaves; Source of Bioactives, Traditional Use and Their Biological Properties. 23(4): 487-515.
- Mir, M. A., Memish, L. A., Elbehairi, S. E., Bashir, N., Masoud, F. S., Shati, A. A., Alfaifi, M. Y., Alamri, A. M., Alkahtani, S. A., and Ahmad, I. (2024).** Antimycobacterial and Anticancer Properties of *Myrtus communis* Leaf Extract. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 17(7): 872. <https://doi.org/10.3390/ph17070872>
- Mistretta, V., Cavalier, E., Collette, J., Lutteri, L., & Chapelle, J.-P. (2009).** Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses biomédicales. *Revue Médicale de Liège*. 64: 5-6.
- Moein, S., Moein, M., Farmani, F., and Sabahi, Z. (2015).** Different methods evaluation of antioxidant properties of *Myrtus communis* extract and its fractions. *Trends in Pharmaceutical Sciences*. 1(3): 153-158.
- Mohd Sairazi, N. S., and Sirajudeen, K. N. S. (2020).** Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: Ecam*. 2020: 6565396. <https://doi.org/10.1155/2020/6565396>

- Mokrani, E. H., Bensegueni, A., Chaput, L., Beauvineau, C., Djeghim, H., and Mouawad, L. (2019).** Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and *in vitro* Approaches. *Molecular Informatics*. 38(5): 1800118. <https://doi.org/10.1002/minf.201800118>
- Mokrani, E. H., Abdelaziz, A., Akakba, N., Teniou, S., Demmak, R. G., and Bensegueni, A. (2022).** Molecular Docking and Drug-likeness Prediction of New Potent Tubulin Colchicine Binding Site Inhibitors for Potential Antitumor Drug. *Cumhuriyet Science Journal*. 43(3): 398-403. <https://doi.org/10.17776/csj.1063966>
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol.* 26(2): 211-219.
- Muchirah, P., Waihenya, R., Muya, S., Makokha, A., Laila, A., Mogaka, S., and Ozwara, H. (2024).** Effect of aqueous and ethanol extracts of Cucurbita maxima seed on fasting blood glucose in alloxan-induced rats. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 7(3): 597. <https://doi.org/10.5455/jabet.2024.d51>
- Muhammad, N. O., Akolade, J. O., Usman, L. A., and Oloyede, O. B. (2012).** Haematological parameters of alloxan-induced diabetic rats treated with leaf essential oil of *Hoslundia opposita* (Vahl). *EXCLI Journal*. 11: 670-676.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., and Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 43(6): 992-999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>
- Munteanu, I. G., and Apetrei, C. (2021).** Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity : A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7): 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Naeim, H., El-Hawiet, A., Abdel Rahman, R. A., Hussein, A., El Demellawy, M. A., and Embaby, A. M. (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. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2876-y>
- Nassarawa, S. S., Nayik, G. A., Gupta, S. D., Areche, F. O., Jagdale, Y. D., Ansari, M. J., Hemeg, H. A., AL-Farga, A., and Alotaibi, S. S. (2023).** Chemical aspects of polyphenol-protein interactions and their antibacterial activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 63(28): 9482-9505. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2067830>
- Oboh, G., Ogunsuyi, O. B., Ogunbadejo, M. D., and Adefegha, S. A. (2016).** Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24(3): 627-634. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.003>
- Olenovych, O., and Zukow, W. (2022).** Osmotic concentration of urine in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes. *Journal of Education, Health and Sport*. 12(10): 389-400. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.10.045>
- Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P., Serralheiro, M. L., and Araújo, M. E. (2014).** Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. 53: 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.008>
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 44(6): 307-315.
- Özkan, A. M. G., and Güray, Ç. G. (2009).** A mediterranean : *Myrtus communis* L.(myrtle). *Plants and Culture: Seeds of the Cultural Heritage of Europe, Morel JP, Mercuri AM (eds.). Edipuglia: Bari*, 159-168.
- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., and Apak, R. (2012).** Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of

- Polyphenols. *Analytical Chemistry*. 84(18): 8052-8059.  
<https://doi.org/10.1021/ac301925b>
- Paço, A., Brás, T., Santos, J. O., Sampaio, P., Gomes, A. C., and Duarte, M. F. (2022).** Anti-Inflammatory and Immunoregulatory Action of Sesquiterpene Lactones. *Molecules*. 27(3): 1142. <https://doi.org/10.3390/molecules27031142>
- Panda, S. K., and Luyten, W. (2018).** Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite*. 25: 10.
- Panero, J. L., and Crozier, B. S. (2012).** Asteraceae. Sunflowers, daisies. *The Tree of Life Web Project*.
- Park, H.-S., Lee, K., Kim, S.-H., Hong, M. J., Jeong, N.-J., and Kim, M.-S. (2020).** Luteolin improves hypercholesterolemia and glucose intolerance through LXR $\alpha$ -dependent pathway in diet-induced obese mice. *Journal of Food Biochemistry*. 44(9): e13358. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13358>
- Parlar Köprülü, R. E., Okur, M. E., Kolbaşı, B., Keskin, İ., and Ozbek, H. (2023).** Effects of Vincamine on Testicular Dysfunction in Alloxan-induced Diabetic Male Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 21(1): e132265. <https://doi.org/10.5812/ijpr-132265>
- Petrovska, B. B. (2012).** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. 6(11): 1-5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., and Vickers, M. H. (2018).** The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(11): 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Pourghasem, M., Nasiri, E., and Shafi, H. (2014).** Early Renal Histological Changes in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 3(1): 11-15.

- Quradha, M. M., Duru, M. E., Kucukaydin, S., Tamfu, A. N., Iqbal, M., Bibi, H., Khan, R., and Ceylan, O. (2024).** Comparative assessment of phenolic composition profile and biological activities of green extract and conventional extracts of *Salvia sclarea*. *Scientific Reports*. 14(1): 1885. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51661-z>
- Rabelo, T. K., Zeidán-Chuliá, F., Caregnato, F. F., Schnorr, C. E., Gasparotto, J., Serafini, M. R., de Souza Araújo, A. A., Quintans-Junior, L. J., Moreira, J. C. F., and Gelain, D. P. (2015).** In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Journal of Molecular Neuroscience MN*. 56(4): 956-965. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0559-9>
- Rais, N., Ved, A., Ahmad, R., and Parveen, A. (2024).** Oxidative Stress and Diabetes Mellitus : Unravelling the Intricate Connection: A Comprehensive Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 36(1): 13-30. <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i17493>
- Rajaei, Z., Hadjzadeh, M.-A.-R., Moradi, R., Ghorbani, A., and Saghebi, A. (2015).** Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Securigera securidaca* seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Advanced Biomedical Research*. 4(1): 33. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.150427>
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G. (1996).** A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*. 261(3): 470-489. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0477>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26(9-10): 1231-1237.
- Release, S. (2015).** *LigPrep, Version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY.*

- Riesen, W. F. (1998).** *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.*
- Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F. F., and Franconi, F. (2004).** Evaluation of Antioxidant Effect of Different Extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radical Research.* 38(1): 97-103.  
<https://doi.org/10.1080/10715760310001625609>
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabrmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K., and Devi, R. (2022).** Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases : Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology.* 13: 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Şafak, E. K., İlgün, S., Çoban, K. N., Mutlu, S. A., Yılmaz, H., and Karatoprak, G. Ş. (2023).** Antioxidant, enzyme inhibitory, and cytotoxic activity screening of *myrtus communis* l. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University.* 47(3): 827-835.  
<https://doi.org/10.33483/jfpau.1264321>
- Salachna, P., Pietrak, A., and Łopusiewicz, Ł. (2021).** Antioxidant Potential of Flower Extracts from *Centaurea* spp. Depends on Their Content of Phenolics, Flavonoids and Free Amino Acids. *Molecules.* 26(24): 7465.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26247465>
- Sangeetha, R. (2019).** Luteolin in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal.* 7(2): 393-398.  
<https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.2.09>
- Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., Ndiaye, B., and Diop, Y. M. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana*

- (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(3): 1263-1269.
- Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013).** Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 27(3): 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., and Marlowe, E. (1979).** A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*. 29(3): 559-566. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>
- Schmidt, T. (2006).** Structure-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*. 33: 309-392. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(06\)80030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(06)80030-X)
- Serbis, A., Kantza, E., Siomou, E., Galli-Tsinopoulou, A., Kanaka-Gantenbein, C., and Tigas, S. (2024).** Monogenic Defects of Beta Cell Function : From Clinical Suspicion to Genetic Diagnosis and Management of Rare Types of Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(19): 10501. <https://doi.org/10.3390/ijms251910501>
- Shah, N. A., and Khan, M. R. (2014).** Antidiabetic Effect of *Sida cordata* in Alloxan Induced Diabetic Rats. *BioMed Research Internationa*. 2014: 671294. <https://doi.org/10.1155/2014/671294>
- Sharma, A. K., Singh, S., Singh, H., Mahajan, D., Kolli, P., Mandadapu, G., Kumar, B., Kumar, D., Kumar, S., and Jena, M. K. (2022).** Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Cells*. 11(17): 2672. <https://doi.org/10.3390/cells11172672>
- Sheriff, O., Olayemi, O., Taofeeq, A., Riskat, K., Dangana, E., and Ibukunoluwa, A. (2020).** A New model for Alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *Journal of*

- Bangladesh Society of Physiologist.* 14: 56-62.  
<https://doi.org/10.3329/jbsp.v14i2.44785>
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Wagner, H., Verpoorte, R., & Heinrich, M. (2014).** Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology.* 154(3): 481-536.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007>
- Silva, C. J., Marques, A., Baracat-Pereira, M., Pinheiro, A., and Meira, R. M. (2012).** Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany.* 60: 707-717. <https://doi.org/10.1071/BT12149>
- Sisay, M., Engidawork, E., and Shibeshi, W. (2017).** Evaluation of the antidiarrheal activity of the leaf extracts of *Myrtus communis* Linn (Myrtaceae) in mice model. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 17(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1625-3>
- Smith, S. J., Lopresti, A. L., Teo, S. Y. M., and Fairchild, T. J. (2020).** Examining the Effects of Herbs on Testosterone Concentrations in Men : A Systematic Review. *Advances in Nutrition.* 12(3): 744-765. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa134>
- Souilah, N., Hakima, B., and Hamdi, B. (2021).** Biochemical properties and in vitro activities of extracts from two Asteraceae endemic species wild (Algeria). *Rhazes:Green Appl. Chem.* 11: 58-70.
- Srief, M., Bani, M., Mokrani, E. H., Mennai, I., Hamdi, M., Boumechhour, A., Abou Mustapha, M., Derdour, M., Kerkatou, M., and El-Shazly, M. (2023).** Evaluation of in vitro and in silico anti-Alzheimer potential of nonpolar extracts and essential oil from *Mentha piperita*. *Foods.* 12(1): 190.

- Srividya, G., Anjaneyulu, P., Prathyusha, G. S., and Rao, G. S. (2024).** In vitro therapeutic potential of selected flavonoids, polyphenols and vitamins against Alzheimer's disease. *Indian Journal of Animal Health*. 63(2): 303-308.
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., and Solujic, S. (2011).** Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 25(1): 2222-2227. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0020>
- Stefanello, M. É. A., Pascoal, A. C. R. F., and Salvador, M. J. (2011).** Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. *Chemistry & Biodiversity*. 8(1): 73-94. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000098>
- Suh, S., Pham, C., Smith, J., and Mesinkovska, N. A. (2020).** The Banned Sunscreen Ingredients and Their Impact on Human Health: A Systematic Review. *International journal of dermatology*. 59(9): 1033-1042. <https://doi.org/10.1111/ijd.14824>
- Szkudelski, T. (2001).** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 50(6): 537-546.
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76(4): 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
- Tadashi, K. (2023).** Regulation and function of glucose metabolism in health and diseases. *Diabetes Management*. 13(4): 502-503.
- Taha, M., Ullah, H., Al Muqarrabun, L. M. R., Khan, M. N., Rahim, F., Ahmat, N., Javid, M. T., Ali, M., and Khan, K. M. (2018).** Bisindolylmethane

thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 26(1): 152-160.

**Talebianpoor, M., Talebianpoor, M., Mansourian, M., and Vafaiee-Nejad, T. (2019).**

Antidiabetic activity of hydroalcoholic extract of *Myrtus communis* (myrtle) fruits in streptozotocin-induced and dexamethasone-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*. 11(2): 115. [https://doi.org/10.4103/pr.pr\\_160\\_18](https://doi.org/10.4103/pr.pr_160_18)

**Tallapragada, D. S. P., Bhaskar, S., and Chandak, G. R. (2015).**

New insights from monogenic diabetes for “common” type 2 diabetes. *Frontiers in Genetics*. 6: 251. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00251>

**Tamfu, A. N., Kucukaydin, S., Yeskaliyeva, B., Ozturk, M., and Dinica, R. M. (2021).**

Non-Alkaloid Cholinesterase Inhibitory Compounds from Natural Sources. *Molecules*. 26(18): 5582. <https://doi.org/10.3390/molecules26185582>

**Tas, S., Tas, B., Bassalat, N., and Jaradat, N. (2018).**

In-vivo, hypoglycemic, hypolipidemic and oxidative stress inhibitory activities of *Myrtus communis* L. fruits hydroalcoholic extract in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedical Research*. 29(13): 2727-2734. <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-708>

**Tehseen, I., Haq, T. U., Ilahi, I., Khan, A. A., Attaullah, M., Zamani, G. Y., Zaman, S.,**

**and Ismail, I. (2022).** Antidiabetic and hepato-renal protective effects of medicinal plants in STZ induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Biology*. 84: e260189. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260189>

**Teneva, O., Petkova, Z., Dobрева, A., Dzhurmanski, A., Stoyanova, L., & Angelova-**

**Romova, M. (2024).** *Centaurea benedicta*—A Potential Source of Nutrients and Bioactive Components. *Plants*. 13(24): 3579. <https://doi.org/10.3390/plants13243579>

- Thomas, L. (1998).** Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST). *Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2,* 55-65.
- Tiwari, A. K., and Rao, J. M. (2002).** Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals : Present status and future prospects. *Current Science.* 83(1): 30-38.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry.* 103(3): 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>
- Tran, N., Pham, B., and Le, L. (2020).** Bioactive Compounds in Anti-Diabetic Plants : From Herbal Medicine to Modern Drug Discovery. *Biology.* 9(9): 252. <https://doi.org/10.3390/biology9090252>
- Tumen, I., Senol, F. S., and Orhan, I. E. (2012).** Inhibitory potential of the leaves and berries of *Myrtus communis* L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 63(4): 387-392. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.629178>
- Usman, H., Abdulrahman, F., and Usman, A. (2009).** Qualitative Phytochemical Screening and In Vitro Antimicrobial Effects of Methanol Stem Bark Extract of *Ficus Thonningii* (Moraceae). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines.* 6(3): 289-295.
- Uysal, S., SiNan, K. I., and ZengiN, G. (2023).** Assessment of antioxidant and enzyme inhibition properties of *Myrtus communis* L. leaves. *International Journal of Secondary Metabolite.* 10(2): 166-174. <https://doi.org/10.21448/ijsm.1106464>
- Vafadar Shoshtari, Z., Rahimmalek, M., Sabzalian, M. R., and Hosseini, H. (2017).** Essential Oil and Bioactive Compounds Variation in Myrtle (*Myrtus communis* L.) as

- Affected by Seasonal Variation and Salt Stress. *Chemistry & Biodiversity*. 14(4): e1600365. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600365>
- Van den Boogaard, W. M. C., Komninos, D. S. J., and Vermeij, W. P. (2022).** Chemotherapy Side-Effects : Not All DNA Damage Is Equal. *Cancers*. 14(3): 627. <https://doi.org/10.3390/cancers14030627>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C. (Chrysa), Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., and Bezirtzoglou, E. (2022).** Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds : Focus on Antimicrobial Combination Effects. *Antibiotics*. 11(8): 1014. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>
- Variya, B. C., Bakrania, A. K., and Patel, S. S. (2020).** Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblca officinalis* : Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- $\gamma$  and Akt signaling. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 73: 152906. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152906>
- Vieira, T., Barco, J., Souza, S., Santos, A., Ismail, D., Rahali, S., Amdouni, N., Bastos, J., Martins, C. H., Ben Said, R., and Crotti, A. E. (2024).** In Vitro and In Silico Studies of the Antimicrobial Activity of Prenylated Phenylpropanoids of Green Propolis and Their Derivatives against Oral Bacteria. *Antibiotics*. 13: 787. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080787>
- Wandhammer, M., Carletti, E., Van der Schans, M., Gillon, E., Nicolet, Y., Masson, P., Goeldner, M., Noort, D., and Nachon, F. (2011).** Structural study of the complex stereoselectivity of human butyrylcholinesterase for the neurotoxic V-agents. *Journal of Biological Chemistry*. 286(19): 16783-16789.

- Weinberg Sibony, R., Segev, O., Dor, S., and Raz, I. (2024).** Overview of oxidative stress and inflammation in diabetes. *Journal of Diabetes*. 16(10): e70014. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.70014>
- Westwood, A. (1991).** The Analysis of Bilirubin in Serum. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 28(2): 119-130. <https://doi.org/10.1177/000456329102800202>
- Wikaningtyas, P., and Sukandar, E. Y. (2016).** The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(1): 16-19. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.08.003>
- Williams, A., Bissinger, R., Shamaa, H., Patel, S., Bourne, L., Artunc, F., and Qadri, S. M. (2023).** Pathophysiology of Red Blood Cell Dysfunction in Diabetes and Its Complications. *Pathophysiology*. 30(3): 327-345. <https://doi.org/10.3390/pathophysiology30030026>
- Yang, H., and Ping Dou, Q. (2010).** Targeting Apoptosis Pathway with Natural Terpenoids : Implications for Treatment of Breast and Prostate Cancer. *Current Drug Targets*. 11(6): 733-744. <https://doi.org/10.2174/138945010791170842>
- Yang, X.-W., Huang, M.-Z., Jin, Y.-S., Sun, L.-N., Song, Y., and Chen, H.-S. (2012).** Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia*. 83(7): 1169-1175. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.005>
- Yangui, I., Younsi, F., Ghali, W., Boussaid, M., and Messaoud, C. (2021).** Phytochemicals, antioxidant and anti-proliferative activities of *Myrtus communis* L. genotypes from Tunisia. *South African Journal of Botany*. 137: 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.040>
- Yin, J., Huang, Y., Wang, K., Zhong, Q., Liu, Y., Ji, Z., Liao, Y., Ma, Z., Bei, W., and Wang, W. (2024).** Ginseng extract improves pancreatic islet injury and promotes  $\beta$ -

- cell regeneration in T2DM mice. *Frontiers in Pharmacology*. 15: 1407200.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1407200>
- Yin, P., Wang, Y., Yang, L., Sui, J., and Liu, Y. (2018).** Hypoglycemic Effects in Alloxan-Induced Diabetic Rats of the Phenolic Extract from Mongolian Oak Cups Enriched in Ellagic Acid, Kaempferol and Their Derivatives. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. 23(5): 1046.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23051046>
- Yıldırım, N., Akın, M., and Saraçoğlu, H. T. (2022).** Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Centaurea balsamita* Lam. And *Centaurea coronopifolia* Lam. *Environmental Toxicology and Ecology*. 2(2): 107-114.
- Yıldız, F. (2024).** Investigation of the effects of Protocatechuic acid on apoptosis, oxidant and antioxidant status in Caco-2 colorectal cancer cells. *Acta Medica Alanya*. 8(2): 136-141. <https://doi.org/10.30565/medalanya.1503397>
- Yırtıcı, Ü., Ergene, A., Atalar, M. N., and Adem, Ş. (2022).** Phytochemical composition, antioxidant, enzyme inhibition, antimicrobial effects, and molecular docking studies of *Centaurea sivasica*. *South African Journal of Botany*. 144: 58-71.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.043>
- Yun, M.-K., Wu, Y., Li, Z., Zhao, Y., Waddell, M. B., Ferreira, A. M., Lee, R. E., Bashford, D., and White, S. W. (2012).** Catalysis and Sulfa Drug Resistance in Dihydropteroate Synthase. *Science (New York, N.Y.)*. 335(6072): 1110-1114.  
<https://doi.org/10.1126/science.1214641>
- Zafar, M., and Naeem-ul-Hassan Naqvi, S. (2010).** Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats : A Comparative Study. *International Journal of Morphology*. 28(1): 135-142.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000100019>

- Zang, Y., Igarashi, K., and Li, Y. (2016).** Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-A(y) mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 80(8): 1580-1586. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116928>
- Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., and Aktumsek, A. (2010).** In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10): 2638-2641. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.033>
- Zhang, C., Li, J., Hu, C., Wang, J., Zhang, J., Ren, Z., Song, X., and Jia, L. (2017).** Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Heridium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice. *Scientific Reports*. 7(1): 10847. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11457-w>
- Zhang, H., Colclough, K., Gloyn, A. L., and Pollin, T. I. (2021).** Monogenic diabetes : A gateway to precision medicine in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 131(3): e142244 <https://doi.org/10.1172/JCI142244>
- Zhang, T., Ma, L., Wu, P., Li, W., Li, T., Gu, R., Dan, X., Li, Z., Fan, X., and Xiao, Z. (2019).** Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway. *Oncology Reports*. 41(3): 1779-1788. <https://doi.org/10.3892/or.2019.6976>
- Zhao, X.-L., Cao, Z.-J., Li, K.-D., Tang, F., Xu, L.-Y., Zhang, J.-N., Liu, D., Peng, C., and Ao, H. (2025).** Gallic acid : A dietary metabolite's therapeutic potential in the management of atherosclerotic cardiovascular disease. *Frontiers in Pharmacology*. 15: 1515172. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1515172>
- Zhao, Y., Shadrack, W. R., Wallace, M. J., Wu, Y., Griffith, E. C., Qi, J., Yun, M.-K., White, S. W., and Lee, R. E. (2016).** Pterin-sulfa conjugates as dihydropterolate

synthase inhibitors and antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(16): 3950-3954. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.006>

**Zidi, S. (2010).** Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique potentiel d'un extrait aqueux de crataegus azarolus chez des rats wistar avec un diabète induit à l'alloxane. (Doctoral dissertation, Annaba)

**Zilkah, S., and Goldschmidt, E. E. (2014).** Myrtle (*Myrtus communis* L.) – A Native Mediterranean and Cultured Crop Species. In Z. Yaniv & N. Dudai (Éds.), *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East*. 253-267. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9276-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9276-9_14)