



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

THESE

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

Thème

Caractérisation et comparaison de quelques extraits naturels et mise en évidence de leurs activités biologiques

Présentée par : M^{elle} MENASRI Horia

Devant le Jury

Pr. BASLI Abdelkader	Professeur	Président	Université de Skikda.
Pr. ZAIDI Nedjoua	Professeur	Directrice de thèse	Université de Skikda.
Dr. KHADRI Sihem	Maitre de conference B	Co-directrice de thèse	Université de Skikda.
Pr. AYAD Radia	Professeur	Examinatrice	Université de Jijel.
Dr. BENZAZIA Samia	Maitre de conference A	Examinatrice	Université de Skikda.
Dr. ENNAGHRA Nadjjet	Maitre de conference A	Examinatrice	Université de Skikda.

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

*En premier lieu, je remercie **Allah** le Tout-Puissant, le Clément et le Miséricordieux, pour la force, la volonté et le courage qu'Il m'a accordés tout au long de ce parcours et qui m'ont permis d'achever cette thèse.*

*Je remercie également les membres du jury, à savoir **Pr. BASLI Abdelkader, Pr. AYAD Radia, Dr. BENZAZIA Samia, et Dr. ENNAGHRA Nadjjet**, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs remarques constructives.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Pr. ZAIDI Nedjoua**, ma directrice de thèse, pour sa précieuse direction, ses conseils avisés et son soutien constant tout au long de cette recherche.*

*Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à ma co-directrice de thèse, **Dr. KHADRI Sihem**, pour son aide durant cette recherche.*

*Mes remerciements vont également à toute l'équipe du **Laboratoire des Interactions, Biodiversité, Écosystèmes et Biotechnologie** de l'Université de **Skikda**. Je suis très reconnaissante envers mes collègues, chercheurs et collaborateurs qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours.*

*Je remercie tout particulièrement Monsieur **Bencouici Chawki**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de recherche du Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine.*

*Je tiens également à exprimer ma gratitude au **Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC)** à Ouargla, pour sa précieuse collaboration.*

*Je n'oublie pas ma famille, en particulier mon père **Menasri Bachir** et ma mère **Fortas Safia**, pour leur patience, leur amour et leur encouragement tout au long de ce parcours académique.*

Enfin, Je tiens à adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À mes chers parents, qui ont été une source constante d'inspiration et de soutien tout au long de mon parcours académique. Je leur dédie ce travail, qui n'aurait pu être achevé sans leur encouragement inlassable et leur amour infini. Leurs sacrifices et leurs conseils ont été la raison principale de cette réussite, et je leur suis redevable de tout ce que j'ai accompli.

À tous les membres de ma famille, qui ont été mon soutien et mon refuge à chaque étape de ce travail. Le soutien moral et matériel qu'ils m'ont apporté n'a pas été de simples mots, mais un véritable appui dans les moments difficiles et face aux obstacles. Ils ont toujours été à mes côtés, m'encourageant et me donnant la force de persévérer. Grâce à eux, j'ai pu surmonter tous les défis rencontrés.

À mes amis et collègues, qui m'ont épaulée et offert un soutien moral et matériel durant les périodes difficiles. Leur présence a été une source de réconfort et d'encouragement continu. Sans leur aide et leur collaboration, je n'aurais pas pu mener ce travail à terme.

À mes professeurs respectés, qui m'ont enseignée, guidée, et conseillée avec bienveillance. Leurs recommandations ont toujours été précieuses, tant dans les aspects de la recherche scientifique que dans la manière de surmonter les difficultés académiques. Je leur adresse mes plus sincères remerciements et ma profonde gratitude, car leur contribution à mon parcours est inestimable.

Table des matières

Liste des figures

List des tableaux

Liste des abréviations

Résumés

1. INTRODUCTION	1
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1. Médecine traditionnelle	4
2.2. Phytothérapie et plantes médicinales	4
2.3. Substances naturelles issues du métabolisme secondaire	4
2.3.1. Polyphénols	5
2.3.2. Terpènes	11
2.3.3. Alcaloïdes.....	13
2.4. Méthodes d'extraction	13
2.4.1. Méthodes d'extraction conventionnelles.....	14
2.4.2. Méthodes d'extraction verte.....	16
2.5. Activités biologiques des composés bioactifs	18
2.5.1. Activité antioxydante	18
2.5.2. Activité anti-enzymatique	22
2.5.3. Activité antimicrobienne.....	25
2.5.4. Activité cytotoxique	29
2.6. Enquêtes ethnobotaniques des plantes médicinales	32
2.7. Aperçu sur les espèces sélectionnées	33
2.7.1. <i>Achillea ligustica</i>	33
2.7.2. <i>Borago officinalis</i>	35

3. MATERIELS ET METHODES	33
3.1. Enquête Ethnobotanique	33
3.1.1. Présentation et description des zones d'étude	33
3.1.2. Étude ethnobotanique.....	34
3.1.3. Analyse des données ethnobotaniques	35
3.2. Matériel végétal	36
3.3. Étude Phytochimique.....	38
3.3.1. Préparation des extraits par macération et fractionnement	38
3.3.2. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques	40
3.3.3. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	40
3.3.4. Analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (LC-ESI-MS/MS).....	41
3.4. Activités Biologiques	41
3.4.1. Activité antioxydante	41
3.4.2. Évaluation de l'activité anti-enzymatique.....	46
3.4.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	50
3.4.4. Évaluation de l'activité cytotoxique sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	53
3.5. Analyse Statistique	53
4. RESULTATS ET DISCUSSION	55
4.1. Enquête Ethnobotanique	55
4.2. Étude Phytochimique	70
4.3. Activités biologiques.....	80
4.4. Comparaison des activités biologiques des deux espèces <i>A. ligustica</i> et <i>B. officinalis</i> ..	102
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	110
ANNEXES	137

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique des principaux acides (a) hydroxybenzoïques (b) hydroxycinnamiques.	7
Figure 2 : Principales classes de flavonoides.....	8
Figure 3 : Structure de base des (a) tanins condensés et (b) tanins hydrolysables.....	10
Figure 4 : Structures de bases des (a) Coumarines simples, (b) Furanocoumarines et (c) Pyranocoumarines.	10
Figure 5 : Structure de base des lignanes	11
Figure 6 : Structure chimique d'isoprène (C ₅ H ₈).....	12
Figure 7 : Structures des noyaux hétérocycliques des alcaloïdes.....	13
Figure 8 : Les classes des antioxydants naturels.	21
Figure 9 : Mécanismes de résistances bactériennes	27
Figure 10 : Morphologie des larves d' <i>Artemia salina</i>	31
Figure 11: Représentation géographique des sites d'enquête	33
Figure 12 : Localisation géographique des sites de récolte des deux espèces (<i>A. ligustica</i>) et (<i>B. officinalis</i>).....	37
Figure 13: Illustration photographique des espèces étudiées ; <i>A. ligustica</i> (a) et <i>B. officinalis</i> (b)..	38
Figure 14: Schéma des étapes d'extraction liquide-liquide.	39
Figure 15 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant	42
Figure 16 : Équation chimique de la réaction entre le cation-radical ABTS ⁺ et l'antioxydant (AOH).....	44
Figure 17 : Réaction de réduction du complexe Fe ³⁺ en Fe ²⁺ dans le test FRAP phénanthroline FeCl ₃	45
Figure 18: Formation du complexe orange-rouge entre la 1,10-phénanthroline et le Fe ²⁺	46
Figure 19: Distribution des absorbances correspondantes à chaque puits dans la microplaque pendant l'analyse de l' activité inhibitrice de l'α-amylase	48

Figure 20 : Distribution des solutions correspondantes à chaque puits dans la microplaque pendant la détermination de la CMI par microdilution	52
Figure 21 : Profils des informateurs enquêtés selon le sexe (a), la catégorie d'âge (b), la situation familiale (c), le lieu de résidence (d), le niveau d'éducation (e) et la profession (f).....	56
Figure 22 : Fréquence d'utilisation des principales familles botaniques par la population étudiée	58
Figure 23 : Fréquence d'utilisation des différentes parties des plantes médicinales	59
Figure 24 : Fréquence des différents modes de préparation des plantes médicinales	60
Figure 25 : Fréquence des différents modes d'administration et d'emploi des plantes médicinales.....	61
Figure 26 : Répartition des affections traitées par les plantes médicinales de la population étudiée	62
Figure 27 :Rendements des fractions de l'espèce de l'espèce <i>A. ligustica</i>	71
Figure 28 : Rendements des fractions l'espèce <i>B. officinalis</i>	71
Figure 29 : Inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées par les extraits d' <i>A. ligustica</i>	96
Figure 30 : Inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées par les extraits de <i>B. officinalis</i>	99

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification taxonomique de l'espèce <i>A. ligustica</i>	33
Tableau 2 : Classification taxonomique de l'espèce <i>B. officinalis</i>	35
Tableau 3 : Liste des plantes médicinales citées par les personnes enquêtées (N = 89) et calcul de l'indice de valeur d'usage (VUs).....	62
Tableau 4 : Distribution des catégories pathologiques selon les espèces végétales.	66
Tableau 5 : Valeurs du FCI calculées pour les maladies prises en charge par la population locale dans les zones d'étude.....	69
Tableau 6 : Taux de polyphénols et flavonoïdes des deux espèces étudiées	72
Tableau 7 : Analyse des composés bioactifs des fractions de l'espèce <i>A. ligustica</i> par LC-ESI-MS/MS.	74
Tableau 8 : Analyse des composés bioactifs des fractions de l'espèce <i>B. officinalis</i> par LC-ESI-MS/MS.	79
Tableau 9 : Activité antioxydante des différents extraits de l'espèce <i>A. ligustica</i>	82
Tableau 10 : Activité antioxydante des différents extraits de l'espèce <i>B. officinalis</i>	85
Tableau 11 : Activité inhibitrice de l'AChE et de la BChE par les fractions de <i>B. officinalis</i> .87	
Tableau 12 : Activité inhibitrice de l' α -amylase des fractions d' <i>A. ligustica</i> et <i>B. officinalis</i>	90
Tableau 13 : Activité inhibitrice de l'uréase des fractions d' <i>A. ligustica</i> et <i>B. officinalis</i>	91
Tableau 14 : Activité antimicrobienne de l'espèce <i>A. ligustica</i>	94
Tableau 15 : Activité antimicrobienne de l'espèce <i>B. officinalis</i>	97
Tableau 16 : Activité cytotoxique des extraits d' <i>A. ligustica</i> et <i>B. officinalis</i> sur les larves d' <i>Artémia salina</i>	100
Tableau 17 : Évaluation comparative des propriétés biologiques des deux plantes médicinales étudiés (<i>A. ligustica</i> et <i>B. officinalis</i>).	106

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-azinobis-3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

AcOEt : Acétate d'éthyle

AChE : Acétylcholinestérase

ANOVA : Analyse de la variance

ATCC : American Type Culture Collection

BChE : Butyrylcholinestérase

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CHCl₃ : Chloroforme (extrait chloroformique)

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

DF : Degré de fidélité

CL₅₀: Concentration létale 50%

DPPH: 1,1'-diphényl-2-picrylhydrazyle

EC: Équivalents de catéchine

EQ : Équivalents de quercétine

ET: Équivalents de Tocophérol

EAG: Équivalents d'acide gallique

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

FCI: Facteur de consensus des informateurs

FC: Folin-Ciocalteu

FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici

FAO : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FRAP : ferric reducing antioxidant potential (pouvoir antioxydant réducteur du fer)

GPx: Glutathion peroxidase

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

LC-ESI-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray

MTT : Test de réduction du bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium

n-BuOH : n-butanol (extrait butanolique)

n-hex : Hexane (extrait hexanique)

O₂⁻ : Radical superoxide

OH• : Radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDA : Potato Dextrose Agar (milieu de culture)

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales algériennes et de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques naturels, cette thèse a porté sur une enquête ethnobotanique et sur l'étude de deux espèces, *Achillea ligustica* (Asteraceae) et *Borago officinalis* (Boraginaceae), choisies en fonction des résultats obtenus dans les régions de Mila et de Skikda. L'enquête a révélé une richesse culturelle et un usage traditionnel bien ancrés, orientant l'étude vers l'analyse phytochimique et l'évaluation pharmacologique. Les extraits ont été préparés par macération hydroalcoolique suivie d'un fractionnement, puis analysés pour déterminer les teneurs totales en composés phénoliques (méthode de Folin-Ciocalteu) et en flavonoïdes (méthode au trichlorure d'aluminium), tandis que la caractérisation qualitative et quantitative des composés a été réalisée par LC-ESI-MS/MS, permettant d'identifier notamment l'acide chlorogénique, l'acide coumarique, l'acide gallique, la naringénine, le kaempférol, la myricétine, la quercétine et la rutine. L'activité antioxydante, évaluée par les méthodes DPPH, ABTS, FRAP et phénanthroline, a mis en évidence un fort pouvoir antiradicalaire, particulièrement marqué pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *A. ligustica*. L'étude anti-enzymatique a montré une inhibition marquée des cholinestérases par *B. officinalis*, ainsi qu'une activité significative des deux espèces contre l' α -amylase (IC_{50} de $199,92 \pm 3,80$ à $334,32 \pm 1,87$ $\mu\text{g/mL}$) et l'uréase (IC_{50} de $39,52 \pm 0,48$ à $97,66 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$). L'activité antimicrobienne a révélé que *A. ligustica* présentait les zones d'inhibition bactérienne les plus élevées (jusqu'à 14 mm) et des CMI comprises entre 0,125 et 0,25 mg/mL, en plus d'une inhibition totale de certains champignons phytopathogènes après 48 heures. Enfin, les tests de cytotoxicité réalisés sur *Artemia salina* ont indiqué une faible toxicité pour *A. ligustica* et une toxicité modérée pour *B. officinalis*. Ces résultats mettent en évidence le potentiel pharmacologique prometteur des deux espèces étudiées et ouvrent la voie à leur valorisation dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots clés : Enquête ethnobotanique, *Achillea ligustica*, *Borago officinalis*, Polyphénols, Flavonoïdes, LC-ESI-MS/MS, Activités biologiques.

Abstract

In the context of valorizing Algerian medicinal plants and exploring new natural therapeutic agents, this thesis combined an ethnobotanical survey with phytochemical and pharmacological investigations of *Achillea ligustica* (Asteraceae) and *Borago officinalis* (Boraginaceae). The ethnobotanical survey, conducted in the regions of Mila and Skikda, revealed a significant cultural richness related to the traditional use of medicinal plants within the studied population. Plant materials were extracted by maceration in 70% methanol (MeOH/H₂O: 70/30, v/v) for 24 hours under agitation, followed by successive liquid–liquid partitioning into solvents of increasing polarity (n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol). Extraction yields were calculated for each fraction, with *A. ligustica* exhibiting the highest yield in the n-butanol fraction (6.4%) and *B. officinalis* in the same fraction (1.6%). Total phenolic and flavonoid contents were determined spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteu and aluminium chloride (AlCl₃) methods, respectively. Qualitative and quantitative characterization of phenolic constituents was carried out by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *A. ligustica* contained the highest levels of total phenolic compounds (151.25 ± 2.39 µg GAE/mg extract) and flavonoids (54.38 ± 0.29 µg QE/mg in the ethyl acetate fraction). Several major phenolic acids, including chlorogenic, *p*-coumaric, and gallic acids, as well as flavonoids such as naringenin, kaempferol, myricetin, quercetin, and rutin, were identified in both species. Biological activities were assessed through multiple *in vitro* assays. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH, ABTS, FRAP, and phenanthroline assays, revealing strong radical scavenging and reducing activities, particularly for the ethyl acetate fraction of *A. ligustica*. Anti-enzymatic potential was investigated against cholinesterases, α-amylase, and urease using standard inhibition assays. *B. officinalis* exhibited marked cholinesterase inhibition, while both species showed significant α-amylase (IC₅₀: 199.92 ± 3.80 to 334.32 ± 1.87 µg/mL) and urease inhibition (IC₅₀: 39.52 ± 0.48 to 97.66 ± 0.92 µg/mL). Antimicrobial activity was determined via agar disk diffusion and broth microdilution methods. *A. ligustica* displayed bacterial inhibition zones up to 14 mm and minimum inhibitory concentrations between 0.125 and 0.25 mg/mL, and its ethyl acetate fraction completely inhibited the growth of phytopathogenic fungi within 48 hours. Cytotoxicity was assessed using the *Artemia salina* lethality assay, indicating low toxicity for *A. ligustica* and moderate toxicity for *B. officinalis*.

Overall, the combination of ethnobotanical insights, detailed phytochemical profiling, and comprehensive bioactivity evaluation highlights these two Algerian species as valuable reservoirs of bioactive metabolites with promising therapeutic potential.

Keywords: Ethnobotanical survey, *Achillea ligustica*, *Borago officinalis*, polyphenols, flavonoids, LC-ESI-MS/MS, biological activities.

المخلص

في إطار تثمين النباتات الطبية الجزائرية والبحث عن عوامل علاجية طبيعية جديدة، ركزت هذه الأطروحة على إجراء استبيان ميداني حول النباتات المستخدمة في الطب التقليدي من قبل سكان ولايتي سكيكدة وميلة (شمال شرق الجزائر)، بالإضافة إلى تقييم الفعالية البيولوجية لنوعين نباتيين *Achillea ligustica* من عائلة Asteraceae و *Borago officinalis* من عائلة Boraginaceae. بهدف تقييم تركيبهما الكيميائي وخصائصهما البيولوجية. تم جمع العينات النباتية وتجفيفها وطحنها، ثم خضعت لعملية استخلاص بالطريقة الصلبة-السائلة باستخدام محلول مائي-ميثانولي (70%)، تلتها عملية فصل سائل-سائل للحصول على مستخلصات ذات مستويات مختلفة من القطبية. تم تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية والفلافونويدات باستخدام طريقتي Folin-Ciocalteu و $AlCl_3$ ، كما أجريت تحليلات نوعية وكمية بواسطة LC-ESI-MS/MS لتحديد المركبات الفعالة. قُيِّمت الأنشطة المضادة للأكسدة باستعمال عدة اختبارات (DPPH، ABTS، FRAP، و *phénanthroline*)، إلى جانب اختبار النشاط المثبط للإنزيمات (الكولينستيراز، الفاميلاز، واليوريز)، والنشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة انتشار الأقراص وتحديد التركيز المثبط الأدنى، والنشاط المضاد للفطريات الممرضة للنبات، بالإضافة إلى تقييم السمية الخلوية على يرقات *Artemia salina*. كشفت نتائج الاستبيان عن ثراء ثقافي كبير في المعرفة المرتبطة بالاستخدام التقليدي للنباتات الطبية لدى المجتمع المحلي. أما التحاليل الكيميائية النباتية، فقد أظهرت أن *Achillea ligustica* قَدِّمت أعلى مردود استخلاص في مستخلص ال- *n-butanol* بنسبة 6.4%، في حين سجلت *Borago officinalis* أعلى مردود في نفس المستخلص بنسبة 1.6%. من الناحية الكمية، احتوت *Achillea ligustica* على أعلى تركيز من المركبات الفينولية الكلية بقيمة $(151.25 \pm 2.39 \mu\text{g}/\text{mg})$ والفلافونويدات $(54.38 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mg})$ في مستخلص أسيتات الإيثيل. سمحت التحليلات النوعية بتقنية LC-ESI-MS/MS بتحديد عدة مركبات فينولية رئيسية مشتركة بين النوعين، مثل: حمض الكلوروجينيك، حمض الكوماريك، وحمض الجاليك. كما تم التعرف على عدة فلافونويدات من بينها: نارينجين، كايامفيرول، ميريسيتين، كيرسيتين، وروتين. أظهرت المستخلصات من كلا النوعين فعالية عالية كمضادات أكسدة عبر اختبارات متعددة، مع تميز مستخلص أسيتات الإيثيل لـ *Achillea ligustica* بنشاط مرتفع على وجه الخصوص. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للإنزيمات، أظهرت *Borago officinalis* فعالية ملحوظة في تثبيط إنزيمات الكولينستيراز، بينما لم تُظهر *Achillea ligustica* نشاطاً مهماً إتجاه هاته الإنزيمات. من ناحية أخرى، أظهرت النبتتان نشاطاً مثبطاً مهماً ضد إنزيم α -amylase بقيم IC_{50} تراوحت بين $(3.80 \pm 1.87) \mu\text{g}/\text{mL}$ و $(334.32 \pm 1.87) \mu\text{g}/\text{mL}$ ، وكذلك ضد إنزيم urease بقيم IC_{50} بين (0.48 ± 39.52) و $(97.66 \pm 0.92) \mu\text{g}/\text{mL}$. تم تأكيد النشاط المضاد للميكروبات لدى كلا النوعين، حيث سجلت *Achillea ligustica* مناطق تثبيط بكتيري وصلت إلى 14 mm، مع تركيزات تثبيط دنيا (MIC) تراوحت بين 0.125 و 0.25 mg/mL. كما أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل الخاص بها تثبيطاً كاملاً لنمو الفطريات الممرضة للنبات بعد 48 ساعة من المعالجة. أخيراً، أشارت اختبارات السمية الخلوية باستخدام يرقات *Artemia salina* إلى سمية منخفضة لدى *Achillea ligustica*، وسمية معتدلة لدى *Borago officinalis*. تدل هذه النتائج على أن النوعين المدروسين يمثلان مصدرًا واعدًا للمركبات النشطة بيولوجيًا، التي قد تحمل خصائص علاجية مهمة للاستخدامات الطبية المستقبلية.

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية، الاستبيانات الإثنوبوتانية، *Achillea ligustica*، *Borago officinalis*، المركبات متعددة الفينولات، الفلافونويدات، LC-ESI-MS/MS، الأنشطة البيولوجية.

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

L'utilisation de produits naturels comme ressource thérapeutique est aussi ancienne que la civilisation humaine et, pendant longtemps, les végétaux ont constitué la seule source de substances bioactives (Kornberg, 1997). Au fil de l'histoire, les humains ont toujours eu recours aux ressources de la nature, dans le but d'améliorer leurs conditions de vie et de garantir leur survie (Bernardini *et al.*, 2018). Près de 80 % de la population mondiale utilise des médicaments à base de plantes pour répondre à ses besoins essentiels en santé, tandis que jusqu'à 90 % de la population des pays en développement fait appel aux plantes médicinales (Murad *et al.*, 2011). Au fil du temps, les plantes ont été sélectionnées et classées, et des techniques de culture ont été mises en place. Les plantes aux vertus thérapeutiques étaient utilisées de manière traditionnelle, un savoir transmis de génération en génération (T. Ali *et al.*, 2022). L'usage des plantes médicinales dans le maintien et la récupération de la santé s'est fait au cours du temps, évoluant des formes les plus simples de traitement jusqu'aux technologies de fabrication de médicaments industriels. Toutefois, il existe d'énormes différences entre ces deux modes d'utilisation. Dans les deux cas, l'être humain a mené des recherches et découvert des composés bioactifs produisant des effets bénéfiques sur l'organisme (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018). Les substances actives des plantes médicinales sont les produits du métabolisme primaire et secondaire. Chaque famille, espèce, et même chaque partie de la plante peut présenter une composition et une concentration différentes de ces substances, ce qui explique la diversité des effets thérapeutiques observés. Certaines substances actives végétales peuvent cependant être nocives pour l'organisme humain (Butnariu & Bocso, 2022).

Les plantes médicinales sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle africaine depuis longtemps, et leur usage a pris une place de plus en plus importante dans la société moderne. Initialement, les populations employaient les plantes à des fins nutritionnelles, mais avec la découverte de leurs propriétés médicinales, la flore est devenue une source essentielle pour la guérison des maladies et l'amélioration de la santé (Mahomoodally, 2013). Selon Sofowora (1996), la médecine traditionnelle en Afrique continue de jouer un rôle crucial dans la santé publique, en raison des défis économiques et sanitaires, notamment la difficulté d'accès de la population aux soins médicaux et pharmaceutiques. Cela renforce la dépendance aux systèmes médicaux traditionnels fondés sur des remèdes à base de plantes, utilisés pour la prévention des maladies, le maintien de la santé ou le traitement des affections.

L'Algérie englobe une grande biodiversité, avec des activités biologiques pertinentes, couramment exploitées dans les préparations de la médecine populaire. Son climat caractéristique contribue de manière significative à la présence naturelle d'espèces ayant une grande valeur économique, utilisées dans des secteurs allant de l'industrie pharmaceutique et cosmétique à l'industrie alimentaire et chimique (Belhouala & Benarba, 2021). Dans ce pays l'usage des plantes médicinales est profondément ancrée dans la pratique indigène, influencée par la culture africaine, donnant naissance à une vaste culture populaire (Fajinmi *et al.*, 2017).

Le retour à la médecine naturelle ou traditionnelle nécessite une position très ferme de la part des milieux académiques. Il est préoccupant aujourd'hui de constater, à travers les enquêtes ethnobotaniques, l'utilisation indiscriminée de plantes médicinales sans aucune connaissance phytochimique, pharmacologique et toxologique. Ces enquêtes révèlent que cela concerne la majorité des espèces végétales consommées par la population (Cerqueira *et al.*, 2020). La phytothérapie existe principalement sur le marché informel, ce qui représente un grand danger pour la santé de la population (Boullata & Nace, 2000). L'identification correcte des espèces, leurs compositions chimiques et activités biologiques, ainsi que le contrôle de qualité, sont également des questions à résoudre. Cela offre aux laboratoires spécialisés (herboristeries, pharmacies de préparation, industries de phytothérapie, établissements d'enseignement pharmaceutique) les conditions nécessaires pour effectuer leur préparation, commercialisation ou étude, en toute sécurité, fondée sur des connaissances scientifiques (Ahmad *et al.*, 2006).

Face aux limites thérapeutiques et aux effets indésirables fréquemment associés aux médicaments conventionnels, les recherches actuelles s'orientent de plus en plus vers l'exploration d'alternatives naturelles (Najmi *et al.*, 2022). Ces dernières années, de grands progrès scientifiques ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes d'action de diverses classes de composés phytochimiques, tels que les composés phénoliques, constitués d'acides phénoliques et de flavonoïdes, des substances bioactives très présentes dans les plantes médicinales (B. R. Albuquerque *et al.*, 2021), qui ont montré un large spectre d'activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, antidiabétique, ainsi que l'activité cytotoxique, entre autres (Y. Zhang *et al.*, 2022).

Une autre activité actuellement très étudiée dans les plantes est leur potentiel antioxydant dans les extraits et/ou les substances isolées. Les antioxydants naturels présents dans les plantes agissent en inhibant les espèces réactives de l'oxygène (ERO), lesquelles sont impliquées dans

plusieurs physiopathologies tels que le cancer, les troubles métaboliques, digestives, cardiovasculaires et neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Gasmi *et al.*, 2022).

Cette thèse se concentre sur l'étude de deux plantes médicinales spécifiques, *Achillea ligustica* et *Borago officinalis*, en vue d'explorer leur potentiel thérapeutique. L'objectif principal est de relier les savoirs ethnobotaniques traditionnels à une analyse scientifique rigoureuse, afin de valider les usages traditionnels de ces plantes à travers des tests phytochimiques et biologiques approfondis. Pour cela, la structure de cette recherche se divise en trois parties distinctes :

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique détaillée sur les plantes médicinales, leur composition chimique et leurs diverses applications thérapeutiques. Cette section met également en lumière les propriétés bioactives des plantes étudiées.

- La deuxième partie présente la méthodologie expérimentale, qui inclut une enquête ethnobotanique permettant la récolte des plantes, leur identification botanique, ainsi que l'analyse phytochimique de leurs extraits. Cette partie explore également les méthodes utilisées pour évaluer les activités biologiques des extraits, telles que l'antioxydant, anti-enzymatique, antimicrobienne et cytotoxique.

- La troisième partie présente les résultats expérimentaux obtenus et une discussion approfondie des données, en les comparant avec les résultats d'études similaires pour mieux comprendre l'efficacité thérapeutique des plantes étudiées.

Enfin, cette thèse se conclut par une synthèse des principaux résultats et propose des perspectives pour l'exploitation de ces plantes dans le développement de nouveaux traitements médicaux.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle est un ensemble de connaissances, de compétences et d'expériences basées sur des théories, des croyances et des expériences provenant de différentes cultures, utilisées pour traiter et prévenir diverses maladies, qu'elles soient physiques ou mentales. Dans de nombreux pays, elle est également désignée sous le terme de médecine alternative ou complémentaire. La forme la plus populaire de médecine traditionnelle est le traitement à base de plantes (phytothérapie), utilisé dans les pays en développement par jusqu'à 80 % des régions comme soins de santé primaires (Yuan *et al.*, 2016).

2.2. Phytothérapie et plantes médicinales

Le terme phytothérapie provient du mot grec "phyton" (plante) et "therapy" (guérison), signifiant "guérison par les plantes". C'est un domaine scientifique qui se consacre au traitement et à la prévention des maladies en utilisant des plantes médicinales et des produits végétaux. Les plantes médicinales sont celles qui, en étant introduites dans le corps humain ou animal ou en entrant en contact avec lui, déclenchent une activité pharmacologique (Miraldi & Bains, 2019). Elles sont depuis longtemps appréciées pour leur contenu en substances biologiquement actives, qui ont un effet positif sur la santé humaine. En médecine, les plantes médicinales occupent toujours une place importante et sont principalement utilisées pour la prévention, mais aussi dans le traitement des maladies et pour la régénération générale de l'organisme. Selon les estimations de la FAO (2002), il existe plus de 50 000 plantes médicinales. Environ 80 % de la population mondiale, soit près de deux milliards de personnes, dépend principalement des plantes médicinales (Chi, 1994). Les substances contenues de ces plantes sont des produits issus du métabolisme primaire et, principalement, du métabolisme secondaire dont les plus importantes sont les huiles essentielles, les phénols simples, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, quinones, les alcaloïdes et les glycosides (Bernhoft, 2010).

2.3. Substances naturelles issues du métabolisme secondaire

Bien que la quantité de substances isolées à partir des organismes vivants soit énorme, il existe certaines substances et réactions biologiques communes à tous les organismes, telles que la synthèse et la dégradation des hydrocarbures, des acides gras, des protéines et des acides nucléiques. Ces réactions sont appelées réactions métaboliques primaires et leurs produits sont

des métabolites primaires (Butnariu & Bocso, 2022). Les métabolites primaires servent de substrats de base pour le métabolisme secondaire. Bien que la biogenèse des métabolites secondaires dépende de quelques métabolites primaires, il existe de nombreuses voies conduisant à la transformation en divers métabolites secondaires, tout comme il existe une multitude de produits finaux (Tiwari & Rana, 2015).

Les métabolites secondaires sont accumulés par les plantes grâce à la structure de leurs cellules et de leurs organes (composée de vacuoles, parois cellulaires, plastides, plasmodesmes, idioblastes, canaux lactés, intercellulaires et trichomes glandulaires) (Crozier *et al.*, 2006). Il est supposé que la plupart de ces substances, dont environ 100 000 sont actuellement connues, jouent un rôle dans le mécanisme de défense des plantes, qui s'est développé au cours de millions d'années de coexistence avec des organismes nuisibles (Erb & Kliebenstein, 2020). Le rôle des métabolites secondaires dans la réaction de défense de la plante varie; certains agissent directement de manière toxique sur les organismes cibles, tandis que d'autres servent de substances de communication (Martín & Liras, 2019).

Des théories suggèrent que la biogenèse de certains types de substances est particulièrement fonctionnelle en relation avec leur action contre un type particulier de pathogène, de prédateur, d'agent pollinisateur, d'espèce végétale envahissante ou pour se protéger d'un phénomène physique (Divekar *et al.*, 2022). Cependant, les métabolites secondaires ne sont pas uniquement des substances de protection; ils jouent souvent aussi le rôle d'attractants (monoterpènes odorants, caroténoïdes) et parfois, la structure de la molécule du métabolite permet de remplir les deux fonctions (Bartley *et al.*, 1994). Ces substances (les métabolites secondaires) peuvent être classés essentiellement en trois grandes catégories: les phénols, les terpènes et les alcaloïdes (González Mera *et al.*, 2019).

2.3.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels appartenant aux métabolites secondaires, qui résultent de deux principales voies de synthèse: Voie du shikimate (phénylpropanoïde) et la voie acétate-malonate dans les plantes (Zagoskina *et al.*, 2023). Ils jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction, fournissent une protection contre les pathogènes et les prédateurs, et contribuent aux caractéristiques colorées et sensorielles des plantes. En plus de leurs fonctions importantes dans les plantes, les polyphénols présentent également une large gamme de propriétés bénéfiques pour la santé humaine, telles que des effets anti-allergènes,

anti-inflammatoires, antimicrobiens, antioxydants, antithrombotiques, cardioprotecteurs et neuroprotecteurs (Li *et al.*, 2014).

Les composés phénoliques sont des substances qui possèdent au moins un noyau aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles attachés. Leur structure est très variée ; les phénols simples comprennent les composés qui possèdent un seul anneau aromatique lié à un ou plusieurs groupes hydroxyles. Par contre, les polyphénols sont ceux qui possèdent plusieurs anneaux phénoliques dans leur structure (Cheynier, 2012). Ils sont classés en fonction du nombre et de l'arrangement de leurs atomes de carbone. Ils se retrouvent couramment sous forme de conjugués avec des acides organiques ou des glucides, où un ou plusieurs résidus sucrés sont liés à des groupes hydroxyles, mais il existe aussi des liaisons directes du sucre (polysaccharide ou monosaccharide) au carbone aromatique (Abbas *et al.*, 2017).

Les principaux groupes de composés phénoliques sont : les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques), les flavonoïdes (flavanones, isoflavones, flavanols, flavones et anthocyanidines...), les tanins, les coumarines et les lignanes (Bertelli *et al.*, 2021).

2.3.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques (Figure 1), représentent une classe importante de substances phénoliques ayant des fonctions biologiquement actives. On les trouve généralement dans les plantes et les produits alimentaires (Martins *et al.*, 2011). D'un point de vue chimique, ce sont toutes les composés organiques qui possèdent au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxyle phénolique. Cependant, selon leur structure, ils se divisent en deux sous-groupes : dérivés des acides hydroxybenzoïques et dérivés des acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques, qui ont une structure commune C6-C1, sont les plus simples trouvés dans la nature et incluent les acides gallique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et syringique. Les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques, possèdent neuf atomes de carbone avec (C6-C3), et les plus courants sont les acides caféïque, férulique, p-coumarique et synaptique (Lafay & Gil-Izquierdo, 2008).

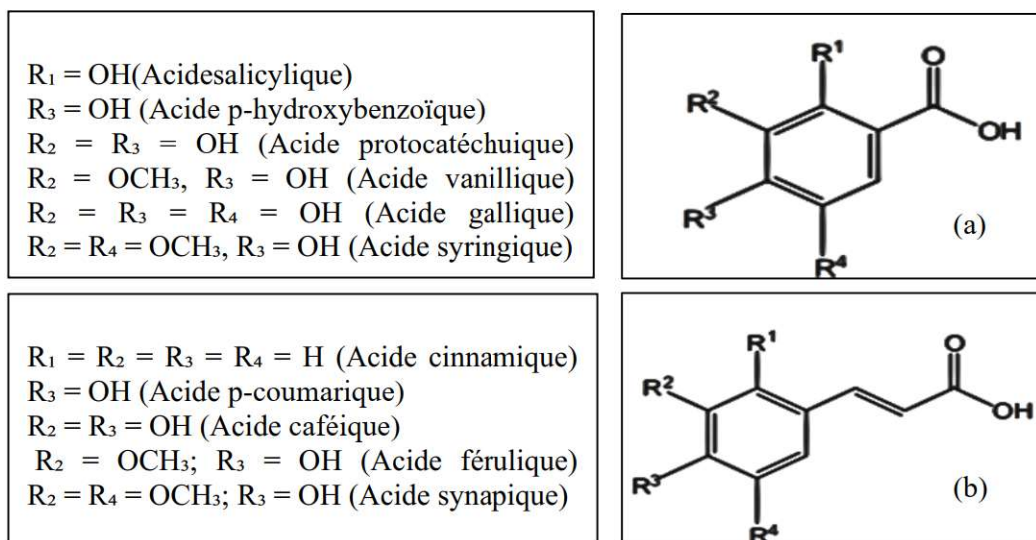


Figure 1 : Structure chimique des principaux acides (a) hydroxybenzoïques (b) hydroxycinnamiques (Heleno *et al.*, 2015).

2.3.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes font partie d'un large groupe de substances phénoliques caractérisées structurellement par un système contenant trois anneaux (C6-C3-C6), appelés respectivement anneau A, C et B (Figure 2). La biosynthèse des flavonoïdes suit une voie mixte, car un intermédiaire de la voie de l'acide shikimique (p-coumaroyl-CoA ou cinnamoyl-CoA) est nécessaire, ainsi qu'un autre intermédiaire de la voie de l'acide acétique (malonyl-CoA), à travers une réaction de condensation catalysée par l'enzyme chalcone-synthase (CHS). À partir de la chalcone formée (2'-4'-6'-trihydroxychalcone), des enzymes spécifiques catalysent une série de modifications structurelles pour la construction du flavonoïde, telles que l'insertion de groupements hydroxyles, méthoxyles, ou encore des réactions redox et des glycosylations (Koes *et al.*, 1994). En fonction du degré d'oxydation de la chaîne C3, on distingue les structures de base suivantes des flavonoïdes avec des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés biologiques distinctes: Les flavanones, les flavanonols, Les isoflavones, les leucoanthocyanidines (flavan-3,4-diols), les flavones, les flavonols, catéchines (flavan-3-ol) et les anthocyanidines (Panche *et al.*, 2016).

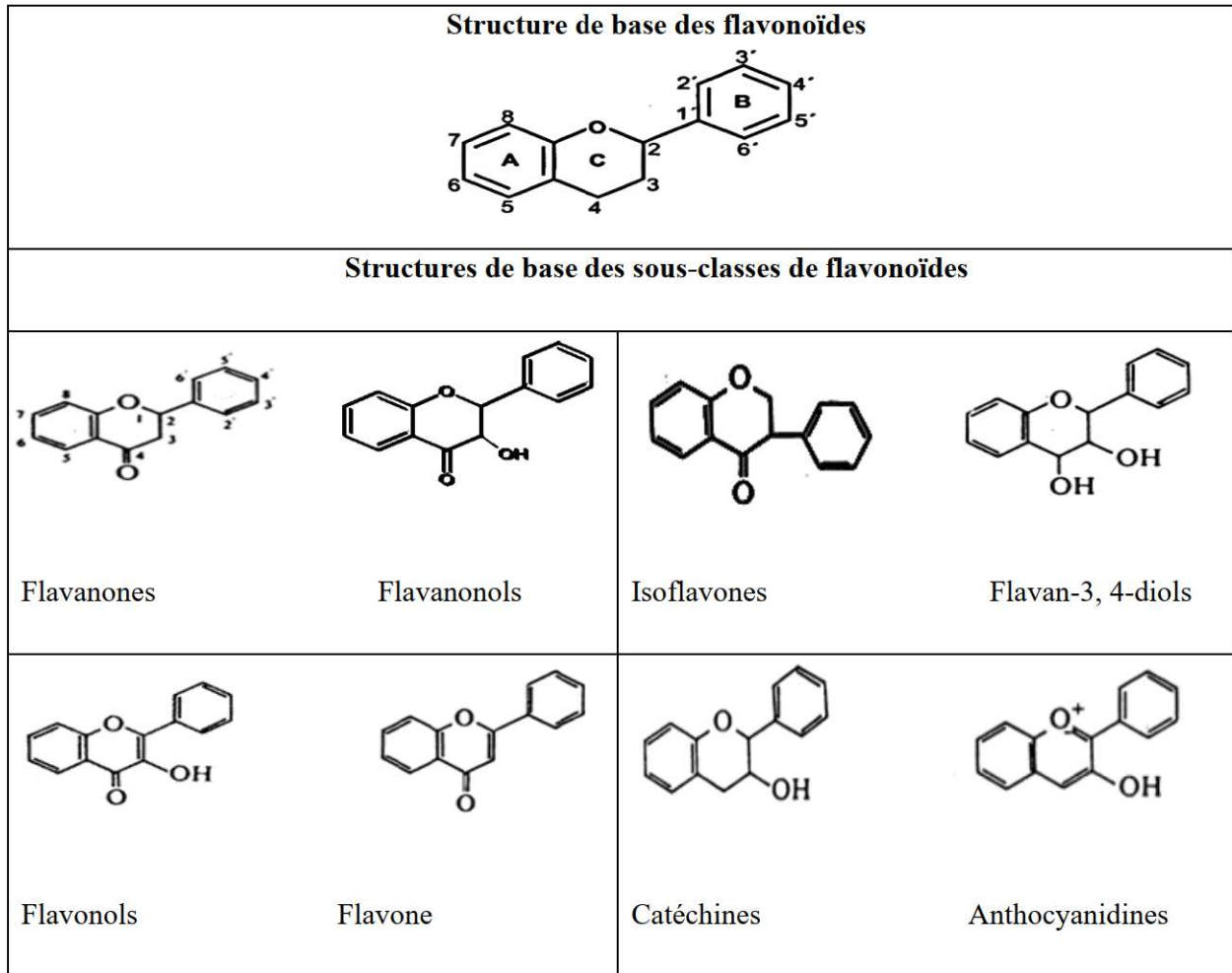


Figure 2 : Principales classes de flavonoïdes (Careri *et al.*, 1998).

Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être trouvés sous forme d'aglycones, ou plus fréquemment sous forme de dérivés glycosides. Parmi les flavonoïdes, les flavones (apigénine, lutéoline, diosmétine, ...), les flavonols (quercétine, myricétine, kaempférol, ...) et leurs glycosides sont les plus répandus. Ils sont présents dans le règne végétal, à l'exception des algues et des champignons. Les flavonols peuvent être trouvés sous forme de O-glycosides et les flavones sous forme de O-glycosides et C-glycosides. La structure du C-glycoside des flavonoïdes est caractérisée par une liaison carbone-carbone entre le carbone anomérique de la molécule de sucre et le carbone C-6 ou C-8 du noyau du flavonoïde. Les flavanols (par exemple, naringénine, hespéridine) sont principalement présents dans les agrumes et les prunes sous forme d'O- ou C-glycosides. Les isoflavones (par exemple, génistéine, daidzéine) possèdent dans leur structure le cycle B d'une molécule de flavonoïde, qui est attaché au carbone C-3 de

l'hétérocycle (Kumar & Pandey 2013). Ce groupe se trouve principalement dans les légumineuses. Le groupe le plus important des pigments végétaux hydrosolubles sont les anthocyanines, responsables des couleurs des fleurs et des fruits des plantes supérieures (Wrolstad, 2004).

2.3.1.3. Tanins

Les tanins sont un groupe de substances organiques naturellement présentes dans de nombreuses plantes. Ils jouent le rôle de métabolites secondaires que les plantes utilisent pour se défendre contre les infections, les insectes ou les animaux, en raison de leur goût, de leur odeur ou de leur toxicité éventuelle (Barbehenn & Peter Constabel, 2011).

D'un point de vue chimique, ce sont des composés polyphénoliques de masse moléculaire relativement élevée (Koleckar *et al.*, 2008). Ces composés sont divisés en tanins condensés et hydrolysables (Figure 2).

a) Tanins condensés

Ce sont des composés polymères et oligomères, constitués de bases de flavan-3-ol. Ces dérivés peuvent se chaîner par condensation et atteindre un degré de polymérisation allant de deux à plus de cinquante unités de base. La polymérisation des tanins condensés est médiée par une liaison carbone-carbone (Schofield *et al.*, 2001).

b. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables constituent une sous-catégorie des tanins. Ils sont eux-mêmes divisés en deux groupes : les gallotanins et les ellagitanins (Mueller-Harvey, 2001). L'unité structurelle de base commune à ces deux sous-groupes est le glucose. Des molécules d'acide gallique, ou d'acide ellagique, sont liées à la molécule de glucose. Cette liaison est réalisée par estérification du groupe carboxyle présent dans la structure de ces acides. L'estérification peut également avoir lieu sur les groupes hydroxyles présents sur ces molécules (Varila *et al.*, 2019).

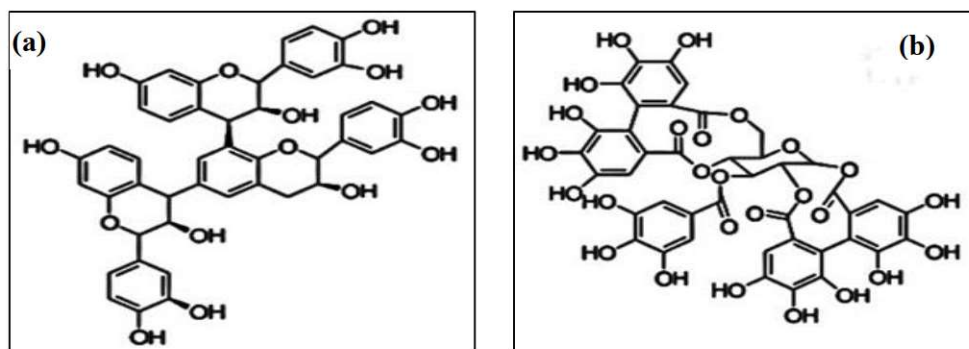


Figure 3 : Structure de base des (a) tanins condensés et (b) tanins hydrolysables (Das *et al.*, 2020).

2.3.1.4. Coumarines

Les coumarines forment un groupe hétérogène de métabolites secondaires, présentes dans un large éventail de plantes supérieures. Elles se distinguent par leurs effets sédatifs, hypnotiques ou antimicrobiens. Des recherches récentes ont confirmé que, durant la dernière décennie, les coumarines ont montré un effet positif dans le traitement de la dépression ou du cancer (Stringlis *et al.*, 2019). Ces composés sont des lactones de l'acide o-hydroxycinnamique. Dans les plantes fraîches, elles se trouvent sous forme de composés glycosidiques. Cependant, lors du séchage, ces composés sont libérés, permettant aux coumarines de se dégager et de produire une odeur caractéristique (Yarnell & Abascal, 2009).

Selon leur structure chimique, elles peuvent être classées en: Coumarines simples et coumarines condensées (Figure 3), qui se divisent en furanocoumarines et pyranocoumarines (Bourgaud *et al.*, 2006).

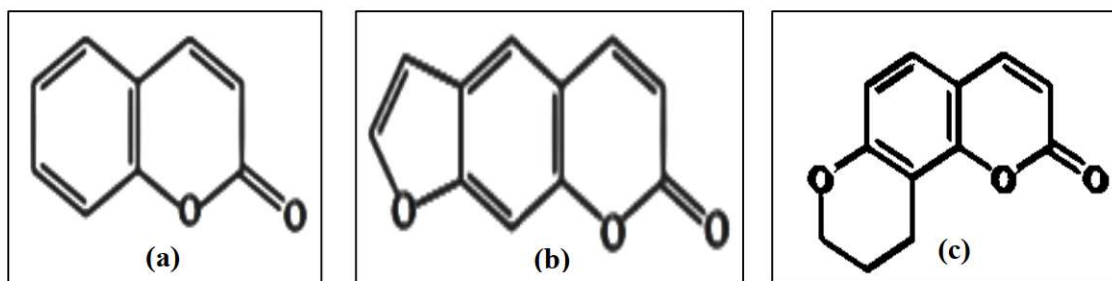


Figure 4 : Structures de bases des (a) Coumarines simples, (b) Furanocoumarines et (c) Pyranocoumarines (Venugopala *et al.*, 2013).

2.3.1.5. Lignanes

Les lignanes sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Il s'agit d'un large groupe de composés dérivés des intermédiaires de la voie du shikimate (de l'acide cinnamique et de l'acide p-coumarique) (Umezawa, 2003). D'un point de vue structural, les lignanes (Figure 4) sont généralement désignés sous forme de dimères, mais certains peuvent également être des trimères ou des tétramères. Ils se trouvent dans presque toutes les parties morphologiques de la plante. La plupart des lignanes se trouvent sous forme libre, mais certains peuvent être présents en combinaison avec un glycone et former des glycosides (Zhang *et al.*, 2014). La fonction biologique des lignanes dans les plantes n'est pas complètement élucidée, mais leur fonction principale est probablement la protection contre les herbivores et les organismes pathogènes. Ils montrent également des effets antifongiques et antibactériens (Stringlis *et al.*, 2019).

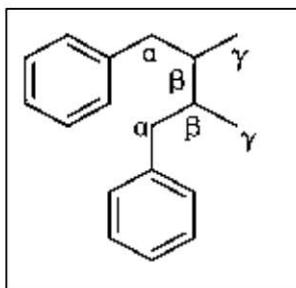


Figure 5 : Structure de base des lignanes (Cui *et al.*, 2020).

2.3.2. Terpènes

Les terpènes sont des métabolites secondaires associés à la croissance et au développement des plantes. Leur unité de base est l'isoprène (Figure 5). Les terpènes, également connus sous le nom d'isoprénoïdes, constituent une classe de métabolites secondaires des plantes avec la plus grande diversité structurale et fonctionnelle (Phillips *et al.*, 2008; Marchev *et al.*, 2014). La structure chimique des terpènes est représentée par l'union de deux, quatre, six, huit ou plus d'unités d'isoprène (Dey & Harborne 1997).

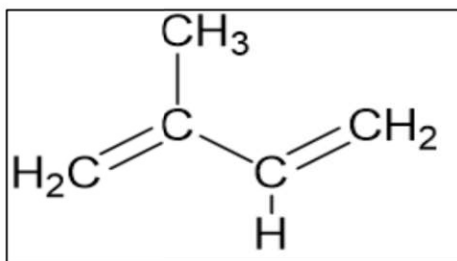


Figure 6 : Structure chimique d'isoprène (C₅H₈) (Parekh *et al.*, 2024).

En fonction du nombre d'unités d'isoprène, on les classe ainsi : Hémiterpènes (1 molécule d'isoprène), monoterpènes (2 molécules d'isoprène), Sesquiterpènes (3 molécules d'isoprène), diterpènes (4 molécules d'isoprène), triterpènes (6 molécules d'isoprène), tétraterpènes (8 molécules d'isoprène), polyterpènes (plus de 8 molécules d'isoprène).

Les terpènes et leurs dérivés ont montré diverses activités biologiques dans le domaine pharmaceutique, étant utilisés comme substances antimicrobiennes, sédatives, tranquillisantes, analgésiques, anticonvulsivantes et même antidépresseurs (de Sousa *et al.*, 2007; Perazzo *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2008).

Les terpènes sont des composants importants des essences ou huiles essentielles, qui sont généralement des mélanges de monoterpènes, sesquiterpènes, aldéhydes, cétones, alcools et esters. Ils ont généralement un point d'ébullition bas, une densité plus faible et un indice de réfraction plus élevé que l'eau. Les huiles essentielles peuvent servir d'attractifs pour les insectes pollinisateurs, de régulateurs de la transpiration ou encore jouer un rôle défensif en agissant comme des phytoncides, c'est-à-dire en inhibant la croissance de micro-organismes (Siddiqui *et al.*, 2024)

Les huiles essentielles sont le plus souvent extraites à l'aide de solvants non-polaires à partir de matériel végétal. On peut utiliser comme solvants, par exemple, l'éthanol, l'hexane ou le glycérol. D'autres méthodes d'extraction incluent la distillation à la vapeur d'eau, le pressage, l'extraction sur lit fluidisé, l'extraction au dioxyde de carbone, entre autres (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

2.3.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont naturellement synthétisés par un grand nombre d'organismes, y compris les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons (Saxena *et al.*, 2013). Ils sont formés en tant que métabolites secondaires à partir des acides aminés et présentent généralement une saveur amère accompagnée de toxicité, ce qui aide à repousser les insectes et les herbivores (de la Rosa *et al.*, 2010). La plupart des alcaloïdes contiennent un noyau de pyridine, de quinoléine, d'isoquinoléine ou de tropane (Figure 6). Ils sont facilement solubles dans l'alcool et peu solubles dans l'eau. Dans les plantes, les alcaloïdes se trouvent principalement dans les graines et les racines (Singh, 2016).

Les alcaloïdes constituent une source essentielle de médicaments pharmaceutiques. Ils sont utilisés comme anesthésiques locaux et stimulants, comme la cocaïne (Saxena *et al.*, 2013). De plus, des recherches montrent que la consommation de certains alcaloïdes présente des avantages pour la santé. Par exemple, la théobromine a des effets diurétiques puissants, stimule et dilate les vaisseaux sanguins (de la Rosa *et al.*, 2010). D'autres alcaloïdes d'origine végétale importants incluent les stimulants supplémentaires tels que la caféine, la nicotine et la morphine (Doughari, 2012).

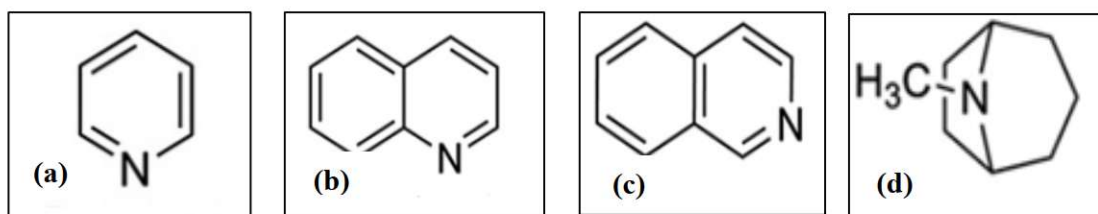


Figure 7 : Structures des noyaux hétérocycliques des alcaloïdes : pyridine (a), quinoléine (b), isoquinoléine (c) et tropane (d) (Oliveri & Di Bella, 2011).

2.4. Méthodes d'extraction

Dans l'industrie agroalimentaire, le terme extraction désigne le processus par lequel une ou plusieurs substances sont transférées d'une matrice biologique vers une phase liquide, suivi de la séparation de cette phase et de l'isolement des composés d'intérêt. La matière première utilisée pour l'extraction peut être d'origine animale ou végétale (animaux, poissons, plantes et algues) (Sasidharan *et al.*, 2010).

Il est essentiel, lors d'un procédé d'extraction, de déterminer l'emplacement des composés cibles ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. Lorsque ces informations sont connues, l'objectif est de maximiser à la fois le rendement et la pureté de l'extrait obtenu. Les procédés d'extraction peuvent être classés selon la nature de l'échantillon et la phase dans laquelle les substances extraites se répartissent: extraction par solvant à partir d'un échantillon en phase liquide ou solide, selon la nature hydrophile ou hydrophobe du composé actif et de l'agent d'extraction, selon le nombre de répétitions du procédé, ou encore selon le sens d'écoulement du solvant d'extraction (Markom *et al.*, 2007). L'extraction solide-liquide est un phénomène de transport de masse au cours duquel les composés solides contenus dans une matrice migrent vers le solvant mis en contact avec cette matrice. Ce phénomène peut être amélioré par des modifications des coefficients de diffusion induites par des méthodes conventionnelles et non conventionnelles (Lozano-Grande *et al.*, 2018).

2.4.1. Méthodes d'extraction conventionnelles

L'extraction conventionnelle par solvant est la technique la plus couramment utilisée à l'échelle industrielle pour obtenir des composés bioactifs à partir de matrices végétales (Latoui *et al.*, 2012). Cependant, ces méthodes nécessitent des temps d'extraction longs et présentent de faibles rendements (Singh & Saldaña, 2011). De plus, un temps d'extraction prolongé ou une température élevée peuvent avoir des effets négatifs sur les composés cibles, entraînant par exemple la dégradation des composés phénoliques. Étant donné que l'extraction solide-liquide est une opération hétérogène et multicomposant impliquant un transfert de masse instable d'une matrice solide vers un liquide, les solutés peuvent être extraits à des vitesses différentes en fonction de leur localisation (surface externe, pores, vacuoles, etc.) et de leur solubilité (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006). Les procédures générales d'extraction conventionnelles solide - liquide sont : la macération, l'hydrodistillation et Extraction de Soxhlet.

2.4.1.1. Macération

La macération est une technique très ancienne d'extraction des composés actifs à partir de diverses matrices, et demeure aujourd'hui encore pratiquée comme méthode simple et économique, adaptée aux matériaux employés. Le procédé consiste à mettre en contact, avec agitation (statique ou dynamique), l'échantillon et un solvant pendant une durée et à une température déterminées. À la fin du processus, le liquide extracteur est séparé et le résidu est pressé (Albuquerque *et al.*, 2017).

Cette technique est considérée comme un procédé statique, non exhaustif, qui ne permet pas l'extraction totale de la matière première végétale, soit en raison de la saturation du liquide extracteur, soit à cause de l'établissement d'un équilibre diffusif entre le milieu extracteur et l'intérieur des cellules. Bien que simple, cette méthode requiert souvent de longues périodes d'extraction et consomme de grands volumes de solvant (Ferrero *et al.*, 2025).

2.4.1.2. Hydrodistillation

La méthode d'hydrodistillation consiste en l'utilisation d'un ballon de distillation contenant la matière végétale médicinale et un solvant (généralement de l'eau). Cette technique est couramment réalisée à l'aide d'un dispositif connu sous le nom d'appareil de Clevenger ou par simple distillation à la vapeur d'eau. Le mélange est chauffé de manière externe à l'aide d'une résistance électrique, ce qui entraîne la formation de vapeurs qui se condensent dans un condenseur, où les huiles essentielles sont collectées. La vapeur contenant l'huile essentielle se condense et l'huile est ensuite séparée (More *et al.*, 2022). Cependant, lors des procédés d'hydrodistillation, des modifications chimiques peuvent survenir et les composés thermosensibles peuvent facilement être dégradés à la température d'ébullition de l'eau. Par conséquent, la qualité des extraits d'huiles essentielles peut être fortement altérée (Baptista-Silva *et al.*, 2020).

2.4.1.3. Extraction de Soxhlet

L'appareil utilisé pour cette méthode, principalement appliquée aux substances solides, comprend un ballon, un extracteur de Soxhlet et un condenseur. On fixe d'abord le ballon inférieur contenant le solvant, sur lequel est placé l'extracteur de Soxhlet muni d'une cartouche d'extraction remplie de l'échantillon. Un condenseur est fixé sur la partie supérieure. Le solvant, chauffé dans le ballon, s'évapore, se condense dans le condenseur, puis s'écoule goutte à goutte sur la cartouche d'extraction, remplissant progressivement l'extracteur. Lorsque le niveau de débordement est atteint, le solvant chargé d'extraits retourne dans le ballon. Ce processus se répète automatiquement jusqu'à obtention d'un extrait concentré, à partir duquel les composés recherchés peuvent être isolés (Seidel, 2012).

2.4.2. Méthodes d'extraction verte

Afin de réduire l'impact environnemental, un effort considérable a été consacré à la recherche sur l'extraction de constituants par des techniques non conventionnelles, permettant ainsi de développer des procédés appliquant les principes de la chimie verte, c'est-à-dire réduire la production de déchets, limiter la consommation d'énergie et protéger la santé humaine ainsi que l'environnement. Bien que ces techniques permettent d'améliorer les rendements et de réduire le temps d'extraction, elles continuent souvent à utiliser des solvants conventionnels (éthanol, méthanol, etc.), et la recherche de méthodes respectueuses de l'environnement demeure un défi (Duba *et al.*, 2015).

2.4.2.1. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes constitue une méthode d'extraction verte, reposant sur l'impact direct exercé sur les composés polaires. L'énergie électromagnétique, dans la gamme de fréquences de 300 MHz à 300 GHz, est transférée afin de générer de la chaleur via la conduction ionique et la rotation dipolaire (Jain *et al.*, 2009).

Ce procédé est supposé comporter trois étapes séquentielle (Alupului *et al.*, 2012): la séparation des solutés des sites actifs de la matrice de l'échantillon sous l'effet de l'élévation de température et de pression, la diffusion du solvant à travers la matrice de l'échantillon et la libération des solutés de la matrice de l'échantillon vers le solvant.

Cette technologie présente plusieurs avantages, notamment un chauffage plus rapide pour l'extraction de substances bioactives à partir de matériaux végétaux, des gradients thermiques réduits, une taille d'équipement diminuée et une production accrue d'extrait (Chemat & Cravotto, 2012). Le traitement par micro-ondes est activement étudié pour l'extraction et la valorisation de composés naturels issus de matrices végétales.

2.4.2.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par ultrasons est l'une des techniques d'extraction les plus efficaces par rapport aux méthodes conventionnelles lorsqu'elle est appliquée à l'extraction de composés bioactifs d'origine végétale (Vinatoru *et al.*, 2017). Cette technique peut accélérer le processus à basse température, entraînant ainsi moins de dommages aux propriétés structurales et moléculaires des composés présents dans les matrices végétales (Yuan *et al.*, 2015). De ce fait,

l'ultrason est couramment utilisé pour accélérer les procédés et réduire les temps d'extraction (Reátegui *et al.*, 2014).

Les avantages liés à l'utilisation des ultrasons incluent une durée d'opération plus courte, une plus grande simplicité de mise en œuvre, une consommation réduite de solvant et de température, une économie d'énergie et un rendement accru (Wen *et al.*, 2018). Comme toute onde sonore, l'onde ultrasonore se propage par une succession de phases de compression et de raréfaction induites sur les molécules. Dans ces zones de variations de pression, un phénomène de cavitation se produit, conduisant à la formation de bulles de gaz. Celles-ci croissent par un processus connu sous le nom de diffusion rectifiée, c'est-à-dire que de petites quantités de vapeur (ou de gaz) issues du milieu pénètrent dans la bulle lors de sa phase d'expansion et ne sont pas entièrement expulsées lors de la phase de compression (Vinatoru *et al.*, 2017).

De manière générale, plusieurs mécanismes ont été identifiés comme intervenant dans les extractions assistées par ultrasons appliquées aux structures végétales: fragmentation, érosion, capillarité, détexturation, effet sonocapillaire, contrainte de cisaillement locale et sonoporation. Il convient de souligner que tous ces mécanismes sont liés au phénomène de cavitation et, qu'agissant individuellement ou de manière combinée, ils participent au processus d'extraction assistée par ultrasons et contribuent à l'extraction des composés bioactifs (Corbin *et al.*, 2015).

Étant donné que les ultrasons constituent une onde mécanique, leurs paramètres physiques (fréquence, puissance, amplitude et cycle) jouent un rôle essentiel dans le processus d'extraction (Setyaningsih *et al.*, 2019), puisqu'ils peuvent influencer la cavitation acoustique et, par conséquent, l'efficacité de l'extraction. À basses fréquences, les bulles de cavitation sont relativement moins nombreuses, mais présentent un diamètre plus élevé, ce qui favorise les effets physiques au détriment des effets chimiques (Leong *et al.*, 2011). L'effet de la fréquence peut être lié non seulement à la taille des bulles de cavitation, mais aussi à son influence sur la résistance au transfert de masse (Esclapez *et al.*, 2011).

Selon Chemat *et al.* (2017), l'intensité ultrasonique est un paramètre déterminant qui influence fortement l'efficacité de l'extraction, car, à mesure qu'elle augmente, l'effondrement des bulles devient plus violent, provoquant la rupture des structures végétales. Cependant, d'autres paramètres tels que la température et le choix du solvant doivent également être pris en compte pour obtenir les résultats escomptés lors du processus à ultrasons. Ainsi, pour une application réussie de l'extraction assistée par ultrasons, il est nécessaire de considérer l'influence de plusieurs variables sur le procédé (Esclapez *et al.*, 2011).

2.4.2.3. Extraction par fluide supercritique

Les fluides supercritiques possèdent des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles des gaz et des liquides, telles que la densité, la viscosité et la diffusivité, qui peuvent être modulées en ajustant la pression et la température (toujours au-dessus du point critique).

Ainsi, les fluides supercritiques peuvent souvent offrir des conditions optimales pour des expériences et procédés. Cette modification de l'état d'agrégation d'un gaz ou d'un liquide, en fonction des variations de pression et de température, entraîne une variation de sa densité et de son pouvoir de solvation, modifiant par conséquent le comportement chimique de la substance (Sargenti & Lanças, 1998).

Le fluide le plus couramment utilisé pour les procédés d'extraction supercritique est le CO₂, en raison de sa faible température critique (31,1 °C), de son absence de toxicité et de sa sécurité d'utilisation. Outre ces caractéristiques, les procédés d'extraction utilisant du CO₂ supercritique se déroulent en l'absence de lumière et d'air, ce qui minimise les réactions de dégradation. Cependant, du fait de son caractère non polaire, le CO₂ n'est pas préféré seul pour extraire les polyphénols polaires. Il est généralement employé en mélange avec des co-solvants organiques (par ex. éthanol, méthanol, acétone), également appelés modificateurs (Herrero *et al.*, 2010). Ces solvants accroissent le pouvoir de solvation du CO₂ et, par conséquent, la solubilité et l'extractibilité des polyphénols. L'extraction par fluide supercritique a également été largement étudiée pour la récupération de composés à haute valeur ajoutée. Cette technologie est particulièrement importante en raison de la pureté des extraits obtenus (Murga *et al.*, 2000).

2.5. Activités biologiques des composés bioactifs

2.5.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés est chimiquement attribuée à leur capacité à piéger les radicaux libres par le don d'électrons (avec ou sans atome d'hydrogène), par l'action de chélation des ions métalliques ou par l'inhibition des enzymes oxydatives (Elsayed Azab *et al.*, 2019). Ainsi, les dommages oxydatifs aux molécules telles que les acides nucléiques, les protéines, les lipides, et d'autres macromolécules peuvent être atténués, ce qui permet de prévenir des maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles neurodégénératifs et le cancer (Medina-Medrano *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2009). Les composés offrant une

protection antioxydante sont de plus en plus recherchés, et l'intérêt pour leur production in vitro augmente. Ainsi, l'identification de sources végétales ayant une forte capacité antioxydante, est d'une importance capitale.

2.5.1.1. Stress oxydatif et radicaux libres

Les radicaux libres (également appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO)), sont des substances qui possèdent au moins un électron non apparié dans leur couche électronique externe. Cette configuration est très instable, ce qui pousse les radicaux libres à chercher un électron supplémentaire afin de compléter leur paire et ainsi atteindre une configuration plus stable (Halliwell & Gutteridge, 2015). Pour cela, les radicaux libres peuvent tenter de se combiner avec un autre radical libre. Cependant, une méthode plus probable est qu'ils arrachent un électron à une molécule stable qui possède tous ses électrons appariés. Lorsque cela se produit, la réaction est appelée réaction en chaîne (Nimse & Pal, 2015). Étant donné que la perte d'un électron correspond, d'un point de vue électrochimique, à une oxydation, les radicaux libres possèdent donc une activité oxydante (Fang *et al.*, 2002).

Les espèces réactives de l'oxygène, jouent différents rôles importants et bénéfiques dans l'organisme lorsqu'ils sont produits en quantités contrôlées. Elles sont utilisées par les cellules immunitaires (comme les neutrophiles et les macrophages) pour détruire les agents pathogènes (bactéries, virus, champignons) par un processus appelé éclatement oxydatif (Adrian *et al.*, 2013). En plus de ce rôle défensif, elles sont également impliquées dans la production d'énergie, la régulation de la croissance cellulaire ainsi que dans la signalisation intercellulaire (Dröge, 2002). Les principales sources endogènes génératrices des ERO comprennent les mitochondries et l'activité de certaines enzymes telles que : la xanthine oxydase (Honorat *et al.*, 2013), le cytochrome P450-oxydase (Bondy & Naderi, 1994), les monoamine-oxydases (Kaludercic *et al.*, 2014), les enzymes impliquées dans la voie de production des prostaglandines et des thromboxanes (Ghosh *et al.*, 2015), ainsi que la NADPH-oxydase de la membrane plasmique des macrophages, qui produisent une grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à des stimuli (Lambeth, 2004).

Cependant, dans certaines conditions, une production accrue d'ERO provoque un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants (Schafer & Buettner, 2001), conduisant au stress oxydatif, au cours duquel certaines de ces espèces réactives, telles que le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\bullet) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

peuvent causer des dommages à l'organisme (Gandhi & Abramov, 2012; Carochi & Ferreira, 2013), tels que des dommages à l'ADN, aux protéines et aux organites cellulaires, comme les mitochondries et les membranes, entraînant des altérations de la structure et des fonctions cellulaires. Ils sont ainsi impliqués dans diverses pathologies telles que le cancer, le vieillissement prématuré, les maladies cardiovasculaires, dégénératives et neurologiques (Liu *et al.*, 2018).

2.5.1.2. Antioxydants

Un antioxydant est une molécule suffisamment stable pour donner un électron à un radical libre, le neutralisant ainsi, réduisant ainsi sa capacité à causer des dommages. Ces antioxydants inhibent ou ralentissent les dommages cellulaires principalement grâce à leur capacité à capturer les radicaux libres, ce qui permet de terminer la réaction en chaîne avant que des dommages aux molécules vitales ne se produisent (Halliwell, 1996). Certains de ces antioxydants sont produits lors du métabolisme normal dans le corps, tandis que d'autres se trouvent dans l'alimentation (Supruniuk *et al.*, 2023). Selon leur origine (Figure 8), les antioxydants naturels sont divisés en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Irato & Santovito, 2021). Selon leur mécanisme d'action, les antioxydants enzymatiques peuvent être classés en enzymes primaires et secondaires. Comme première ligne de défense enzymatique contre les ERO, il y a les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX) des enzymes responsables de l'inactivation des superoxydes et peroxydes d'hydrogène. La deuxième ligne de défense responsable de la détoxification des ERO est constituée des glutathion réductases et glucose-6-phosphate-déhydrogénases (Dietz, 2016).

Les antioxydants non enzymatiques peuvent exercer un effet antioxydant, comme les caroténoïdes, flavonoïdes, polyphénols, tocophérols, tanins, vitamines (A, C et E), principalement trouvées dans les fruits et légumes (Rudenko *et al.*, 2023).

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butylhydroxytoluène) (Atta *et al.*, 2017). Cependant, bien qu'ils soient très efficaces et stables, ils ont suscité des préoccupations concernant les doses de sécurité et la toxicité (Balasundram *et al.*, 2006).

Plusieurs méthodes *in vitro* sont utilisées pour évaluer la capacité d'élimination des radicaux libres, dans lesquelles différents composés artificiels ont été utilisés, tels que : 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) et 1,1'-diphényl-2-picrylhydrazyle

(DPPH). Cependant, étant des radicaux artificiels, ils ne se reproduisent pas en situation in vivo, ce qui constitue un inconvénient (Singh & Singh, 2008). Ainsi, les études visant à évaluer les propriétés antioxydantes des extraits végétaux utilisent plus d'une méthodologie pour inférer, avec plus de certitude, si les extraits analysés peuvent également présenter une activité pour combattre les radicaux libres formés dans l'organisme humain (Alam *et al.*, 2013).

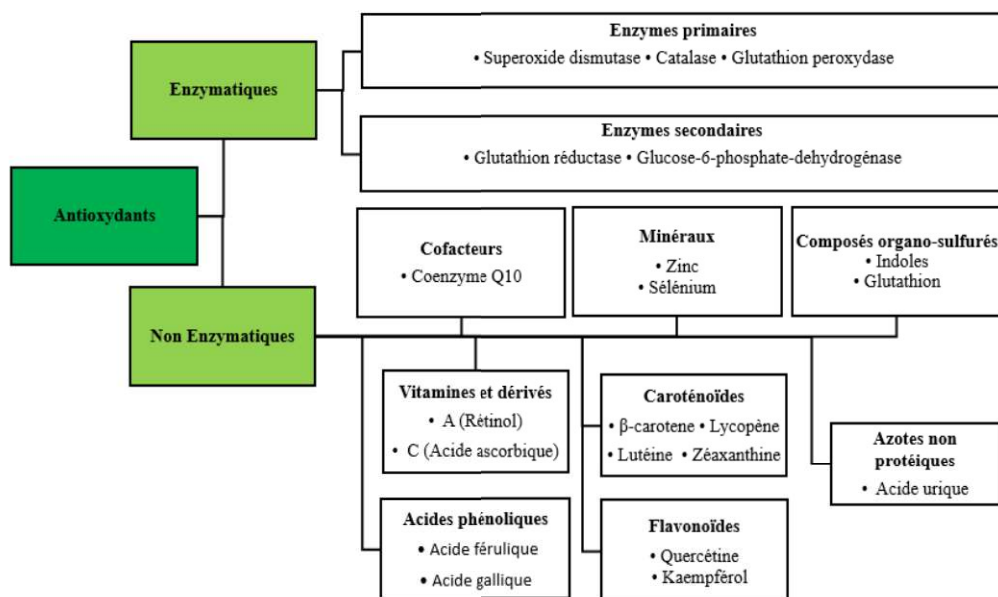


Figure 8 : Classification des antioxydants naturels. Adaptée de (Carocho & Ferreira, 2013).

2.5.1.3. Composés phénoliques comme antioxydants

La littérature a mis en évidence le potentiel antioxydant des acides phénoliques, qui se caractérisent par la présence d'un anneau benzénique, d'un groupe carboxylique et d'un ou plusieurs groupes hydroxyle et/ou méthoxyle, agissant comme des piègeurs de radicaux et parfois comme des chélateurs de métaux, intervenant à la fois lors de l'initiation et de la propagation du processus oxydatif (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008).

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut varier considérablement entre les membres de cette famille. Elle dépend de leur structure et peut être déterminée par cinq facteurs : la réactivité en tant qu'agent donneur d'hydrogène et d'électrons, la stabilité du radical flavanoyl formé, la réactivité vis-à-vis d'autres antioxydants, la capacité de chélater les métaux de

transition, la solubilité et l'interaction avec les membranes. Elle inclut la capture des radicaux peroxyde, hydroxyle et superoxyde ainsi que du peroxyde d'hydrogène (Cao *et al.*, 1997).

Les catéchines sont des flavonoïdes amphipathiques, exerçant ainsi leur activité antioxydante dans les environnements lipidique et aqueux. Les catéchines se sont révélées efficaces pour capter les radicaux superoxyde, les radicaux hydroxyles et les radicaux peroxydes (Powers *et al.*, 2004).

Les anthocyanines sont des flavonoïdes connues pour être de puissants antioxydants qui aident à protéger les plantes contre les dommages causés par les UV (Steyn *et al.*, 2002). Les proanthocyanidines sont des antioxydants naturels largement disponibles dans les fruits, légumes, noix, graines, fleurs et écorces. Il a été rapporté qu'elles possédaient un large éventail de propriétés biologiques, pharmacologiques et thérapeutiques, ainsi que des activités contre les radicaux libres et le stress oxydatif (Bagchi *et al.*, 2000).

2.5.2. Activité anti-enzymatique

2.5.2.1. Acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE)

Caractérisée comme une maladie neurodégénérative grave, chronique et progressive, la maladie d'Alzheimer est associée à une altération de la mémoire et de la cognition, pouvant conduire à la mort de l'individu, étant la cause la plus fréquente de démence chez les populations âgées, principalement les personnes de plus de 65 ans (Dey *et al.*, 2017). La pathogénicité de la maladie d'Alzheimer n'a pas encore été complètement élucidée, cependant, l'hypothèse cholinergique est la théorie la plus ancienne et la plus acceptée par les chercheurs. Cette hypothèse repose sur le déficit du neurotransmetteur appelé acétylcholine, qui constitue le substrat de l'enzyme AChE (Craig *et al.*, 2011). Cette enzyme se trouve dans les zones synaptiques du système nerveux central et périphérique ainsi que dans les membranes des globules rouges, et catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en acétate et en choline (Tougu, 2001). L'approche thérapeutique visant à interrompre l'hydrolyse de l'acétylcholine par les enzymes AChE et BChE, consiste à empêcher la liaison du substrat (acétylcholine) avec ces enzymes. L'enzyme AChE, localisée principalement au niveau des plaques neuromusculaires et des synapses cholinergiques du cerveau (Quinn, 1987), est responsable de 80 % de l'hydrolyse de l'acétylcholine en quelques secondes ou millisecondes après sa libération par un neurone cholinergique présynaptique, tandis que l'enzyme BChE, principalement localisée dans le foie, est responsable de 20 %, jouant généralement un rôle de co-régulation de

l'hydrolyse de l'acétylcholine (Jing *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2018). Contrairement à l'AChE, la BChE hydrolyse le butyrylcholine plus rapidement que l'acétylcholine. Selon Belyaev *et al.* (2010), le manque d'acétylcholine dans le cerveau provoque une accumulation de plaques amyloïdes, entraînant une perte des fonctions intellectuelles, comme des troubles de la communication et une désorientation spatio-temporelle, caractéristiques de la démence (généralement chez les personnes âgées).

Actuellement, l'utilisation de médicaments tels que la physostigmine, la tacrine, le donépézil et la galantamine (inhibiteurs synthétiques) est largement répandue pour inhiber les enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. Toutefois, la prise de ces médicaments est directement associée à divers effets indésirables, tels que la toxicité hépatique et des complications gastro-intestinales (Khan *et al.*, 2018). Dans le but d'éliminer les effets secondaires causés par les inhibiteurs synthétiques, plusieurs extraits issus de sources naturelles sont actuellement testés afin d'évaluer leur potentiel d'inhibition des enzymes AChE et BChE (Neagu *et al.*, 2015; Moyo *et al.*, 2010; Nile *et al.*, 2018).

2.5.2.2. α -amylase

Le diabète est l'une des maladies chroniques les plus courantes qui affectent la population mondiale, touchant environ un demi-milliard de personnes (463 millions) dans le monde en 2019 (Saeedi *et al.*, 2019). Cette maladie métabolique chronique est causée par des modifications ou des carences dans la production d'insuline et est définie comme un syndrome hétérogène, car elle peut se présenter sous diverses formes cliniques, dont les plus importantes sont le type 1, également connu sous le nom de diabète insulino-dépendant, causé par la destruction des cellules β du pancréas productrice de l'insuline, et le type 2, ou diabète non insulino-dépendant, où le pancréas produit de l'insuline, mais les cellules du corps deviennent résistantes à cette insuline. Au fil du temps, la production d'insuline peut aussi diminuer (Carrizzo *et al.*, 2018).

Selon Dai *et al.* (2018), le contrôle des niveaux de glucose reste le principal mécanisme dans le traitement des patients diagnostiqués avec le diabète de type 2, ce qui peut être atteint par l'inhibition des enzymes hydrolysantes (entre autres, l' α -amylase). L' α -amylase, présente dans la salive et le suc pancréatique, est responsable de l'hydrolyse des liaisons 1,6 et 1,4- α -glucosidiques des polysaccharides (l'amidon étant la source de glucides la plus consommée dans l'alimentation humaine), produisant des disaccharides α -anomériques (maltose) qui

favorisent l'augmentation de la glycémie postprandiale. Une des stratégies pour atteindre des niveaux normaux de glucose sanguin est la suppression de la transformation des glucides alimentaires en glucose ou le ralentissement de l'absorption du glucose dans l'intestin, ce qui peut être réalisé par l'inhibition de l'activité de cette enzyme (Kim *et al.*, 2014). Certains médicaments synthétiques, tels que l'acarbose, sont largement utilisés pour inhiber cette enzyme, cependant, la prise de ces composés peut entraîner divers effets secondaires, tels que des troubles hépatiques, des flatulences et des coliques abdominales (Figueiredo-González *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, il est d'une importance capitale d'explorer des composés naturels tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, en vue de remplacer les médicaments synthétiques existants. Une grande partie de l'attention est portée sur l'étude des plantes médicinales traditionnellement utilisées dans les médecines populaires pour le traitement du diabète. Étant donné que le lien entre le stress oxydatif et le développement des complications du diabète a été confirmé, de nombreuses expériences se concentrent sur la recherche d'une activité hypoglycémiant ainsi qu'antioxydante des plantes étudiées. Basés sur la médecine traditionnelle, où plus de 400 espèces de plantes sont connues pour leurs activités hypoglycémiques (Bailey & Day, 1989), de nombreux chercheurs se sont engagés dans la découverte d'inhibiteurs d'enzymes digestives d'origine végétale (Ali *et al.*, 2006; Mai & Chuyen, 2007; Shobana *et al.*, 2009).

2.5.2.3. Uréase

L'uréase est une métalloenzyme, qui agit dans l'hydrolyse de l'urée, formant de l'ammoniac et du dioxyde de carbone, et est produite par les plantes, les champignons et les bactéries (Khan *et al.*, 2010). L'hydrolyse de l'urée joue un rôle important dans le cycle de l'azote, car elle fournit cet élément pour la croissance des micro-organismes et des plantes (Ali *et al.*, 2021). Cependant, une action excessive de l'uréase conduit à divers problèmes chez les organismes vivants et peut également causer des dommages environnementaux et économiques (Arshad *et al.*, 2017). Chez les humains et d'autres animaux, l'hyperactivité de l'uréase entraîne divers problèmes pathologiques, tels que les calculs rénaux, les ulcères gastroduodénaux, l'arthrite, entre autres (Elbastawesy *et al.*, 2019). L'enzyme uréase est utilisée par le pathogène gastrique *Helicobacter pylori*, une bactérie à Gram négatif, que se trouve dans l'estomac des humains (Porrás *et al.*, 2013). Sa capacité à se développer dans le milieu acide de l'estomac dépend de la production de grandes quantités de l'enzyme uréase, qui neutralise l'acidité

gastrique en produisant de l'ammoniac issu de l'hydrolyse de l'urée. Celui-ci agit comme récepteur des protons libérés par les cellules pariétales présentes dans les glandes gastriques. Ainsi, *H. pylori* est capable de coloniser la muqueuse gastrique, provoquant des infections associées à des inflammations gastroduodénales, et augmentant les risques de néoplasie gastrique (Fahey *et al.*, 2013). En conséquence, les inhibiteurs de l'uréase peuvent constituer une bonne alternative pour le traitement des maladies causées par des micro-organismes pathogènes dépendants de l'enzyme uréase (Mamidala *et al.*, 2021).

Cependant, les inhibiteurs de l'uréase disponibles commercialement, tels que les phosphorodiamidates, les dérivés de l'acide hydroxamique et les imidazoles, sont toxiques et peu stables, deux caractéristiques qui empêchent leur utilisation clinique (Modolo *et al.*, 2015). De nombreuses recherches ont été menées au cours des dernières années dans le but de réguler l'activité de l'enzyme uréase, tant dans le domaine thérapeutique qu'agronomique (Berlicki *et al.*, 2012). Les substances naturelles ayant montré des effets inhibiteurs sur l'uréase incluent des alcaloïdes, des composés phénoliques, des dérivés de l'acide cinnamique, des terpènes et des composés soufrés (Modolo *et al.*, 2015).

2.5.3. Activité antimicrobienne

Les micro-organismes font partie intégrante de la nature et de la vie humaine. On peut dire qu'ils sont essentiels à la préservation de l'environnement, contribuant de manière significative, par exemple, aux processus de dégradation dans le sol ou à l'auto-nettoyage des ressources en eau. Cependant, en plus des micro-organismes bénéfiques, il existe également une large gamme de pathogènes qui peuvent affecter négativement la santé des humains, des animaux et des plantes (Muhammad & Jega, 2024). Malgré leur taille modeste, ces micro-organismes peuvent provoquer des maladies dévastatrices et résister aux traitements médicaux classiques (Witkowska-Banaszczak & Długaszewska, 2017).

La résistance antimicrobienne (naturelle ou acquise), est un état où un micro-organisme devient résistant à l'effet d'une substance antimicrobienne. Ce phénomène est l'un des facteurs les plus préoccupants liés à la santé mondiale, car il s'aggrave très rapidement par rapport aux décennies précédentes (Abushaheen *et al.*, 2020).

L'émergence de la résistance antimicrobienne, en particulier la multirésistance, est un grave problème de santé publique, combinant l'augmentation de sa fréquence et de sa gravité

ainsi que la diminution du développement de nouveaux agents anti-infectieux par les entreprises pharmaceutiques, devenant ainsi un défi pour la science (Cohen, 2000).

Les principales causes de l'apparition des résistances aux agents antimicrobiens sont actuellement multiples. Il a été prouvé qu'il existe un lien entre le taux d'utilisation d'un agent donné et la vitesse d'apparition de la résistance à cet agent (Goossens, 2009). De plus, il a été démontré que la prescription incorrecte et excessive de médicaments antimicrobiens par les médecins contribue également au développement de la résistance (Andreatos *et al.*, 2018). L'utilisation intensive des agents antimicrobiens dans l'agriculture pour la prévention et le traitement contribue également à la propagation progressive des souches résistantes (Economou & Gousia, 2015).

Les conséquences de l'augmentation de la résistance représentent un danger sanitaire en raison de l'inefficacité des traitements antimicrobiens pour les patients. Le problème de la résistance aux antibiotiques nécessite un nouvel effort pour examiner diverses plantes médicinales pour leurs propriétés antimicrobiennes potentielles. Les maladies infectieuses causées par des micro-organismes résistants sont associées à des hospitalisations prolongées, une augmentation des coûts et un risque accru de morbidité et de mortalité. Pour cette raison, il y a un besoin croissant de remplacer les médicaments standard par de nouvelles substances ayant des effets antimicrobiens. Les plantes et les substances qu'elles contiennent, qui sont souvent issues du métabolisme secondaire peuvent constituer une alternative (Alonso *et al.*, 2022). À titre d'exemple, on peut citer certains représentants des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, coumarines), des terpènes ou des alcaloïdes (Silva & Fernandes Junior, 2010).

2.5.3.1. Mécanismes de résistance bactérienne

Les bactéries, lorsqu'elles sont exposées aux antibiotiques, tentent naturellement de se défendre et utilisent différents mécanismes à cet effet (Figure 9). Parmi les plus importants, on trouve: l'efflux accru, l'influx réduit, la modification du site cible, l'inactivation de l'antibiotique et l'empêchement de l'activation de l'antibiotique (Bello & Dingle, 2018; Khameneh *et al.*, 2016). Les différentes bactéries peuvent également utiliser plusieurs de ces mécanismes de résistance simultanément. Lorsqu'une bactérie développe une résistance à au moins trois antibiotiques issus de groupes différents, on parle de bactérie multirésistante (Abushaheen *et al.*, 2020).

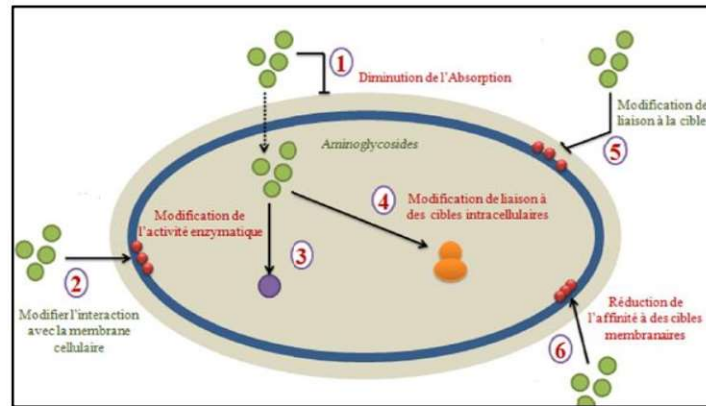


Figure 9 : Mécanismes de résistances bactériennes (Bouyahya et al., 2017).

a) Éflux accru

Les pompes d'efflux sont des structures composées de protéines situées dans la membrane cellulaire, qui permettent aux cellules d'éliminer activement les substances toxiques, y compris les antibiotiques, de leur intérieur. Lorsqu'elles sont exposées à un antibiotique, les bactéries activent leurs systèmes d'efflux et transportent l'antibiotique à l'extérieur de la cellule (Abushaheen *et al.*, 2020). Ce processus est énergétiquement coûteux pour la cellule, car à chaque activation de la pompe d'efflux, la cellule doit fournir une certaine quantité d'énergie, souvent sous forme d'ATP (Cattoir, 2004). Les bactéries tentent d'augmenter l'efflux de manière à ce qu'il dépasse l'influx, ce qui permet de transporter immédiatement l'antibiotique hors de la cellule (Reygaert, 2018).

b) Influx réduit

Les antibiotiques et autres substances, y compris les nutriments, pénètrent dans les cellules des bactéries Gram-négatives via des protéines de leur membrane externe appelées porines (Pagès, 2017). Lorsqu'une cellule bactérienne est exposée à un antibiotique, elle peut se défendre en réduisant le nombre de porines, en modifiant leur structure ou en les éliminant. Ainsi, la cellule bactérienne réduit la perméabilité de sa membrane et empêche l'entrée de l'antibiotique dans la cellule (Pagès *et al.*, 2008).

c) Modification du site cible

Ce mécanisme dépend du mode d'action spécifique de chaque groupe d'antibiotiques. La cellule bactérienne peut modifier diverses structures avec lesquelles l'antibiotique interagit, telles que les ribosomes, les enzymes ou la membrane cellulaire. La modification du site cible peut résulter d'une mutation spontanée, d'une réaction chimique ou d'un ajustement de la voie métabolique bloquée. Par ces modifications, l'antibiotique perd son efficacité, car il ne peut plus se lier à la structure cible sur laquelle il agit (Esterly *et al.*, 2011).

d) Inactivation de l'antibiotique

Dans ce type de mécanisme de résistance, la bactérie utilise ses enzymes pour soit modifier (modification) soit cliver (dégradation) la molécule d'antibiotique à laquelle elle est exposée (Decré, 2012). Lors de la réaction de modification, l'enzyme se fixe à un site spécifique de la molécule d'antibiotique, ce qui entraîne une modification de sa structure. Cette altération empêche l'antibiotique de se lier à sa cible, le rendant ainsi inactif. La dégradation se produit lorsque les enzymes bactériennes se lient directement à la molécule de l'antibiotique, ce qui entraîne sa scission (généralement hydrolytique). L'antibiotique est ainsi inactivé par cette dégradation, ce qui l'empêche de se lier à la structure cible et rend la bactérie résistante (Ramirez & Tolmasky, 2010).

e) Empêchement de l'activation de l'antibiotique

Ce mécanisme de résistance s'applique uniquement aux antibiotiques sous forme de pro-médicaments (par exemple, le métronidazole). Ce sont des médicaments qui sont administrés sous forme inactive et qui ne deviennent actifs qu'après avoir été transformés par les enzymes spécifiques produites par la bactérie concernée. La bactérie se défend contre l'antibiotique soit en réduisant la production de cet enzyme, soit en générant une mutation spontanée qui produit un enzyme modifié, rendant ainsi l'activation de l'antibiotique inefficace. L'antibiotique reste alors sous forme de pro-médicament inactif et devient inoffensif pour la bactérie (Wilson, 2011).

2.5.3.2. Mécanismes de résistance fongique

Certains champignons, responsables des dommages et de la détérioration des produits agricoles, sont à l'origine de pertes considérables pour les cultures d'importance économique. Certains sont capables de produire des substances toxiques appelées mycotoxines, qui sont hautement nocives pour la santé humaine (Edah *et al.*, 2021). Le principal groupe de champignons, connu pour sa capacité à produire des mycotoxines, comprend des espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Fusarium* (Greco *et al.*, 2014). L'utilisation de fongicides synthétiques est l'un des principaux moyens de contrôle des maladies des plantes, mais leur utilisation continue peut favoriser la sélection de champignons phytopathogènes résistants, non contrôlés par les fongicides qui étaient efficaces auparavant (Hu & Chen, 2021). Selon Garnaud & Cornet (2020), les mécanismes de résistance les plus utilisés par les fongicides sont:

- Le changement du site cible de l'action.
- La production accrue de la protéine cible.
- La dégradation métabolique du fongicide ou l'élimination du fongicide par les protéines de transport.

En raison de la pression croissante des organisations non gouvernementales écologiques et de certaines institutions gouvernementales, en particulier dans les pays développés, pour éviter l'utilisation de fongicides synthétiques, de l'augmentation des espèces de pathogènes résistants et de l'effet cancérigène potentiel de certains de ces produits (Wilson & Wisniewski, 1992; Zaki *et al.*, 1998), Un intérêt croissant pour les composés antimicrobiens d'origine naturelle, notamment ceux extraits des plantes médicinales, s'est développé récemment (Guynot *et al.*, 2003). La littérature a enregistré l'efficacité des extraits issus d'une large gamme d'espèces végétales pour inhiber le développement de divers phytopathogènes fongiques (Duarte *et al.*, 2005; Montes-Belmont & Carvajal, 1998; Ouoba *et al.*, 2018).

2.5.4. Activité cytotoxique

La toxicité est l'effet néfaste, voire létal, des substances sur les organismes vivants. Dans sa forme modérée, elle se manifeste par des troubles de certaines fonctions physiologiques. Les formes graves de toxicité sont accompagnées de la mortalité des organismes (Pope *et al.*, 2020). Les tests de toxicité sont généralement divisés en tests aigus, chroniques et subchroniques (Lheureux, *et al.*, 1996). Les tests de toxicité aiguë sont des tests à court terme, d'une durée de quelques heures à quelques jours, mais qui ne dépassent généralement pas une semaine. Pendant

ces tests, des doses relativement élevées de substances toxiques sont administrées aux organismes de test pendant une période courte (Bruce, 1985). Les tests de toxicité chronique sont de longue durée, allant de quelques mois à plusieurs années. Pendant ces tests, des doses relativement faibles de substances toxiques sont administrées aux organismes pendant une période prolongée (Arome & Chinedu, 2013). Les tests de toxicité subchronique durent généralement plusieurs semaines, mais ne dépassent pas 10 % de la durée de vie normale des organismes de test. Il est important de noter que la durée de la toxicité subchronique peut varier en fonction des espèces utilisées dans les tests. Par exemple, pour des souris, cela pourrait être de 2 à 3 mois, tandis que pour des organismes ayant une durée de vie plus courte, cela pourrait être plus court. Pendant ces tests, des doses modérées de substances toxiques sont administrées aux organismes (Zarn *et al.*, 2010).

De nos jours, une grande partie des informations relatives aux plantes médicinales est souvent diffusée sans fondement scientifique, en ce qui concerne leur efficacité, leur toxicité et leurs effets secondaires. Dans ce contexte, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise une validation scientifique des usages des plantes médicinales afin de minimiser les risques d'effets secondaires et de toxicité (Ohikhena *et al.*, 2016).

2.5.4.1. Test de toxicité sur les larves d'*Artemia salina*

D'un point de vue méthodologique, les tests biologiques standards présentent certains inconvénients. Ils sont très exigeants en termes de temps et de qualification du personnel. Cela rend ces expérimentations trop coûteuses. Ce problème est résolu par les tests de deuxième génération. Ce sont des tests microbiologiques alternatifs qui utilisent des micro-organismes tels que des bactéries, des champignons, des algues, des protozoaires et des invertébrés (Silva & Silva, 2023). L'un des invertébrés couramment utilisés dans divers tests biologiques depuis longtemps est le genre *Artemia*. Leurs larves, appelées « crevettes de saumure », sont idéales pour surveiller la toxicité, car elles sont très sensibles à une large gamme de substances chimiques (Dvořák *et al.*, 2009). Le test sur *Artemia salina* détermine la concentration de composés actifs et d'extraits capables de provoquer la mortalité de 50 % (CL₅₀) de ces microcrustacés, dans un milieu salin. Cet essai est simple, rapide et peu coûteux, ce qui permet de tester un grand nombre d'échantillons et de les traiter de manière adéquate. Il est largement utilisé dans la recherche de composés bioactifs dans les extraits de plantes médicinales, ainsi que pour évaluer la toxicité (Parra *et al.*, 2001). Le rapport entre le nombre de larves mortes et le nombre de larves vivantes, par rapport à un contrôle négatif, est utilisé pour estimer la toxicité

des solutions testées (Pelka *et al.*, 2000). Ce test est corrélé à l'activité cytotoxique des composés anticancéreux, c'est pourquoi il est fréquemment utilisé pour le criblage initial à la recherche de composés anticancéreux (Meyer *et al.*, 1982). Il est important de souligner qu'en ce qui concerne la reproductibilité, des paramètres tels que la température (de 20 à 30 °C), la stimulation lumineuse qui influence considérablement l'éclosion des cysts, la composition et la salinité du milieu et l'âge des larves doivent être pris en compte (Hartl & Humpf, 2000).

2.5.4.2. Crevette de saumure (*Artemia salina*)

Les crevettes de saumure, sont des crustacé de la classe des phyllopoDES (Anteunis *et al.*, 1966). Elles ont un corps allongé constitué de la tête, du thorax avec onze segments et d'un abdomen de neuf segments avec une fourche. Elles ne possèdent pas de carapace. Leurs yeux composés sont situés sur des pédoncules. Les segments thoraciques portent une paire de pattes feuillues, chacune avec une seule articulation. Ces pattes thoraciques servent à la fois pour la locomotion, la prise de nourriture, la respiration et ont aussi une fonction sensorielle. Elles se nourrissent de débris organiques et de petits organismes qu'elles filtrent de l'eau. La crevette de saumure mesure entre 8 et 10 mm de long (Criel & Macrae, 2002). Elle se trouve dans les eaux salées continentales et supporte des concentrations élevées de sel et de température. Elle est très résistante aux conditions environnementales défavorables. Dans certaines régions, ses œufs s'accumulent en couches épaisses sur les rives. Ils sont récoltés et les larves éclosées sont utilisées comme nourriture pour les alevins de poissons (Nunes *et al.*, 2006).



Figure 10 : Morphologie des larves d' *Artemia salina* (Zubairi *et al.*, 2016).

2.6. Enquêtes ethnobotaniques des plantes médicinales

Le terme « ethnobotanique » a été créé en 1896 par le botaniste taxonomiste John. Harshberger, de l'Université de Pennsylvanie (Albuquerque *et al.*, 2017). Cette discipline inclut l'étude de la relation mutuelle entre les populations traditionnelles et les plantes. Il a désigné ainsi un domaine qui s'occupait de la description des groupes de personnes qui collectaient des plantes utiles et de la manière dont elles étaient utilisées (Harshberger, 1896).

La tendance actuelle de la recherche ethnobotanique implique l'utilisation d'indices quantitatifs et de l'ethnobotanique appliquée à la conservation de la biodiversité et des connaissances traditionnelles (Albuquerque *et al.*, 2006). Les techniques quantitatives sont utilisées pour comparer les usages et l'importance culturelle de différents taxons de plantes. Ces analyses sont d'un grand intérêt scientifique, car elles reflètent les systèmes de valeurs culturelles, et elles peuvent également aider à la conservation de la biodiversité (Byg & Balslev, 2001). Parmi ces analyses, le calcul de la valeur d'usage (VUs), basé sur le nombre d'usages et le nombre de personnes enquêtées, constitue un outil essentiel. Cette méthode a été largement utilisée dans les études ethnobotaniques pour indiquer les espèces considérées comme les plus importantes pour une population donnée (La Torre-Cuadros & Islebe, 2003). En complément des analyses de la valeur d'usage des espèces et des familles, il y a le calcul du facteur de consensus des informateurs (FCI), qui cherche à identifier les systèmes corporels ou catégories de maladies ayant la plus grande importance relative pour la population locale (Uddin & Hassan, 2014). Ainsi, les espèces de valeur médicinale sont enregistrées pour le traitement de divers systèmes corporels (système respiratoire, système digestif, système circulatoire, maladies infectieuses, etc.).

L'ethnobotanique est désormais un outil précieux pour le développement des soins de santé et la protection de l'environnement, applicable dans divers domaines de la société. Elle a pour objectif, entre autres, d'aider à découvrir et à protéger les savoirs de nos ancêtres, qui doivent être préservés avant qu'ils ne disparaissent complètement (Choudhary *et al.*, 2008). La préservation de ces savoirs est liée à leur inventaire. Les différentes découvertes peuvent ensuite servir de base pour des études phytochimiques cherchant de nouveaux médicaments à base de plantes médicinales.

2.7. Aperçu sur les espèces sélectionnées

2.7.1. *Achillea ligustica*

2.7.1.1. Description botanique

Le nom du genre *Achillea* provient probablement d'Achille, le héros de la mythologie grecque, ou d'Achillo, un médecin qui utilisa des parties de la plante pour traiter un soldat blessé (Mitich, 1990). Ce genre comprend entre 110 et 140 espèces et fait partie de la famille des Asteraceae (Compositae), la plus grande famille des plantes vasculaires. Les plantes de cette famille ont une large distribution géographique et sont particulièrement répandues dans les zones subtropicales sèches et semi-arides (Appelquist & Moerman, 2011). L'achillée de ligurie (*A. ligustica*), est une plante à fleurs herbacée vivace, rizomateuse, érigée, aromatique, avec des tiges droites atteignant de 6 à 80 cm de hauteur. Elle est ramifiée dans la partie supérieure et ses feuilles sont alternées, composées, finement pennées, de couleur vert grisâtre foncé. Les fleurs sont petites, réunies en inflorescences appelées capitules, regroupées dans une panicule terminale, et présentent une couleur blanche (Conforti *et al.*, 2005). Cette espèce est couramment trouvée en Europe, dans les régions tempérées de l'Asie, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord. En Algérie, cette espèce est connue sous le nom de Belkissoum (Quezel & Santa, 1964). Elle fleurit généralement en Mai et Juin. En raison du charme de ses fleurs, cette espèce est une plante de jardin populaire (Azizi *et al.*, 2010; Bremer *et al.*, 1992). Sa classification taxonomique est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Classification taxonomique de l'espèce *A. ligustica*.

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Achillea</i>
Espèce	<i>Achillea ligustica</i> .

2.7.1.2. Composition phytochimique

A. ligustica est une espèce représentative de la richesse du métabolisme secondaire des espèces appartenant à la famille des Asteraceae. Ses principaux constituants comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes ainsi que les huiles essentielles. Les extraits de cette plante contiennent notamment des acides phénoliques, avec l'acide caféique et l'acide chlorogénique comme principaux représentants. Les flavonoïdes trouvés dans *A. ligustica* étaient les flavones, flavonols et flavonoïdes glycosides. Des composés tels que la lutéoline (Venditti *et al.*, 2015), l'apigénine et la quercétine ont été identifiés (Tuberoso *et al.*, 2009; Tzakou *et al.*, 1995). En outre, des dérivés glycosides de flavones et de flavonols, notamment l'apigénine 7-O-glucoside, la lutéoline 7-O-glucoside et la rutine (Tuberoso *et al.*, 2009), ont été isolés. Dans sa composition chimique, la littérature décrit aussi la présence d'huile essentielle (principalement le linalol (Giamperi *et al.*, 2018), le β -pinène (Benelli *et al.*, 2018), le 1,8-cinéole, le 4-terpinéol (Cecchini *et al.*, 2012), le carvone (Bader *et al.*, 2007) et le camphre (Muselli *et al.*, 2009)). Ainsi, *A. ligustica* se distingue par la richesse et la diversité de ses composés bioactifs, ce qui en fait une plante d'intérêt majeur pour des applications thérapeutiques et pharmaceutiques potentielles.

2.7.1.3. Propriétés pharmacologiques

En médecine traditionnelle, *A. ligustica* est recommandé contre la fièvre, le rhume, l'asthme, les troubles digestifs (Bader *et al.*, 2007), rhumatismales (Bruni *et al.*, 1997) et en application topique, pour les inflammations cutanées ou les plaies mal cicatrisées (Muselli *et al.*, 2009). Les substances présentes dans les extraits et les huiles essentielles sont responsables de divers effets thérapeutiques, tels que des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antidiabétiques, antiproliférative, antibactériennes et antifongiques.

L'activité antioxydante des extraits a été étudiée par plusieurs chercheurs utilisant différentes méthodes, telles que DPPH (Tuberoso *et al.*, 2005), ABTS (Jemia *et al.*, 2013), β -carotène (Maggi *et al.*, 2009) et la peroxydation lipidique des liposomes (Conforti *et al.*, 2005). Ces méthodes ont confirmé que l'activité antioxydante des composés était corrélée à la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes. Ces résultats mettent en évidence l'efficacité des extraits à neutraliser les radicaux libres et à inhiber la peroxydation des lipides, suggérant un potentiel antioxydant important pour ces composés. *A. ligustica* a démontré des activités anti-inflammatoires significatives. Elle peut moduler les niveaux de médiateurs inflammatoires dans

le corps, en inhibant complètement la biosynthèse de LTB₄, un médiateur de l'inflammation aiguë. Cela en fait un candidat prometteur pour le développement de nouvelles substances anti-inflammatoires (Bader *et al.*, 2015; Si *et al.*, 2006; Tuberoso *et al.*, 2009).

L'activité inhibitrice de l' α -amylase de la plante suggère également son potentiel dans la gestion du diabète, en ralentissant l'absorption du glucose et, par conséquent, en atténuant l'élévation postprandiale du glucose plasmatique (Conforti *et al.*, 2005). L'activité antiproliférative des huiles essentielles a été confirmée par le test MTT, et les résultats révèlent des effets significatifs sur la réduction de la viabilité cellulaire, indiquant un potentiel marqué pour inhiber la prolifération des cellules cibles. Ces données suggèrent que les huiles essentielles étudiées possèdent des propriétés antitumorales notables, qui pourraient être exploitées dans des applications thérapeutiques (Maggi *et al.*, 2009).

L'évaluation de divers extraits obtenus à partir d'*A. ligustica*. vis-à-vis d'un large éventail de bactéries et de champignons a montré que ces extraits présentent des propriétés antimicrobiennes significatives ce qui en fait une plante prometteuse pour le développement de traitements antimicrobiens naturels (Freires *et al.*, 2015).

2.7.2. *Borago officinalis*

2.7.2.1. Description botanique

Borago officinalis de la famille des Boraginacées est connu sous les noms de bourrache. En Algérie, cette plante est connue sous le nom de "Lessane el thawr" ou "Bouchenaf" (Asadi-Samani *et al.*, 2014). C'est une plante herbacée annuelle, densément couverte de trichomes rugueux, atteignant une hauteur de 40 à 70 cm. L'ensemble de la plante est ancré dans le sol par un système racinaire composé d'une racine principale longue et épaisse, complétée par des racines latérales plus petites. La tige est dressée, creuse et ramifiée dans sa partie supérieure. La plante forme d'abord une rosette basale de feuilles, puis, lors du passage à la phase générative, des feuilles apparaissent également sur la tige de manière alternée (Asadi-Samani *et al.*, 2014; Pieszak *et al.*, 2012). La bourrache produit des feuilles simples, de forme obovoïde ou ovée, avec un bord dentelé et une nervation bien marquée. Elles sont bifaciales, la face supérieure étant d'un vert foncé. Tandis que la face inférieure est plutôt de couleur vert grisâtre, en raison de la couverture dense de trichomes. La rosette basale forme des feuilles pétiolées avec une base en forme de coin, tandis que les feuilles de la tige sont plutôt sessiles ou légèrement pétiolées. À la surface des feuilles, on trouve de nombreux stomates. Les feuilles

sont amphistomatiques, ce qui signifie que les stomates peuvent être observés des deux côtés de la feuille. Les stomates sur le côté adaxial de la feuille sont généralement plus grands et moins nombreux, tandis que sur le côté abaxial, c'est l'inverse. L'ensemble du corps de la plante est densément couvert de trichomes, qui ont principalement une fonction protectrice. La bourrache fleurit de Juin jusqu'à la mi-août, généralement avec des fleurs bleues et plus rarement roses ou blanches (Gupta & Singh, 2010). Cette espèce est originaire de l'Orient et du bassin méditerranéen Nord-Africain, actuellement cultivée en Europe, en Amérique du Nord, en Inde, en Chine et en Nouvelle-Zélande (Colombo *et al.*, 2010; Río-Celestino *et al.*, 2008). La classification taxonomique de cette espèce est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Classification taxonomique de l'espèce *B. officinalis*.

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Boraginales
Famille	Boraginaceae
Genre	<i>Borago</i>
Espèce	<i>Borago officinalis</i> .

2.7.2.2. Composition phytochimique

La composition chimique des différentes parties de la plante *B. officinalis* a attiré l'attention des scientifiques du monde. Ils ont découvert des composés polyphénoliques et des acides phénoliques (acide vanillique, gentisique, caféique, p-cumarique, p-hydroxybenzoïque, romarinique et chlorogénique) (Fernandes *et al.*, 2019; Meletis & Wagner, 2002), Les flavonoïdes les plus caractéristiques de la bourrache sont principalement le kaempférol, le quercétol, astragaline, vitexine, rutoside (Michalak *et al.*, 2023). D'autres molécules ont été détectées dans l'huile essentielle de bourrache. Parmi ces molécules, on retrouve le spathulénol, qui est le principal composant, ainsi que le trifluorométhyl, le thymol, le verrucarol, le globulol et le guaiol (Ibrahim & Alshammaa, 2023).

Elles présentent également de petites quantités d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (sénécionine, lycopsamine, 7-acétyl-lycopsamine, amabiline, supinidine, supinine, des traces d'intermédiine et de dérivés 7-acétylés, et d'autres). L'alcaloïde principal présent dans les graines de cette plante est la tesinine. Les feuilles de cette espèce contiennent aussi des saponines et

des tanins (Mohajer *et al.*, 2016). Cette diversité de composition chimique met en évidence le potentiel de *B. officinalis* en tant que source de produits naturels, avec des applications prometteuses dans divers domaines, notamment en phytothérapie et en recherche pharmaceutique.

2.7.2.3. Propriétés pharmacologiques

La plante *B. officinalis* a été largement utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle de divers pays d'Asie, d'Amérique et d'Afrique, sous forme de décoctions et d'infusions (Ibrahim & Alshammaa, 2023). Elle est reconnue pour ses propriétés tranquillisantes et est couramment utilisée pour traiter les troubles digestifs, respiratoires et cardiovasculaires, ainsi que pour soulager les menstruations difficiles, symptômes de la ménopause (Gilani *et al.*, 2007), la peau enflammée ou hypersensible et les blessures (Farahpour & Mavaddati, 2012). Leur efficacité a également été décrite pour le traitement des maux de gorge, des rhumes, des toux persistantes et des maladies de la peau (furoncles, eczémas et éruptions cutanées). Les fleurs de bourrache sont utilisées comme diurétique et expectorant (Ibrahim & Alshammaa, 2023). Elle est également couramment utilisée pour traiter les problèmes rénaux, la dépression et pour la faiblesse nerveuse et cardiaque (Kh & Siddiqui, 2024).

L'utilisation traditionnelle étendue de *B. officinalis* incite les chercheurs à réaliser des études sur ses propriétés pharmacologiques. L'activité antimicrobienne a été bien documentée, montrant des effets antibactériens contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Mujahid *et al.*, 2017), ainsi que des propriétés antifongiques (Eidi *et al.*, 2014). Les polyphénols de bourrache agissent également comme d'excellents antioxydants (Manthena *et al.*, 2022). Ils réduisent le risque de cancer, de maladies cardiovasculaires, et de la maladie d'Alzheimer (Ramandi *et al.*, 2017). De plus, cette plante a montré des effets antidiabétiques dans diverses études, soulignant son potentiel comme traitement complémentaire dans la gestion du diabète (Rodríguez-Magaña *et al.*, 2019). L'huile extraite des graines mûres favorise la production de substances anti-inflammatoires et antispasmodiques dans le corps (Arnal-Schnebelen, 2006).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Enquête Ethnobotanique

L'enquête a été réalisée sur sept subdivisions administratives de la wilaya de Mila, comprenant Ain Mellouk, Terrai Bainnane, Chelghoum laid, Mila, Amirat Arres, Ahmed Rachedi, et Ferdjioua. De plus, elle a également couvert sept subdivisions administratives de la wilaya de Skikda, à savoir Beni Oualbane, Oum Toub, Ain Charchar, Ain Kechra, Tamalous, Sidi Mezghiche, et Collo. Les subdivisions étudiées sont présentées dans la Figure 10.

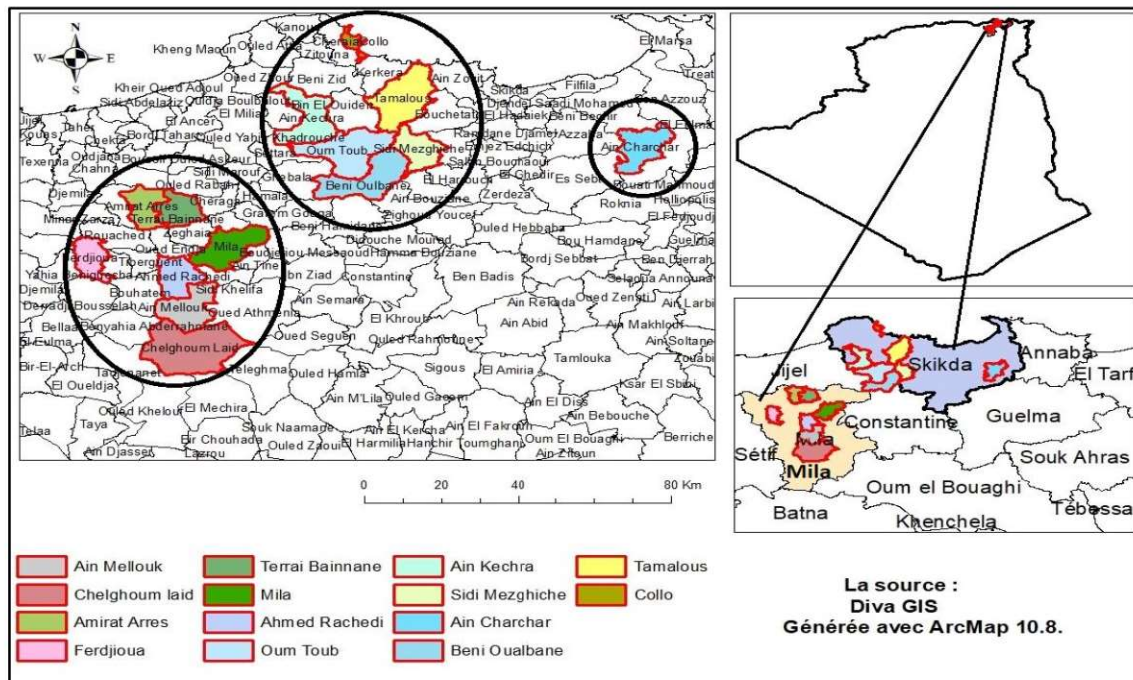


Figure 11 : Représentation géographique des sites d'enquête.

3.1.1. Présentation et description des zones d'étude

3.1.1.1. Région de Mila

La région de Mila est située dans le Nord-Est de l'Algérie, avec des coordonnées entre 36°30' N de latitude et 6°24'E de longitude, à une altitude de 315 mètres au-dessus du niveau de la mer. Sur le plan administratif, La région de Mila est limitrophe de la wilaya de Jijel, au Nord, de la wilaya de Skikda, au Nord-Est, de la wilaya de Constantine, à l'Est, de la wilaya de Batna au Sud et de la wilaya de Sétif au Sud-Ouest. La région connaît un climat semi-aride, marqué par des

périodes de sécheresse qui peuvent varier en durée. Son paysage est dominé par de vastes chaînes de montagnes, un terrain à fortes pentes et un relief complexe.

3.1.1.2. Région de Skikda

La région de Skikda (36°53'N de latitude, 06°56'E de longitude et à 1,30 mètres d'altitude), est située dans Nord-Est de l'Algérie. Avec une superficie de 4137,68 Km², principalement montagneuse (41% de la surface totale). Au Nord, elle est délimitée par la mer méditerranéenne, au Sud par la wilaya de Mila, Constantine et Guelma, à l'Est par la wilaya d'Annaba et à l'Ouest par la wilaya de Jijel. La région possède un climat de type méditerranéen.

3.1.2. Étude ethnobotanique

La collecte des données ethnobotaniques pour la progression de cette recherche a été réalisée par le biais de questionnaires (Annexe 3) d'entretiens afin de recueillir le maximum d'informations sur les espèces de plantes médicinales utilisées. Le choix approprié des interviewés est une étape très importante dans une recherche ethnobotanique afin d'obtenir de bons résultats. Les personnes ont été sélectionnées en fonction de leur connaissance et de leur utilisation des plantes médicinales (Albuquerque *et al.*, 2014). Les questionnaires ont été distribués à des personnes (N=89) de différentes subdivisions administratives de la wilaya de Mila et Skikda. Les informateurs ont répondu à des questions concernant les données socio-économiques (Nom de l'informateur, année de naissance, sexe, occupation actuelle, niveau d'éducation, etc), et les données ethnobotaniques (Noms des espèces de plantes médicinales, les indications thérapeutiques, les méthodes de préparation, etc.). La distribution des questionnaires a été réalisée en deux phases : la première a été distribuée aux informateurs lors de leur rencontre, sans préavis, en évitant de la part du chercheur tout commentaire susceptible d'influencer les réponses des interviewés, afin de garantir que l'information obtenue était uniquement celle qu'ils connaissaient. La seconde partie a été donnée aux informateurs pour qu'ils la remplissent à leur domicile, avec l'aide de leurs familles et des personnes qui les connaissent.

La collecte des données a eu lieu durant la période (2019-2020) et l'enquête a permis de collecter un total de 347 fiches d'enquête complétées, dans lesquelles 88 espèces ont été mentionnées. Les données obtenues ont été tabulées, analysées et, afin de faciliter leur visualisation, converties en valeurs en pourcentages et fréquences et présentées sous forme de tableaux et de graphiques. Les indices ethnobotaniques ont été calculés à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics version 25. Les noms populaires des espèces floristiques natives et exotiques ont

été enregistrés conformément aux citations des informateurs. Les noms scientifiques ont été validés par consultation du livre *Encyclopédie des plantes médicinales* (Chevallier, 2001).

3.1.3. Analyse des données ethnobotaniques

Dans le modèle ethnobotanique quantitatif, les indices ethnobotaniques se distinguent, car ils servent à calculer dans quelle mesure les informateurs font usage des plantes qui les entourent et à évaluer l'importance culturelle relative des plantes pour les différents usages (par exemple, l'importance des plantes médicinales). La quantification est importante et aide dans le processus de démonstration, à la généralisation des résultats, et permet aussi de mesurer sa validité et sa fiabilité. Ainsi, nous avons calculé divers indices et comptages ethnobotaniques classiques, tels que la valeur d'usage des espèces (VUs), le degré de fidélité (DF) et le facteur de consensus des informateurs (FCI). Nous traitons tous ces indices séparément et avec plus de profondeur dans la section de discussion.

a) Valeur d'Usage

La valeur d'usage des espèces (VUs) est un des outils pour valider l'importance des plantes, car les plantes ayant une valeur d'usage élevée reflètent un usage important dans la zone d'étude et une action thérapeutique maximale contre les problèmes de santé (Silva & Albuquerque, 2005).

Pour savoir quelle espèce subit la plus grande pression d'utilisation, la Valeur d'Usage (VUs) a été calculée, selon Phillips & Gentry, (1993) et Phillips *et al.* (1994), modifiée par Rossato *et al.* (1999).

$$VUs = \frac{\Sigma Us}{N}$$

Où:

- VUs = Valeur d'usage pour une espèce s
- ΣUs = Nombre d'usages mentionnés de l'espèce s
- N = Nombre total d'informateurs

b) Degré de fidélité (DF)

Pour déterminer la concordance entre les réponses des informateurs concernant l'utilisation des plantes médicinales pour les animaux, le consensus des informateurs a été calculé à l'aide du degré de fidélité adapté de la proposition de Friedman *et al.* (1986), selon la formule suivante:

$$DF = \frac{Np}{N} \times 100$$

Où:

- **DF** = Degré de fidélité
- **Np** = Nombre d'informateurs ayant cité l'usage principal pour une espèce donnée
- **N** = Total des informateurs ayant cité l'espèce pour toute finalité

c) Facteur de consensus des informateurs (FCI)

Pour analyser les systèmes corporels (catégories de maladies ou de symptômes) ayant la plus grande importance relative au sein de la communauté, le Facteur de Consensus des Informateurs (FCI) proposé par Trotter & Logan, (2019) a été calculé. Une valeur faible (proche de 0) indique un désaccord parmi les informateurs concernant les plantes utilisées pour traiter les affections d'une catégorie spécifique. La valeur maximale que le FCI peut atteindre pour une catégorie est 1, qui indique un consensus total entre les informateurs sur les plantes utilisées pour cette catégorie. Le FCI a été obtenu à partir de la formule suivante :

$$FCI = \frac{(Nur - Nt)}{(Nur - 1)}$$

Où:

- **FCI** = Facteur de consensus des informateurs
- **Nur** = Nombre de citations d'utilisation dans chaque catégorie de maladie
- **Nt** = Nombre d'espèces utilisées dans cette catégorie

3.2. Matériel végétal

Dans cette étude, le choix des espèces végétales a été guidé par les résultats de l'enquête ethnobotanique réalisée au début de la thèse. Deux plantes, *A. ligustica* (Asteraceae) et *B. officinalis* (Boraginaceae), ont été sélectionnées. Le choix de ces espèces a été motivé par leur utilisation traditionnelle en médecine populaire, soulignant leur potentiel pour explorer des

propriétés biologiques et thérapeutiques encore peu étudiées. De plus, leur faible représentation dans la littérature scientifique, en particulier celle d'*Achillea ligustica*, qui suscite un intérêt en raison de l'absence d'études approfondies dans les domaines botanique et phytochimique, ainsi que leur disponibilité locale dans ces régions, facilitant leur collecte et leur étude, ont renforcé leur sélection.

Les deux plantes ont été collectées dans la région de Mila, au Nord-Est de l'Algérie (36°30'N, 6°24'E, à une altitude de 315 m), respectivement dans les communes d'Amirat Arres et d'Ain Mellouk (Figure 12), dans le mois d'avril 2021.

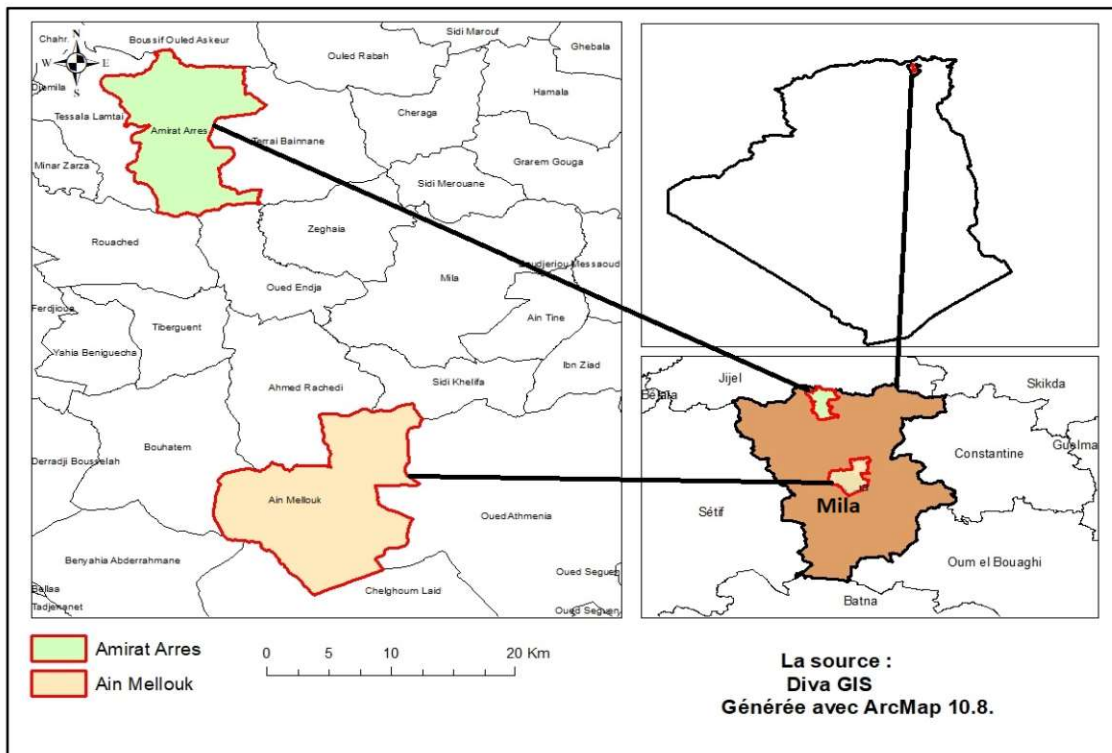


Figure 12 : Localisation géographique des sites de récolte des deux espèces (*A. ligustica*) et (*B. officinalis*).

L'identification des deux espèces (Figure 13) a été effectuée par Dr. Sakhraoui Nora, spécialiste en taxonomie végétale, Université du 20 Août 1955 – Skikda.

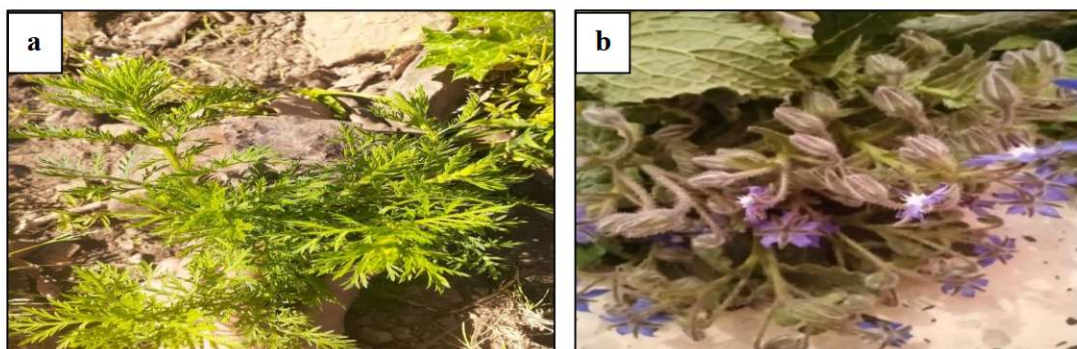


Figure 13 : Illustration photographique des espèces étudiées ; *A. ligustica* (a) et *B. officinalis* (b).

3.3. Étude Phytochimique

3.3.1. Préparation des extraits par macération et fractionnement

L'extraction a été effectuée au niveau du laboratoire de biochimie de l'Université 20 Août 1955, Skikda. 100 g du matériel végétal provenant des feuilles sèches broyées des deux plantes a été placé dans des récipients et macéré séparément dans 1L d'une solution hydroalcoolique (méthanol à 70% ; MeOH/H₂O : 70/30, v/v) pendant 24 heures, sous agitation, à température ambiante et avec un renouvellement du solvant chaque 24 heures, avec en moyenne 3 changements de solvant. La filtration a été effectuée à travers du papier filtre, avec des collectes périodiques des filtrats. Les filtrats ont été concentrés à l'évaporateur sous vide, ce qui a permis d'obtenir l'extrait brut. L'extrait brut a d'abord été dissous dans 200 ml de l'eau distillée bouillante. Après une nuit de repos, la fraction aqueuse résultante a été filtrée et soumise à une extraction liquide-liquide avec des solvants dans un ordre croissant de polarité (n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol). Chaque solvant étant utilisé trois fois afin d'assurer une extraction optimale.

Les fractions suivantes ont ainsi été obtenues : hexanique (n-hex), chloroformique (CHCl₃), acétate d'éthyle (AcOEt), et n-butanolique (n-BuOH). Les fractions ont été concentrées dans un évaporateur rotatif à pression réduite et à une température de 40 °C, puis pesées pour déterminer le rendement en masse. Ensuite, ils ont été stockés à température de 4°C jusqu'à l'analyse. Le diagramme représentant le processus d'obtention des fractions est présenté dans la Figure 14.

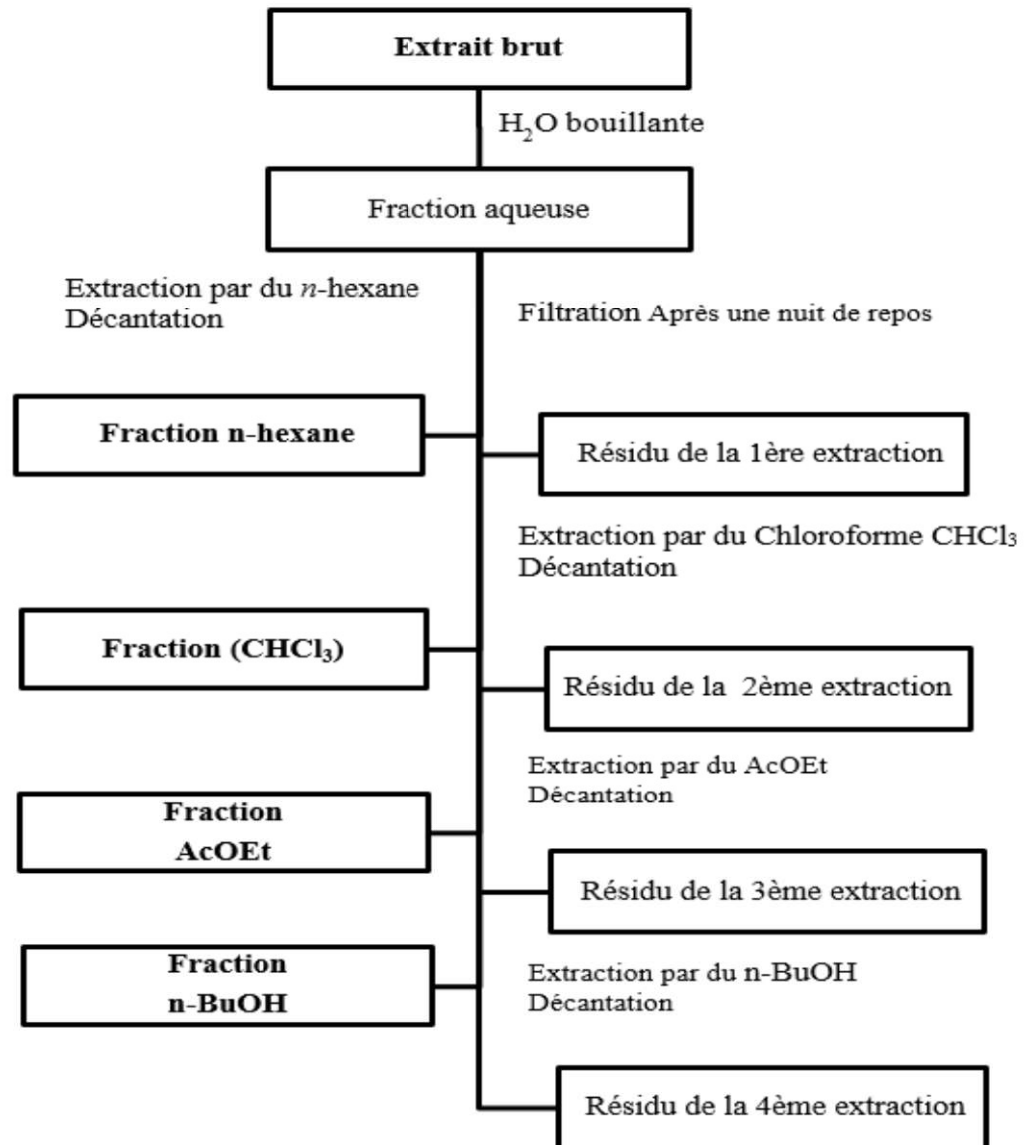


Figure 14: Schéma des étapes d'extraction liquide-liquide (Ćetković *et al.*, 2007).

Pour évaluer l'efficacité de la technique d'extraction, les rendements extractifs ont été calculés et exprimés en pourcentage selon la formule suivante a été utilisée :

$$\text{Rendement \%} = \frac{M1}{M0} \times 100$$

Où:

- **M1** : La masse (en grammes) de l'extrait sec obtenu lors du processus d'extraction
- **M0** : La masse (en grammes) de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction

3.3.2. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques

Pour déterminer la teneur totale en composés phénoliques (TCP) des extraits (AcOEt et n-BuOH) des deux plantes, on a utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu selon Singleton & Rossi, (1965), une méthode colorimétrique basée sur une réaction d'oxydoréduction entre le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) et les composés phénoliques. L'agent F-C est généralement composé de tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de HCl concentré, d'acide phosphorique à 85 % (H_3PO_4), de sulfate de lithium ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et d'eau. Ce mélange donne à l'agent une couleur jaune intense, qui se transforme en bleu en présence de contaminants réducteurs (Folin & Ciocalteu, 1927). Le changement de couleur du mélange réactionnel est provoqué par un transfert d'électrons, au cours duquel le réactif FC (agent oxydant) est réduit, tandis que les composés phénoliques (agents réducteurs) sont oxydés. Les composés phénoliques agissent ainsi comme donneurs d'électrons. La réduction du molybdène (contenu dans le composé Na_2MoO_4 du réactif FC) entraîne la formation de complexes bleus, qui sont détectés par spectrophotométrie à une longueur d'onde autour de 765 nm (Gülçin, 2012).

Dans une plaque à 96 puits, le mélange suivant a été préparé : 20 μL d'extrait (dilué à 1 mg/mL dans du méthanol), 75 μL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % (p/v) et 100 μL de réactif FC à 10 % (v/v). Le méthanol a été utilisé comme blanc à la place de l'extrait. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2 heures à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques de 96 puits (Perkin Elmer, Enspire). La TCP des extraits a été calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 2). Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg Extrait).

3.3.3. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes (TF) a été déterminée selon le protocole développé par Topçu *et al.* (2007), et adapté à une analyse en microplaque. Grâce à leur forte teneur en groupes oxo et hydroxyles, les flavonoïdes présentent une grande affinité pour les ions métalliques tels que Al^{3+} . Cette méthode repose sur la réaction des flavonoïdes avec les ions aluminium en milieu alcalin. Pour cela, 50 μL de l'extrait (AcOEt et n-BuOH), 130 μL de méthanol, 10 μL d'acétate de potassium et 10 μL de nitrate d'aluminium (10 %) ont été mélangés dans une plaque à 96 puits. Pour le blanc, 150 μL de méthanol ont été ajoutés à la place de l'extrait. Les lectures d'absorbance ont été prises à 415 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Perkin Elmer, Enspire). La TF a été

calculée et exprimée en microgrammes d'équivalents de la quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ Extrait), sur la base d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (Annexe 1).

3.3.4. Analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (LC-ESI-MS/MS)

L'identification des composés chimiques présents dans les extraits (AcOEt et n-BuOH) des plantes *Achillea ligustica* et *Borago officinalis* a été réalisée à l'aide d'un système UPLC-ESI-MS/MS Shimadzu 8040, intégrant la technologie UFMS et équipé d'une pompe binaire Nexera XR LC-20AD. La séparation chromatographique a été effectuée avec une colonne Ultra-force C18 (I, D, 150 mm \times 4,6 mm, 3 μm de taille de particules ; Restek). Dans le cadre de l'optimisation des standards des composés chimiques, une injection directe sans colonne a été réalisée. Les conditions d'ionisation par ESI étaient les suivantes : gaz CID à 230 KPa, dynode de conversion à $-6,00$ kV, température de l'interface à 350 °C, température du DL à 250 °C, débit du gaz de nébulisation à $3,00$ L/min, température du bloc de chauffe à 400 °C, et débit du gaz de séchage à $15,00$ L/min. Les standards ont été préparés à une concentration de 500 $\mu\text{g/L}$ en méthanol. La détection a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse à piège ionique a été utilisé en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), en ions positifs et négatifs. Le système de phases mobiles était composé de de la phase A, qui était de l'eau avec l'ajout de $0,1$ % d'acide formique, et de la phase B, qui était du méthanol. Le débit de la phase mobile a été réglé sur $0,3$ mL/min. Le volume d'injection de l'échantillon était de 5 μL , et le gradient de la phase mobile était le suivant : de 0 à 1 min, A à 80 % ; de 1 à 30 min, A à 20 % ; de 30 à 40 min, A à 0 % ; de 40 à 45 min, A à 0 % ; et de 45 à 60 min, A à 80 %.

3.4. Activités Biologiques

3.4.1. Activité antioxydante

3.4.1.1. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH

La méthode originale de DPPH \cdot , du terme anglais 1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl, a été décrite par Blois, (1958) et, par la suite, modifiée par Brand-Williams *et al.* (1995). Le processus se déroule par des réactions impliquant le transfert d'atome d'hydrogène et d'électrons de l'antioxydant vers le radical DPPH \cdot (Figure 15).

Le DPPH, sous forme de radical, présente une coloration violette intense avec une absorbance maximale entre 515 et 528 nm (Huang *et al.*, 2005). L'espèce chimique formée après

réaction avec la substance antioxydante présente une coloration jaune et, par conséquent, il y a une réduction de la bande d'absorption observée précédemment à 517 nm (Shahidi & Zhong, 2015).

Le potentiel de l'activité antioxydante de l'échantillon est proportionnel au changement de couleur de la solution contenant le radical DPPH•. Pour l'analyse, une solution méthanolique de DPPH (0,15 mM) a été préparée. Pour chaque test, 40 µL des extraits (AcOEt ou n-BuOH) à différentes concentrations (0,0078-0,5 mg/mL) ont été mélangés avec 160 µL de la solution de DPPH. En parallèle, le contrôle négatif a été préparé en remplaçant l'échantillon par du méthanol. Les plaques ont été incubées pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière pour déterminer l'activité antioxydante (% d'inhibition), en utilisant l'équation suivante :

$$\% d' inhibition = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \right] \times 100$$

Où

- **A1** : l'absorbance du contrôle négatif
- **A2** : l'absorbance de l'échantillon testé

Les valeurs IC₅₀, indiquant la concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux DPPH, ont été déterminées à partir de la régression linéaire du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'échantillon. De plus, pour évaluer l'efficacité antioxydante, les valeurs IC₅₀ des extraits de plantes ont été comparées à celles du standard synthétique butylhydroxyanisole (BHA).

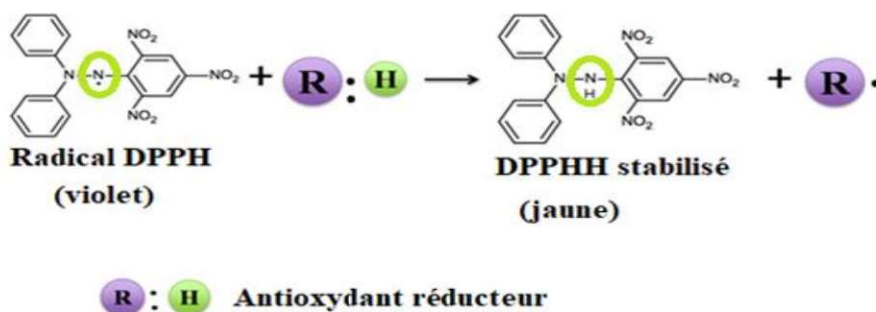


Figure 15 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant (Liang & Kitts, 2014).

3.4.1.2. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode ABTS

Le méthode ABTS, de l'abréviation anglaise 2,2'-AzinoBis-3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonic acid, a été investiguée selon le protocole décrit par Re *et al.* (1999). La formation du cation-radical ABTS^{•+} se produit à partir du mélange d'une solution contenant le réactif ABTS (7 mM) avec une solution de persulfate de potassium (2,45 mM) dans de l'eau. Ce mélange est laissé au repos pendant 16 heures, dans l'obscurité. À la fin de ce temps, une solution contenant le cation-radical ABTS^{•+} de couleur vert-bleu intense est obtenue.

Avant la réaction, il est nécessaire de réaliser des dilutions de la solution concentrée contenant le cation-radical ABTS^{•+}, en utilisant du méthanol, jusqu'à obtenir une solution diluée avec une absorbance de 0,7 à 734 nm. Le cation-radical ABTS^{•+} présent dans la solution peut être stabilisé après réaction avec des substances ayant des activités antioxydantes. Le processus se déroule par des réactions impliquant le transfert d'un atome d'hydrogène et des électrons de l'antioxydant vers le cation-radical ABTS^{•+} (Figure 16) (Prior et al., 2005). Pour l'expérience, 40 µL de l'extrait (AcOEt et n-BuOH) préparé à différentes concentrations (0,0078-0,5 mg/mL) ont été ajoutés à 160 µL de la solution radicale ABTS^{•+}. Un contrôle négatif a été préparé en utilisant la même procédure, remplaçant les échantillons par du méthanol. Après incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance a été déterminée autour de 734 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} a été déterminé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{(A1 - A2)}{A1} \right] \times 100$$

Où:

- **A1** : l'absorbance du contrôle négatif
- **A2** : l'absorbance de l'échantillon testé

Des standards synthétiques, tels que le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butylhydroxytoluène), ont été utilisés pour comparer les pourcentages d'inhibition et les valeurs d'IC₅₀ (concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical ABTS^{•+}) ont été mesurées à partir du graphique de l'inhibition d'ABTS^{•+} en fonction de la concentration de l'échantillon.

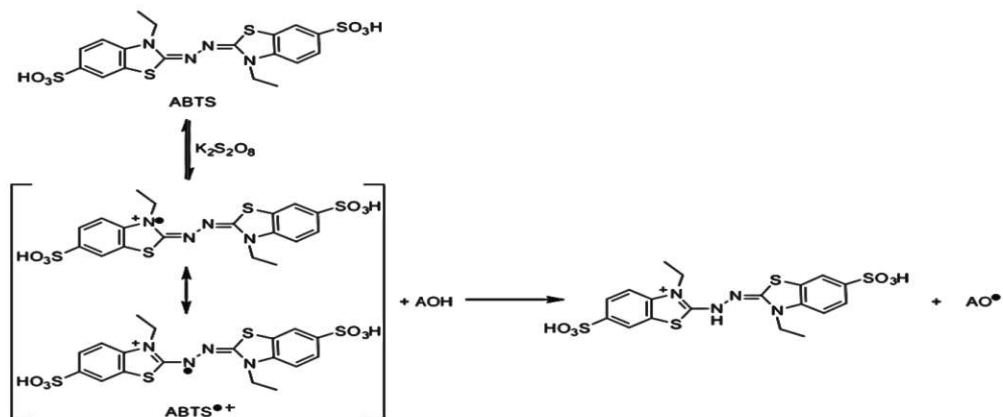


Figure 16 : Équation chimique de la réaction entre le cation-radical $ABTS^{\bullet+}$ et l'antioxydant (AOH) (Kumar *et al.*, 2019).

3.4.1.3. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP

La méthode FRAP de l'abréviation en anglais (ferric reducing antioxidant potential), a été adaptée de la méthode décrite par Oyaizu (1986). C'est une méthode rapide, simple et rentable, et ne nécessite aucun équipement spécial. Elle est également caractérisée par sa haute précision et sa sensibilité (Munteanu & Apetrei, 2021). Cette méthode repose sur le principe d'une réaction redox (Figure 17), c'est-à-dire la réduction du complexe d'ions ferreux Fe^{3+} en complexe ferreux Fe^{2+} (coloration bleue intense) sous l'action des antioxydants (Shahidi & Zhong, 2015).

Pour l'analyse, un aliquote de 10 μ L des extraits (AcOEt et n-BuOH) ou de chacun des standards à plusieurs concentrations (0,0625–4mg/mL) a été ajouté à 40 μ L de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 μ L de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation pendant 20 minutes à 50°C, 40 μ L d'eau distillée et 10 μ L de chlorure ferrique $FeCl_3$ (0,1%) ont été ajoutés dans les puits de la microplaque. La mesure de l'absorbance a été effectuée autour de 700 nm et les données ont été exprimées en $A_{0.5}$ μ g/mL et comparées aux standards antioxydants α -tocophérol et acide ascorbique.

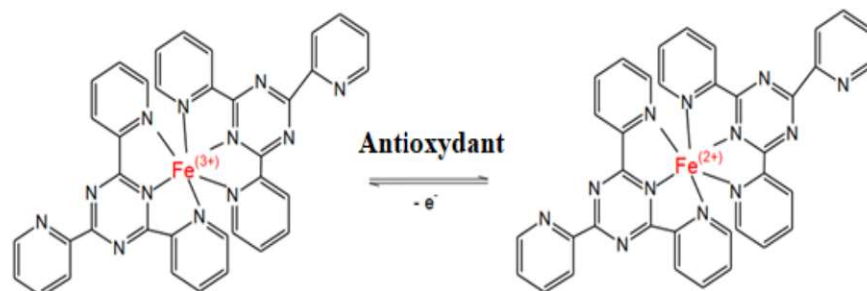


Figure 17 : Réaction de réduction du complexe Fe^{3+} en Fe^{2+} dans le test FRAP phénanthroline FeCl_3 (Lewoyehu & Amare, 2019).

3.4.1.4. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode phénanthroline

Ce test repose sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant. La réaction entre les ions ferreux (Fe^{2+}) et la 1,10-phénanthroline, conduit à la formation d'un complexe rouge-orange (Figure 18), dont l'absorbance maximale se situe entre 508 et 510 nm (Kolthoff *et al.*, 1950). Par conséquent, la création du complexe ferreux-triphenanthroline dépend directement de l'efficacité et de la concentration de l'antioxydant (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

L'activité antioxydante par la méthode phénanthroline a été mesurée dans la présente étude en utilisant la méthodologie de Szydlowskac-zerniak *et al.* (2008). Dans une microplaque à 96 puits, 10 μL de l'extrait (AcOEt et n-BuOH) à différentes concentrations (0,0625–4mg/mL) a été mélangé avec du FeCl_3 (50 μL , 0,2%), de la phénanthroline (30 μL , 0,5%) et 110 μL de méthanol. L'absorbance a été mesurée autour de 510 nm après conservation de la plaque dans l'obscurité pendant 20 minutes à 30°C pour permettre à la réaction de se terminer. Les données ont été exprimées en $A_{0,5} \mu\text{g/mL}$. Le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butylhydroxytoluène), ont été utilisés comme standards.

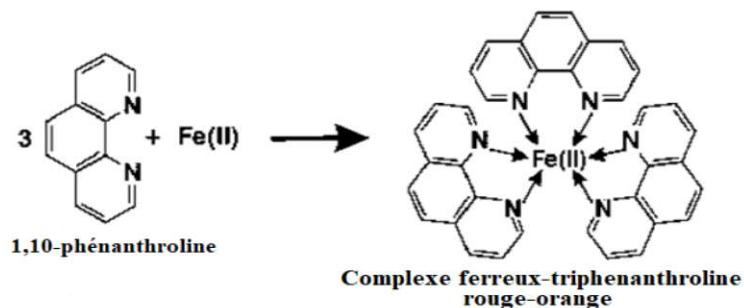


Figure 18: Formation du complexe orange-rouge entre la 1,10-phénanthroline et le Fe^{2+} (Koronkiewicz, 2021).

3.4.2. Évaluation de l'activité anti-enzymatique

3.4.2.1. Activité inhibitrice de la cholinestérase

L'activité inhibitrice contre l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) a été déterminée à l'aide de la méthode modifiée d'Ellman *et al.* (1961). Le principe de la méthode consiste à mesurer la quantité de thiocholine produite par l'estérase, qui résulte de la conversion de substrats (L'acétylthiocholine ou la butyrylthiocholine). Le thiocholine réagit ensuite avec le dithio-bis-(2-nitrobenzoate) (DTNB), produisant un anion jaune, le 5-thio-2-nitrobenzoate. La production de l'anion est évaluée par spectrophotométrie, en mesurant l'absorbance autour de la longueur d'onde de 412 nm.

Le système de réaction était composé de 150 μL de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 8.0), 10 μL de solution d'extrait (AcOEt et n-BuOH) dissous dans du méthanol à différentes concentrations, 20 μL de solution d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou de solution de BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U). Le mélange a été incubé à 25°C pendant 15 minutes, puis 10 μL de réactif 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (0,5 mM) et 10 μL d'acétylthiocholine iodure (0,71 mM) ou 10 μL de butyrylthiocholine chlorure (0,2 mM) ont été ajoutés. La solution de méthanol a servi de contrôle négatif. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaque à 96 puits (Perkin Elmer, Enspire) à 412 nm, à différents intervalles de temps : 0 minute, 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes. L'analyse a été réalisée en triplicat ($n = 3$). Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100$$

Où

- **A₁**: Absorbance du contrôle négatif
- **A₂**: Absorbance de l'échantillon

Les résultats ont été exprimés en valeurs IC₅₀, qui ont été calculées comme la concentration des extraits entraînant une inhibition de 50% de l'activité de l'AChE et de la BChE. La galantamine a été utilisée comme contrôle positif.

3.4.2.2. Activité inhibitrice de l' α -amylase

Pour l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits (AcOEt et n-BuOH) de plantes étudiés, l'essai d'inhibition de l' α -amylase a été utilisé. Ce dernier a été adapté de la méthode décrite par Zengin *et al.* (2015), basée sur le test d'amidon-iode, avec quelques modifications. Lors de l'inhibition de l' α -amylase par les extraits de plantes, l'hydrolyse du substrat (amidon) est empêchée, entraînant ainsi son accumulation. Cette accumulation réagit avec l'iode pour former un complexe bleu-noir, provoquant un changement de l'absorbance. La couleur bleu foncé indique la présence d'amidon ; la couleur jaune indique l'absence d'amidon, tandis qu'une couleur brunâtre indique un amidon partiellement dégradé dans le mélange de la réaction.

L'essai a commencé par le mélange de 25 μ L d'extrait végétal (AcOEt et n-BuOH) (préalablement préparé à des concentrations de 0,0625-4 mg/mL), du 50 μ L de solution enzymatique (α -amylase, 1U) préparée dans de tampon phosphate de sodium à pH 6,9. Le mélange a été pré-incubé pendant 10 minutes à 37°C. Après cette incubation, 50 μ L de la solution aqueuse d'amidon à 0,1% ont été ajoutés. Après 10 minutes supplémentaires d'incubation, 25 μ L de la solution d'HCl (1M) et 100 μ L de la solution aqueuse d'iode-potassium (IKI) ont été ajoutés (Figure 19). La lecture a ensuite été réalisée à 630 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (Perkin Elmer, EnSpire). Le pourcentage d'inhibition de l' α -amylase a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition de l}'\alpha - \text{amylase} = 1 - \left[\frac{((Ac - Ae) - (As - Ab))}{(Ac - Ae)} \right]$$

Où:

- **Ac:** Absorbance [amidon+ IKI+ HCl+ volume de solvant de l'extrait+ tompon phosphate de l'enzyme].
- **Ae:** Absorbance [Enzyme+ amidon+ IKI+ HCL+ volume de se solvant de l'extrait]
- **As:** Absorbance [Enzyme + Extrait+ amidon+ IKI+ HCl]
- **Ab:** Absorbance [Extrait+ IKI+ tompon phosphate de sodium].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
B	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
C	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
D	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
E	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
F	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
G	As1	As1	As1	Ab1	As2	As2	As2	Ab2	As	As	As	Ab
H	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

Figure 19 : Distribution des absorbances correspondantes à chaque puits dans la microplaque pendant l'analyse de l'activité inhibitrice de l' α -amylase.

Les résultats sont également exprimés en IC₅₀ (µg/mL), qui désigne la concentration inhibitrice à 50 % de la quantité d'enzyme. Le médicament anti-hyperglycémiant acarbose est approuvé pour la prévention et le traitement du diabète de type 2 grâce à son administration quotidienne. Il agit par inhibition compétitive de l' α -amylase (en mimant leur substrat), régulant ainsi l'absorption du glucose au niveau de l'intestin (Yoon & Robyt, 2003). Il est donc utilisé comme contrôle positif dans cette étude.

3.4.2.3. Activité inhibitrice de l'uréase

L'uréase est une enzyme qui catalyse la conversion de l'urée en ammoniac (NH₃) et en dioxyde de carbone (CO₂) (Upadhyay, 2012). La détection colorimétrique de l'ammoniac produit lors de l'hydrolyse de l'urée permet d'évaluer l'activité inhibitrice de l'enzyme. La diminution de la

quantité d'ammoniac dans le milieu réactionnel est proportionnelle à l'efficacité de l'inhibiteur (Deng *et al.*, 2016).

La détermination de l'activité inhibitrice de l'uréase a suivi la procédure proposée par Taha *et al.* (2018). Le réactif A a été préparé en dissolvant du phénol (8 % p/v) et du nitroprussiate de sodium (0,1 % p/v). Le réactif B a été préparé en dissolvant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) (2,85 %) et de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) (4,7 %). Une microplaque à 96 puits, un mélange réactionnel contenant 25 µL de solution d'enzyme uréase, 50 µL de la solution d'urée (17 mM) et 10 µL µl de solution d'inhibiteur (extraits de plantes (AcOEt et n-BuOH) de à des concentrations allant de 0,0625 à 4 mg/mL). Ces solutions ont été incubées pendant 15 minutes à 30°C. Ensuite, 45 µL du réactif A et 70 µL du réactif B ont été ajoutés au mélange, qui a été incubé pendant 50 minutes à 30°C. Après cette période, les échantillons ont été soumis à une analyse par spectrophotométrie et la lecture de l'absorbance a été effectuée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (PerkinElmer, EnSpire). Toutes les réactions ont été effectuées en triplicate. En plus de l'échantillon, il était nécessaire de mesurer l'absorbance de l'échantillon blanc. Celui-ci diffère de l'échantillon en ce que l'extrait est remplacée par de méthanol dans la réaction. Le blanc est mesuré en raison de l'interaction entre les composants du mélange réactionnel, la coloration générée influençant les valeurs d'absorbance de l'échantillon mesuré. La valeur réelle de l'absorbance est obtenue par la différence entre l'absorbance mesurée de l'échantillon et celle du blanc. Le standard d'inhibition utilisé était la thiourée. À la fin des procédures, les valeurs d'absorption ont été converties en pourcentage d'inhibition puis en l'IC₅₀ en utilisant l'équation suivante :

$$\% inhibition = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100$$

Où

- **A₁**: Absorbance du contrôle négatif
- **A₂**: Absorbance de l'échantillon

3.4.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Dans le cadre de l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits AcOEt et n-BuOH des deux plantes étudiées, l'activité antibactérienne et antifongique a été évaluée par les méthodes suivantes :

3.4.3.1. Activité antibactérienne par la méthode de diffusion de disques

Le test de diffusion sur disque de Kirby-Bauer décrit par (Meral & Karabay, 2002), a été utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits (AcOEt et n-BuOH) de plantes testées.

Ce test repose sur l'interaction entre un disque de papier (diamètre d'environ 6 mm) imprégné d'extraits et la surfaceensemencée du milieu de culture. Les molécules actives présentes dans ces extraits diffusent alors dans le milieu, provoquant la formation de zones d'inhibition de tailles variables autour des disques. Les bords de la zone d'inhibition apparaissent lorsque la concentration de la substance est encore suffisante pour inhiber la croissance des micro-organismes. Cette technique a été utilisée de manière préliminaire pour évaluer si les extraits de plantes médicinales étudiés possédaient une activité antibactérienne et pour sélectionner les bactéries qui seraient testées pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les souches bactériennes utilisées dans les essais provenaient de l'ATCC (American Type Culture Collection) : pour les bactéries Gram-positives, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ; et pour les bactéries Gram-négatives, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Escherichia coli* ATCC 25922. En plus des souches de référence ATCC, deux souches cliniques (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*), provenant de divers sites de prélèvement tels que l'urine et les prélèvements vaginaux, ont également été utilisées. Ces souches ont été collectées à l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) Abderrazak Bouhara à Skikda. L'ensemble de souches a été cultivé à partir de cultures de réserve sur de la gélose inclinée puis conservé à 4°C jusqu'à l'analyse.

À partir de cultures pures incubées pendant 18 heures sur la gélose nutritive, une suspension d'une densité de 0,5 McFarland a été préparée dans 5 mL de solution physiologique de NaCl (0,9%). Sur des boîtes de petri contenant de la gélose Muller-Hinton, la suspension bactérienne a été étalée uniformément sur toute la surface de l'agar à l'aide d'écouvillons stériles. Des disques de papier stériles de 6 mm de diamètre, ont été placés sur le milieuensemencé et imbibés successivement de 20 µL des extraits (AcOEt et n-BuOH) préparés à une concentration de

1mg/mL. L'expérience a été réalisée en trois répétitions et un contrôle de l'effet du solvant (boîte avec inoculum et disques imbibés de DMSO), a été préparé. Après 24 heures d'incubation à une température de 37°C, la valeur moyenne de la zone d'inhibition ainsi que l'écart-type ont été déterminés. Les bactéries sont considérées comme sensibles aux extraits lorsque la zone d'inhibition est comprise entre 9 et 14 mm, très sensibles pour des zones de 15 à 19 mm, et extrêmement sensibles lorsque le diamètre de la zone d'inhibition dépasse 20 mm (Ponce *et al.*, 2003).

3.4.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon Mueller-Hinton, suivant les recommandations établies par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) comme détaillé par Rota *et al.* (2004), avec quelques modifications. Les essais ont été réalisés dans des plaques stériles à 96 puits. Avant de commencer les tests, le couvercle de la plaque a été marqué avec un marqueur selon le schéma du test prévu (Figure 20).

Dans chaque puits de la plaque, 170 µL de milieu nutritif liquide (Mueller-Hinton), 10 µL de la suspension bactérienne (préparée selon la méthode décrite au point 4.3.1.1) et 20 µL des extraits (AcOEt et n-BuOH), préparés à cinq concentrations dans le DMSO (0,0625–1 mg/mL), ont été ajoutés. La sixième colonne de la plaque (MI), contenant uniquement le milieu inoculé, a servi de contrôle positif de la croissance, tandis que la septième colonne (M), contenant le milieu non inoculé, a servi de contrôle de stérilité du bouillon utilisé. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Ce test a été réalisé en double répétition. Après 24 heures d'incubation, 10 µL d'une solution de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) ont été ajoutés à chaque puit. Après 1 heure d'incubation à 37 °C, la croissance bactérienne est indiquée par l'apparition d'une coloration rose. La CMI a été déterminée comme étant la concentration la plus faible qui inhibe la croissance visible des micro-organismes.

[mg/ml]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
B	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
C	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
D	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
E	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
F	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
G	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					
H	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	MI	M					

Figure 20 : Distribution des solutions correspondantes à chaque puits dans la microplaque pendant la détermination de la CMI par microdilution.

(A1-A5 jusqu'à H1-H5) → dilutions des extraits testés

(A6-H6) → MI (milieu +inoculum)

(A7-H7) → M → (milieu)

3.4.3.3. Activité antifongique

Le potentiel antifongique des extraits (AcOEt et n-BuOH) des deux plantes étudiées, a été évalué contre les champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC 4287 et *Alternaria* sp, fournis par le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT), Constantine. La méthode utilisée était basée sur la technique décrite par Vinale *et al.* (2006).

Le milieu de culture PDA a été préparé en faisant bouillir 200 g de pomme de terre dans 1 L d'eau distillé, filtré et récupéré, auquel ont été ajoutés 20 g de dextrose et 15 g d'agar. Le milieu obtenu a été transféré dans des flacons en verre, puis autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes. Après cela, il a été coulé dans des boîtes de Petri. Une fois le milieu solidifié, à l'aide d'un emporte-pièce stérile, des disques de 5 mm de diamètre ont été prélevés à partir des extrémités de croissance des colonies (afin d'obtenir des colonies plus jeunes), puis ajoutées au centre de chaque boîte. Ces disques ont ensuite été imbibés de 10 µl de différents extraits dissous dans du DMSO, avec une concentration de 30 %.

Trois boîtes témoins négatif ont été préparées avec le milieu de culture et les spores du champignon, pour observer le développement dans des conditions normales, tandis que trois boîtes témoins positif ont été préparées avec le milieu de culture, les spores du champignon et 10µl de DMSO afin de confirmer que ce dernier n'a aucune influence sur la croissance fongique. Le test a été réalisé en trois répétitions pour chaque extrait et champignon, et les boîtes ont ensuite été

incubées à une température de 25 °C. La croissance mycélienne des champignons a été mesurée par le diamètre de la colonie après 48h et 6 jours. L'activité antifongique a été exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne et calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de la croissance} = \left[\frac{(dc - dt)}{dc} \right] \times 100$$

Où:

- **dc** : mesure du diamètre de la colonie du champignon témoin
- **dt** : mesure du diamètre de la colonie du champignon traité

3.4.4. Évaluation de l'activité cytotoxique sur les larves d'*Artemia salina*

Les essais de toxicité des extraits (AcOEt et n-BuOH) des deux plantes étudiés ont été réalisés selon la méthode décrite par Meyer *et al.* (1982) sur des plaques de 96 puits. Dans un premier temps, l'éclosion des kystes d'*A. salina* a été réalisée en incubant environ 10 mg g de kystes dans 200 mL d'eau de mer artificielle (solution saline (3,8 %)) à 25-28°C sous éclairage fluorescent pendant 48 heures. Après l'éclosion, 100 µL d'une solution contenant 10 larves d'*A. salina*, 80 µL d'eau de mer et 20 µL de chaque extrait (préparés à partir d'une solution mère de 4 mg/mL) ou contrôle positif (dichromate de potassium, 0,1 %) ont été ajoutés en triplicat aux puits de la plaque. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 24 heures. Après incubation, le pourcentage de mortalité à chaque concentration a été calculé après comptage du nombre de larves survivantes, et la mortalité a été exprimée en concentration létale (CL₅₀) (Concentration nécessaire pour tuer 50 % des larves) en utilisant l'analyse Probit dans IBM SPSS Statistics version 25. Les substances ayant des valeurs de CL₅₀ inférieures à 1000 µg/mL ont été considérées comme toxiques.

3.5. Analyse Statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type, et proviennent de l'analyse de 3 répliques des échantillons (n = 3) sauf pour la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) qui a été effectuée avec seulement 2 répétitions. Le programme IBM SPSS Statistics version 25 a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats obtenus sur les différents extraits étudiés selon les différentes méthodes analytiques. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA à un facteur, suivie d'un test post-hoc de comparaison multiple selon la méthode de Tukey, qui compare les résultats de l'analyse à ceux du contrôle. La

valeur de p détermine le niveau de signification pour rejeter l'hypothèse. Les différences mesurées sont considérées comme statistiquement significatives lorsque les valeurs de p sont $\leq 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Enquête Ethnobotanique

Les résultats de notre étude ethnobotanique reposent sur les informations obtenues à partir de 347 questionnaires, au cours desquels nous avons parlé avec 89 personnes.

4.1.1. Analyse des caractéristiques de la population étudiée

L'analyse des profils des informateurs révèle que, parmi le nombre total de répondants, 83,15 % étaient des femmes et 16,85% des hommes (Figure 21, a). La tranche d'âge la plus représentée est celle des 20 à 30 ans, avec 52,81 % de l'échantillon, suivie par les groupes d'âge de 30 à 40 ans (20,22%) et de 40 à 50 ans (12,36 %). Les personnes âgées de 50 ans et plus représentent 11,24 % des répondants, tandis que les 18 à 20 ans ne constituent que 3,37 % de l'échantillon (Figure 21, b). Concernant la situation familiale, 62,92% des répondants sont célibataires, tandis que 37,08 % sont mariés (Figure 21, c). En ce qui concerne le lieu de résidence, la majorité des informateurs (50,56%) vivent en milieu rural (Figure 21, d). Pour ce qui est du niveau d'éducation, une grande majorité des informateurs (84,27%) ont un niveau d'éducation universitaire, suivi de 10,11 % ayant un niveau secondaire, et seulement 1,12 % sont néants (Figure 21, e). Quant à la profession, la majorité des informateurs (78,65%) sont sans emploi, tandis que 21,35% ont un emploi (Figure 21, f).

La comparaison de nos résultats avec ceux de Bendif *et al.* (2020), où l'utilisation des plantes médicinales par les jeunes a été très évidente dans la communauté étudiée, on constate qu'il existe une transmission des connaissances traditionnelles des plus âgés vers les personnes jeunes. Il est également observé que dans d'autres études (Chohra & Ferchichi, 2019; Meddour *et al.*, 2020), les informants de sexe féminin prédominent clairement. Ces auteurs justifient cette prédominance des femmes par le fait que, tout au long de l'histoire, la responsabilité des tâches domestiques et des soins des enfants leur étaient attribués, et elles se chargeaient également du traitement des maladies simples à l'aide de plantes.

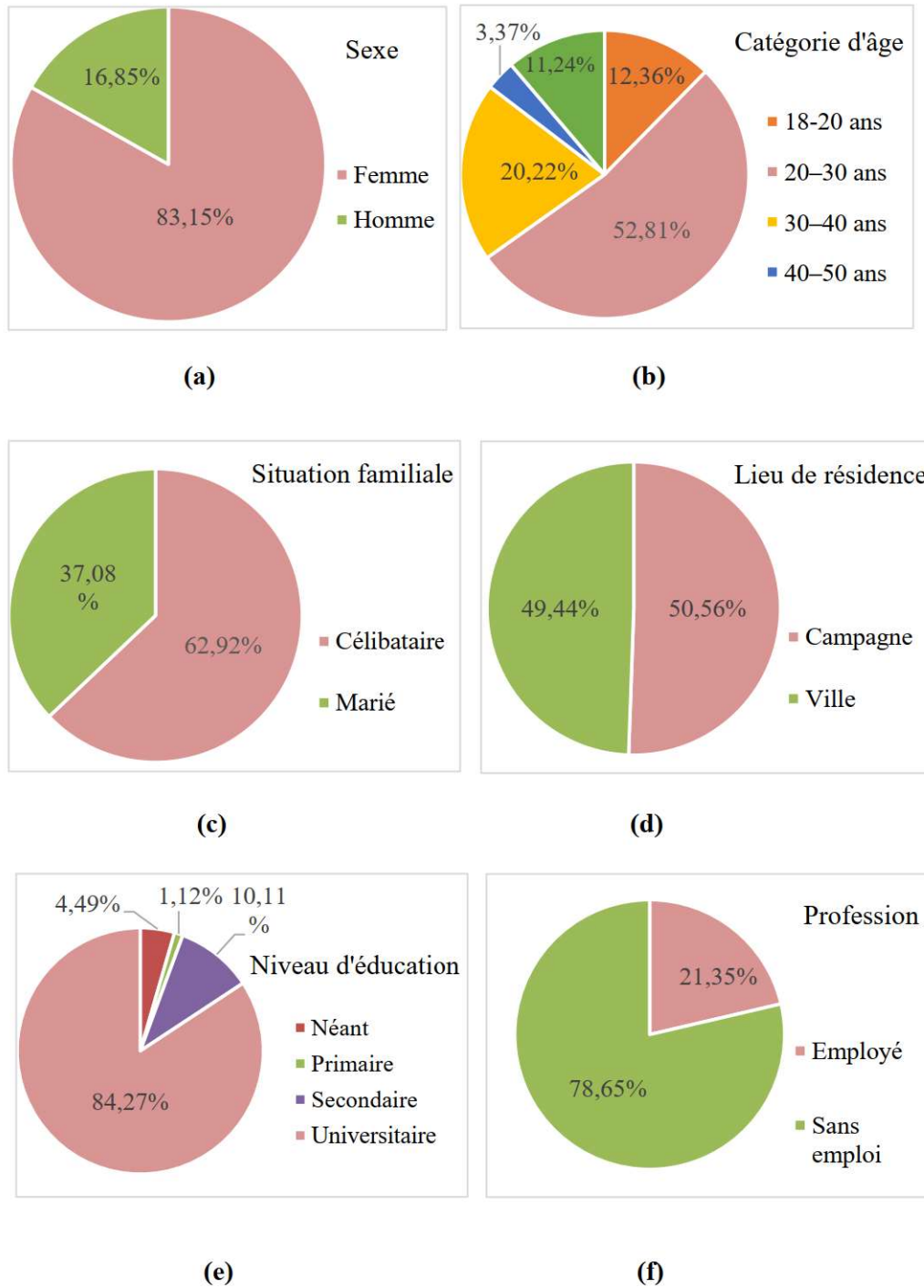


Figure 21 : Profils des informateurs enquêtés selon le sexe (a), la catégorie d'âge (b), la situation familiale (c), le lieu de résidence (d), le niveau d'éducation (e) et la profession (f).

Concernant le niveau d'éducation des personnes interrogées, un résultat similaire a été observé dans le travail de Taïbi *et al.* (2020), qui ont indiqué que la plupart des répondants ont déclaré avoir un niveau universitaire, suivis de ceux ayant un niveau secondaire. pour les

résultats de la situation familiale, celles des études de Salhi *et al.* (2010) et Baziz *et al.* (2020), les résultats s'inversent, où le plus grand nombre de réponses aux questionnaires provient des personnes mariées.

Les résultats concernant la profession sont conformes à ceux d'autres études ethnobotaniques (Bendif *et al.*, 2021; Meddour *et al.*, 2020), qui ont rapporté une situation professionnelle marquée par un taux élevé de chômage, ce qui pourrait influencer les perceptions et pratiques de la population concernant l'utilisation des plantes médicinales. Bien que ces justifications soient prises en compte, il ne peut en aucun cas être affirmé que ces résultats montrent qui possède un plus grand savoir sur les plantes, car il existe des variables, telles que la stratégie d'échantillonnage ou simplement le hasard, qui peuvent influencer de manière décisive ces résultats.

4.1.2. Analyse pharmacologique et ethnofloristique

4.1.2.1. Selon les familles botaniques

Les 89 informateurs ont cité 88 espèces de plantes médicinales, réparties sur 42 familles botaniques. Les familles les plus représentatives étaient Lamiaceae (33,72% avec 14 espèces), Asteraceae (11,24% avec 8 espèces), Apiaceae (10,09% avec 10 espèces), Zingiberaceae (5,76% avec 3 espèces), Fabaceae (4,90% avec 4 espèces), Verbenaceae (4,03% avec 1 espèce) et Myrtaceae (4,32% avec 4 espèces) (Figure 22). Les autres familles rapportées avaient sept citations ou moins.

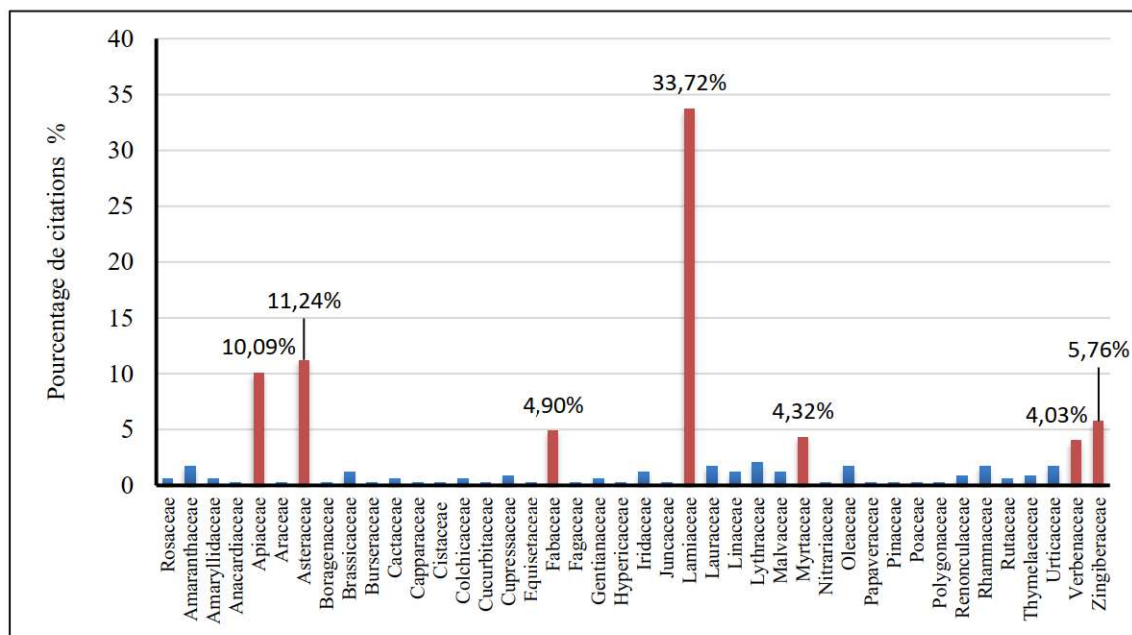


Figure 22 : Fréquence d'utilisation des principales familles botaniques par la population étudiée.

D'autres études ethnobotaniques sur les plantes médicinales réalisées dans plusieurs régions de l'aire méditerranéenne, signalent également Asteraceae et Lamiaceae parmi les familles les plus représentatives (Bouayyadi *et al.*, 2015; Ouelbani *et al.*, 2016; Redouan *et al.*, 2020). La majorité des plantes médicinales appartenant à ces familles possèdent un grand nombre d'espèces riches en principes actifs et sont responsables de diverses activités biologiques, justifiant ainsi cette prédominance.

4.1.2.2. Selon la partie utilisée

Il a été constaté que les parties de plantes les plus utilisées (Figure 23), étaient les feuilles (55,62%), suivies des grains (14,12%), des fleurs (9,80%), des racines (8,36%), des parties aériennes (4,03%) et de l'écorce et des tiges (2,31 % chacune). La prédominance de l'utilisation des feuilles est conforme à d'autres études ethnobotaniques (Bendif *et al.*, 2020; Mechaala *et al.*, 2021; Miara *et al.*, 2018, 2019). La préférence pour les feuilles par rapport aux autres parties de la plante est due au fait que les feuilles sont des organes photosynthétiques qui contiennent des photosynthétats responsables de leurs propriétés médicinales. La popularité des feuilles par rapport aux autres organes est également attribuée au fait que la collecte des feuilles et leur

traitement sont plus faciles que la collecte des racines ou de la plante entière, et qu'en même temps, cela ne cause pas de dommages significatifs à la plante.

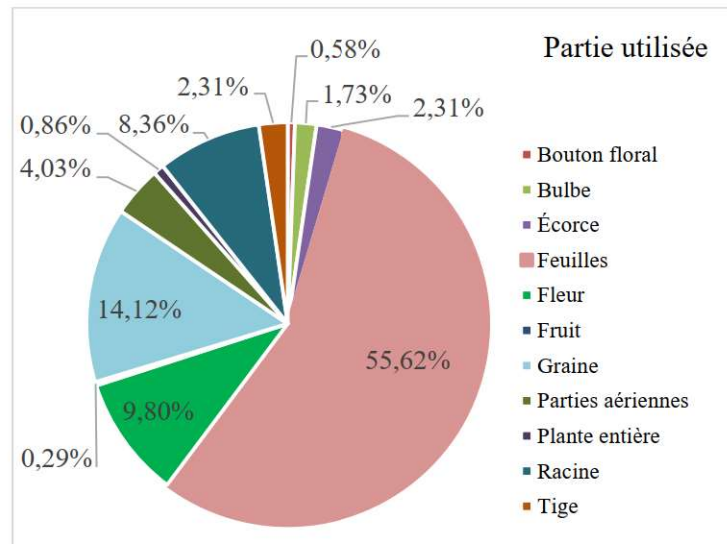


Figure 23 : Fréquence d'utilisation des différentes parties des plantes médicinales.

4.1.2.3. Selon le mode de préparation

Concernant les formes de préparation, les décoctions (75,71%), ont obtenu le plus d'attention, étant préparées avec des parties de la plante immergées dans de l'eau et soumises à une ébullition pendant un temps très court, suivies de l'utilisation sous forme d'infusions (10,86%), où les parties de la plante sont recouvertes d'eau bouillante et infusées pendant quelques minutes, et de la consommation à l'état cru (8%). D'autres méthodes incluent la préparation par macération et sous forme de cataplasme (Figure 24). Les décoctions et les infusions sont considérées comme les méthodes les plus courantes pour la préparation de remèdes à base de plantes. Elles sont considérées comme efficaces car l'une des raisons pour lesquelles les plantes médicinales sont soumises à l'action de l'eau chaude est de permettre aux principes actifs de se dissoudre rapidement dans l'eau. Ces derniers ont été les méthodes de préparation les plus citées dans les travaux de Ouelbani *et al.* (2016) et Mechaala *et al.* (2021).

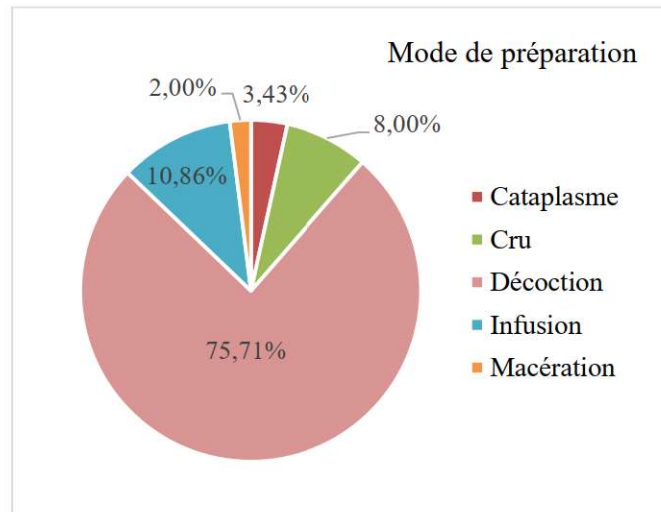


Figure 24 : Fréquence des différents modes de préparation des plantes médicinales.

4.1.2.4. Selon le mode d'administration et d'emploi

En ce qui concerne les formes et d'administration des plantes médicinales, les formes les plus courantes sont : les formes d'administration orale, représentant 85,91% du total, suivies des des formes d'application topiques (6,35%) et des préparations sous forme de gouttes nasales (5,52%). Le mode d'emploi comme tisanes, par exemple en tant que formes d'administration orale, est le mode le plus couramment utilisé pour les remèdes de la tradition de la population étudiée (79,50%). Dans la figure 25, apparaissent les graphiques de la répartition numérique des formes les plus citées.

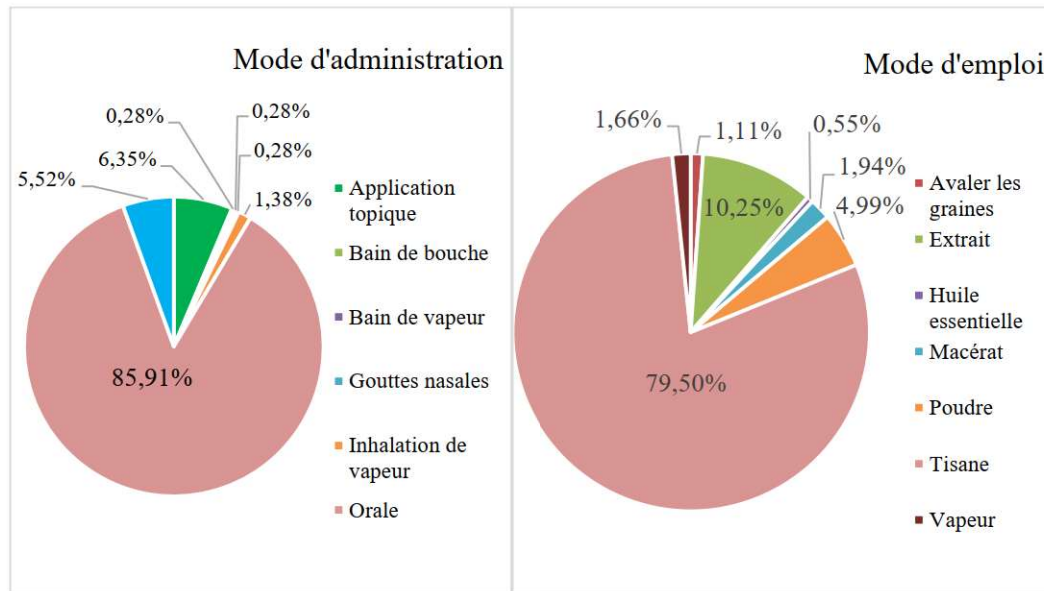


Figure 25 : Fréquence des différents modes d'administration et d'emploi des plantes médicinales.

Ces résultats ressemblent beaucoup à celle d'études précédentes dans d'autres régions (Benarba *et al.*, 2015; Ould El Hadj *et al.*, 2003; Sarri *et al.*, 2015), dans lesquelles les tisanes sont également les plus citées, probablement en raison de leur facilité de préparation et d'administration.

4.1.2.5. Selon les affections traitées

Dans la population étudiée, les plantes médicinales font partie de la routine dans le traitement de diverses affections, principalement les affections digestives (27,95%) suivies par les affections neurologiques (16,14%), respiratoires (12,50%), métaboliques (8,64%) et dermatologiques (7,73%) (Figure 26).

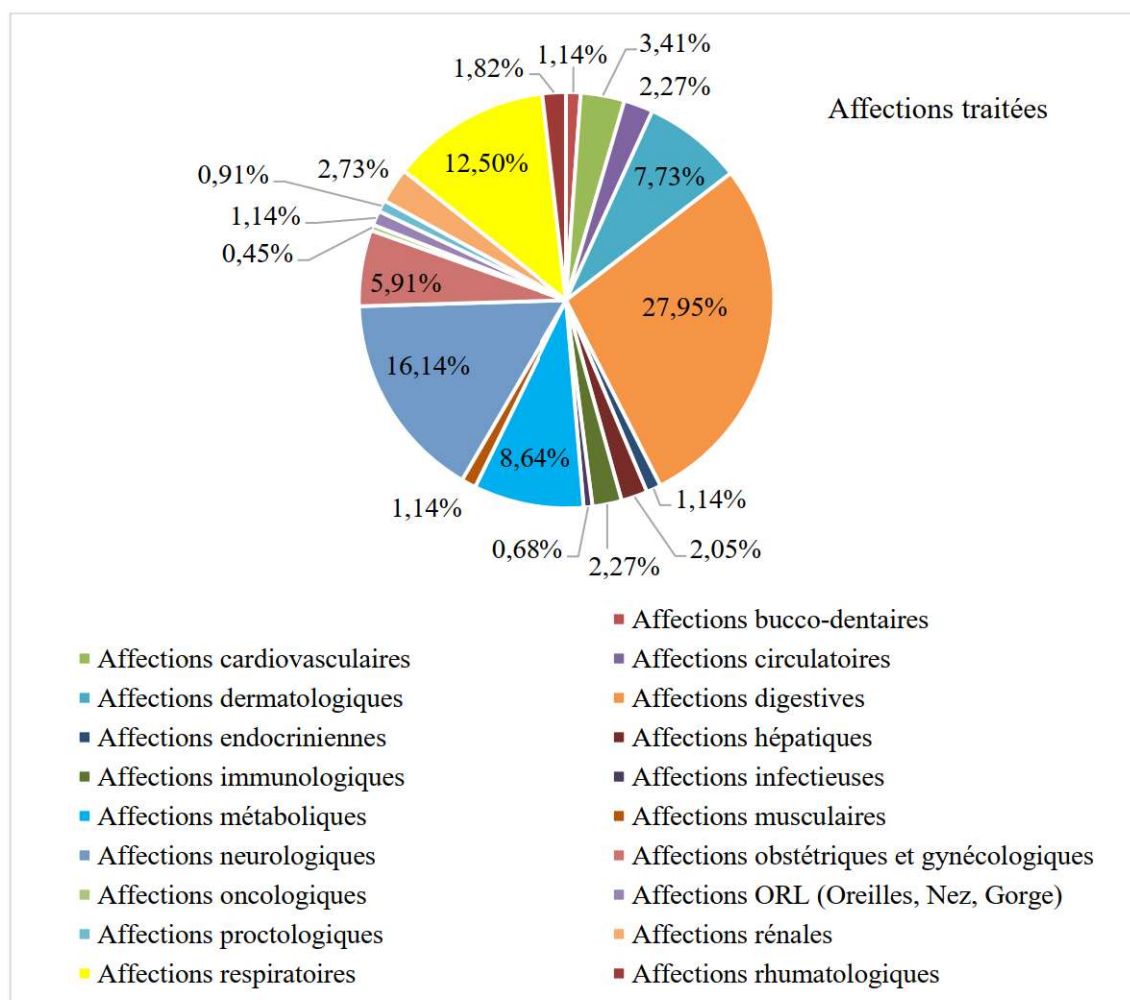


Figure 26 : Répartition des affections traitées par les plantes médicinales de la population étudiée.

Des études réalisées sur d'autres populations ont également constaté que le plus grand nombre d'espèces médicinales était indiqué pour les maladies associées au système digestif et à l'appareil respiratoire (Baziz *et al.*, 2020; Benderradji *et al.*, 2021; Chohra & Ferchichi, 2019; Senouci *et al.*, 2019).

4.1.2.6. Selon la valeur d'usage des espèces (VUs)

Les espèces citées dans les deux communautés présentent une valeur d'utilisation (VU) variant de 0,01 à 0,49 (Tableau 3). Une grande partie des espèces a présenté une valeur basse pour cet indice, seules cinq espèces ayant obtenu des valeurs élevées : *Thymus vulgaris* (0,49),

Mentha piperita (0,48), *Matricaria chamomilla* (0,35), *Rosmarinus officinalis* (0,30), et *Trigonella foenum-graecum* (0,24), et qu'elles avaient la plus grande importance.

En ce qui concerne le nombre de citations, les plus citées ont été *Mentha piperita* (33 citations), *Thymus vulgaris* (31 citations), *Rosmarinus officinalis* (24 citations), *Matricaria chamomilla* (21 citations), *Zingiber officinale* (14 citations). Ces espèces présentent, selon les informateurs, des propriétés médicinales très caractéristiques. La faible valeur d'usage de *Zingiber officinale* (0,06) pourrait être attribuée à une connaissance restreinte de ses applications thérapeutiques parmi les informateurs, ou au fait qu'ils ne mentionnent que les usages qu'ils considèrent comme importants.

Tableau 3 : Liste des plantes médicinales citées par les personnes enquêtées (N = 89) et calcul de l'indice de valeur d'usage (VUs).

Nom scientifique	ΣUs	VUs	Nom scientifique	ΣUs	VUs
<i>Achillea ligustica</i>	1	0,06	<i>Lepidium sativum</i>	2	0,02
<i>Ajuga iva</i>	1	0,01	<i>Linum usitatissimum</i>	4	0,04
<i>Alchemilla vulgaris</i>	2	0,02	<i>Lupinus albus</i>	2	0,02
<i>Allium cepa</i>	2	0,02	<i>Malva sylvestris</i>	1	0,01
<i>Aloysia citrodora</i>	17	0,19	<i>Marrubium vulgare</i>	1	0,01
<i>Alpinia galanga</i>	1	0,01	<i>Matricaria chamomilla</i>	31	0,35
<i>Ammoides pusilla</i>	1	0,01	<i>Melissa officinalis</i>	1	0,01
<i>Anacyclus clavatus</i>	6	0,07	<i>Mentha piperita</i>	43	0,48
<i>Anastatica hierochuntica</i>	1	0,01	<i>Mentha pulegium</i>	3	0,03
<i>Anethum graveolens</i>	1	0,01	<i>Myrtus communis</i>	10	0,11
<i>Apium graveolens</i>	1	0,01	<i>Nigella sativa</i>	5	0,06
<i>Aquilaria malaccensis</i>	2	0,02	<i>Olea europaea</i>	8	0,09
<i>Artemisia herba-alba</i>	7	0,08	<i>Onopordum macracanthum</i>	1	0,01
<i>Arum italicum</i>	1	0,01	<i>Opuntia ficus-indica</i>	2	0,02

<i>Atriplex halimus</i>	6	0,07	<i>Origanum majorana</i>	4	0,04
<i>Borago officinalis</i>	1	0,03	<i>Parietaria officinalis</i>	3	0,03
<i>Bunium bulbocastanum</i>	4	0,04	<i>Peganum harmala</i>	1	0,01
<i>Capparis spinosa</i>	1	0,01	<i>Petroselinum crispum</i>	6	0,07
<i>Carthamus caeruleus</i>	2	0,02	<i>Pimpinella anisum</i>	6	0,07
<i>Chelidonium majus</i>	1	0,01	<i>Pinus halepensis</i>	1	0,01
<i>Cinnamomum camphora</i>	2	0,02	<i>Pistacia atlantica</i>	1	0,01
<i>Cistus salviifolius</i>	2	0,02	<i>Prunus cerasus</i>	1	0,01
<i>Colchicum autumnale</i>	2	0,02	<i>Psidium guajava</i>	1	0,01
<i>Commiphora myrrha</i>	1	0,01	<i>Punica granatum</i>	8	0,09
<i>Coriandrum sativum</i>	1	0,01	<i>Quercus ilex</i>	1	0,01
<i>Crocus sativus</i>	5	0,06	<i>Rhamnus alaternus</i>	2	0,02
<i>Cuminum cyminum</i>	4	0,04	<i>Rheum rhabarbarum</i>	2	0,02
<i>Curcuma longa</i>	5	0,06	<i>Rosmarinus officinalis</i>	27	0,30
<i>Cytisus villosus</i>	2	0,02	<i>Ruta graveolens</i>	4	0,04
<i>Daphne gnidium</i>	3	0,03	<i>Salvia officinalis</i>	8	0,09
<i>Ecballium elaterium</i>	1	0,01	<i>Salvia Hispanica</i>	2	0,02
<i>Equisetum arvense</i>	1	0,01	<i>Saussurea costus</i>	1	0,01
<i>Eruca sativa</i>	1	0,01	<i>Senna alexandrina</i>	1	0,01
<i>Erythraea centaurium</i>	4	0,04	<i>Syzygium aromaticum</i>	2	0,02
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	3	0,03	<i>Teucrium polium</i>	4	0,04
<i>Foeniculum vulgare</i>	13	0,15	<i>Thapsia garganica</i>	3	0,03
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	4	0,04	<i>Thuja occidentalis</i>	1	0,01
<i>Hordeum vulgare</i>	1	0,01	<i>Thymus munbyanus</i>	3	0,03

<i>Hypericum perforatum</i>	1	0,01	<i>Thymus vulgaris</i>	44	0,49
<i>Inula viscosa</i>	6	0,07	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	21	0,24
<i>Juncus acutus</i>	1	0,01	<i>Urtica dioica</i>	5	0,06
<i>Juniperus phoenicea</i>	2	0,02	<i>Zingiber officinale</i>	19	0,21
<i>Laurus nobilis</i>	5	0,06	<i>Zizyphus lotus</i>	5	0,06
<i>Lavandula stoechas</i>	2	0,02	/	/	/

Dans ce travail, peu d'espèces ont présenté des valeurs d'utilisation élevées, un faible nombre de plantes avec une valeur d'utilisation élevée ayant également été observé dans les travaux de Bouafia *et al.* (2021) et Miara *et al.* (2018), où peu d'espèces ont enregistré des valeurs supérieures à 1,0 pour cet indice. Cela renforce l'idée que chaque informateur possède ses connaissances et expériences sur les plantes utilisées à des fins médicinales.

4.1.2.7. Selon le degré de fidélité (DF%)

Les résultats concernant le degré de fidélité (DF%) (Tableau 4) des espèces les plus citées (N supérieur à 10) ont montré que *Foeniculum vulgare* obtenu la valeur la plus élevée (90,91 %) pour le traitement des troubles digestifs. Elle est suivie par *Matricaria chamomilla*, utilisée pour traiter les maladies neurologiques avec une valeur de DF% de 80,95 %. *Aloysia citrodora* a été employée pour les problèmes respiratoires avec une valeur DF% de 71,43 %. En ce qui concerne les maladies métaboliques *Trigonella foenum-graecum* présenté une valeur DF% de 62,29 %.

Des résultats similaires ont également été observés par Abdelouahab *et al.* (2021), qui ont mis en évidence l'importance de ces espèces dans le traitement des affections digestives, respiratoires et neurologiques. Leur étude a montré que ces plantes médicinales sont largement utilisées par les communautés locales, *Foeniculum vulgare* et *Matricaria chamomilla* ont été identifiées comme des remèdes de première ligne pour les troubles digestifs et neurologiques.

Tableau 4: Distribution des catégories pathologiques selon les espèces végétales.

Catégorie de Maladies	Espèce	Np	N	DF %
Affections digestives	<i>Aloysia citrodora</i>	4	14	28,57
	<i>Foeniculum vulgare</i>	10	11	90,91
	<i>Matricaria chamomilla</i>	8	21	38,10
	<i>Mentha piperita</i>	18	33	54,55
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	8	24	33,33
	<i>Thymus vulgaris</i>	17	31	54,84
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	3	14	21,43
Affections respiratoires	<i>Aloysia citrodora</i>	10	14	71,43
	<i>Mentha piperita</i>	3	33	9,09
	<i>Thymus vulgaris</i>	14	31	45,16
	<i>Zingiber officinale</i>	5	14	35,71
Affections rhumatologiques	<i>Matricaria chamomilla</i>	1	21	4,76
Affections rénales	<i>Mentha piperita</i>	1	33	3,03
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	1	14	7,14
Affections ORL (Oreilles, Nez, Gorge)	<i>Matricaria chamomilla</i>	1	21	4,76
	<i>Thymus vulgaris</i>	1	31	3,23
	<i>Zingiber officinale</i>	1	14	7,14
Affections obstétriques et gynécologiques	<i>Aloysia citrodora</i>	1	14	7,14
	<i>Foeniculum vulgare</i>	2	11	18,18
	<i>Matricaria chamomilla</i>	1	21	4,76
	<i>Mentha piperita</i>	1	33	3,03

RÉSULTATS ET DISCUSSION

	<i>Thymus vulgaris</i>	2	31	6,45
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	2	14	14,29
Affections neurologiques	<i>Aloysia citrodora</i>	1	14	7,14
	<i>Foeniculum vulgare</i>	1	11	9,09
	<i>Matricaria chamomilla</i>	17	21	80,95
	<i>Mentha piperita</i>	14	33	42,42
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4	24	16,67
	<i>Thymus vulgaris</i>	3	31	9,68
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	6	14	42,86
	<i>Zingiber officinale</i>	1	14	7,14
Affections musculaires	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1	24	4,17
	<i>Thymus vulgaris</i>	2	31	6,45
	<i>Zingiber officinale</i>	1	14	7,14
Affections métaboliques	<i>Matricaria chamomilla</i>	3	21	14,29
	<i>Mentha piperita</i>	1	33	3,03
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	9	14	64,29
Affections infectieuses	<i>Thymus vulgaris</i>	1	31	3,23
Affections immunologiques	<i>Aloysia citrodora</i>	1	14	7,14
	<i>Mentha piperita</i>	1	33	3,03
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	24	8,33
	<i>Thymus vulgaris</i>	2	31	6,45
	<i>Zingiber officinale</i>	3	14	21,43
Affections dermatologiques	<i>Rosmarinus officinalis</i>	10	24	41,67
Affections circulatoires	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	24	8,33

	<i>Thymus vulgaris</i>	2	31	6,45
	<i>Zingiber officinale</i>	2	14	14,29
Affections cardiovasculaires	<i>Mentha piperita</i>	3	33	9,09
	<i>Zingiber officinale</i>	1	14	7,14
Affections bucco-dentaires	<i>Mentha piperita</i>	1	33	3,03

4.1.2.8. Selon le facteur de consensus des informateurs (FCI)

Dans la présente étude, 19 catégories de maladies ont été enregistrées. Parmi celles-ci, quatre ont atteint des valeurs de FCI égales ou supérieures à 0,5 bien que ces valeurs n'atteignent pas le maximum de 1.

Selon les résultats obtenus (Tableau 5), l'utilisation des plantes médicinales par la population étudiée est principalement liée aux maladies du système digestif, avec le plus grand FCI (0,71). La prédominance de cette catégorie est conforme à d'autres études ethnobotaniques (Adli *et al.*, 2021; Benarba *et al.*, 2015; Eddouks *et al.*, 2016; Miara *et al.*, 2019). Dans la présente étude, la deuxième catégorie avec le plus grand FCI (0,68) était les maladies du système nerveux, suivie des affections respiratoires, avec un FCI de 0,63. En quatrième place, on trouve les affections endocriniennes, avec un FCI de 0,5.

Les plantes utilisées pour traiter une catégorie donnée de maladies avec un plus grand consensus parmi les informateurs, sont culturellement importantes pour la communauté locale, où l'échange et l'interaction des connaissances sur l'utilisation de ces espèces sont intenses. De plus, les valeurs élevées du FCI montrent quelles espèces méritent des études plus approfondies sur leurs activités pharmacologiques (Canales *et al.*, 2005).

Tableau 5 : Valeurs du FCI calculées pour les maladies prises en charge par la population locale dans les zones d'étude.

Catégorie de maladies	Nur	Nt	FCI	Catégorie de maladies	Nur	Nt	FCI
Affections immunologiques	10	6	0,44	Affections métaboliques	39	23	0,42
Affections respiratoires	55	21	0,63	Affections cardiovasculaires	16	11	0,33
Affections obstétriques et gynécologiques	26	18	0,32	Affections bucco-dentaires	5	5	0,00
Affections rhumatologiques	8	6	0,29	Affections musculaires	5	4	0,25
Affections rénales	12	8	0,36	Affections oncologiques	2	2	0,00
Affections infectieuses	4	4	0,00	Affections hépatiques	9	8	0,13
Affections digestives	125	37	0,71	Affections circulatoires	11	7	0,40
Affections endocriniennes	5	3	0,50	Affections proctologiques	4	4	0,00
Affections neurologiques	70	23	0,68	Affections ORL (Oreilles, Nez, Gorge)	5	5	0,00
Affections dermatologiques	34	20	0,42	/	/	/	/

En se basant sur les résultats de l'enquête ethnobotanique, les deux plantes choisies pour cette étude n'ont été mentionnées qu'une seule fois (1 citation) au cours du questionnaire, ce qui indique qu'elles sont rarement utilisées par la population étudiée. En effet, ces plantes présentent des valeurs d'usage de 0,06 pour *A. ligustica* et 0,03 pour *B. officinalis*, bien qu'elles soient

associées à une diversité d'usages. Cependant, ces deux plantes affichent des valeurs de degré de fidélité (DF%) de 100% dans le traitement de diverses affections: dermatologiques, digestives, métaboliques, circulatoires et infectieuses pour *A. ligustica*, et digestives, cardiovasculaires et bucodentaires pour *B. officinalis*. Ces résultats renforcent la pertinence de l'étude scientifique de ces deux espèces afin de confirmer la validité des théories traditionnelles concernant leur utilisation, aussi pour la découverte de nouvelles sources thérapeutiques à base de plantes moins étudiées et mal connues.

4.2. Étude Phytochimique

4.2.1. Rendement de l'extraction

Les rendements d'extraction des deux espèces *A. ligustica* et *B. officinalis*, ont été calculés à partir de quatre fractions obtenues en utilisant différents solvants : n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. Les résultats de calcul du rendement d'extraction de l'espèce *A. ligustica* (Figure 27), montrent que l'extrait de n-butanol a montré le rendement le plus élevé, atteignant 6,4 %. Ce résultat est conforme aux attentes, car le n-butanol est un solvant polaire capable d'extraire efficacement des composés polaires tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins, qui sont des composants majeurs dans cette plante (Kaczorová *et al.*, 2021). Le n-butanol est particulièrement efficace pour l'extraction des composés bioactifs à polarité intermédiaire en raison de sa capacité à solubiliser une large gamme de composés bioactifs tout en restant relativement peu toxique (Reetz & König, 2021). En comparaison, l'extrait de n-hexane a donné un rendement de 4 %, ce qui est également significatif, mais plus faible. Les rendements plus faibles observés avec le n-hexane pour *A. ligustica* peuvent être attribués à la moindre quantité de composés lipophiles présents dans cette plante par rapport aux composés polaires, qui sont mieux extraits par le n-butanol (Nakamura *et al.*, 2017). Les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle ont montré des rendements respectifs de 2,6 % et 0,6 %. Bien que ces solvants soient également polaires, ils ne sont pas aussi efficaces que le n-butanol pour l'extraction de flavonoïdes spécifiques. En effet, l'acétate d'éthyle, par exemple, est un solvant qui présente une polarité intermédiaire, ce qui le rend moins performant pour l'extraction de certains composés bioactifs comparé à des solvants plus polaires comme le n-butanol. De plus, l'extraction des composés végétaux dépend de plusieurs paramètres, notamment la température, le temps d'extraction, la taille des particules de la plante et la concentration du solvant. Si l'une de ces conditions n'est pas optimale, cela peut entraîner un

rendement d'extraction plus faible, même si le solvant utilisé est théoriquement efficace (Bourgou *et al.*, 2016).

Pour *B. officinalis*, les rendements étaient globalement plus faibles (Figure 28), l'extrait de l'acétate d'éthyle et n-butanol ayant des rendements de seulement 0,5 % et 1,6 % respectivement. Ce faible rendement suggère que cette plante libère moins de composés actifs lorsque traitée avec des solvants polaires. Ce phénomène pourrait être expliqué par une concentration plus faible de flavonoïdes et d'autres composés polaires dans *B. officinalis* par rapport à *A. ligustica*. De plus, des recherches sur *B. officinalis* ont révélé que cette plante contient principalement des composés lipophiles comme les acides gras et les phytostérols, qui sont mieux extraits par des solvants non polaires (Río-Celestino *et al.*, 2008). Les solvants polaires comme le n-butanol se révèlent être plus efficaces pour extraire des flavonoïdes et d'autres composés polaires, tandis que les solvants non polaires comme le n-hexane et le chloroforme sont mieux adaptés pour l'extraction des composés lipophiles. Cela est dû à la capacité des solvants polaires à solubiliser les composés chargés ou polaires, tandis que les solvants non polaires extraient davantage les composés apolaires, ce qui explique les différences de rendement observées entre les différentes espèces et solvants utilisés dans cette étude (Nawaz *et al.*, 2020).

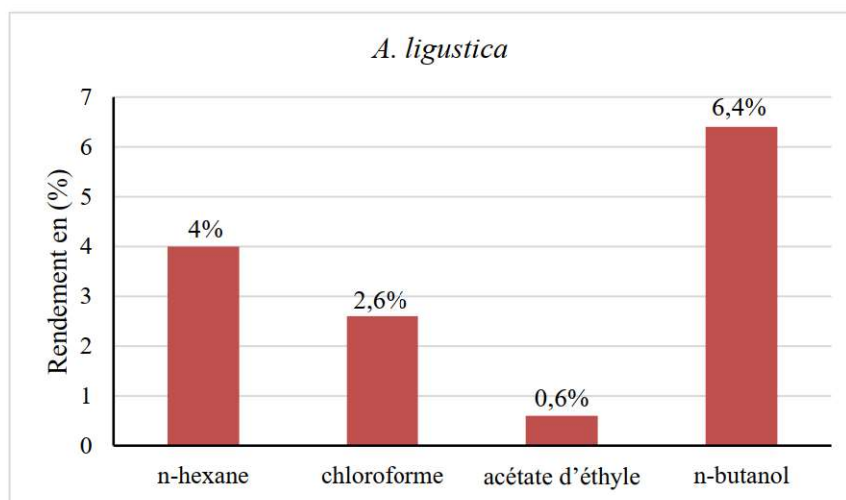


Figure 27 : Rendements des fractions de l'espèce *A. ligustica*.

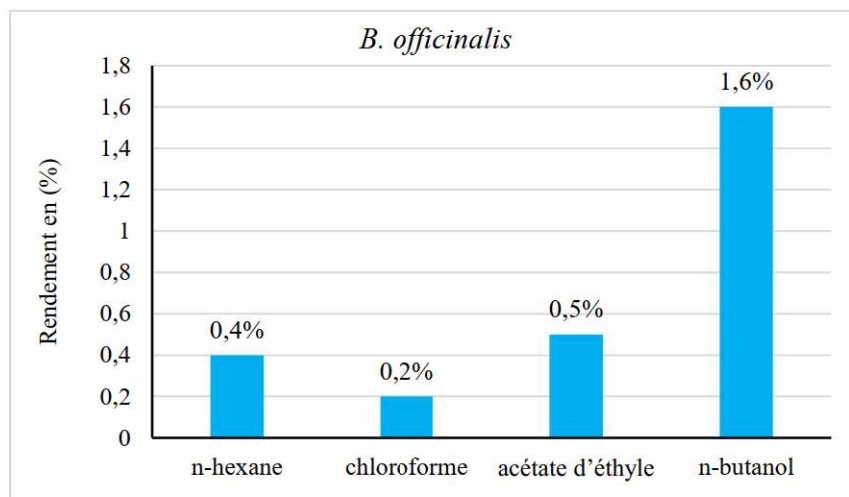


Figure 28 : Rendements des fractions l'espèce *B. officinalis*.

4.2.2. Quantification des polyphénols et flavonoïdes

Les résultats de dosages des polyphénols et flavonoïdes des deux espèces étudiées sont représentés dans le tableau 6. Pour l'espèce *A. ligustica*, il a été observé que l'extrait de n-butanol ($151,25 \pm 2,39 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) présente une concentration en composés phénoliques légèrement plus élevée que l'extrait d'acétate d'éthyle ($127,03 \pm 2,71 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait). En ce qui concerne les flavonoïdes, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une concentration bien plus élevée ($54,38 \pm 0,29 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) par rapport à l'extrait de n-butanol ($27,85 \pm 0,29 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait). Cette différence de concentration pourrait être liée aux propriétés solubilisantes des solvants, où le n-butanol semble favoriser l'extraction des composés phénoliques, tandis que l'acétate d'éthyle serait plus efficace pour les flavonoïdes.

Tableau 6 : Taux de polyphénols et flavonoïdes des deux espèces étudiées (*A. ligustica*) et (*B. officinalis*).

Extrait		Composés phénoliques ($\mu\text{g EAG/mg}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$)
<i>A. ligustica</i>	AcOEt	$127,03 \pm 2,71^a$	$54,38 \pm 0,29^b$
	n-BuOH	$151,25 \pm 2,39^b$	$27,85 \pm 0,29^a$
<i>B. officinalis</i>	AcOEt	$93,41 \pm 2,22^a$	$24,72 \pm 2,36^b$
	n-BuOH	$60,37 \pm 2,89^b$	$35,21 \pm 2,21^a$

Les valeurs suivies de lettres indices différentes dans la même colonne pour chaque plante séparément indiquent une différence significative (test de Tukey, $p \leq 0,05$)

Cependant, dans l'étude de Bouteche *et al.* (2024), qui porte également sur l'espèce *A. ligustica*, l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) a montré des niveaux beaucoup plus élevés de composés phénoliques ($465,47 \pm 1,02 \mu\text{g EAG /mg}$) et de flavonoïdes ($225,63 \pm 0,59 \mu\text{g EQ/mg}$), surpassant ainsi les extraits de n-butanol et de méthanol. En outre, dans l'étude de Bakr *et al.* (2014) sur *A. fragrantissima* en Égypte, l'extrait d'acétate d'éthyle a également montré un contenu phénolique élevé ($34,52 \pm 0,63 \text{ mg/g EAG}$) par rapport à l'extrait de n-butanol ($19,948 \pm 0,54 \text{ mg/g EAG}$), ainsi qu'une plus grande concentration en flavonoïdes ($23 \pm 0,2 \text{ mg/g QE}$) pour l'extrait d'acétate d'éthyle contre $20 \pm 0,18 \text{ mg/g EQ}$ pour l'extrait du n-butanol. De plus, dans l'étude de Şabanoğlu *et al.* (2019), portant sur trois espèces d'*Achillea*, les concentrations en composés phénoliques ont été rapportées comme suit : $178,4 \pm 9,5 \text{ mg/g}$ pour *A. biebersteinii*, $167,9 \pm 3,5 \text{ mg/g}$ pour *A. setacea*, et $155,5 \pm 8,7 \text{ mg/g}$ pour *A. wilhelmsii*. L'ensemble de ces études souligne l'importance du choix du solvant dans l'extraction des composés bioactifs, car chaque solvant représente des capacités différentes d'extraction en fonction de la polarité et des propriétés chimiques des composés visés.

Pour l'espèce *B. officinalis*, L'extrait d'acétate d'éthyle dépasse significativement l'extrait de n-butanol en termes de teneur totale en phénols, avec des valeurs de ($93,41 \pm 2,22 \mu\text{g EAG /mg}$ d'extrait) et ($60,37 \pm 2,89 \mu\text{g EAG /mg}$ d'extrait), respectivement. En revanche, la plus

grande quantité de flavonoïdes a été trouvée dans l'extrait de n-butanol ($35,21 \pm 2,21$ µg EQ/mg d'extrait), suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle ($24,72 \pm 2,36$ µg EQ/mg d'extrait). Ces différences étaient statistiquement significatives (test de Tukey, $p \leq 0,05$), ce qui indique la capacité variable des solvants à extraire des types spécifiques de composés.

De nombreuses études sur *B. officinalis* mettent en évidence sa richesse en phénols totaux et en flavonoïdes, des composés cruciaux pour son activité biologique. Zemmouri *et al.* (2019) ont rapporté des teneurs plus élevées en polyphénols (94,09 mg EAG /g d'extrait) et en flavonoïdes (37,65 mg EQ/g d'extrait) dans les extraits d'éthanol par rapport aux extraits aqueux. Mohajer *et al.* (2016) ont trouvé des teneurs en acide phénolique et en flavonoïdes de 13,14 mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (EAG/g d'extrait) et 9,75 mg d'équivalents de catéchine par gramme de poids sec (EC/g d'extrait), respectivement, dans la fraction d'acétate d'éthyle. Ces résultats soulignent également l'importance du choix du solvant pour améliorer l'extraction des composés bioactifs.

4.2.3. Analyse par LC-ESI-MS/MS

4.2.3.1. Fractions de l'espèce *A. ligustica*

L'analyse phytochimique qualitative de l'espèce *A. ligustica* réalisée par LC-ESI-MS/MS a confirmé la présence de 14 composés bioactifs dans les différents extraits (acétate d'éthyle et n-butanol). Les composés résultants appartiennent principalement à deux groupes : les acides phénoliques et les flavonoïdes. Le tableau 7 fournit une liste détaillée des composés identifiés.

Tableau 7 : Analyse des composés bioactifs des fractions de l'espèce *A. ligustica* par LC-ESI-MS/MS.

Composés	TR (min)	Poids moléculaire	Ion précurseur	Ion produit	Charge (+/-)	Voltage EC (v)	Intensité maximale	
							AcOEt	n -BuOH
Naringénine	47,4	272,25	273,1	147,15	+	-25	680	750
Acide coumarique	47,5	164,15	165,1	101,2	+	-14	391061	494359
Acide benzoïque	47,5	122,12	123,1	91,2	+	-12	90740	78582
Acide chlorogénique	10	354,31	355	238	+	-10	410	/
Kaempférol	46,5	286,24	287,1	225,25	+	-8	5011	5691
Myricétine	2,9	318,23	336,25	46,15	+	-20	220	120
Quercétine	47,5	302,23	303,1	85,05	+	-41	1960	2210
Chrysin	47,7	254,24	255,1	223,3	+	-8	115346	143865
Rutine	41	610,5	611,2	73,2	+	-77	1500	150
Hespérétine	38,5	302,28	300,9	255,25	-	10	2910	5751
Hespéridine	42	610,6	608,8	609,3	-	25	160	400
Acide caféique	48	180,16	178,8	135,1	-	19	1020	1170
Acide ascorbique	47,5	176,124	174,9	87,05	-	23	93521	77548
Acide gallique	20	170,12	168,6	125,1	-	16	160	200

Les effets pharmacologiques des acides phénoliques, notamment leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires, sont bien documentés (Khatri *et al.*, 2019), ce qui fait des plantes une ressource précieuse pour des applications médicinales. Dans la présente étude, cinq (5) acides phénoliques ont été détectés dans nos extraits : l'acide coumarique, benzoïque, chlorogénique, caféique et l'acide gallique.

Ces composés renforcent la capacité antioxydante de la plante, ce qui pourrait aider à protéger l'organisme contre le stress oxydatif et les maladies chroniques. Parmi eux, l'acide chlorogénique et l'acide caféique sont particulièrement connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Espíndola *et al.*, 2019), antioxydantes et anti-inflammatoires (Shin *et al.*, 2017). En effet, l'acide gallique et l'acide coumarique, présentent des caractéristiques antibactériennes et antioxydantes (Tyagi *et al.*, 2015), et contribuent à la prévention des maladies oncologiques (Ruwizhi & Aderibigbe, 2020). Par ailleurs, l'acide benzoïque, présent dans les deux extraits (acétate d'éthyle et n-butanol), est reconnu pour leur activités antioxydantes (Makori *et al.*, 2021) et antifongiques (Berne *et al.*, 2015).

Les flavonoïdes et leurs glycosides sont couramment associés aux effets antioxydants, antidiabétiques, anticancéreux et anti-inflammatoires des plantes médicinales (Panche *et al.*, 2016). *A. ligustica* présente une diversité significative de flavonoïdes, avec huit (8) composés identifiés, incluant des dérivés de flavonols tels que la quercétine, myricétine et le kaempférol sont des flavonoïdes reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Wang *et al.*, 2010). Ces composés sont également connus pour leurs implications majeures dans la lutte contre l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et certains cancers (Middleton *et al.*, 2000). La rutine, identifiée dans les deux extraits, est parmi les composés contribuant au potentiel antidiabétique, anti-Alzheimer et antimicrobien de la plante (Ganeshpurkar & Saluja, 2017).

L'acide ascorbique, également observé dans les deux extraits, contribue également de manière significative au potentiel antioxydant élevé de la plante. En réduisant l'inflammation et les dommages oxydatifs, la phloridzine joue un rôle crucial dans le traitement de nombreuses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires et les cancers (Asplund, 2002).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la littérature, où plusieurs études utilisant des techniques chromatographiques et spectroscopiques modernes ont permis l'identification de composés phénoliques dans différents extraits d'espèces d'*Achillea*. Agar *et al.* (2015) ont mis en évidence la richesse en composés phénoliques des extraits méthanoliques d'*Achillea coarctata*, *Achillea kotschy* et *Achillea lycanica*, en identifiant des composés tels que l'acide quinique, l'acide chlorogénique, l'acide rosmarinique, la rutine, la quercétine, la lutéoline et l'apigénine.

Par ailleurs, Dias *et al.* (2013) ont étudié l'extrait méthanolique d'*Achillea millefolium* et ont identifié des composés appartenant à deux grandes classes : les acides phénoliques (dont des dérivés de l'acide caféoylquinique et de l'acide dicaffeoylquinique) et les flavonoïdes (dérivés de l'apigénine, la quercétine, la lutéoline et le kaempférol). Concernant les travaux antérieurs sur *Achillea ligustica*, Boubertakh *et al.* (2024) ont identifié plusieurs substances telles que l'acide chlorogénique, la lutéoline, la quercétine, l'apigénine et l'acide rosmarinique dans un extrait hydroéthanolique. De plus, Tzakou *et al.* (1995) ont identifié l'apigénine, la lutéoline et la santine dans des extraits méthanoliques et aqueux. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Tuberoso *et al.* (2009), qui ont découvert plusieurs flavonoïdes, notamment la quercétine, la lutéoline et le 6-hydroxykaempférol, dans des extraits éthanoliques. Enfin, les recherches de Venditti *et al.* (2015) sur des extraits méthanoliques ont confirmé la présence de composés variés, incluant la lutéoline, la 7-O-méthyl-apigénine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'apigénine-7-O-glucuronide et la quercétine-3-O-glucuronide. Ces résultats soulignent ainsi le potentiel des espèces appartenant au genre d'*Achillea*, notamment *Achillea ligustica*, comme source de composés bioactifs aux propriétés thérapeutiques importantes.

4.2.3.2. Fractions de l'espèce *B. officinalis*

L'espèce *B. officinalis* contient tous les polyphénols identifiés dans *A. ligustica*, à l'exception de la rutine, qui est absente dans l'extrait d'acétate d'éthyle. On observe également la présence de l'acide chlorogénique dans l'extrait de n-butanol (Tableau 8). L'acide cinnamique détecté exclusivement dans les deux extraits de *B. officinalis*, est un polyphénol aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires notables, reconnu pour son rôle dans la réduction du stress oxydatif et la prévention des maladies chroniques (Ruwizhi & Aderibigbe, 2020). Les

propriétés pharmacologiques des autres constituants de *B. officinalis*, qui présentent des similitudes avec celles d'*A. ligustica*, sont détaillées dans la section 4.2.3.1.

Tableau 8 : Analyse des composés bioactifs des fractions de l'espèce *B. officinalis* par LC-ESI-MS/MS.

Composés	TR (min)	Poids moléculaire	Ion précurseur	Ion produit	Charge (+/-)	Voltage EC (v)	Intensité maximale	
							AcOEt	n -BuOH
Naringénine	47,4	272,25	273,1	147,15	+	-25	650	400
Acide coumarique	47,5	164,15	165,1	101,2	+	-14	283640	403114
Acide benzoïque	47,5	122,12	123,1	91,2	+	-12	95339	81734
Acide chlorogénique	10	354,31	355	238	+	-10	250	150
Kaempférol	46,5	286,24	287,1	225,25	+	-8	5781	3930
Myricétine	2,9	318,23	336,25	46,15	+	-20	240	160
Quercétine	47,5	302,23	303,1	85,05	+	-41	2160	1930
Chrysin	47,7	254,24	255,1	223,3	+	-8	127513	105415
Rutine	41	610,5	611,2	73,2	+	-77	/	1160
Hespérétine	38,5	302,28	300,9	255,25	-	10	4591	4470
Hespéridine	42	610,6	608,8	609,3	-	25	480	170
Acide caféique	48	180,16	178,8	135,1	-	19	1450	1110
Acide ascorbique	47,5	176,124	174,9	87,05	-	23	83802	82135
Acide gallique	20	170,12	168,6	125,1	-	16	200	180
Acide cinnamique	12	148,16	149,1	77,2	+	-35	230	610

Les travaux antérieurs sur *B. officinalis* ont révélé une richesse en composés polyphénoliques et flavonoïdes, confirmant le potentiel thérapeutique de cette plante. Zemouri *et al.* (2019) ont étudié la composition chimique et l'activité antioxydante de l'extrait de feuille de *B. officinalis* cultivé en Algérie. Cette étude a identifié plusieurs composés bioactifs, dont l'acide m-geranyl-p-hydroxybenzoïque, l'acide caféoyl shikimique, la syringaldéhyde, l'acide sinapique hexoside, le quercétine-3-O-glucoside (Isoquercétine), et la lutéoline-7-O-glucoside. Ces composés possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, contribuant à l'efficacité thérapeutique de la plante. Dans une autre étude, Fernandes *et al.* (2019) ont réalisé une caractérisation phytochimique de *B. officinalis*, identifiant une gamme de composés phénoliques, dont l'acide hydroxycinnamique, un antioxydant puissant. De plus, Borowy & Kaplan, (2020) ont confirmé la présence de flavonoïdes et d'acides phénoliques dans les extraits de *B. officinalis*, en mettant l'accent sur leurs propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces études soulignent toutes l'importance du choix du solvant pour extraire efficacement ces composés bioactifs et renforcent l'idée que *B. officinalis* et *A. ligustica* partagent des caractéristiques chimiques et pharmacologiques significatives.

4.3. Activités biologiques

4.3.1. Activité antioxydante

Les deux plantes étudiées ont montré une activité antioxydante significative dans divers tests réalisés, démontrant leur potentiel à neutraliser les radicaux libres.

4.3.1.1. Activité antioxydante de l'espèce *A. ligustica*

L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce *A. ligustica* obtenus à partir des différents tests in-vitro est présenté dans le tableau 9.

a) Test DPPH

D'après les données rapportées dans cette étude, une activité antioxydante accrue est indiquée par une valeur IC_{50} plus faible. En conséquence, le potentiel antioxydant de l'extrait d'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 4,18 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$), obtenu par la méthode du radical DPPH, est plus élevé que celui de l'extrait de n-butanol ($IC_{50} = 9,14 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) et de l'antioxydant

commercial BHA ($IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats attendus peuvent être expliqués par la teneur plus élevée en flavonoïdes dans l'extrait d'acétate d'éthyle ($54,38 \pm 0,29 \mu\text{g QE/mg Ext}$), qui est significativement plus faible dans l'extrait de n-butanol ($27,85 \pm 0,29 \mu\text{g QE/mg Ext}$).

b) Test ABTS

En ce qui concerne le radical ABTS, les deux extraits, acétate d'éthyle et n-butanol, ont démontré la plus grande activité antioxydante ($IC_{50} = 4,06 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ et $IC_{50} = 6,96 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$, respectivement), ce qui est proche de l'activité antioxydante des standards BHA ($IC_{50} = 1,03 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) et BHT ($IC_{50} = 1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$). Cela est probablement dû à la capacité de ces extraits à se stabiliser en donnant des électrons ou de l'hydrogène au radical ABTS.

c) Test de Phénanthroline

Les résultats ont montré une activité antioxydante significative de l'extrait d'acétate d'éthyle avec $A_{0.5} = 3,93 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$, proche de l'activité antioxydante du BHT ($A_{0.5} = 2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$) et du BHA ($A_{0.5} = 0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). En revanche, l'extrait de n-butanol a montré une activité antioxydante plus faible ($A_{0.5} = 11,04 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$).

d) Test de Pouvoir Réducteur

En utilisant la méthode du test de pouvoir réducteur, la capacité antioxydante des extraits a été statistiquement comparable à celle de l' α -tocophérol et de l'acide ascorbique. Cependant, la capacité réductrice de tous les extraits a montré des différences significatives. Dans le test FRAP, l'extrait d'acétate d'éthyle a donné les meilleures valeurs. Les données ont indiqué que le potentiel antioxydant de tous les extraits était significativement plus élevé que celui du α -tocophérol de référence ($A_{0.5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$), avec les valeurs suivantes : acétate d'éthyle ($A_{0.5} = 7,96 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$), et n-butanol ($A_{0.5} = 10,20 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$). De plus, l'activité antioxydante ($A_{0.5} = 7,96 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$) de l'extrait d'acétate d'éthyle était proche de la capacité d'inhibition de l'acide ascorbique standard ($A_{0.5} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 9 : Activité antioxydante des différents extraits de l'espèce *A. ligustica* ($m \pm$ écart-type ; $n = 3$).

Extraits et standards	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)	Phénanthroline A _{0.5} (µg/mL)	Pouvoir réducteur A _{0.5} (µg/mL)
AcOEt	4,18 ± 0,06 ^a	4,06 ± 0,04 ^{a, b}	3,93 ± 0,78 ^c	7,96 ± 0,92 ^a
n-BuOH	9,14 ± 0,11 ^c	6,96 ± 0,28 ^b	11,04 ± 0,20 ^d	10,20 ± 0,43 ^b
BHA	5,73 ± 0,41 ^b	1,03 ± 0,00 ^a	0,93 ± 0,07 ^a	NT
BHT	NT	1,59 ± 0,03 ^a	2,24 ± 0,17 ^b	NT
α-Tocophérol	NT	NT	NT	34,93 ± 2,38 ^d
Acide ascorbique	NT	NT	NT	6,77 ± 1,15 ^a

Les moyennes suivies de la même lettre dans la même colonne ne diffèrent pas statistiquement selon le test de Tukey. NT : non testé ; BHA : Butylhydroxyanisole ; BHT : Butylhydroxytoluène

La grande variété d'acides phénoliques (tels que l'acide caféique et l'acide chlorogénique) et de flavonoïdes (y compris la quercétine et la rutine) identifiés dans les extraits de l'espèce *A. ligustica*, confirme son potentiel en tant qu'agent thérapeutique et une source prometteuse d'antioxydants. En effet, les mêmes composés phénoliques peuvent exhiber différents effets antioxydants en fonction de leur concentration dans les extraits étudiés (Shi *et al.*, 2022), ce qui peut expliquer les différences d'activité antioxydante observées dans les différents tests et extraits. De plus, les composés phénoliques présentent des degrés variables de l'activité antioxydante des composés phénoliques varie en fonction du test utilisé (par exemple, DPPH, ABTS, FRAP, phénanthroline, et autres) (Tabart *et al.*, 2009).

De nombreuses études *in vitro* démontrent que les composés phénoliques extraits des espèces *Achillea* agissent comme des antioxydants non-enzymatiques, servant de puissants piègeurs de radicaux libres. Conforti *et al.* (2005) ont observé que les extraits méthanoliques obtenus d'*A. ligustica* via le test DPPH avaient une forte activité antioxydante (IC₅₀ de 50 µg/mL), mettant en évidence les propriétés antioxydantes significatives de la plante. De même, plusieurs études ont utilisé le test de réduction DPPH pour étudier l'activité antioxydante d'autres espèces d'*Achillea*. Par exemple, Varasteh-kojourian *et al.* (2017) ont trouvé que *A. biebersteinii* présentait une activité antioxydante plus forte (IC₅₀ = 0,276 ± 0,003 mg/mL)

comparée à *A. eriophora* ($IC_{50} = 0,703 \pm 0,023$ mg/mL), bien que les deux soient moins efficaces que l'acide ascorbique. Pour évaluer la capacité des espèces d'*Achillea* à piéger les radicaux ABTS, Gevrenova *et al.* (2021) ont étudié *A. aleppica* et *A. santolinoides* et ont trouvé que les extraits méthanoliques présentaient une activité antioxydante de piégeage des radicaux ABTS significativement plus forte que les extraits d'acétate d'éthyle. Plus précisément, les extraits méthanoliques d'*A. aleppica* et *A. santolinoides* ont montré des valeurs respectives de $88,93 \pm 0,79$ mg TE/g et $42,06 \pm 0,40$ mg TE/g, démontrant ainsi la capacité supérieure du méthanol à extraire les composés antioxydants. En revanche, Ertaş *et al.* (2014) ont rapporté que, comparé à l' α -tocophérol, l'antioxydant standard qui a montré presque 90 % d'inhibition, l'extrait méthanolique de *Achillea cappadocica* présentait une activité modérée de piégeage des radicaux ABTS, atteignant 70 % d'inhibition à 100 μ g/mL.

Plusieurs études ont évalué le pouvoir réducteur des espèces d'*Achillea* en utilisant le test FRAP. Özgen *et al.* (2004) ont constaté que l'extrait méthanolique d'*A. wilhelmsii* montrait une augmentation dépendante de la concentration du pouvoir réducteur, avec des valeurs allant de $2,1 \pm 0,3$ μ g/mL à 50 μ g/mL à $13,1 \pm 1,2$ μ g/mL à 500 μ g/mL. Cependant, le pouvoir réducteur était relativement modéré comparé aux antioxydants standards puissants. Georgieva *et al.* (2015) ont étudié l'espèce *A. millefolium* et ont trouvé que la méthode de décoction fournissait la valeur FRAP la plus élevée ($132,71 \pm 1,29$ μ M ET/g de poids sec), excédant l'extraction assistée par micro-ondes ($76,41 \pm 0,53$ μ M ET/g de poids sec), mettant en évidence l'influence des méthodes d'extraction sur la capacité antioxydante de la plante.

Dans une autre étude utilisant le test de phénanthroline, Boubertakh *et al.* (2024) a examiné l'extrait hydro-éthanolique de feuille de l'espèce *A. ligustica*, qui a montré une activité antioxydante modérée ($A_{0.5} = 5,25 \pm 0,65$ μ g/mL). Cependant, ce dernier était moins efficace comparé à l'antioxydant standard BHT. De plus, Amira *et al.* (2023) ont étudié le potentiel antioxydant de l'extrait hydro-méthanolique de l'espèce *A. odorata* et ont trouvé qu'il présentait de fortes propriétés antioxydantes, avec une valeur $A_{0.5}$ de phénanthroline de $6,22 \pm 0,04$ μ g/mL, comparable à la valeur de BHA. Ces études confirment que les espèces *Achillea*, en particulier *A. ligustica*, sont des sources prometteuses d'antioxydants naturels avec des applications thérapeutiques potentielles pour lutter contre le stress oxydatif.

4.3.1.2. Activité antioxydante de l'espèce *B. officinalis*

L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce *B. officinalis* obtenus à partir des différents tests in-vitro est présenté dans le tableau 10.

a) Test DPPH

En termes de résultats exprimés sous forme de valeurs IC_{50} , l'extrait de n-BuOH a montré une activité de piégeage des radicaux DPPH significativement plus élevée ($9,63 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) que l'extrait d'AcOEt ($19,83 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$), par rapport à l'antioxydant standard BHA ($5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$).

b) Test ABTS

Dans le test ABTS, l'extrait de n-BuOH a présenté une forte activité antioxydante, avec un $IC_{50} = 12,33 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$, suivi de l'extrait d'AcOEt ($21,77 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$), en comparaison avec les antioxydants de référence BHT ($1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) et BHA ($1,03 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$).

c) Test de phénanthroline

Dans le test de phénanthroline, l'extrait de n-BuOH a montré une capacité de réduction plus forte ($A_{0.5} = 8,33 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$) que l'extrait d'AcOEt ($A_{0.5} = 11,96 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$), bien que les deux aient présenté une puissance significativement plus faible par rapport au BHA ($A_{0.5} = 0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) et au BHT ($A_{0.5} = 2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$).

d) Test de pouvoir réducteur

Dans le test du pouvoir réducteur, l'extrait de n-BuOH a montré une activité significativement plus élevée ($A_{0.5} = 43,10 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$) que l'extrait d'AcOEt ($A_{0.5} = 184,82 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$), par rapport à l'acide ascorbique ($A_{0.5} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$) et à l' α -tocophérol ($A_{0.5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 10 : Activité antioxydante des différents extraits de l'espèce *B. officinalis* ($m \pm$ écart-type ; $n = 3$).

Extraits et standards	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)	Phénanthroline A _{0.5} (µg/mL)	Pouvoir réducteur A _{0.5} (µg/mL)
AcOEt	19,83 ± 0,66 ^c	21,77 ± 0,58 ^c	11,96 ± 0,53 ^d	184,82 ± 0,80 ^d
n-BuOH	9,63 ± 0,08 ^b	12,33 ± 0,13 ^b	8,33 ± 0,22 ^c	43,10 ± 0,28 ^c
BHA	5,73 ± 0,41 ^a	1,03 ± 0,00 ^a	0,93 ± 0,07 ^a	NT
BHT	NT	1,59 ± 0,03 ^a	2,24 ± 0,17 ^b	NT
α-Tocophérol	NT	NT	NT	34,93 ± 2,38 ^b
Acide ascorbique	NT	NT	NT	6,77 ± 1,15 ^a

Les moyennes suivies de la même lettre dans la même colonne ne diffèrent pas statistiquement selon le test de Tukey. NT : non testé ; BHA : Butylhydroxyanisole ; BHT : Butylhydroxytoluène

L'efficacité de l'extrait de n-BuOH par rapport à l'extrait d'AcOEt est probablement due à sa teneur plus élevée en flavonoïdes (à titre d'exemple la quercétine et la rutine), reconnus pour leurs fortes propriétés antioxydantes (Chu *et al.*, 2000). Les études précédentes confirment la forte activité antioxydante de *B. officinalis*, comme le montre sa capacité significative de piégeage des radicaux à travers divers tests. Abu-Qaoud *et al.* (2018) rapporté une activité exceptionnelle (IC₅₀ = 6,3 µg/mL) pour les extraits méthanoliques de feuilles sauvages, attribuée à une teneur élevée en composés phénoliques et flavonoïdes, tandis que Bandonien & Murkovic, (2002) ont montré une inhibition des radicaux DPPH de 89 % avec des extraits bruts. Zemmouri *et al.* (2019) ont mis en évidence l'efficacité supérieure des extraits d'éthanol (IC₅₀ = 92,85 ± 3,07 µg/mL) par rapport aux extraits aqueux. Bien que Rodríguez-Magaña *et al.* (2019) aient évalué l'activité de piégeage des radicaux DPPH et que les résultats aient montré une faible activité antioxydante de l'extrait méthanolique, avec une valeur IC₅₀ de 255,74 ± 5,24 mg/mL, toutes ces études soulignent collectivement le fort potentiel antioxydant de *B. officinalis*, en faisant une source naturelle prometteuse d'antioxydants.

4.3.2. Activité anti-enzymatique

4.3.2.1. Activité inhibitrice de l'AChE et la BChE

Lors de l'analyse des résultats de l'activité inhibitrice de l'AChE et de la BChE pour les fractions des deux espèces, les résultats montrent que l'espèce *A. ligustica* n'exerce aucune activité inhibitrice sur les deux enzymes à la concentration mère de 200 µg/mL, et présente une valeur d'IC₅₀ supérieure à 200 µg/mL pour les deux fractions (AcOET et n-BuOH). À l'inverse, *B. officinalis* a montré des résultats intéressants et une activité inhibitrice importante vis-à-vis des deux enzymes (tableau 11).

Tableau 11 : Activité inhibitrice de l'AChE et de la BChE par les fractions de *B. officinalis* (m ± S, n=3).

Extraits et standards	Activité inhibitrice de la l'acétylcholinestérase										IC ₅₀ µg/mL	
	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg					
AcOET	17,86 ± 3,34	26,01 ± 2,60	33,06 ± 0,57	35,38 ± 1,16	49,52 ± 0,70	65,49 ± 0,46	85,67 ± 1,95					57,98 ± 0,78 ^b
n-BuOH	19,45 ± 1,65	24,75 ± 1,38	27,10 ± 0,46	31,21 ± 2,18	39,28 ± 1,69	60,58 ± 3,10	74,95 ± 2,61					74,57 ± 3,62 ^c
Galantamine	35,93 ± 2,28	43,77 ± 0,00	68,50 ± 0,31	80,69 ± 0,41	85,78 ± 1,63	91,80 ± 0,20	94,77 ± 0,34					6,27 ± 1,15 ^a
Extraits et standards	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase											
AcOET	26,54 ± 0,40	37,53 ± 1,73	39,66 ± 0,66	44,85 ± 0,79	50,50 ± 0,95	56,90 ± 0,53	71,09 ± 2,45					53,54 ± 3,06 ^b
n-BuOH	7,21 ± 1,26	15,67 ± 2,72	27,99 ± 1,92	39,99 ± 0,70	45,95 ± 0,78	51,75 ± 3,30	74,87 ± 1,11					80,85 ± 4,71 ^c
Galantamine	3,26 ± 0,62	6,93 ± 0,62	24,03 ± 2,94	45,13 ± 2,60	63,87 ± 2,85	73,57 ± 0,77	78,95 ± 0,58					34,75 ± 1,99 ^a

Les lettres en exposant (a, b, c) indiquent des différences significatives ($P < 0,05$) au sein de chaque enzyme, analysées indépendamment.

La plus forte activité inhibitrice a été enregistrée pour la BChE, où l'extrait d'AcOEt a montré une meilleure activité inhibitrice ($IC_{50} = 53,54 \pm 3,06 \mu\text{g/mL}$), avec une inhibition allant de 26,54 % à 71,09 %, comparé à l'extrait de n-BuOH, qui a montré une inhibition de 7,21 % à 74,87 % avec une valeur de IC_{50} de $80,85 \pm 4,71 \mu\text{g/mL}$, indiquant une activité plus faible. Pour l'AChE, l'extrait d'EtOAc a encore montré la capacité inhibitrice la plus forte ($IC_{50} = 57,98 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$), avec une inhibition allant de 17,86 % à 85,67 %, tandis que l'extrait de n-BuOH a montré une inhibition légèrement plus faible allant de 19,45 % à 74,95 %, avec une IC_{50} de $74,57 \pm 3,62 \mu\text{g/mL}$. Comparé au contrôle positif, la galantamine a montré une inhibition allant de 3,26 % à 78,95 % pour la BChE ($IC_{50} = 34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$) et de 35,93 % à 94,77 % pour l'AChE ($IC_{50} = 6,27 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats suggèrent que les extraits de *B. officinalis* pourraient représenter un nouvel outil pharmacologique intéressant pour atténuer la progression de la maladie d'Alzheimer.

Une analyse des données littéraires montre que les recherches sur les activités inhibitrices de la BChE et de l'AChE de l'espèce *B. officinalis* sont limitées. Cependant, les études disponibles valident son potentiel inhibiteur significatif. Hussien, (2018) a démontré que l'extrait alcoolique de *B. officinalis* inhibe l'activité de l'AChE, l'inhibition augmentant de 15,2 % à 0,001 mg/mL à 84,18 % à 0,1 mg/mL. Plusieurs études soulignent la forte teneur en acides phénoliques et flavonoïdes de cette espèce, tels que l'acide gallique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide rosmarinique, l'apigénine et le kaempférol (Ibrahim *et al.*, 2024). Ces composés étant connus pour leurs effets inhibiteurs sur l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) (Szwajgier, 2015).

Les propriétés inhibitrices de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase des espèces de la famille des Boraginaceae ont fait l'objet de nombreuses études. Eruygun *et al.* (2018) ont constaté que l'extrait méthanolique d'*Anchusa undulata* inhibait l'AChE de 80 % et la BChE de 70 % à une concentration de 250 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, Imran *et al.* (2017) ont rapporté que la fraction d'acétate d'éthyle de *Nonea micrantha* a montré une inhibition considérable de l'AChE (68,54 %) et de la BChE (54,71 %) lors d'expériences *in vitro*, montrant une activité potentielle avec des valeurs d' IC_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ et 720 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Plus récemment, un autre groupe de chercheurs a étudié les propriétés inhibitrices des extraits méthanoliques d'espèces de cette famille contre l'AChE et la BChE. Panou *et al.* (2024) et Ganos *et al.* (2024) ont rapporté que les flavonoïdes et les lignanes présents dans *Onosma*

graeca possédaient la plus grande inhibition de l'anticholinestérase et de la butyrylcholinestérase, avec des valeurs de $(2,35 \pm 0,11 \text{ mg EGALA/g})$ et $(1,24 \pm 0,07 \text{ mg EGALA/g})$, respectivement. D'autre part, l'extrait méthanolique de l'espèce *Alkanna kotschyana* possède une inhibition prononcée de l'AChE $(1,67 \pm 0,06 \text{ mg EGALA/g})$, tandis que l'espèce *Alkanna tinctoria* a montré une capacité potentielle à inhiber la butyrylcholinestérase $(1,29 \pm 0,08 \text{ mg EGALA/g})$. Les résultats de ces études confirment fortement nos résultats, démontrant l'activité inhibitrice significative des extraits testés contre l'AChE et la BChE, qui sont des cibles clés dans la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

4.3.2.2. Activité inhibitrice de l' α -amylase

Les résultats de l'activité inhibitrice de l' α -amylase des fractions des espèces *A. ligustica* et *B. officinalis* par rapport à l'inhibiteur synthétique, l'acarbose, sont montrés dans le tableau 12. Pour l'espèce *A. ligustica*, les résultats ont révélé une efficacité marquée. L'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) a montré la plus forte activité inhibitrice, atteignant $59,85 \pm 0,28 \%$ à $400 \mu\text{g/mL}$, avec une valeur IC_{50} de $297,33 \pm 3,78 \mu\text{g/mL}$. L'extrait de n-butanol (n-BuOH) a également montré une inhibition dose-dépendante atteignant $56,67 \pm 0,28 \%$ à $400 \mu\text{g/mL}$, avec une IC_{50} de $334,32 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$. Ces fractions sont plus actives que l'acarbose, utilisé comme référence synthétique, qui a présenté une IC_{50} de $365,09 \pm 2,07 \mu\text{g/mL}$.

Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Conforti *et al.* (2005) qui ont montré que l'extrait de *n*-hexane des parties aériennes d'*A. ligustica* présentait une activité inhibitrice de l' α -amylase atteignant $89,30 \%$ à 1 mg/mL , tandis que l'extrait méthanolique était inactif à cette même concentration. En complément, l'étude de Asghari *et al.* (2020) sur *A. filipendulina* a montré que les extraits éthanoliques des fleurs présentaient une forte capacité inhibitrice $(1,91 \pm 0,05 \text{ mmol EAC/g})$, confirmant le potentiel antidiabétique des espèces du genre *Achillea*. Plus récemment, Ristić *et al.* (2023) ont comparé les activités inhibitrices de plusieurs espèces d'*Achillea* sur l' α -amylase. Les extraits d'acétate d'éthyle d'*A. millefolium*, *A. chrysocoma*, et *A. abrotanoides* ont respectivement présenté des IC_{50} de $189,62 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, $212,35 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$, et $128,97 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$. Ces valeurs, bien que inférieures à celle d'*A. ligustica*, confirment la richesse de ce genre en composés bioactifs à potentiel inhibiteur de l' α -amylase.

Tableau 12 : Activité inhibitrice de l' α -amylase des fractions d'*A. ligustica* et *B. officinalis* ($m \pm S$, $n=3$).

Extraits et standard	% d'inhibition (<i>A. ligustica</i>)								IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg		
AcOEt	17,12 \pm 1,69	20,06 \pm 2,24	22,34 \pm 1,13	25,44 \pm 0,85	35,55 \pm 0,28	38,32 \pm 0,56	59,85 \pm 0,28	297,33 \pm 3,78 ^a	
n-BuOH	7,99 \pm 1,13	9,62 \pm 0,28	11,41 \pm 0,75	27,40 \pm 1,71	32,12 \pm 0,56	35,39 \pm 0,28	56,67 \pm 0,28	334,32 \pm 1,87 ^b	
Acarbose	7,76 \pm 0,17	8,08 \pm 0,30	9,46 \pm 0,11	10,70 \pm 0,96	31,81 \pm 2,89	37,21 \pm 3,54	53,05 \pm 1,59	365,09 \pm 2,07 ^b	
Extraitset standard	% d'inhibition (<i>B. officinalis</i>)								
AcOEt	11,03 \pm 1,54	13,67 \pm 0,10	20,11 \pm 0,60	26,61 \pm 1,43	35,52 \pm 2,43	50,08 \pm 0,77	78,78 \pm 1,32	199,92 \pm 3,80 ^a	
n-BuOH	3,84 \pm 2,14	4,90 \pm 1,49	6,54 \pm 0,57	10,79 \pm 1,95	12,78 \pm 0,86	19,76 \pm 2,92	27,03 \pm 2,72	>400	
Acarbose	7,76 \pm 0,17	8,08 \pm 0,30	9,46 \pm 0,11	10,70 \pm 0,96	31,81 \pm 2,89	37,21 \pm 3,54	53,05 \pm 1,59	365,09 \pm 2,07 ^b	

Les valeurs suivies de lettres indices différentes dans la même colonne pour chaque plante séparément indiquent une différence significative (test de Tukey, $p \leq 0,05$)

L'ensemble des travaux antérieurs souligne l'intérêt pharmacologique des espèces du genre *Achillea*, et justifie des recherches approfondies sur leurs composés actifs et mécanismes d'action, en vue de leur valorisation dans la prévention ou la gestion du diabète de type 2.

Les résultats obtenus pour les extraits de *B. officinalis* révèlent un potentiel inhibiteur significatif vis-à-vis de l'enzyme α -amylase, en particulier pour l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt), qui a démontré une inhibition croissante en fonction de la concentration. À 400 $\mu\text{g/mL}$, l'inhibition maximale atteint $78,78 \pm 1,32 \%$, avec une valeur IC_{50} de $199,92 \pm 3,80 \mu\text{g/mL}$, inférieure à celle de l'inhibiteur de référence, l'acarbose ($\text{IC}_{50} = 365,09 \pm 2,07 \mu\text{g/mL}$).

Cette performance souligne la richesse de cette fraction en composés bioactifs capables d'interférer efficacement avec l'activité enzymatique digestive. En comparaison, l'extrait de n-butanol (n-BuOH) s'est révélé beaucoup moins actif, avec une inhibition maximale de seulement $27,03 \pm 2,72 \%$ et une valeur $\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$, mettant en évidence l'impact critique du solvant d'extraction sur l'efficacité biologique des fractions.

Ces résultats sont en accord avec les études disponibles sur l'activité inhibitrice de l' α -amylase de *B. officinalis*. Notamment, Marrelli *et al.* (2013) ont montré que l'extrait hydroalcoolique de cette plante présente une inhibition remarquable avec une IC_{50} de $31,61 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, excédant même l'acarbose ($\text{IC}_{50} = 50,0 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) dans leur protocole expérimental. Bien que les méthodes d'extraction et les tests utilisés diffèrent légèrement, cette convergence souligne clairement le potentiel de *B. officinalis* comme source naturelle d'inhibiteurs enzymatiques prometteurs de l' α -amylase, une enzyme impliquée dans divers troubles métaboliques tels que le diabète de type 2.

4.3.2.3. Activité inhibitrice de l'uréase

L'analyse de l'activité inhibitrice de l'uréase des extraits d'*A. ligustica* (AcOEt et n-BuOH), présentée dans le tableau 14, révèle des résultats significatifs en termes d'inhibition de l'enzyme. Les extraits d'*A. ligustica* ont montré une inhibition croissante de l'uréase avec des valeurs d' IC_{50} respectivement de $97,66 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait AcOEt et $73,03 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait n-BuOH. Ces résultats indiquent une activité inhibitrice notable, comparable au standard utilisé (le thiourea), qui a démontré une inhibition de l'uréase de $98,90 \pm 0,05\%$, avec une valeur d' IC_{50} de $11,57 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$.

Tableau 13 : Activité inhibitrice de l'uréase des fractions d'*A. ligustica* et *B. officinalis* (m ± S, n=3).

Extraits et standard	% inhibition de l' uréase (<i>A. ligustica</i>)										IC ₅₀ µg/mL
	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL			
AcOEt	5,82 ± 1,13	11,79 ± 1,41	24,06 ± 0,89	34,06 ± 0,80	37,01 ± 0,19	49,67 ± 0,31	79,69 ± 1,44	97,66 ± 0,92 ^c			
n-BuOH	7,02 ± 0,78	10,74 ± 0,69	11,54 ± 0,12	35,02 ± 0,81	44,93 ± 1,61	57,25 ± 0,28	78,71 ± 0,35	73,03 ± 2,40 ^b			
Thiourée	4,49 ± 0,78	19,85 ± 2,74	55,64 ± 4,24	94,17 ± 0,15	98,42 ± 0,19	98,49 ± 0,41	98,90 ± 0,05	11,57 ± 0,68 ^a			
Extraits et standard	% inhibition de l' uréase (<i>B. officinalis</i>)										IC ₅₀ µg/mL
	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL			
AcOEt	12,38 ± 0,73	13,46 ± 1,45	14,67 ± 1,20	39,94 ± 0,14	59,83 ± 0,88	69,59 ± 0,35	74,46 ± 3,53	39,52 ± 0,48 ^b			
n-BuOH	24,51 ± 2,25	39,27 ± 2,44	42,68 ± 0,03	47,89 ± 0,01	49,0 ± 0,35	72,26 ± 2,64	75,98 ± 3,40	39,77 ± 0,45 ^b			
Thiourée	4,49 ± 0,78	19,85 ± 2,74	55,64 ± 4,24	94,17 ± 0,15	98,42 ± 0,19	98,49 ± 0,41	98,90 ± 0,05	11,57 ± 0,68 ^a			

Les valeurs suivies de lettres indices différentes dans la même colonne pour chaque plante séparément indiquent une différence significative (test de Tukey, p ≤ 0,05)

Concernant les travaux antérieurs, une étude menée par Ghous *et al.* (2010) a évalué les extraits d'*A. millefolium* (éthanol/méthanol) pour leur activité inhibitrice de l'uréase, rapportant un IC₅₀ de 94.243 µg/5ml, ce qui correspond à une inhibition significative de l'enzyme. Ce résultat est en accord avec les observations de l'étude actuelle, soulignant l'efficacité des extraits d'*Achillea* dans l'inhibition de l'uréase.

Une autre étude réalisée par Taşkın *et al.* (2018) sur *A. nobilis* a mis en évidence l'activité inhibitrice de l'extrait d'acétate d'éthyle, dont l'inhibition de l'uréase était de $6.32 \pm 0.34\%$ (extraction par macération). Le thiourea, dans cette même étude, a montré une inhibition de $97.04 \pm 0.14\%$, ce qui en fait un standard de comparaison pour les extraits végétaux étudiés.

Enfin, une étude plus récente menée par Azhikhanova *et al.* (2024) sur *A. setacea* a évalué l'extrait méthanolique, rapportant une inhibition de l'uréase de $73.45 \pm 0.55\%$, avec un IC₅₀ de 76.05 ± 0.86 µg/mL. Ces résultats viennent compléter les données existantes et confirment l'efficacité des extraits d'*Achillea* en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'uréase, avec des niveaux d'inhibition comparables à ceux des standards chimiques utilisés.

L'analyse des résultats obtenus pour les extraits de *B. officinalis* (AcOEt et n-BuOH) et l'inhibiteur standard, la thiourea, met en évidence des différences notables en termes d'efficacité inhibitrice de l'uréase. Les extraits d'AcOEt montrent une inhibition croissante allant de $12,38 \pm 0,73 \%$ à $74,46 \pm 3,53 \%$, avec une IC₅₀ de $39,52 \pm 0,48$ µg/mL, tandis que les extraits de n-BuOH présentent des inhibitions variant de $24,51 \pm 2,25 \%$ à $75,98 \pm 3,40 \%$, avec une IC₅₀ de $39,77 \pm 0,45$ µg/mL. En revanche, la thiourea, utilisée comme inhibiteur standard, affiche une inhibition bien plus marquée, avec des résultats variant de $94,17 \pm 0,15 \%$ à $98,90 \pm 0,05 \%$, et une IC₅₀ très faible de $11,57 \pm 0,68$ µg/mL. Ces données montrent que bien que les extraits de *B. officinalis* présentent une inhibition de l'uréase significative, l'efficacité de ces extraits reste inférieure à celle de la thiourea, qui demeure l'inhibiteur le plus puissant dans ces conditions expérimentales. Néanmoins, les extraits de *B. officinalis* offrent un potentiel intéressant, notamment en raison de leur activité modérée et de la possibilité d'améliorer leur efficacité par des méthodes d'extraction ou de formulation adaptées.

À notre connaissance, peu d'études se sont concentrées sur l'activité inhibitrice de l'uréase des extraits de *B. officinalis*, ce qui souligne l'importance de nos résultats pour cette plante. Contrairement à d'autres espèces de la famille des Boraginaceae, telles que *Heliotropium ophioglossum*, également un membre de cette famille, les travaux de Firdous *et al.* (2012) sur

l'extrait méthanolique de *Heliotropium ophioglossum* ont montré une inhibition significative de l'uréase, avec une valeur d'IC₅₀ de 23,1 µM. Cela suggère que les Boraginaceae possèdent un potentiel considérable dans la lutte contre des maladies liées à cette enzyme, telles que l'ulcère gastrique ou les troubles rénaux.

4.3.3. Activité antimicrobienne

Une activité antimicrobienne intéressante a été observée pour les deux espèces étudiées, tant vis-à-vis des bactéries que des champignons. Cette activité peut être attribuée à la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits, composés reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Xie *et al.*, 2017).

4.3.3.1. Activité antimicrobienne de l'espèce *A. ligustica*

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits d'*A. ligustica* (AcOEt et n-BuOH) contre diverses souches bactériennes, incluant des souches de référence (ATCC) et des souches cliniques, ainsi que contre des champignons phytopathogènes, sont présentés dans le tableau 14. Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de l'espèce *A. ligustica* (AcOEt et n-BuOH), montrent qu'aucune inhibition significative n'a été observée contre les bactéries Gram-positives, telles que les souches de référence *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 6633. En revanche, des résultats plus prometteurs ont été observés contre certaines souches cliniques de bactéries Gram-négatives, notamment *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les zones d'inhibition pour ces souches ont varié entre 11,33 ± 0,58 mm et 14 ± 1,73 mm, avec des valeurs de CMI relativement faibles, indiquant une activité antibactérienne modérée à forte des extraits. En particulier, l'extrait n-BuOH a montré une plus grande efficacité avec des CMI de 0,125 ± 0,00 mg/mL pour *E. coli* et *K. pneumoniae*. Le potentiel antibactérien de l'espèce *A. ligustica* est confirmé par plusieurs travaux, qui rapportent des résultats significatifs concernant son activité antimicrobienne contre diverses souches bactériennes. Ces études se concentrent principalement sur les huiles essentielles de *A. ligustica*, l'étude réalisée par Tuberoso *et al.* (2005), a montré une activité antimicrobienne contre *E. coli* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 12 mm et 10 mm respectivement. Par ailleurs, selon Filippi *et al.* (2006), l'huile essentielle de *A. ligustica* a montré des zones d'inhibition significatives contre *S. albus* (20 mm à 100% de concentration). En ce qui concerne l'activité antibactérienne des extraits phénoliques, elle a également été répertoriée dans la littérature pour d'autres espèces du genre *Achillea*, telles que celles réalisées par les auteurs Stojanović *et al.* (2005), qui ont rapporté des zones

d'inhibition pour *A. clavennae* (26 mm contre *E. coli* et 22 mm contre *P. aeruginosa*), *A. lingulata* (22 mm contre *E. coli* et 20 mm contre *P. aeruginosa*), et *A. millefolium* (15 mm contre *S. enteritidis*).

Tableau 14 : Activité antimicrobienne de l'espèce *A. ligustica* (m ± S, n= 3).

Souches bactériennes		Zone d'inhibition (mm)		CMI (mg/mL)	
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
Gram Positif	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
Gram Négatif	<i>K. pneumoniae</i>	14 ± 1,00	14 ± 1,73	0,25 ± 0,00	0,125 ± 0,00
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
	<i>E. coli</i>	11,33 ± 0,58	13,00 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,125 ± 0,00
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
Souches fongiques		Diamètre de la colonie (cm)		Taux d' inhibition en (%)	
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
Après (48h)	<i>FOL</i> ATCC 4287	0,00 ± 0,00	1,63 ± 0,06	100 ± 0,00	17,10 ± 0,00
	<i>Alternaria sp</i>	0,00 ± 0,00	1,30 ± 0,10	100 ± 0,00	39,24 ± 2,84
Après (6 jours)	<i>FOL</i> ATCC 4287	3,13 ± 0,35	5,00 ± 0,26	50,56 ± 1,92	13,89 ± 0,96
	<i>Alternaria sp</i>	1,77±0,59	4,97±0,47	65,15±1,95	21,30 ±1,95

Les résultats de l'activité antifongique des extraits de l'espèce *A. ligustica* contre des souches fongiques phytopathogènes, notamment *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL* ATCC 4287) et *Alternaria sp*, montrent que l'extrait AcOEt présente une inhibition significative de la croissance fongique. Après 48 heures, l'extrait AcOEt a complètement inhibé la croissance des deux champignons, avec un taux d'inhibition de 100%. En revanche, l'extrait n-BuOH a montré une inhibition plus modeste, avec un taux d'inhibition de 17,10% contre *FOL* ATCC 4287, et de 39,24% contre *Alternaria sp*. Après 6 jours, l'extrait AcOEt reste plus efficace,

inhibant la croissance de FOL ATCC 4287 à 50,56% et celle d'*Alternaria* sp à 65,15%, tandis que l'extrait n-BuOH montre une inhibition réduite à 13,89% contre FOL ATCC 4287 et 21,30% contre *Alternaria* sp. La diminution de l'activité antifongique observée après 6 jours (Figure 29) pourrait être attribuée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, les champignons peuvent développer des mécanismes de résistance, De plus, les composés antifongiques présents dans les extraits de plantes peuvent se dégrader sous l'effet de facteurs environnementaux (Balkis *et al.*, 2002). Les résultats obtenus démontrent le potentiel de l'espèce *A. ligustica* en tant que source de molécules bioactives présentant des propriétés antimicrobiennes notables, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cette plante dans le développement de traitements naturels contre les infections bactériennes et fongiques.

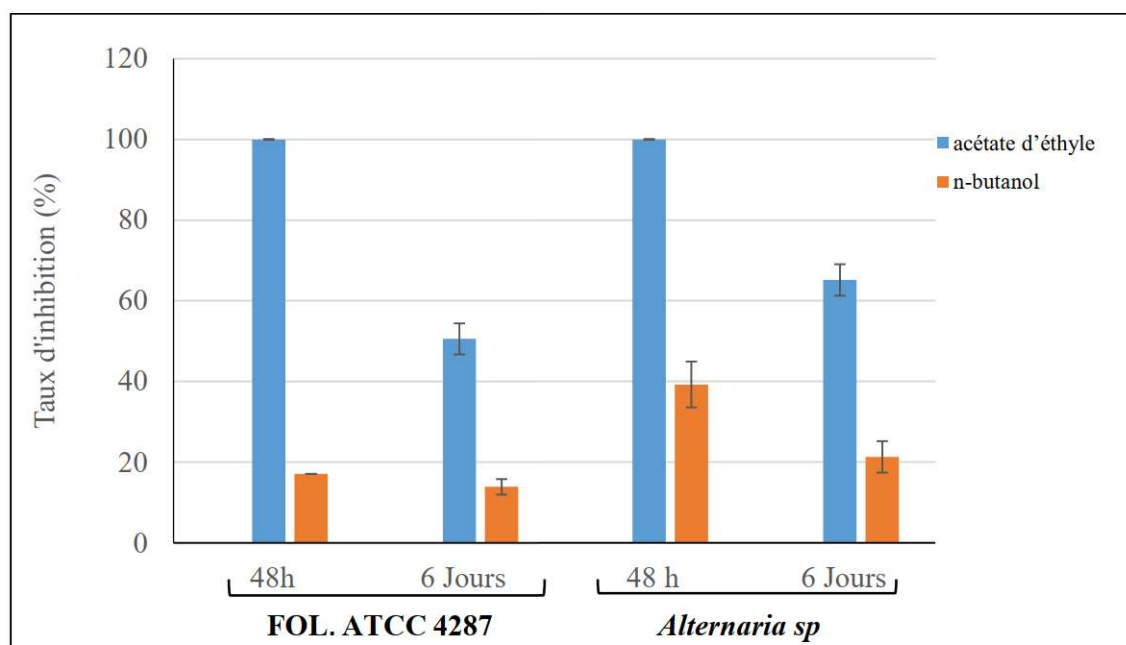


Figure 29 : Inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées par les extraits d'*A. ligustica*.

4.3.3.2. Activité antimicrobienne de l'espèce *B. officinalis*

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *B. officinalis* (AcOEt et n-BuOH), testés contre différentes souches bactériennes, incluant des souches de référence (ATCC) et des souches cliniques, ainsi que contre des champignons phytopathogènes, sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Activité antimicrobienne de l'espèce *B. officinalis* (m ± S, n= 3).

Souches bactériennes		Zone d'inhibition (mm)		CMI (mg/mL)	
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
Gram Positif	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
Gram Négatif	<i>K. pneumoniae</i>	10,67 ± 0,58	11,33 ± 0,58	0,125 ± 0,00	0,125 ± 0,00
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
	<i>E. coli</i>	10,33 ± 0,58	9,67 ± 0,58	0,25 ± 0,00	0,125 ± 0,00
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
Souches fongiques		Diamètre de la colonie (cm)		Taux d' inhibition en (%)	
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
Après (48h)	FOL ATCC 4287	1,3 ± 0,06	1,2 ± 0,06	30,92 ± 2,99	36,10 ± 2,99
	<i>Alternaria sp</i>	1,1 ± 0,06	1 ± 0,00	44,17 ± 2,84	50,74 ± 0,00
Après (6jours)	FOL ATCC 4287	4,3 ± 0,06	4,2 ± 0,10	28,89 ± 0,96	30,00 ± 1,67
	<i>Alternaria sp</i>	5,1 ± 0,10	4,4 ± 0,06	14,00 ± 1,69	25,24 ± 0,97

Les extraits de *B. officinalis* (AcOEt et n-BuOH) ont été évalués contre une gamme de souches bactériennes, comprenant des souches Gram-positives et Gram-négatives, y compris des souches cliniques telles que *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les résultats montrent que les deux extraits possèdent une activité antibactérienne notable contre les souches cliniques, en particulier contre *K. pneumoniae*. L'extrait AcOEt a montré une zone d'inhibition de 10,67 ±

0,58 mm, tandis que l'extrait n-BuOH a présenté une activité légèrement plus élevée avec une zone d'inhibition de $11,33 \pm 0,58$ mm et une concentration minimale inhibitrice (CMI) de $0,125 \pm 0,00$ mg/mL pour les deux extraits. En ce qui concerne *E. coli*, les deux extraits ont également montré une activité antibactérienne, bien que l'inhibition soit moins marquée que pour *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition respectives de $10,33 \pm 0,58$ mm pour l'extrait de l'AcOEt et $9,67 \pm 0,58$ mm pour l'extrait de n-BuOH, avec une CMI de $0,25 \pm 0,00$ mg/mL pour l'extrait de l'AcOEt et $0,125 \pm 0,00$ mg/mL pour l'extrait de n-BuOH.

Ces résultats suggèrent que l'espèce *B. officinalis* exerce une activité antibactérienne plus marquée contre les souches Gram-négatives telles que *K. pneumoniae*, mais que son efficacité est réduite contre les souches Gram-positives. Aucune inhibition significative n'a été observée contre *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 6633.

Aliakbarlu & Tajik, (2011), ont trouvé des zones d'inhibition de $10,32 \pm 0,4$ mm contre *L. monocytogenes* avec un extrait de méthanol, et $7,1 \pm 0,2$ mm contre *B. subtilis*. De plus, Karimi *et al.* (2017) ont rapporté des zones d'inhibition contre *S. aureus* de 1,29 cm pour les extraits de *B. officinalis*. Bien que les résultats soient similaires pour certaines souches, l'inhibition observée dans cette étude contre *E. coli* et *K. pneumoniae* suggère un effet antibactérien spécifique, particulièrement marqué contre les souches Gram-négatives. Ces études renforcent l'efficacité antibactérienne observée dans l'étude actuelle, soulignant le potentiel de l'espèce *B. officinalis* en tant que source d'extraits antimicrobiens, en particulier contre les souches Gram-négatives.

Les résultats de l'activité antifongique des extraits de l'espèce *B. officinalis* montrent une activité significative contre les souches fongiques FOL ATCC 4287 et *Alternaria* sp, à des intervalles de 48 heures et 6 jours. Après 48 heures, l'extrait de l'AcOEt a montré un taux d'inhibition de $30,92 \pm 2,99$ % contre FOL ATCC 4287 et $44,17 \pm 2,84$ % contre *Alternaria* sp, tandis que l'extrait de n-BuOH a présenté des taux d'inhibition respectifs de $36,10 \pm 2,99$ % et $50,74 \pm 0,00$ %. Après 6 jours, l'efficacité des deux extraits a diminué, avec des taux d'inhibition de $28,89 \pm 0,96$ % et $14,00 \pm 1,69$ % pour l'extrait de AcOEt, et $30,00 \pm 1,67$ % et $25,24 \pm 0,97$ % pour l'extrait de n-BuOH. La diminution de l'activité antifongique observée après 6 jours d'incubation (Figure 30) peut être attribuée au développement de mécanismes d'adaptation ou de résistance des champignons face aux composés antifongiques présents dans les extraits de l'espèce *B. officinalis*.

Il n'y avait pas d'études dans la littérature sur l'effet antifongique des extraits de *B. officinalis* contre des souches telles que *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) et *Alternaria* sp. Cependant, une étude menée par Eidi *et al.* (2014) a rapporté des zones d'inhibition faibles pour les extraits de *B. officinalis* contre des souches d'*Aspergillus* et *Candida*, avec des zones d'inhibition variant de 1 mm à 6 mm. Ces résultats soulignent la variabilité de l'activité antifongique de *B. officinalis* en fonction des différentes souches fongiques, avec des effets plus marqués contre certaines souches et moins efficaces contre d'autres.

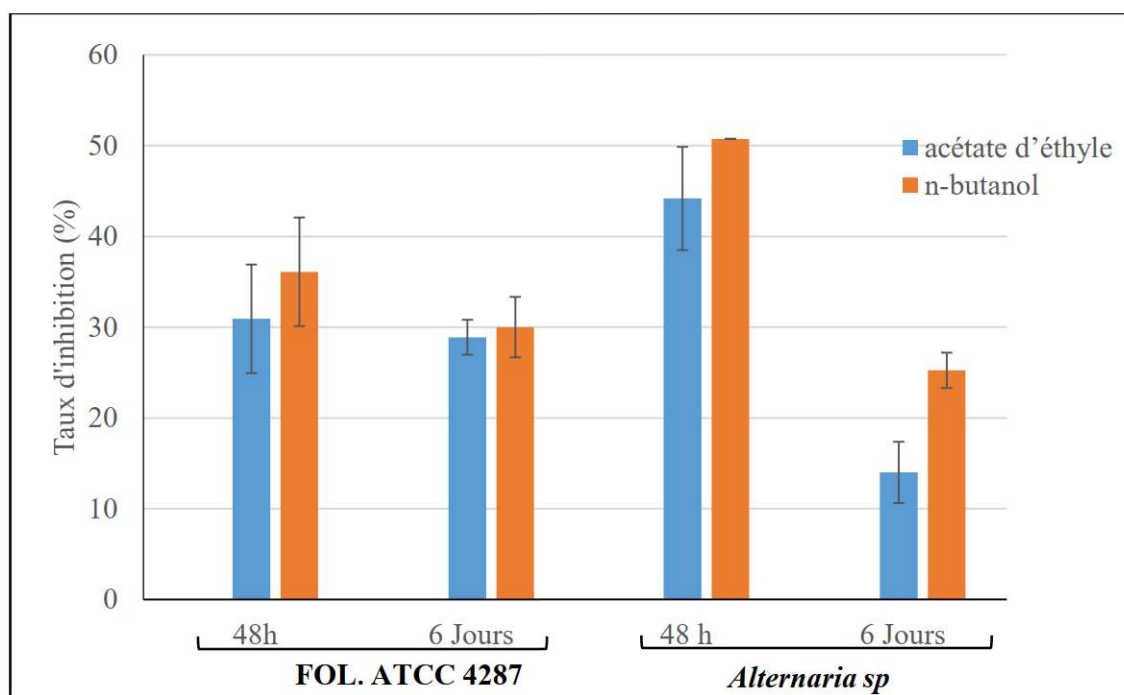


Figure 30 : Inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées par les extraits de *B. officinalis*

4.3.4. Activité cytotoxique sur les larves d'*Artemia salina*

Les résultats de l'activité cytotoxique des extraits (AcOET et n-BuOH) des deux espèces *A. ligustica*, *B. officinalis* et du contrôle positif, bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), sont représentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Activité cytotoxique des extraits d'*A. ligustica* et *B. officinalis* sur les larves d'*Artémia salina* ($m \pm S$, $n= 3$).

Extraits et standard	Concentration ($\mu\text{g / mL}$)						
	12,5	25	50	100	200	400	CL ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	Mortalité (%) sous l'effet de l'espèce <i>A. ligustica</i>						
AcOEt	10 \pm 0,00	15 \pm 0,71	20 \pm 0,00	30 \pm 0,00	35 \pm 0,71	45 \pm 0,71	582,78 \pm 0,67 ^c
n-BuOH	5 \pm 0,71	5 \pm 0,71	10 \pm 0,00	25 \pm 0,71	30 \pm 0,00	35 \pm 0,71	664,25 \pm 3,54 ^d
Extrait	Mortalité (%) sous l'effet de l'espèce <i>B. officinalis</i>						CL ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
AcOEt	15 \pm 0,71	20 \pm 0,00	30 \pm 0,00	35 \pm 0,71	40 \pm 0,00	50 \pm 0,00	403,66 \pm 5,07 ^c
n-BuOH	10 \pm 0,00	15 \pm 0,71	25 \pm 0,71	30 \pm 0,00	35 \pm 0,71	50 \pm 0,00	373,104 \pm 1,07 ^b
K ₂ Cr ₂ O ₇	Concentration ($\mu\text{g / mL}$)					CL ₅₀ $\mu\text{g/mL}$	
	10	20	40	80			
Mortalité (%)	0,00 \pm 0,00	50 \pm 10,00	80 \pm 0,00	100 \pm 0,00		26,490 \pm 1,34 ^a	

Les lettres en exposant (a–c) indiquent des différences statistiquement significatives ($P < 0,05$), avec le K₂Cr₂O₇ désigné comme contrôle positif

Cette étude marque la première fois que les extraits d'*A. ligustica* ont été soumis à un test de toxicité aiguë utilisant les larves d'*A. salina*, tout en déterminant la CL₅₀ (concentration nécessaire pour tuer 50% des larves testées) de chacun. À une concentration de 400 $\mu\text{g/mL}$, l'extrait de l'acétate d'éthyle (AcOET) a montré un taux de mortalité de 45%. Cependant, l'extrait de n-butanol (n-BuOH), a présenté un pourcentage de mortalité plus bas, enregistré à 35% à la même concentration. Dans ce test, le nombre de larves mortes était proportionnel à l'augmentation de la concentration. Selon les critères de classification de Clarkson *et al.* (2004) et Meyer *et al.* (1982), et en comparant les résultats avec le contrôle positif hautement cytotoxique, le bichromate de potassium (CL₅₀ = 26,49 \pm 1,34 $\mu\text{g/mL}$), l'extrait de l'acétate d'éthyle (CL₅₀ = 582,78 \pm 0,67 $\mu\text{g/mL}$) et du n-butanol (CL₅₀ = 664,25 \pm 3,54 $\mu\text{g/mL}$), ont montré une faible toxicité (1000 $\mu\text{g/mL}$ > CL₅₀ \geq 500 $\mu\text{g/mL}$). Dans ce contexte, les composés des espèces *Achillea*, y compris *A. ligustica*, responsables de la toxicité sont probablement des

alcaloïdes (Raeisi *et al.*, 2024) et des saponines (Barda *et al.*, 2021). Ces composés sont bien connus pour leurs effets toxiques (Masi *et al.*, 2022; Zong *et al.*, 2015). Des études supplémentaires sur cette espèce sont nécessaires pour identifier les composés responsables de sa toxicité potentielle et valider son utilisation traditionnelle, afin d'assurer la sécurité publique.

Les résultats du test de cytotoxicité des extraits de la plante *B. officinalis* montrent que les taux de mortalité pour l'extrait de l'AcOEt variaient de 15 % à 50 %, avec une valeur de CL_{50} de $403,66 \pm 5,07 \mu\text{g/mL}$. Pour l'extrait de n-BuOH, les taux de mortalité variaient de 10 % à 50 %, avec une valeur de CL_{50} de $373,10 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$. Selon la classification de Clarkson *et al.* (2004) (Les valeurs de CL_{50} se situent dans la plage de 250 à 500 $\mu\text{g/mL}$), et par comparaison avec le contrôle positif, le bichromate de potassium, qui a montré une toxicité extrême avec un CL_{50} de $26,49 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$), les deux extraits ont été classés comme modérément toxiques. La toxicité de cette espèce est liée à la présence de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les glycosides et les saponines. Ces composés, bien qu'ayant des effets thérapeutiques à des doses appropriées, peuvent provoquer des effets toxiques indésirables lorsqu'ils sont consommés en excès ou mal préparés (Chrzanowska *et al.*, 2024).

Meyer *et al.* (1982) ont établi une relation entre la toxicité et la concentration létale moyenne (CL_{50}) des extraits de plantes sur les larves d'*A. salina*. Les valeurs supérieures à 1000 $\mu\text{g/mL}$ sont considérées comme non toxiques.

La littérature existante fournit des informations sur le profil de toxicité de l'espèce *B. officinalis*, mettant en évidence une variabilité en fonction des méthodes d'extraction et des conditions expérimentales. Rodríguez-Magaña *et al.* (2019) ont évalué la toxicité de *B. officinalis* en utilisant des larves d'*A. salina* et ont conclu qu'il est non toxique, avec une valeur de CL_{50} supérieure à 1000 $\mu\text{g/mL}$. De même, Leos-Rivas *et al.* (2011) ont observé une faible toxicité dans un extrait méthanolique, rapportant une valeur de CL_{50} supérieure à 1000 $\mu\text{g/mL}$, confirmant ainsi la sécurité de cette plante pour un usage thérapeutique. De manière similaire à notre étude, Mirzaei & Mirzaei, (2013) ont rapporté une toxicité modérée pour l'extrait d'acétate d'éthyle ($CL_{50} = 545,6 \mu\text{g/mL}$), en comparaison avec l'extrait méthanolique, qui a montré une toxicité significativement plus faible ($CL_{50} = 1144,6 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats confirment que la nature du solvant utilisé dans le processus d'extraction a une influence directe sur le niveau de toxicité des extraits. Collectivement, ces travaux soutiennent la sécurité générale de *B.*

officinalis, tout en soulignant la nécessité d'une attention particulière aux méthodes d'extraction dans les évaluations de toxicité.

Bien que la toxicité des plantes demeure une préoccupation en matière de sécurité, des études récentes, telles que celle de Thiago *et al.* (2015), ont mis en évidence le potentiel antitumoral des plantes cytotoxiques. Il convient également de noter que de nombreuses études ont montré que les extraits ayant des effets cytotoxiques présentent diverses activités biologiques, notamment antifongiques (Niño *et al.*, 2006), antibactériennes (Brasileiro *et al.*, 2006) anticancéreuses et pesticides (Meyer *et al.*, 1982).

4.4. Comparaison des activités biologiques des deux espèces *A. ligustica* et *B. officinalis*

Cette section compare les activités biologiques des deux plantes médicinales étudiées, en évaluant leurs effets sur diverses cibles biologiques (tableau 17). L'objectif est d'analyser les propriétés thérapeutiques potentielles de chaque plante.

Concernant l'activité antioxydante, l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. ligustica* a montré les meilleures activités dans tous les tests réalisés, avec une IC_{50} de $4,18 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test DPPH, une IC_{50} de $4,06 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test ABTS, une $A_{0.5}$ de $3,93 \pm 0,78$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test de phénanthroline et une $A_{0.5}$ de $7,96 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test FRAP, indiquant une activité antioxydante remarquable. En comparaison, l'extrait de n-butanol de *B. officinalis* a montré une activité antioxydante significativement plus élevée par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle de *A. ligustica*, avec une IC_{50} de $9,63 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test DPPH, une IC_{50} de $12,33 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test ABTS, une $A_{0.5}$ de $8,33 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test de phénanthroline et une $A_{0.5}$ de $43,10 \pm 0,28$ $\mu\text{g/mL}$ dans le test FRAP.

Les deux plantes étudiées, *A. ligustica* et *B. officinalis*, ont montré des résultats variés concernant leur activité anti-enzymatique, en particulier pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE). *A. ligustica*, dans ses deux fractions (AcOEt et n-BuOH), n'a montré aucune activité inhibitrice significative à la concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$, avec des valeurs d' IC_{50} supérieures à 200 $\mu\text{g/mL}$ pour les deux enzymes. En revanche, *B. officinalis* a montré des résultats plus intéressants et une activité inhibitrice significative vis-à-vis des deux enzymes. Pour la BChE, l'extrait d'AcOEt a révélé une forte activité inhibitrice avec une IC_{50} de $53,54 \pm 3,06$ $\mu\text{g/mL}$, tandis que l'extrait de n-BuOH a montré une inhibition plus faible avec une valeur d' IC_{50} de $80,85 \pm 4,71$ $\mu\text{g/mL}$. Concernant l'AChE, l'extrait d'AcOEt a également montré la capacité inhibitrice la plus élevée

($IC_{50} = 57,98 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$), tandis que l'extrait de n-BuOH a montré une inhibition plus modérée, avec une IC_{50} de $74,57 \pm 3,62 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats indiquent que *B. officinalis* présente une activité inhibitrice plus marquée sur les deux enzymes comparativement à *A. ligustica*, suggérant une meilleure efficacité dans ce domaine.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice de l' α -amylase, *A. ligustica* a montré une efficacité marquée, avec l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) présentant la plus forte activité inhibitrice, avec une IC_{50} de $297,33 \pm 3,78 \mu\text{g/mL}$. L'extrait de n-butanol (n-BuOH) a également montré une inhibition dose-dépendante, avec une IC_{50} de $334,32 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$. En revanche, *B. officinalis* a montré un potentiel inhibiteur plus fort, avec son extrait d'acétate d'éthyle ayant une IC_{50} de $199,92 \pm 3,80 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats montrent que *B. officinalis*, en particulier son extrait d'acétate d'éthyle, possède une activité inhibitrice plus forte que *A. ligustica*.

Les deux plantes étudiées, *A. ligustica* et *B. officinalis*, ont montré des activités inhibitrices de l'uréase significatives, bien que leurs efficacités varient. Pour *A. ligustica*, l'extrait de n-butanol a présenté une inhibition plus forte, avec une IC_{50} de $73,03 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$, comparé à l'extrait d'acétate d'éthyle (IC_{50} de $97,66 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$). En revanche, pour *B. officinalis*, les extraits d'AcOEt et de n-BuOH ont montré des valeurs d' IC_{50} respectivement de $39,52 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ pour AcOEt et $39,77 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$ pour n-BuOH. Ces résultats suggèrent que *B. officinalis* possède une activité inhibitrice de l'uréase plus forte que *A. ligustica*, bien que les deux plantes montrent un potentiel significatif pour inhiber l'uréase.

En termes d'activité antibactérienne, *B. officinalis* a montré une activité marquée contre les souches Gram-négatives, notamment *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à $11,33 \pm 0,58 \text{ mm}$ pour l'extrait de n-butanol et des CMI de $0,125 \pm 0,00 \text{ mg/mL}$ pour les deux extraits (AcOEt et n-BuOH). Comparativement, *A. ligustica* a montré des zones d'inhibition allant de $11,33 \pm 0,58 \text{ mm}$ à $14 \pm 1,73 \text{ mm}$ contre *K. pneumoniae* et *E. coli*, avec des CMI relativement faibles. Toutefois, l'extrait de n-butanol de *A. ligustica* a montré la plus grande efficacité, avec une CMI de $0,125 \pm 0,00 \text{ mg/mL}$. En revanche, *A. ligustica* et *B. officinalis* n'ont présenté d'activité antibactérienne contre les souches Gram-positives (*S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 6633). Ainsi, *A. ligustica* présente des activités antibactériennes globalement plus fortes, particulièrement contre les souches Gram-négatives, avec une efficacité notable pour l'extrait de n-butanol.

Les deux plantes étudiées, *A. ligustica* et *B. officinalis*, ont montré des résultats intéressants en termes d'activité antifongique contre des souches fongiques phytopathogènes, notamment *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL ATCC 4287) et *Alternaria* sp. Pour *A. ligustica*, l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) a montré une inhibition significative, avec un taux

d'inhibition de 100% contre les deux champignons après 48 heures. Concernant *B. officinalis*, l'extrait de n-butanol (n-BuOH) a montré la plus forte activité antifongique, avec un taux d'inhibition de $36,10 \pm 2,99\%$ contre *FOL ATCC 4287* et de $50,74 \pm 0,00\%$ contre *Alternaria sp.* Ces résultats montrent que *A. ligustica*, en particulier son extrait AcOEt, présente une activité antifongique plus forte et plus durable (Après 6 jours, l'extrait AcOEt restait plus efficace, avec une inhibition de 50,56% contre *FOL ATCC 4287* et de 65,15% contre *Alternaria sp.*) que *B. officinalis*. Toutefois, l'extrait de n-butanol de *B. officinalis* a montré des résultats prometteurs, en particulier contre *Alternaria sp.*, bien que son efficacité globale reste inférieure à celle de *A. ligustica*.

Selon les critères de Clarkson *et al.* (2004) et Meyer *et al.* (1982), *A. ligustica* a montré une faible toxicité, avec un extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) présentant une CL_{50} de $582,78 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$ et un extrait de n-butanol (n-BuOH) affichant une CL_{50} de $664,25 \pm 3,54 \mu\text{g/mL}$. Pour *B. officinalis*, les extraits ont montré une toxicité modérée. L'extrait d'AcOEt a présenté une CL_{50} de $403,66 \pm 5,07 \mu\text{g/mL}$, tandis que l'extrait de n-BuOH a montré une CL_{50} de $373,10 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$, indiquant une toxicité modérée. Ces résultats indiquent que *A. ligustica* possède une faible toxicité, tandis que *B. officinalis*, bien que modérément toxique, présente une activité cytotoxique plus marquée, particulièrement pour l'extrait de n-butanol.

Tableau 17 : Évaluation comparative des propriétés biologiques des deux plantes médicinales étudiées (*A. ligustica* et *B. officinalis*).

Activités	<i>A. ligustica</i>		<i>B. officinalis</i>	
	AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
Activité antioxydante	<p>DPPH : IC₅₀ = 4,18 ± 0,06 µg/mL</p> <p>ABTS : IC₅₀ = 4,06 ± 0,04 µg/mL</p> <p>Phénanthroline : A_{0.5} = 3,93 ± 0,78 µg/mL</p> <p>FRAP : A_{0.5} = 7,96 ± 0,92 µg/mL</p>	<p>DPPH : IC₅₀ = 9,14 ± 0,11 µg/mL</p> <p>ABTS : IC₅₀ = 6,96 ± 0,28 µg/mL</p> <p>Phénanthroline : A_{0.5} = 11,04 ± 0,20 µg/mL</p> <p>FRAP : A_{0.5} = 10,20 ± 0,43 µg/mL</p>	<p>DPPH : IC₅₀ = 19,83 ± 0,66 µg/mL</p> <p>ABTS : IC₅₀ = 21,77 ± 0,58 µg/mL</p> <p>Phénanthroline : A_{0.5} = 11,96 ± 0,53 µg/mL</p> <p>FRAP : A_{0.5} = 184,82 ± 0,80 µg/mL</p>	<p>DPPH : IC₅₀ = 9,63 ± 0,08 µg/mL</p> <p>ABTS : IC₅₀ = 12,33 ± 0,13 µg/mL</p> <p>Phénanthroline : A_{0.5} = 8,33 ± 0,22 µg/mL</p> <p>FRAP : A_{0.5} = 43,10 ± 0,28 µg/mL</p>
Inhibition de l'ACHÉ	IC ₅₀ > 200 µg/mL	IC ₅₀ > 200 µg/mL	IC ₅₀ = 57,98 ± 0,78 µg/mL	IC ₅₀ = 74,57 ± 3,62 µg/mL
Inhibition de la BChE	IC ₅₀ > 200 µg/mL	IC ₅₀ > 200 µg/mL	IC ₅₀ = 53,54 ± 3,06 µg/mL	IC ₅₀ = 80,85 ± 4,71 µg/mL

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Inhibition de l' α -amylase	$IC_{50} = 297,33 \pm 3,78$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 334,32 \pm 1,87$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 199,92 \pm 3,80$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} > 400$ $\mu\text{g/mL}$
Inhibition de l'uréase	$IC_{50} = 97,66 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 73,03 \pm 2,40$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 39,52 \pm 0,48$ $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 39,77 \pm 0,45$ $\mu\text{g/mL}$
Activité antibactérienne (Gram-négatif)	Zones d'inhibition/ CMI : K. pneumoniae : $14 \pm 1,00$ mm / $0,25 \pm 0,00$ mg/mL E. coli : $11,33 \pm 0,58$ mm / $0,25 \pm 0,00$ mg/mL	Zones d'inhibition/ CMI : K. pneumoniae : $14 \pm 1,73$ mm / $0,125 \pm 0,00$ mg/mL E. coli : $13 \pm 0,00$ mm / $0,125 \pm 0,00$ mg/mL	Zones d'inhibition/ CMI : K. pneumoniae : $10,67 \pm 0,58$ mm / $0,125 \pm 0,00$ mg/mL E. coli : $10,33 \pm 0,58$ mm / $0,25 \pm 0,00$ mg/mL	Zones d'inhibition/ CMI : K. pneumoniae : $11,33 \pm 0,58$ mm / $0,125 \pm 0,00$ mg/mL E. coli : $9,67 \pm 0,58$ mm / $0,125 \pm 0,00$ mg/mL
Activité antibactérienne (Gram-positif)	Pas d'activité contre S. aureus ATCC 25923 et B. subtilis ATCC 6633	Pas d'activité contre S. aureus ATCC 25923 et B. subtilis ATCC 6633	Pas d'activité contre S. aureus ATCC 25923 et B. subtilis ATCC 6633	Pas d'activité contre S. aureus ATCC 25923 et B. subtilis ATCC 6633

RÉSULTATS ET DISCUSSION

<p>Activité antifongique (48h)</p>	<p>Taux d'inhibition de 100% contre FOL ATCC 4287 et <i>Alternaria sp.</i></p>	<p>Taux d'inhibition de 17,10 ± 0,00 % (FOL ATCC 4287), 39,24 ± 2,84 % (<i>Alternaria sp.</i>)</p>	<p>Taux d'inhibition de 30,92 ± 2,99 % (FOL ATCC 4287), 44,17 ± 2,84 % (<i>Alternaria sp.</i>)</p>	<p>Taux d'inhibition de 36,10 ± 2,99 % (FOL ATCC 4287), 50,74 ± 0,00% (<i>Alternaria sp.</i>)</p>
<p>Cytotoxicité</p>	<p>CL₅₀ = 582,78 ± 0,67 µg/mL</p>	<p>CL₅₀ = 664,25 ± 3,54 µg/mL</p>	<p>CL₅₀ = 403,66 ± 5,07 µg/mL</p>	<p>CL₅₀ = 373,10 ± 1,07 µg/mL</p>

Conclusion et Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche de nouveaux agents bioactifs demeure une voie majeure pour la découverte de substances thérapeutiques à la fois plus efficaces et moins toxiques. Dans ce cadre, cette étude s'est attachée à valoriser les savoirs traditionnels d'une population spécifique, en identifiant les plantes médicinales utilisées et les méthodes traditionnelles associées au traitement des pathologies courantes. L'objectif principal était d'évaluer la présence de composés phénoliques totaux et de flavonoïdes dans les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol des feuilles de deux espèces médicinales, *A. ligustica* et *B. officinalis*, ainsi que d'évaluer leurs activités biologiques (antioxydantes, anti-enzymatiques, antimicrobiennes et cytotoxiques).

L'enquête ethnobotanique a révélé une utilisation significative des espèces de la famille des Lamiaceae (33,72%), principalement dans le traitement des troubles digestifs (27,95%). Les femmes ont représenté plus de 80 % des informateurs, avec une prédominance des jeunes adultes de 20 à 30 ans, majoritairement détenteurs d'un niveau universitaire. Une part importante des répondants vivant en milieu rural souligne l'importance des plantes médicinales dans les pratiques de santé locale.

Les analyses phytochimiques ont montré que *A. ligustica* présentait les rendements d'extraction les plus élevés, notamment pour la fraction n-butanol (6,4 %) et n-hexane (4 %), tandis que *B. officinalis* a montré un rendement maximal dans la fraction n-butanol (1,6 %). L'espèce *A. ligustica* a également affiché des teneurs particulièrement élevées en composés phénoliques totaux ($151,25 \pm 2,39$ μg EAG/mg dans l'extrait n-butanol) et en flavonoïdes ($54,38 \pm 0,29$ μg EQ/mg dans l'extrait d'acétate d'éthyle). Pour *B. officinalis*, la teneur totale en composés phénoliques dans l'extrait d'acétate d'éthyle était supérieure à celle de l'extrait n-butanol ($93,41 \pm 2,22$ μg EAG/mg).

La caractérisation qualitative par LC-ESI-MS/MS a mis en lumière plusieurs composés phénoliques majeurs, dont l'acide chlorogénique, caféique, coumarique et gallique, communs aux deux espèces, tandis que l'acide cinnamique était spécifique à *B. officinalis*. Parmi les flavonoïdes, on a identifié la naringénine, le kaempférol, la myricétine, la quercétine, le chrysin, la rutine, l'hespérétine et l'hespéridine.

Les extraits des deux espèces ont démontré un fort potentiel antioxydant confirmé par différents tests (DPPH, ABTS, phénanthroline et FRAP), avec une activité particulièrement prononcée pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *A. ligustica*. Concernant l'activité anti-enzymatique, *B. officinalis* a révélé une inhibition notable des cholinestérases, enzymes impliquées dans les maladies neurodégénératives, tandis que *A. ligustica* n'a montré aucune activité significative à cet égard. Les deux espèces ont également inhibé l' α -amylase, enzyme liée au diabète, et l'uréase, avec une activité modérée.

Une activité antimicrobienne prometteuse a été observée pour les deux espèces contre des bactéries Gram-négatives et Gram-positives ainsi que contre des champignons phytopathogènes, avec une meilleure efficacité des extraits de *A. ligustica*.

Enfin, les tests de cytotoxicité sur *Artemia salina* ont indiqué une faible toxicité pour *A. ligustica*, tandis que *B. officinalis* présentait une toxicité modérée, suggérant la nécessité d'études complémentaires de sécurité.

En résumé, ces résultats mettent en évidence le potentiel pharmacologique prometteur des deux espèces étudiées, soutenant ainsi leur usage traditionnel en phytothérapie. Ces données ouvrent la voie à des études complémentaires, afin d'optimiser leur utilisation future comme sources naturelles de composés thérapeutiques. Parmi les perspectives scientifiques envisageables, il serait pertinent de:

- Réaliser des études in vivo afin de confirmer les effets pharmacologiques observés in vitro.
- Isoler et caractériser les composés bioactifs responsables des activités thérapeutiques, notamment par isolement à l'aide d'une HPLC préparative.
- Étudier plus en détail les mécanismes d'action au niveau moléculaire.
- Développer des formulations pharmaceutiques adaptées pour améliorer l'efficacité.
- Optimiser les méthodes d'extraction pour maximiser le rendement et la stabilité des composés actifs.
- Évaluer l'efficacité des extraits sur d'autres pathologies d'intérêt thérapeutique.

La poursuite de ces investigations permettra de consolider les bases scientifiques nécessaires à une exploitation sécurisée et optimale de ces plantes médicinales comme sources naturelles de composés thérapeutiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699.

Abdelouahab, B., Yassine, B., Vázquez, F. M., Nabila, S., & Hamdi, B. (2021). The Phytotherapeutic Arsenal in the Guerbes-Sanhadja Wetlands Complex (North East of Algeria). *Journal of Bioresource Management*, 8(2), 38–54.

Abu-Qaoud, H., Shawarb, N., Hussen, F., Jaradat, N., & Shtaya, M. (2018). Comparison of qualitative, quantitative analysis and antioxidant potential between wild and cultivated *Borago officinalis* leaves from palestine. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 31(3), 953–959.

Abushaheen, M. A., Muzahed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.

Adli, B., Touati, M., Yabrir, B., Bezini, E., Mohamed, H., Yousfi, I., & Dahia, M. (2021). Consensus Level and Knowledge of Spontaneous Medicinal Plants Used in Algerian Central Steppe Region (Djelfa). *Agriculture Conspectus Scientificus*, 86(2), 139–152.

Adrian, A., Schoppmann, K., Sromicki, J., Brungs, S., Von Der Wiesche, M., Hock, B., Kolanus, W., Hemmersbach, R., & Ullrich, O. (2013). The oxidative burst reaction in mammalian cells depends on gravity. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 98.

Agar, O., Dikmen, M., Ozturk, N., Yilmaz, M., Temel, H., & Turkmenoglu, F. (2015). Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L. Species Growing in Turkey. *Molecules*, 20(10), 17976–18000.

Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Eds.). (2006). *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs* (1st ed.). Wiley.

Alam, Md. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, Md. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152.

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14–29.

Albuquerque, U. P., Cruz Da Cunha, L. V. F., De Lucena, R. F. P., & Alves, R. R. N. (Eds.). (2014). *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. Springer New York.

- Albuquerque, U. P., Lucena, R. F. P., Monteiro, J. M., Florentino, A. T. N., & Almeida, C. D. F. C. B. R. (2006). Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. *Ethnobotany Research and Applications*, 4, 051.
- Albuquerque, U. P., Ramos, M. A., Júnior, W. S. F., & De Medeiros, P. M. (2017). History and Concepts. In U. P. Albuquerque, M. A. Ramos, W. S. Ferreira Júnior, & P. M. De Medeiros, *Ethnobotany for Beginners* (pp. 1–16). Springer International Publishing.
- Ali, F., Shamim, S., Lateef, M., Khan, K. M., Taha, M., Salar, U., Wadood, A., Rehman, A. U., Nawaz, N. U. A., & Perveen, S. (2021). *N*-Aryl-3,4-dihydroisoquinoline Carbothioamide Analogues as Potential Urease Inhibitors. *ACS Omega*, 6(24), 15794–15803.
- Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2006). α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 449–455.
- Ali, T., Belay, S., & Edessa, S. (2022). Indigenous knowledge transfer: the case of traditional medicine and agricultural practices. *African Journal of Chemical Education*, 12(2), 112-135.
- Aliakbarlu, J., & Tajik, H. (2011). Antioxidant and antibacterial activities of various extracts of *Borago officinalis* flowers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(6), 539–544.
- Alonso, A.-M., Reyes-Maldonado, O. K., Puebla-Pérez, A. M., Arreola, M. P. G., Velasco-Ramírez, S. F., Zúñiga-Mayo, V., Sánchez-Fernández, R. E., Delgado-Saucedo, J.-I., & Velázquez-Juárez, G. (2022). GC/MS Analysis, Antioxidant Activity, and Antimicrobial Effect of *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae). *Molecules*, 27(11), 3436.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74(2), 129–142.
- Amira, H., Benabdallah, H., Mamache, W., Benchikh, F., Ounis, R., Chawki, B., & Amira, S. (2023). Evaluation of the phytochemical content and antioxidant properties of different extracts of *Achillea odorata* L. *Bionatura*, 8(3), 1–10.
- Andreatos, N., Shehadeh, F., Pliakos, E. E., & Mylonakis, E. (2018). The impact of antibiotic prescription rates on the incidence of MRSA bloodstream infections: A county-level, US-wide analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 195–200.
- Anteunis, A., Fautrez-Firlefyn, N., & Fautrez, J. (1966). A propos d'un complexe tubulo-mitochondrial ordonné dans le jeune o-cyte d'*Artemia salina*. *Journal of Ultrastructure Research*, 15(1–2), 122–130.
- Applequist, W. L., & Moerman, D. E. (2011). Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Economic Botany*, 65(2), 209–225.

- Arnal-Schnebelen, B. (2006). Le(s) syndrome(s) prémenstruel(s), place de l'huile d'onagre et de l'huile de bourrache. *Phytothérapie*, 4(S1), hs8–hs13.
- Arome, D., & Chinedu, E. (2013). The importance of toxicity testing. *Journal of Pharmaceutical and BioSciences*, 4, 146–148.
- Arshad, T., Khan, K. M., Rasool, N., Salar, U., Hussain, S., Asghar, H., Ashraf, M., Wadood, A., Riaz, M., Perveen, S., Taha, M., & Ismail, N. H. (2017). 5-Bromo-2-aryl benzimidazole derivatives as non-cytotoxic potential dual inhibitors of α -glucosidase and urease enzymes. *Bioorganic Chemistry*, 72, 21–31.
- Asadi-Samani, M., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S22–S28.
- Asghari, B., Mafakheri, S., Zengin, G., Dinparast, L., & Bahadori, M. B. (2020). In-depth study of phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory and antiproliferative properties of *Achillea filipendulina*: A good candidate for designing biologically-active food products. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2196–2208.
- Asplund, K. (2002). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: A systematic review. *Journal of Internal Medicine*, 251(5), 372–392.
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Abdelgawad, A. A. M. (2017). Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365.
- Azhikhanova, Z., Duru, M. E., Megbenu, H. K., Kucukaydin, S., tas-Kucukaydin, M., Baisalova, G., Shaimardan, M., Seiilgazy, M., Nuraje, N., & Özler, M. A. (2024). Phytochemical Study of *Achillea setacea* Waldst. Et Kit. With Anticholinesterase, Antidiabetic, Anti-Urease, and Anti-Tyrosinase Activities. *Engineered Science*, 31, 1256.
- Azizi, M., Chizzola, R., Ghani, A., & Oroojalian, F. (2010). Composition at Different Development Stages of the Essential Oil of Four *Achillea* Species Grown in Iran. *Natural Product Communications*, 5(2), 283–290.
- Bader, A., Martini, F., Schinella, G. R., Rios, J. L., & Prieto, J. M. (2015). Modulation of Cox-1, 5-, 12- and 15-Lox by Popular Herbal Remedies Used in Southern Italy Against Psoriasis and Other Skin Diseases. *Phytotherapy Research*, 29(1), 108–113.
- Bader, A., Panizzi, L., Cioni, P., & Flamini, G. (2007). *Achillea ligustica*: Composition and antimicrobial activity of essential oils from the leaves, flowers and some pure constituents. *Open Life Sciences*, 2(2), 206–212. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0020-3>

- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., & Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, *148*(2–3), 187–197.
- Bailey, C. J., & Day, C. (1989). Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care*, *12*(8), 553–564.
- Bakr, R. O., Arafa, R. K., Al-Abd, A. M., & Elshishtawy, H. M. (2014). Phenolics of *Achillea fragrantissima* growing in Egypt and its cytotoxic activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, *8*(21), 763–771.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203.
- Balkis, M. M., Leidich, S. D., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Mechanisms of Fungal Resistance: An Overview. *Drugs*, *62*(7), 1025–1040.
- Bandonien, D., & Murkovic, M. (2002). The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *53*(1–3), 45–49.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, *32*(4), 279–295.
- Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, *72*(13), 1551–1565.
- Barda, C., Grafakou, M.-E., Tomou, E.-M., & Skaltsa, H. (2021). Phytochemistry and Evidence-Based Traditional Uses of the Genus *Achillea* L.: An Update (2011–2021). *Scientia Pharmaceutica*, *89*(4), 50.
- Bartley, G. E., Scolnik, P. A., & Giuliano, G. (1994). Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *45*(1), 287–301.
- Baziz, K., Maougal, R. T., & Amroune, A. (2020). An ethnobotanical survey of spontaneous plants used in traditional medicine in the region of Aures, Algeria. *European Journal of Ecology*, *6*(2).
- Belhouala, K., & Benarba, B. (2021). Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Algeria: A Multiregional Ethnobotanical Study. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 760492.

- Bello, A., & Dingle, T. C. (2018). What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(20), 165–174.
- Belyaev, N. D., Kellett, K. A. B., Beckett, C., Makova, N. Z., Revett, T. J., Nalivaeva, N. N., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2010). The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a β -Secretase-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41443–41454.
- Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., Bekkar, A. A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 626–637.
- Benderradji, L., Bounar, R., Ghadbane, M., & Khellaf, R. (2021). Etude ethnobotanique comparative et utilisation thérapeutique de plantes médicinales de djebel djedoug (Hammam Dhalaa) et du milieu oasien (oasis de Boussaâda). *Journal of Oasis Agriculture and Sustainable Development*, 3(1), 1–11.
- BENDIF, H., HARIR, M., Merzouk YAHIAOUI, SOUILAH, N., HECHAICHI, F. Z., MIARA, M. D., & Ifriqya MEDILA. (2021). Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in El Hammdia (Southern region of the province of Bordj Bou Arreridj, Algeria). *Algerian Journal of Biosciences.*, 2(1), 6–15.
- Bendif, H., Souilah, N., Miara, M. D., Daoud, N., Miri, Y. B., Lazali, M., Khalfa, H., & Bahloul, F. (2020). Medicinal plants popularly used in the rural. *AgroLife Scientific Journal*, 9(2).
- Benelli, G., Pavela, R., Giordani, C., Casettari, L., Curzi, G., Cappellacci, L., Petrelli, R., & Maggi, F. (2018). Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops and Products*, 112, 668–680.
- Berlicki, Ł., Bochno, M., Grabowiecka, A., Białas, A., Kosikowska, P., & Kafarski, P. (2012). N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. *Amino Acids*, 42(5), 1937–1945.
- Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., & Ovidi, E. (2018). Natural products for human health: An historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32(16), 1926–1950.
- Berne, S., Kovačič, L., Sova, M., Kraševc, N., Gobec, S., Križaj, I., & Komel, R. (2015). Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: Design, synthesis, structure–activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15), 4264–4276.

- Bernhoft, A. (2010). *Bioactive compounds in plants: Benefits and risks for man and animals : proceedings from a symposium held in Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13-14 November 2008*. Novus Forlag.
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bainsi, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From Theory to Practice. *Foods*, 10(11), 2595.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.
- Bondy, S. C., & Naderi, S. (1994). Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology*, 48(1), 155–159.
- Borowy, A., & Kaplan, M. (2020). Chemical composition and antioxidant activity of borage (*Borago officinalis* L.) SEEDS. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 19(6), 79–90.
- Bouafia, M., Amamou, F., Gherib, M., Benaissa, M., Azzi, R., & Nemmiche, S. (2021). Ethnobotanical and ethnomedicinal analysis of wild medicinal plants traditionally used in Naâma, southwest Algeria. *Vegetos*, 34(3), 654–662.
- Bouayyadi, L., El Hafian, M., & Zidane, L. (2015). Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. *Journal of Applied Biosciences*, 93(1), 8770.
- Boubertakh, H., Kabouche, Z., Boudechicha, A., Madi, A., Khalfallah, A., & Kabouche, A. (2024). RP-UHPLC-ESI-QTOF-MSⁿ analyses, antioxidant, antimicrobial, analgesic activities and toxicity of *Achillea ligustica* All. *Natural Product Research*, 1(6), 1–6.
- Boullata, J. I., & Nace, A. M. (2000). Safety Issues with Herbal Medicine. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 20(3), 257–269.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., & Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2–3), 293–308.
- Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). *Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia*. 28.
- Bouteche, A., Touil, A., Akkal, S., Bensouici, C., & Nieto, G. (2024). Phenolic Constituents, Photoprotective Effect, and Antioxidant Capacities of *Achillea ligustica* All. *Molecules*, 29(17), 4112.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173–183.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brasileiro, B. G., Pizziolo, V. R., Raslan, D. S., Jamal, C. M., & Silveira, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(2), 195–202.
- Bremer, K., Jansen, R. K., Karis, P. O., Källersjö, M., Keeley, S. C., Kim, K., Michaels, H. J., Palmer, J. D., & Wallace, R. S. (1992). A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. *Nordic Journal of Botany*, 12(2), 141–148.
- Bruce, D. (1985). An Up-and-Down Procedure for Acute Toxicity Testing. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5(1), 151–157.
- Bruni, A., Ballero, M., & Poli, F. (1997). Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 57(2), 97–124.
- Butnariu, M., & Bocso, N.-S. (2022). The biological role of primary and secondary plants metabolites. *Nutrition and Food Processing*, 5(3), 01–07.
- Byg, A., & Balslev, H. (2001). Diversity and use of palms in Zahamena, eastern Madagascar. *Biodiversity and Conservation*, 10, 951–970.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Vivar, A. R. D., Avila, G., Duran, A., & Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 429–439.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749–760.
- Careri, M., Mangia, A., & Musci, M. (1998). Overview of the applications of liquid chromatography–mass spectrometry interfacing systems in food analysis: Naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*, 794(1–2), 263–297.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Carrizzo, A., Izzo, C., Oliveti, M., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Di Pietro, P., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Migliarino, S., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., & Vecchione, C. (2018). The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2968.

- Cattoir, V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52(10), 607–616.
- Cecchini, C., Silvi, S., Cresci, A., Piciotti, A., Caprioli, G., Papa, F., Sagratini, G., Vittori, S., & Maggi, F. (2012). Antimicrobial Efficacy of *Achillea ligustica* ALL. (Asteraceae) Essential Oils against Reference and Isolated Oral Microorganisms. *Chemistry & Biodiversity*, 9(1), 12–24.
- Cerqueira, T. M. G., de Carvalho Correia, A. C., Dos Santos, R. V., Lemos, R. P. L., da Silva, S. A. S., & Barreto, E. (2020). The use of medicinal plants in Maceió, Northeastern Brazil: An ethnobotanical survey. *Medicines*, 7(2), 7.
- Ćetković, G. S., Mandić, A. I., Čanadanović-Brunet, J. M., Djilas, S. M., & Tumbas, V. T. (2007). HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana* L.) Extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(2), 293–306.
- Chemat, F., & Cravotto, G. (2012). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chevallier, A. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales: [Identification, préparations, soins]* (Ed. mise à jour). Larousse.
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 153–177.
- Chi, C. (1994). Integrating traditional medicine into modern health care systems: Examining the role of Chinese medicine in Taiwan. *Social Science & Medicine*, 39(3), 307–321.
- Chohra, D., & Ferchichi, L. (2019). Ethnobotanical study of Belezma National Park (BNP) plants in Batna: East of Algeria. *Acta Scientifica Naturalis*, 6(2), 40–54.
- Choudhary, K., Singh, M., & Pillai, U. (2008). Ethnobotanical Survey of Rajasthan—An Update. *American-Eurasian Journal of Botany*, 1(2), 38–45.
- Chrzanowska, E., Denisow, B., Ekiert, H., & Pietrzyk, Ł. (2024). Metabolites Obtained from Boraginaceae Plants as Potential Cosmetic Ingredients—A Review. *Molecules*, 29(21), 5088.
- Chu, Y., Chang, C., & Hsu, H. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 561–566.

- Clarkson, C., Maharaj, V. J., Crouch, N. R., Grace, O. M., Pillay, P., Matsabisa, M. G., Bhagwandin, N., Smith, P. J., & Folb, P. I. (2004). In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(2–3), 177–191.
- Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature*, *406*, 762–767.
- Colombo, M. L., Assisi, F., Puppa, T. D., Moro, P., Bissoli, M., Borghini, R., Perego, S., Galasso, G., & Davanzo, F. (2010). Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. *J. Pharm. Sci.*, *2*(7), 417.
- Conforti, F., Loizzo, M. R., Statti, G. A., & Menichini, F. (2005). Comparative Radical Scavenging and Antidiabetic Activities of Methanolic Extract and Fractions from *Achillea ligustica* ALL. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *28*(9), 1791–1794.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.-P., Ferroud, C., & Doussot, J. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *26*, 176–185.
- Craig, L. A., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer’s disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(6), 1397–1409.
- Criel, G. R. J., & Macrae, T. H. (2002). *Artemia* Morphology and Structure. In Th. J. Abatzopoulos, J. A. Beardmore, J. S. Clegg, & P. Sorgeloos (Eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology* (pp. 1–37). Springer Netherlands.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2006). *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Pub.
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., & Rong, L. (2020). Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules*, *25*(1), 183.
- Da Silva, S. M., Koehnlein, E. A., Bracht, A., Castoldi, R., De Moraes, G. R., Baesso, M. L., Peralta, R. A., De Souza, C. G. M., De Sá-Nakanishi, A. B., & Peralta, R. M. (2014). Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, *56*, 1–8.
- Dai, T., Chen, J., Li, Q., Li, P., Hu, P., Liu, C., & Li, T. (2018). Investigation the interaction between procyanidin dimer and α -amylase: Spectroscopic analyses and molecular docking simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *113*, 427–433.

- Das, A. K., Islam, Md. N., Faruk, Md. O., Ashaduzzaman, Md., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58–70.
- de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2010). Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. *Wiley-Blackwell*, 384.
- De Los Angeles La Torre-Cuadros, M., & Islebe, G. A. (2003). Traditional ecological knowledge and use of vegetation in southeastern Mexico: A case study from Solferino, Quintana Roo. *Biodiversity and Conservation*, 12, 2455–2476.
- de Sousa, D. P., Nóbrega, F. F. F., Claudino, F. S., de, R. N., Leite, J. R., & Mattei, R. (2007). Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17(2), 170–175.
- Decré, D. (2012). *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques: Un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(441), 43–52. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71412-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71412-0)
- Deng, H.-H., Hong, G.-L., Lin, F.-L., Liu, A.-L., Xia, X.-H., & Chen, W. (2016). Colorimetric detection of urea, urease, and urease inhibitor based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 915, 74–80.
- Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, 35(2), 178–216.
- Dey, P. M., & Harborne, J. B. (1997). *Plant biochemistry*. Academic Press.
- Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A. M., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, 141(4), 4152–4160.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2441–2469.
- Dietz, K.-J. (2016). Thiol-Based Peroxidases and Ascorbate Peroxidases: Why Plants Rely on Multiple Peroxidase Systems in the Photosynthesizing Chloroplast? *Molecules and Cells*, 39(1), 20–25.
- Divekar, P. A., Narayana, S., Divekar, B. A., Kumar, R., Gadratagi, B. G., Ray, A., Singh, A. K., Rani, V., Singh, V., Singh, A. K., Kumar, A., Singh, R. P., Meena, R. S., & Behera, T. K.

- (2022). Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2690.
- Doughari, J. H. (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. In V. Rao (Ed.), *Phytochemicals—A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305–311.
- Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29–38.
- Dvořák, P., Žďárský, M., & Beňová, K. (2009). Possibilities of alternative generation II biotests at Artemia. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2), 45–47.
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61.
- Edah, L., Ezin, C., Latifou, A. B., Adda, C., Vissienon, C., & Vissienon, Z. (2021). Mycotoxines: Effets Sur La Santé Humaine. *International Journal of Science and High Technology*, 24(2), 310–333.
- Eddouks, M., Ajbli, M., & Hebi, M. (2016). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 516–530.
- Eidi, S., Ghodrati Azadi, H., & Ghanbari Nehbandani, H. (2014). Comparative Evaluation of the Antifungal Activity of *Borage* (*Borago officinalis*) and *Camellia sinesis* (*Green tea*) leaves against various *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 4(1), 29–36.
- Elbastawesy, M. A. I., Aly, A. A., Ramadan, M., Elshaier, Y. A. M. M., Youssif, B. G. M., Brown, A. B., & El-Din A Abuo-Rahma, G. (2019). Novel Pyrazoloquinolin-2-ones: Design, synthesis, docking studies, and biological evaluation as antiproliferative EGFR-TK inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 90, 103045.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.

- Elsayed Azab, A., A Adwas, A., Ibrahim Elsayed, A. S., A Adwas, A., Ibrahim Elsayed, A. S., & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43–47.
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39–52.
- Ertaş, A., Boğa, M., Haşimi, N., Yeşil, Y., Gören, A. C., Topçu, G., & Kolak, U. (2014). Antioxidant, anticholinesterase, and antimicrobial activities and fatty acid constituents of *Achillea cappadocica* Hausskn. Et Bornm. *Turkish journal of chemistry*, 38(4), 592–599.
- Eruygur, N., Üstün, O., & Taban, K. (2018). Biological activity studies on the aqueous methanol extract of *Anchusa undulata* L. subsp. *Hybrida* (Ten.) Coutinho. *Journal of Research in Pharmacy*, 22(1), 29–36.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108–120.
- Espíndola, K. M. M., Ferreira, R. G., Narvaez, L. E. M., Silva Rosario, A. C. R., Da Silva, A. H. M., Silva, A. G. B., Vieira, A. P. O., & Monteiro, M. C. (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 541.
- Esterly, J. S., Richardson, C. L., Eltoukhy, N. S., Qi, C., & Scheetz, M. H. (2011). Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter Baumannii*. *Annals of Pharmacotherapy*, 45(2), 218–228.
- Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Wade, K. L., & Talalay, P. (2013). Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 1–7.
- Fajinmi, O. O., Olarewaju, O. O., & Van Staden, J. (2017). Traditional Use of Medicinal and Aromatic Plants in Africa. In M. Neffati, H. Najjaa, & Á. Máthé (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants of the World—Africa Volume 3* (Vol. 3, pp. 61–76). Springer Netherlands.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879.
- Farahpour, M. R., & Mavaddati, A. H. (2012). Effects of borage extract in rat skin wound healing model, histopathological study. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 651–656.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2019). Phytochemical characterization of *Borago officinalis* L. and *Centaurea cyanus* L. during flower development. *Food Research International*, 123, 771–778.

- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From *In Vitro* Results to *In Vivo* Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671.
- Ferrero, L., Beria D'Argentina, S., Paissoni, M. A., Río Segade, S., Rolle, L., & Giacosa, S. (2025). Phenolic budget in red winemaking: Influence of maceration temperature and time. *Food Chemistry*, 482, 144159.
- Figueiredo-González, M., Grosso, C., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2016). α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: A stronger alternative to acarbose? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 118, 322–327.
- Filippi, J.-J., Lanfranchi, D.-A., Prado, S., Baldovini, N., & Meierhenrich, U. J. (2006). Composition, Enantiomeric Distribution, and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Achillea ligustica* All. from Corsica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6308–6313.
- Firdous, S., Ansari, N. H., Fatima, I., Malik, A., Afza, N., Iqbal, L., & Lateef, M. (2012). Ophiamides A-B, new potent urease inhibitory sphingolipids from *Heliotropium ophioglossum*. *Archives of Pharmacal Research*, 35(7), 1133–1137.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem*, 73(2), 627–650.
- Freires, I., Denny, C., Benso, B., De Alencar, S., & Rosalen, P. (2015). Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules*, 20(4), 7329–7358.
- Friedman, J., Yaniv, Z., Dafni, A., & Palewitch, D. (1986). A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev Desert, Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 16(2–3), 275–287.
- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 149–164.
- Ganos, C., Zengin, G., Chinou, I., AliGiannis, N., & Graikou, K. (2024). Phytochemical Profiling and Biological Assessment of the Aerial Parts from Three Mediterranean *Alkanna* Species (*A. orientalis*, *A. tinctoria*, *A. kotschyana*) in the Boraginaceae Family. *Plants*, 13(2), 278.

- Georgieva, L., Gadjalova, A., Mihaylova, D., & Pavlov, A. (2015). Achillea millefolium L.-phytochemical profile and in vitro antioxidant activity. *International Food Research Journal*, 22(4), 1347–1352.
- Gevrenova, R., Zengin, G., Sinan, K. I., Yıldıztuğay, E., Zheleva-Dimitrova, D., Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Imran, M., & Dall'Acqua, S. (2021). UHPLC-MS Characterization and Biological Insights of Different Solvent Extracts of Two Achillea Species (*A. aleppica* and *A. santolinoides*) from Turkey. *Antioxidants*, 10(8), 1180.
- Ghosh, R., Alajbegovic, A., & Gomes, A. V. (2015). NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–25.
- Ghous, T., Akhtar, K., Nasim, F.-U.-H., & Choudhry, M. A. (2010). Screening of selected medicinal plants for urease inhibitory activity. *Biology and Medicine*, 2(4), 64–69.
- Giamperi, L., Bucchini, A. E. A., Ricci, D., Papa, F., & Maggi, F. (2018). Essential Oil of *Achillea ligustica* (Asteraceae) as an Antifungal Agent against Phytopathogenic Fungi. *Natural Product Communications*, 13(9), 1171–1174.
- Gilani, A. H., Bashir, S., & Khan, A. (2007). Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 393–399.
- González Mera, I. F., González Falconí, D. E., & Morera Córdova, V. (2019). Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura*, 4(4), 1000–1009. <https://doi.org/10.21931/rb/2019.04.04.11>
- Goossens, H. (2009). Antibiotic consumption and link to resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 12–15.
- Greco, M. V., Franchi, M. L., Rico Golba, S. L., Pardo, A. G., & Pose, G. N. (2014). Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 1–9.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391.
- Gupta, M., & Singh, S. (2010). *Borago officinalis* Linn. an important medicinal plant of Mediterranean region: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 5(1), 27–34.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marin, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893–899.

- Halliwell, B. (1996). Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 38, pp. 3–20). Elsevier.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (Fifth edition). Oxford University Press.
- Harshberger, J. W. (1896). The Purposes of Ethno-Botany. *Botanical Gazette*, 21(3), 146–154.
- Hartl, M., & HUMPF, H.-U. (2000). Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 38(12), 1097–1102.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495–2511.
- Honorat, J. A., Kinoshita, M., Okuno, T., Takata, K., Koda, T., Tada, S., Shirakura, T., Fujimura, H., Mochizuki, H., Sakoda, S., & Nakatsuji, Y. (2013). Xanthine Oxidase Mediates Axonal and Myelin Loss in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *PLoS ONE*, 8(8), e71329.
- Hu, M., & Chen, S. (2021). Non-Target Site Mechanisms of Fungicide Resistance in Crop Pathogens: A Review. *Microorganisms*, 9(3), 502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030502>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Hussien, Z. G. (2018). The effect of alcoholic extract of *Borago officinalis* on monoamine oxidase (mao) and acetylcholinesterase (ache) in human serum in vitro.: the effect of alcoholic extract of *Borage officinalis* on monoamine oxidase (MAO) and acetylcholinesterase (ache) in human serum in vitro. *Iraqi Journal of Market Research and Consumer Protection*, 10(2), 147–153.
- Ibrahim, M. M., El-Sayed, I. M., & Soliman, D. M. (2024). Profiling of phenolic and flavonoid compounds of in vitro *Borago officinalis* l. Plantlets: a promising plant in therapeutic nutrition. *Minia Journal of Agricultural Research and Development*, 44(1), 137–149.
- Ibrahim, R. M., & Alshammaa, D. A. S. (2023). Pharmacological aspects of *Borago officinalis* (Borage): A review article. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683 - 3597 E-ISSN 2521 - 3512)*, 32(1), 1–13.

- Imran, M., Ullah, F., Ayaz, M., Sadiq, A., Shah, M. R., Jan, M. S., & Ullah, F. (2017). Anticholinesterase and antioxidant potentials of *Nonea micrantha* Bioss. & Reut along with GC-MS analysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 499.
- Irato, P., & Santovito, G. (2021). Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants*, *10*(4), 579.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, *7*(1), 1–7.
- Jemia, M. B., Rouis, Z., Maggio, A., Venditti, A., Bruno, M., & Senatore, F. (2013). Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of the Essential Oil of *Achillea ligustica* Growing Wild in Lipari (Aeolian Islands, Sicily). *Natural Product Communications*, *8*(11), 1629–1632.
- Jing, L., Wu, G., Kang, D., Zhou, Z., Song, Y., Liu, X., & Zhan, P. (2019). Contemporary medicinal-chemistry strategies for the discovery of selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Drug Discovery Today*, *24*(2), 629–635.
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., & Čavar Zeljković, S. (2021). Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two *Achillea* Species. *Molecules*, *26*(6), 1601.
- Kaludercic, N., Mialet-Perez, J., Paolocci, N., Parini, A., & Di Lisa, F. (2014). Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *73*, 34–42.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Karimi, A., Noura, R., & Ebrahimi, M. (2017). *Borago officinalis* L. flower: A comprehensive study on bioactive compounds and its health-promoting properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(2), 826–838.
- Kh, A. N., & Siddiqui, N. (2024). An Insight into a therapeutically significant herbal drug, Gul-e-Gaozuban (*Borago officinalis* flower), from the treasures of Unani Medicine. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*, *8*(1), 112–118.
- Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K., & Fazly Bazzaz, B. S. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, *95*, 32–42.
- Khan, H., Marya, Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S. (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *101*, 860–870.
- Khan, K. M., Wadood, A., Ali, M., Zia-Ullah, Ul-Haq, Z., Lodhi, M. A., Khan, M., Perveen, S., & Choudhary, M. I. (2010). Identification of potent urease inhibitors via ligand- and

structure-based virtual screening and in vitro assays. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28(8), 792–798.

Khatri, S., Paramanya, A., & Ali, A. (2019). Phenolic Acids and Their Health-Promoting Activity. In M. Ozturk & K. R. Hakeem (Eds.), *Plant and Human Health, Volume 2* (pp. 661–680). Springer International Publishing.

Kim, K.-T., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27–33.

Koes, R. E., Quattrocchio, F., & Mol, J. N. M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays*, 16(2), 123–132.

Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., & Opletal, L. (2008). Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), 436–447.

Kolthoff, I. M., Leussing, D. L., & Lee, T. S. (1950). Reaction of Ferrous and Ferric Iron with 1,10-Phenanthroline. III. The Ferrous Monophenanthroline Complex and the Colorimetric Determination of Phenanthroline. *Journal of the American Chemical Society*, 72(5), 2173–2177.

Kornberg, A. (1997). Science and medicine at the millennium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 1379–1386.

Koronkiewicz, S. (2021). Photometric Determination of Iron in Pharmaceutical Formulations Using Double-Beam Direct Injection Flow Detector. *Molecules*, 26(15), 4498.

Kumar, R., Gupta, A., Ganguly, R., & Pandey, A. K. (2019). In-vitro Models to Assess Antioxidant Potential. In S. Kumar & C. Egbuna (Eds.), *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update* (pp. 237–250). Springer Singapore.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1).

Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301–311.

Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181–189.

Leite, M. P., Fassin Jr., J., Baziloni, E. M. F., Almeida, R. N., Mattei, R., & Leite, J. R. (2008). Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 661–666.

- Leong, T., Ashokkumar, M., & Sandra, K. (2011). *The fundamentals of power ultrasound-A review. Acoustics Australia*, 39(2), 54–63.
- Leos-Rivas, C., Verde-Star, M. J., Torres, L. O., Oranday-Cardenas, A., Rivas-Morales, C., Barron-Gonzalez, M. P., Morales-Vallarta, M. R., & Cruz-Vega, D. E. (2011). *In vitro* Amoebicidal Activity of Borage (*Borago officinalis*) Extract on *Entamoeba histolytica*. *Journal of Medicinal Food*, 14(7–8), 866–869.
- Lewoyehu, M., & Amare, M. (2019). Comparative evaluation of analytical methods for determining the antioxidant activities of honey: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1685059.
- Lheureux, P., Askenasi, R., & Maes, V. (1996). Du bon usage du laboratoire de toxicologie 2^o partie *: Utilité clinique et interpretation des résultats. *Réanimation Urgences*, 5(3), 341–352.
- Li, A.-N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047.
- Liang, N., & Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9, 477.
- Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018, 1–13.
- Maggi, F., Bramucci, M., Cecchini, C., Coman, M. M., Cresci, A., Cristalli, G., Lupidi, G., Papa, F., Quassinti, L., Sagratini, G., & Vittori, S. (2009). Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, 80(6), 313–319.
- Mahomoodally, M. F. (2013). Traditional Medicines in Africa: An Appraisal of Ten Potent African Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–14.
- Mai, T. T., & Chuyen, N. V. (2007). Anti-Hyperglycemic Activity of an Aqueous Extract from Flower Buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(1), 69–76.
- Makori, S. I., Mu, T.-H., & Sun, H.-N. (2021). Physicochemical properties, antioxidant activities, and binding behavior of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid with beta-lactoglobulin colloidal particles. *Food Chemistry*, 347, 129084.

- Mamidala, R., Bhimathati, S. R. S., & Vema, A. (2021). Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent *Helicobacter pylori* Urease inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, *114*, 105010.
- Manthena, S. S., Polimati, H., Annam, S. S. P., & Hieu, H. V. (2022). Hepatoprotective Properties of Starflowers from an Annual Herb, *Borago officinalis* L. (Boraginaceae): Hepatoprotective profile of Borage. *International Pharmacy Acta*, *5*(1), e7: 1-7.
- Marchev, A., Haas, C., Schulz, S., Georgiev, V., Steingroewer, J., Bley, T., & Pavlov, A. (2014). Sage in vitro cultures: A promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. *Biotechnology Letters*, *36*(2), 211–221.
- Markom, M., Hasan, M., Daud, W., Singh, H., & Jahim, J. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, *52*(3), 487–496.
- Marrelli, M., Loizzo, M. R., Nicoletti, M., Menichini, F., & Conforti, F. (2013). *In vitro* investigation of the potential health benefits of wild Mediterranean dietary plants as anti-obesity agents with α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activities: Anti-Obesity Dietary Plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(11), 2217–2224. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6544>
- Martín, J. F., & Liras, P. (2019). Harnessing microbiota interactions to produce bioactive metabolites: Communication signals and receptor proteins. *Current Opinion in Pharmacology*, *48*, 8–16.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 365–373.
- Masi, M., Di Lecce, R., Mérindol, N., Girard, M.-P., Berthoux, L., Desgagné-Penix, I., Calabrò, V., & Evidente, A. (2022). Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreatium maritimum*. *Toxins*, *14*(4), 262.
- Mechaala, S., Bouatrous, Y., & Adouane, S. (2021). Traditional knowledge and diversity of wild medicinal plants in El Kantara's area (Algerian Sahara gate): An ethnobotany survey. *Acta Ecologica Sinica*, *42*(1), 33–45.
- Meddour, R., Sahar, O., & Ouyessad, M. (2020). Enquête ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc national du Djurdjura et sa zone d'influence, Algérie—Ethnobotanical survey on medicinal plants in the Djurdjura National Park and its influence area, Algeria. *Ethnobotany Research and Applications*, *20*(1–25).

- Medina-Medrano, J. R., Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M. S., Uribe-Soto, J. N., González-Valdez, L. S., & Herrera-Arrieta, Y. (2015). Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Botanical Studies*, 56(1), 24.
- Meletis, C. D., & Wagner, E. (2002). Natural Remedies for Promoting Skin Health. *Alternative and Complementary Therapies*, 8(3), 186–190.
- Meral, G. E., & Karabay, N. U. (2002). In vitro antibacterial activities of three hypericum species from west anatolia. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 6–10.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31–34.
- Miara, M. D., Bendif, H., Ait Hammou, M., & Teixidor-Toneu, I. (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by nomadic peoples in the Algerian steppe. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 248–256.
- Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16, 100262.
- Michalak, M., Zagórska-Dziok, M., Klimek-Szczykutowicz, M., & Szopa, A. (2023). Phenolic Profile and Comparison of the Antioxidant, Anti-Ageing, Anti-Inflammatory, and Protective Activities of *Borago officinalis* Extracts on Skin Cells. *Molecules*, 28(2), 868.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.
- Miraldi, E., & Bains, G. (2019). Medicinal plants and health in human history: from empirical use to modern phytotherapy. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 10(1).
- Mirzaei, M., & Mirzaei, A. (2013). Comparison of the *Artemia salina* and *Artemia urmiana* bioassays for toxicity of 4 Iranian medicinal plants. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(3), 49–54.
- Mitich, L. W. (1990). Yarrow – the Herb of Achilles. *Weed Technology*, 4(2), 451–453.
- Modolo, L. V., De Souza, A. X., Horta, L. P., Araujo, D. P., & De Fátima, Â. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 35–44.

- Mohajer, S., Taha, R. M., Ramli, R. B., & Mohajer, M. (2016). Phytochemical constituents and radical scavenging properties of *Borago officinalis* and *Malva sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, *94*, 673–681.
- Montes-Belmont, R., & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in Maize with Plant Essential Oils and Their Components. *Journal of Food Protection*, *61*(5), 616–619.
- More, P. R., Jambrak, A. R., & Arya, S. S. (2022). Green, environment-friendly and sustainable techniques for extraction of food bioactive compounds and waste valorization. *Trends in Food Science & Technology*, *128*, 296–315.
- Moyo, M., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, *123*(1), 69–76.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, *91*(1–2), 3–20.
- Muhammad Muhammad, S., & Jega, B. G. (2024). A Review on Environmental Impacts and Risks of Beneficial Microorganisms. *Innovative Research in Applied, Biological and Chemical Sciences*, *2*(1), 13–20.
- Mujahid, R., Qasim Hameed, H., & Ali, A. (2017). Antimicrobial activity of *Borago officinalis* leaves extract against *Staphylococcus* Spp. And *Streptococcus pyogenes*. *Diyala Journal For Pure Science*, *13*(1), 62–73.
- Mukhopadhyay, D., Dasgupta, P., Sinha Roy, D., Palchoudhuri, S., Chatterjee, I., Ali, S., & Ghosh Dastidar, S. (2016). A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1,10-Phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*, *6*(1), 124–132.
- Munteanu, I. G., & 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>
- Murad, W., Ahmad, A., Gilani, S. A., & Khan, M. A. (2011). Indigenous knowledge and folk use of medicinal plants by the tribal communities of Hazar Nao Forest, Malakand District, North Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(7), 1072–1086.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., & Cabezas, J. L. (2000). Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3408–3412.
- Muselli, A., Pau, M., Desjobert, J.-M., Foddai, M., Usai, M., & Costa, J. (2009). Volatile Constituents of *Achillea ligustica* All. By HS-SPME/GC/GC-MS. Comparison with Essential

- Oils Obtained by Hydrodistillation from Corsica and Sardinia. *Chromatographia*, 69(5–6), 575–585.
- Najmi, A., Javed, S. A., Al Bratty, M., & Alhazmi, H. A. (2022). Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. *Molecules*, 27(2), 349.
- Nakamura, M., Ra, J.-H., Jee, Y., & Kim, J.-S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 316–326.
- Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., & Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e17129.
- Neagu, E., Paun, G., Albu, C., & Radu, G.-L. (2015). Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 52, 1–6.
- Nile, A., Nile, S. H., Kim, D. H., Keum, Y. S., Seok, P. G., & Sharma, K. (2018). Valorization of onion solid waste and their flavonols for assessment of cytotoxicity, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 281–289.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006.
- Niño, J., Narváez, D. M., Mosquera, O. M., & Correa, Y. M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 566–570.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, 144(2), 453–462.
- Ohikhena, F. U., Wintola, O. A., & Afolayan, A. J. (2016). Toxicity Assessment of Different Solvent Extracts of the Medicinal Plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology*, 12(7), 701–710. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.701.710>
- Oliveri, I. P., & Di Bella, S. (2011). Highly sensitive fluorescent probe for detection of alkaloids. *Tetrahedron*, 67(48), 9446–9449.
- Ouelbani, R., Bensari, S., Mouas, T. N., & Khelifi, D. (2016). Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 196–218.

- Ould El Hadj, M., Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier Du Savoir Scientifique et Technique*, 3(3), 47–51.
- OUOBA, P., OUATTARA, L., BONZI, S., YAMEOGO, J. T., & SOMDA, I. (2018). Evaluation of antifungal activity and phytotoxicity of the essential oil of *Zanthoxylum zanthoxyloides* fruits. *Agricultural Science Research Journal*, 8(4), 92–99.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., & Coflkun, M. (2004). Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some asteraceae species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 203–216.
- Pagès, J.-M. (2017). Transports des antibiotiques et perméabilité membranaire: Nouvelles perspectives afin de combattre la résistance bactérienne. *Biologie Aujourd'hui*, 211(2), 149–154.
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1–15.
- Panou, E., Zengin, G., Milic, N., Ganos, C., Graikou, K., & Chinou, I. (2024). A Comparative UPLC/HRMS Molecular Networking-Enhanced Study on the Phenolic Profiles and Bioactivities of Three Medicinally Significant Species of *Onosma* (Boraginaceae). *Plants*, 13(24), 3468.
- Parekh, S. S., Parmar, G. R., Kanojiya, D., Baile, S. B., Trivedi, R., & Bhatt, F. (2024). Unlocking the Therapeutic Potential of Terpenoids: A Roadmap for Future Medicine. *Pharmacognosy Research*, 16(4), 698–705.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buella, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., & Petschelt, A. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry*, 28(5), 341–345.
- Perazzo, F. F., Carvalho, J. C. T., Rodrigues, M., Morais, E. K. L., & Maciel, M. A. M. (2007). Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous

extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4), 521–528.

Phillips, M., Leon, P., Boronat, A., & Rodriguezconcepcion, M. (2008). The plastidial MEP pathway: Unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, 13(12), 619–623.

Phillips, O., Gentry, A. H., Reynel, C., Wilkin, P., & Galvez-Durand B, C. (1994). Quantitative Ethnobotany and Amazonian Conservation. *Conservation Biology*, 8(1), 225–248.

Pieszak, M., Mikołajczak, P. Ł., & Manikowska, K. (2012). Borage (*Borago officinalis* L.) – a valuable medicinal plant used in herbal medicine. *Herba Polonica*, 58(4).

Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684.

Pope, C. N., Schlenk, D., & Baud, F. J. (2020). History and basic concepts of toxicology. In *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology* (pp. 3–15). Elsevier.

Porras, C., Nodora, J., Sexton, R., Ferreccio, C., Jimenez, S., Dominguez, R. L., Cook, P., Anderson, G., Morgan, D. R., Baker, L. H., Greenberg, E. R., & Herrero, R. (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes & Control*, 24(2), 209–215.

Powers, S. K., Deruisseau, K. C., Quindry, J., & Hamilton, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22(1), 81–94.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

Quezel, P., & Santa, S. (1964). Quezel, P. et Santa, S. —Nouvelle Flore de l'Algérie et de ses régions désertiques méridionales. Tome II. Paris, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, 1963. *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)*, 18(2), 238–238.

Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955–979.

Raeisi, H., Azimirad, M., Asadi-Sanam, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Yadegar, A., & Zali, M. R. (2024). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of *Achillea millefolium* L. extracts on *Clostridioides difficile* ribotype 001 in human intestinal epithelial cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 37.

- Ramandi, N. F., Ghassempour, A., Najafi, N. M., & Ghasemi, E. (2017). Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Borago Officinalis* L. flower by central composite design. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S23–S27.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151–171.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237.
- Reátegui, J. L. P., da Fonseca Machado, A. P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2014). Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, *94*, 223–233.
- Redouan, F. Z., Benítez, G., Picone, R. M., Crisafulli, A., Yebouk, C., Bouhbal, M., Ben Driss, A., Kadiri, M., Molero-Mesa, J., & Merzouki, A. (2020). Traditional medicinal knowledge of Apiaceae at Talassemtane National Park (Northern Morocco). *South African Journal of Botany*, *131*, 118–130.
- Reetz, M. T., & König, G. (2021). *n* -Butanol: An Ecologically and Economically Viable Extraction Solvent for Isolating Polar Products from Aqueous Solutions. *European Journal of Organic Chemistry*, *2021*(46), 6224–6228. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100829>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482–501.
- Río-Celestino, M. D., Font, R., & De Haro-Bailón, A. (2008). Distribution of fatty acids in edible organs and seed fractions of borage (*Borago officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(2), 248–255.
- Ristić, M., Dekić, B., Dekić, V., Stanojević, M., Milošević, S., Aksić, M., Janićević, S., & Janićević. (2023). Phytochemical investigation, acute toxicity, antioxidant and antidiabetic activity of extracts from aerial parts of four wild growing *Achillea* species. *FARMACIA*, *71*(4), 788–797.
- Rodríguez-Magaña, M. P., Cordero-Pérez, P., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., Moreno-Peña, D. P., García-Hernández, D. G., & Leos-Rivas, C. (2019). Hypoglycemic Activity of *Tilia americana* , *Borago officinalis* , *Chenopodium nuttalliae* , and *Piper sanctum* on Wistar Rats. *Journal of Diabetes Research*, *2019*, 1–6.
- Rossato, S. C., Leitão-Filho, H. D. F., & Begossi, A. (1999). Ethnobotany of caitaras of the atlantic forest coast (BRAZIL). *Economic Botany*, *53*, 387–395.

- Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants against Selected Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1252–1256.
- Rudenko, N. N., Vetoshkina, D. V., Marenkova, T. V., & Borisova-Mubarakshina, M. M. (2023). Antioxidants of Non-Enzymatic Nature: Their Function in Higher Plant Cells and the Ways of Boosting Their Biosynthesis. *Antioxidants*, 12(11), 2014.
- Ruwizhi, N., & Aderibigbe, B. A. (2020). Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5712.
- ŞABANOĞLU, S., GÖKBULUT, A., & ALTUN, M. L. (2019). Characterization of phenolic compounds, total phenolic content and antioxidant activity of three Achillea species. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(3), 567–576.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843.
- Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L., & Douira, A. (2010). Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa*, 31, 133–143.
- Sargenti, S. R., & Lanças, F. M. (1998). Influence of the extraction mode and temperature in the supercritical fluid extraction of Tangor murcote (Blanco)×Citrus sinensis (Osbeck). *Journal of Microcolumn Separations*, 10(2), 213–223.
- Sarri, M., Boudjelal, A., Hendel, N., Sarri, D., & Benkhaled, A. (2015). Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 24–30.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. (2010). Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 168–182.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191–1212.
- Seidel, V. (2012). Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. In S. D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation* (Vol. 864, pp. 27–41). Humana Press.

- Senouci, F., Ababou, A., & Chouieb, M. (2019). Ethnobotanical Survey of the Medicinal Plants used in the Southern Mediterranean. Case Study: The Region of Bissa (Northeastern Dahra Mountains, Algeria). *Pharmacognosy Journal*, *11*(4), 647–659.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Carrera, C. A., & Palma, M. (2019). Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. *Food Chemistry*, *288*, 221–227.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(54), 81112–81129.
- Shin, H., Satsu, H., Bae, M.-J., Totsuka, M., & Shimizu, M. (2017). Catechol Groups Enable Reactive Oxygen Species Scavenging-Mediated Suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Nutrients*, *9*(2), 165.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, *115*(4), 1268–1273.
- Si, X.-T., Zhang, M.-L., Shi, Q.-W., & Kiyota, H. (2006). Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*. *Chemistry & Biodiversity*, *3*(11), 1163–1180.
- Siddiqui, T., Khan, M. U., Sharma, V., & Gupta, K. (2024). Terpenoids in essential oils: Chemistry, classification, and potential impact on human health and industry. *Phytomedicine Plus*, *4*(2), 100549.
- Silva, A. C. O. D., & Albuquerque, U. P. D. (2005). Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica*, *19*(1), 17–26.
- Silva, L. M. D., & Silva, F. J. D. (2023). BIOASSAY WITH ARTEMIA SALINA L.: A GATEWAY TO UNDERSTANDING THE TOXICITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS. In *Botânica, Ecologia e Sustentabilidade: Uma perspectiva multidisciplinar* (1st ed., pp. 50–69). Editora Científica Digital.
- Silva, N., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *16*(3), 402–413.
- Singh, A. (2016). *Compendia of World's Medicinal Flora* (1st ed.). CRC Press.

- Singh, P. P., & Saldaña, M. D. A. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44(8), 2452–2458.
- Singh, S., & Singh, R. P. (2008). *In Vitro* Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Reviews International*, 24(4), 392–415.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sofowora, A. (1996). Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2(3), 365–372.
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., & Jacobs, G. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: A proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155(3), 349–361.
- Stojanović, G., Radulović, N., Hashimoto, T., & Palić, R. (2005). In vitro antimicrobial activity of extracts of four Achillea species: The composition of Achillea clavennae L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 185–190.
- Stringlis, I. A., De Jonge, R., & Pieterse, C. M. J. (2019). The Age of Coumarins in Plant–Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*, 60(7), 1405–1419.
- Supruniuk, E., Górski, J., & Chabowski, A. (2023). Endogenous and Exogenous Antioxidants in Skeletal Muscle Fatigue Development during Exercise. *Antioxidants*, 12(2), 501.
- Szwajgier, D. (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(4), 690–694.
- Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226–1233.
- Taha, M., Ullah, H., Al Muqarrabun, L. M. R., Khan, M. N., Rahim, F., Ahmat, N., Javid, M. T., Ali, M., & Khan, K. M. (2018). Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(1), 152–160.
- Taïbi, K., Abderrahim, L. A., Ferhat, K., Betta, S., Taïbi, F., Bouraada, F., & Boussaid, M. (2020). Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(11), 1451–1465.

- Taşkın, D., Taşkın, T., & Rayaman, E. (2018). Phenolic composition and biological properties of *Achillea nobilis* L. subsp. *Neilreichii* (Kerner) Formanek. *Industrial Crops and Products*, *111*, 555–562.
- Thiago, A. D. S. A., Peixoto Sobrinho, T. J. D. S., Aguiar, J. D. S., Ana Carolina, O. D. S., Brito, F. U., Teresinha, G. D. S., Elba, L. C. D. A., & Maria, C. D. S. P. (2015). Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, *9*(9), 310–319.
- Tiwari, R., & Rana, C. S. (2015). *Plant secondary metabolites: A review*. *3*(5).
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, *79*(7), R1231–R1249.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, *103*(3), 816–822.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, *1*(2), 155–170.
- Tripti Jain, T. J., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., & Shukla, S. S. (2009). *Microwave assisted extraction for phytoconstituents-an overview*.
- Trotter, R. T., & Logan, M. H. (2019). Informant consensus: A new approach for identifying potentially effective medicinal plants. In *Plants and indigenous medicine and diet* (pp. 91–112). Routledge.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Coroneo, V., Russo, M. T., Dessì, S., & Cabras, P. (2005). Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antifungal Activities of the Essential Oil of *Achillea ligustica* All. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(26), 10148–10153.
- Tuberoso, C. I. G., Montoro, P., Piacente, S., Corona, G., Deiana, M., Dessì, M. A., Pizza, C., & Cabras, P. (2009). Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *50*(3), 440–448.
- Tyagi, B., Dubey, A., Verma, A. K., & Tiwari, S. (2015). Antibacterial activity of phenolics compounds against pathogenic bacteria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, *35*(1), 04.
- Tzakou, O., Couladis, M., Evmorfia, V., & Loukis, A. (1995). Leaf flavonoids of *Achillea ligustica* and *Achillea holosericea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *23*(5), 569–570.

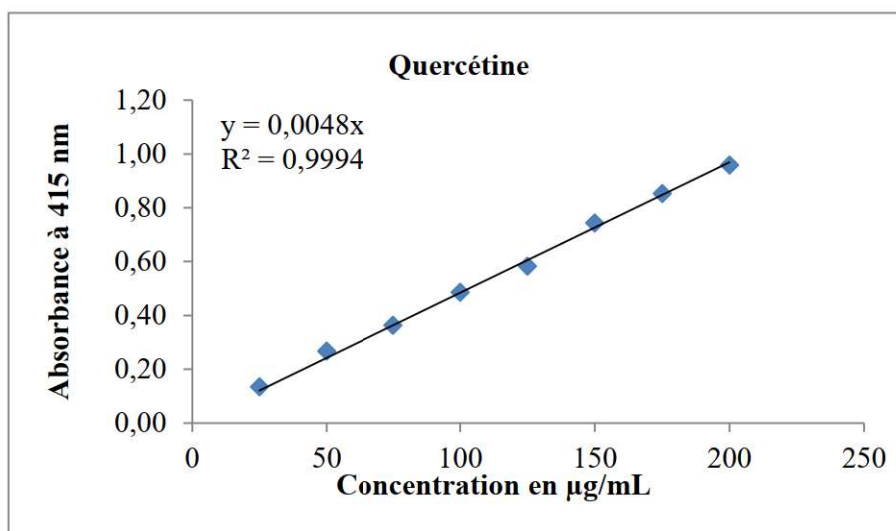
- Uddin, M. Z., & Hassan, Md. A. (2014). Determination of informant consensus factor of ethnomedicinal plants used in Kalenga forest, Bangladesh. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 21(1), 83–91.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371–390.
- Upadhyay, L. S. B. (2012). Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 381–388.
- Varasteh-kojourian, M., Abrishamchi, P., Matin, M. M., Asili, J., Ejtehadi, H., & Khosravitarbar, F. (2017). Antioxidant, cytotoxic and DNA protective properties of *Achillea eriophora* DC. and *Achillea biebersteinii* Afan. Extracts: A comparative study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 7(2), 157–168.
- Varila, T., Romar, H., Luukkonen, T., & Lassi, U. (2019). Physical activation and characterization of tannin-based foams enforced with boric acid and zinc chloride. *AIMS Materials Science*, 6(2), 301–314.
- Venditti, A., Guarcini, L., Bianco, A., Rosselli, S., Bruno, M., & Senatore, F. (2015). Phytochemical analysis of *Achillea ligustica* All. From Lipari Island (Aeolian Islands). *Natural Product Research*, 30(8), 912–919.
- Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International*, 2013, 1–14.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143–148.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, Ijtt. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178.
- Wang, S.-J., Tong, Y., Lu, S., Yang, R., Liao, X., Xu, Y.-F., & Li, X. (2010). Anti-inflammatory Activity of Myricetin Isolated from *Myrica rubra* Sieb. Et Zucc. Leaves. *Planta Medica*, 76(14), 1492–1496.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549.
- Wilson, B. A. (2011). *Bacterial pathogenesis: A molecular approach* (3rd ed). ASM Press.

- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1992). Future Alternatives to Synthetic Fungicides for the Control of Postharvest Diseases. In E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, & R. J. Cook (Eds.), *Biological Control of Plant Diseases* (pp. 133–138). Springer US.
- Witkowska-Banaszczak, E., & Długaszewska, J. (2017). Essential oils and hydrophilic extracts from the leaves and flowers of *Succisa pratensis* Moench. And their biological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *69*(11), 1531–1539.
- Wrolstad, R. E. (2004). Anthocyanin Pigments—Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, *69*(5).
- Wu, S.-J., Chang, S.-P., Lin, D.-L., Wang, S.-S., Hou, F.-F., & Ng, L.-T. (2009). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1132–1138.
- Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., & Liu, L. (2017). Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules*, *22*(11), 1913.
- Yarnell, E., & Abascal, K. (2009). Plant Coumarins: Myths and Realities. *Alternative and Complementary Therapies*, *15*(1), 24–30.
- Yoon, S.-H., & Robyt, J. F. (2003). Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV- α -maltohexaosyl and 4IV- α -maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Research*, *338*(19), 1969–1980.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, *21*(5), 559.
- Yuan, J., Huang, J., Wu, G., Tong, J., Xie, G., Duan, J., & Qin, M. (2015). Multiple responses optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology (RSM) for rapid analysis of bioactive compounds in the flower head of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Industrial Crops and Products*, *74*, 192–199.
- Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 13874.
- Zaki, K., Misaghi, I. J., Heydari, A., & Shatla, M. N. (1998). Control of Cotton Seedling Damping-off in the Field by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Plant Disease*, *82*(3), 291–293.
- Zarn, J. A., Hänggi, E., Kuchen, A., & Schlatter, J. R. (2010). The significance of the subchronic toxicity in the dietary risk assessment of pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *58*(1), 72–78.

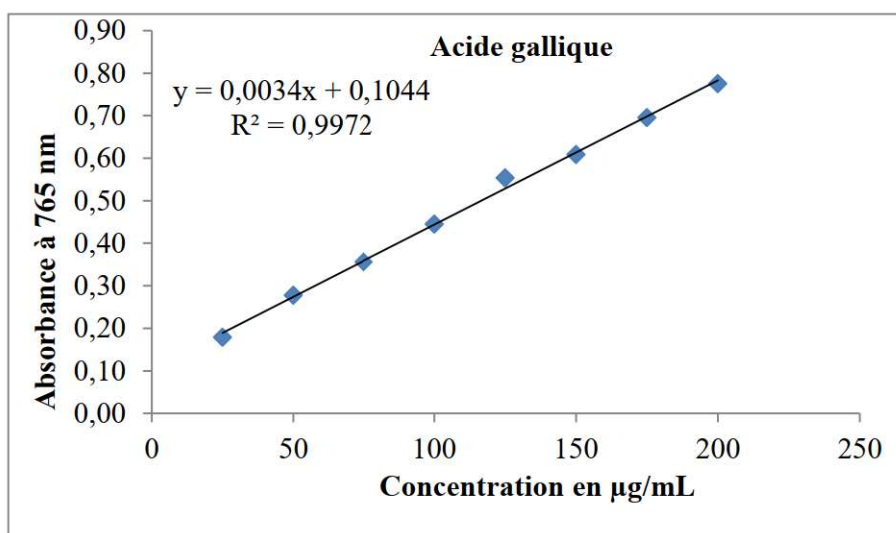
- Zemmouri, H., Ammar, S., Boumendjel, A., Messarah, M., El Feki, A., & Bouaziz, M. (2019). Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 1954–1963.
- Zengin, G., Guler, G. O., Aktumsek, A., Ceylan, R., Picot, C. M. N., & Mahomoodally, M. F. (2015). Enzyme Inhibitory Properties, Antioxidant Activities, and Phytochemical Profile of Three Medicinal Plants from Turkey. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2015*, 1–8.
- Zhang, J., Chen, J., Liang, Z., & Zhao, C. (2014). New Lignans and Their Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, *11*(1), 1–54.
- Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*, *17*(1), 1–14.
- Zong, J., Wang, R., Bao, G., Ling, T., Zhang, L., Zhang, X., & Hou, R. (2015). Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *Camellia oleifera* Abel. Show anti-proliferative activity against tumor cells. *Fitoterapia*, *104*, 7–13.
- Zubairi, S. I., Othman, Z. S., Sarmidi, M. R., & Abdul Aziz, R. (2016). Environmental friendly bio-pesticide rotenone extracted from *Derris* sp.: a review on the extraction method, toxicity and field effectiveness. *Jurnal Teknologi*, *78*(8).

ANNEXES

ANNEXES



Annexe 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine.



Annexe 2. Courbes d'étalonnage de l'acide gallique.

Fiche d'enquêtePlantes médicinales❖ Informations relatives à la personne enquêtée

- Age :
- Sexe : Masculin Féminin
- Situation familiale : Célibataire Marié
- Niveau académique : Néant Primaire Secondaire Universitaire
- Profession :
- Ville /Campagne :

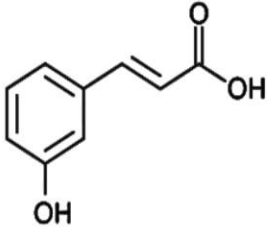
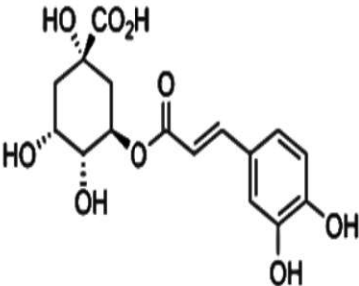
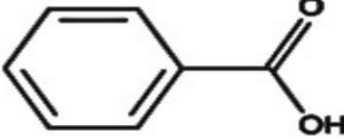
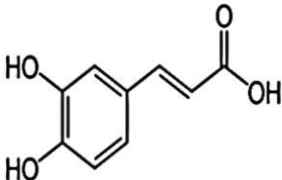
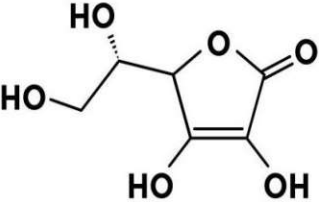
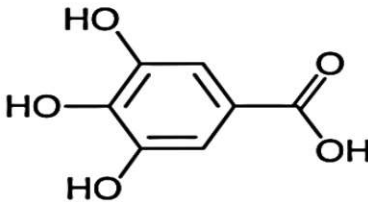
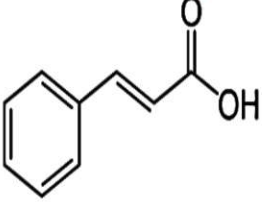
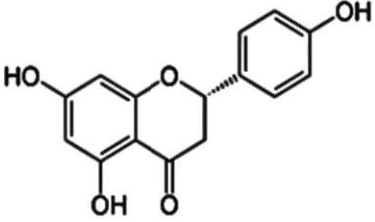
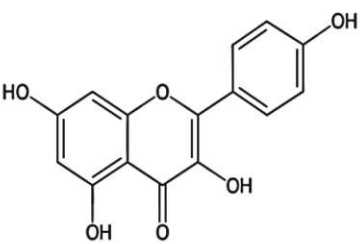
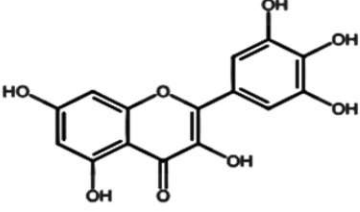
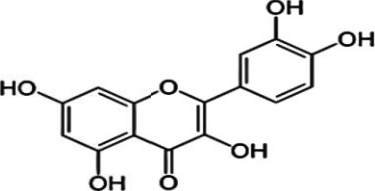
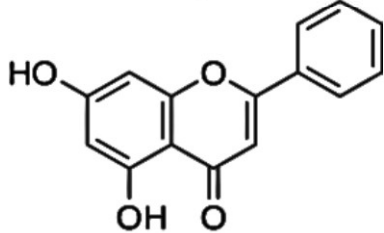
❖ Matériel végétal

- Nom vernaculaire :
- Nom français :
- Nom scientifique :
- Usage de la plante : Plante seule Association possible
- Type de maladie ou des symptômes :
-
- Période de récolte : Eté Automne Hiver Printemps Toute l'année
- Partie utilisée : Tige Fleurs Fruits Graine Ecorce
Rhizome Bulbe Feuilles Plante entière
- Mode d'emploi : Tisane Poudre Huiles essentielles Huiles grasses
Extrait (teinture, solution, gélule)
- Mode de préparation : Infusion Décoction Cataplasme Cru cuit
Autres :
- Dose utilisée : Pincée Poignée Cuillerée
- Dose précise : Quantité en g /verre
- Quantité en g /litre

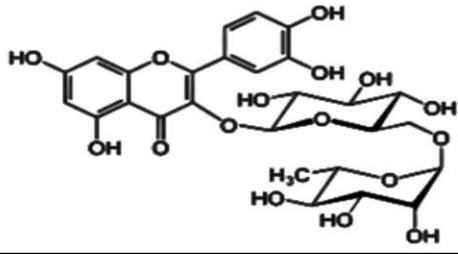
<ul style="list-style-type: none"> • Autres :..... • Mode d'administration : Oral <input type="checkbox"/> Massage <input type="checkbox"/> Rinssage <input type="checkbox"/> Badigeonnage <input type="checkbox"/> Autres <input type="checkbox"/> : • Administration : Avant repas <input type="checkbox"/> Au milieu <input type="checkbox"/> Après repas <input type="checkbox"/> • Posologie : nombre de prise par jour. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Pour les enfants : 1fois/jour <input type="checkbox"/> 2fois/jour <input type="checkbox"/> 3fois/jour <input type="checkbox"/> Autres : <input type="checkbox"/>..... ✓ Pour les personnes âgées : 1fois/jour <input type="checkbox"/> 2fois/jour <input type="checkbox"/> 3fois/jour <input type="checkbox"/> Autres : <input type="checkbox"/>..... ✓ Pour les adultes : 1fois/jour <input type="checkbox"/> 2fois/jour <input type="checkbox"/> 3fois/jour <input type="checkbox"/> Autres : <input type="checkbox"/>..... • Durée d'utilisation : Un jour <input type="checkbox"/> Une semaine <input type="checkbox"/> Un mois <input type="checkbox"/> Jusqu'à la guérison <input type="checkbox"/> • Résultat : Guérison <input type="checkbox"/> Amélioration <input type="checkbox"/> inefficace <input type="checkbox"/> • Effets secondaires : • Précautions d'emploi : <p style="margin-left: 40px;">Date :...../...../.....</p>

Annexe 3. Fiche d'enquête.

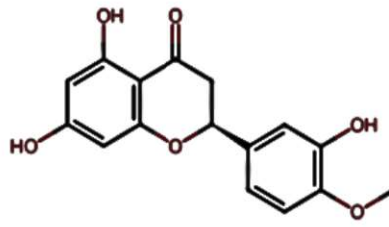
Annexe 4: Profil structural des composés phytochimiques identifiés

<p>Acide coumarique</p> 	<p>Acide chlorogénique</p> 	<p>Acide benzoïque</p> 
<p>Acide caféique</p> 	<p>Acide ascorbique</p> 	<p>Acide gallique</p> 
<p>Acide cinnamique</p> 	<p>Naringénine</p> 	<p>Kaempférol</p> 
<p>Myricétine</p> 	<p>Quercétine</p> 	<p>Chrysin</p> 

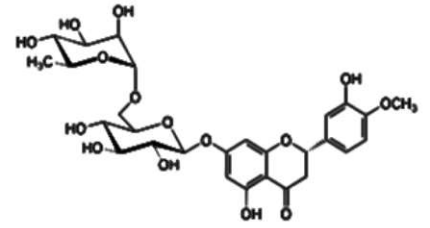
Rutine



Hespérétine



Hespéridine



Travaux scientifiques

Phytochemical characterization of natural leaf extracts from *Achillea ligustica*: HRMS analysis, antioxidant activity, and brine shrimp lethality testing

Horia Menasri¹, Nedjoudja Zaidi^{2*}, Lucia Bartella³, Fabio Mazzotti³, Yahia Khelef⁴, Chawki Bensouici⁵, and Imen Laib²

¹Laboratory of Interactions, Biodiversity, Ecosystems and Biotechnology, Faculty of Sciences, University 20 August 1955 Skikda, Skikda 21000, Algeria

²Laboratory of the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas, Faculty of Sciences, University 20 August 1955, Skikda-21000, Algeria

³Laboratory TRANSMED & AGRIFOOD, Department of Chemistry and Chemical Technology, University of Calabria, Italy

⁴Laboratory of Biology, Environment and Health (LBEH), Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of El Oued, Algeria

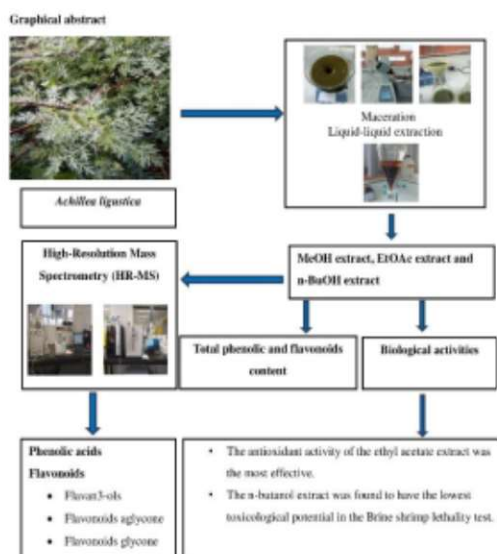
⁵Laboratory of Biochemistry, Biotechnology and Health Division, Center for Research in Biotechnology, Constantine 25000, Algeria

Received: 24/12/2024, Accepted: 12/03/2025, Available online: 18/03/2025

*to whom all correspondence should be addressed: e-mail: n.zaidi@univ-skikda.dz / znedjoudja@yahoo.fr

<https://doi.org/10.30955/gni.07182>

Graphical abstract



Abstract

This research aims to enhance the composition of phenolic compounds, the antioxidant and cytotoxic activities of the methanol, ethyl acetate, and n-butanol extracts produced from the leaves of *Achillea ligustica*, collected in the northeast of Algeria. The measure of extracts' total phenolic and flavonoid contents was performed by the aluminum nitrate and Folin-Ciocalteu colorimetric techniques, respectively. The chemical composition was detected using the Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry

method. Moreover, the antioxidant activity was investigated by four methods (DPPH, ABTS, FRAP, and Phenanthroline method), while the cytotoxic effect was evaluated on the phenolic compounds extracted from *Achillea ligustica* using the brine shrimp lethality test. The obtained data showed that both the highest phenolic ($334.29 \pm 1.06 \mu\text{g GAE/mg extract}$) and the highest flavonoid ($92.85 \pm 0.15 \mu\text{g QE/mg extract}$) contents were identified in the methanolic extract. Also, large spectrum of phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins was detected. Besides, in all realized tests highest antioxidant activity was detected in the ethyl acetate extract, while the lowest toxicological potential ($\text{LC}_{50} = 502.73 \mu\text{g/mL}$) was demonstrated in the n-butanol extract. Finally, the methanolic extract induced the highest mortality rate in *Artemia salina* larvae, reaching 65% at $400 \mu\text{g/mL}$. The findings of our research revealed that the leaves of *Achillea ligustica* represent a noteworthy medicinal plant species that merits additional investigation.

Keywords: *Achillea ligustica*, antioxidant activity, LC-HRMS analyses, brine shrimp, phenolic compounds

1. Introduction

The therapeutic properties of botanical species have been recognized by humans since ancient times. These traditional knowledges were gradually abandoned due to the emergence of modern medicine and the perceptions of inefficacy. However, numerous studies demonstrating the efficacy and reliability of plant-based preparations have reversed this trend. Phenolic compounds, a large and diverse class of natural substances with over 50,000 identified representatives (Tacias-Pascacio *et al.* 2022), are particularly noteworthy. They are associated with preventing, treating, or alleviating the symptoms of

diseases, offering a more accessible and cost-effective alternative to chemically synthesized products, which are often more expensive due to technological patents (Kumar and Goel. 2019). The toxicological and pharmacological properties of medicinal plants have garnered the attention of scientists seeking to verify their therapeutic potential, isolate active constituents, and investigate possible toxicities (Naeeri and Shirzad. 2013).

The *Achillea* genus consists of more than 150 species that are distributed throughout North Africa, Europe, Asia and North America (Orhan. 2019). In traditional medicine, many ailments, including as gastrointestinal disorders, stomach and duodenal ulcers, anemia, sensitive skin, and as an anthelmintic, have been treated using *Achillea* species (Cecchini *et al.* 2012; Conforti *et al.* 2005; Muselli *et al.* 2009). Moreover, several recent studies indicate that the *Achillea* genus has a great number of beneficial characteristics, such as hemostatic, hypoglycemic, wound-healing, anti-inflammatory, antioxidant, antispasmodic, anti-allergic, and bactericidal activities. These therapeutic applications are attributed to biologically active compounds isolated and identified by various researchers (Tuberoso *et al.* 2009; Saeidnia *et al.* 2011; Barda *et al.* 2021).

The current research aimed to investigate the chemical composition of polyphenols of the extracts of the Algerian medicinal plant *Achillea ligustica* (Asteraceae), traditionally known for its therapeutic properties using LC-HRMS analyses. Moreover, the properties of these extracts such as the antioxidant activity using DPPH, ABTS, phenanthroline, and FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assays and the cytotoxic activity, using the brine shrimp lethality bioassay, were performed.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Achillea ligustica (Asteraceae) were sampled from the Mila region, located in the northeast of Algeria (36°30'14.51" N, 6°24'45.41" E, at an altitude of 315 m). A representative plant sample was identified by Prof. Sakhraoui Nora (University of 20 August 1955-Skikda). The leaves of *Achillea ligustica* were air-dried at room temperature for one month under natural ventilation and then ground with an electric mill (Sayona SZJ-R14 (350W, 50g).

2.2. Preparation of extracts of different polarities

After drying and grinding the plant material, 100 g of the powder was subjected to exhaustive maceration with 1L of 70% methanol (MeOH/H₂O: 70/30) at room temperature (25°C) under magnetic agitation for 24 hours, repeated for three consecutive days with daily solvent replacement. To remove the methanol, the extract was subjected to a filtration and concentration under reduced pressure at 40°C, then to a liquid-liquid extraction with a series of solvents of progressively increasing polarity. Finally, in order to remove the solvent, each fraction obtained was concentrated at 40°C and then conserved at 4 °C.

2.3. Total phenolic (TPC) and total flavonoid (TFC) content

The TPC was realized using the protocol of Singleton *et al.* 1999 as Müller *et al.* (2010) describe. In a 96-well plate, the following mixture was prepared: 20 µL of extract (diluted to 1 mg/mL in methanol), 75 µL of 7.5% (w/v) Na₂CO₃ solution and 100 µL of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. Methanol was utilized as the blank instead of the extract. After adding all reagents, an incubation of the plate was released for 2 hours in the dark. Total Phenolic Content was calculated and expressed as µg GAE/mg after measurement of absorbance using a 96-well microplate reader at 765 nm.

The determination of TFC was realized following the protocol developed by Topçu *et al.* (2007) and adapted for microplate analysis. For this 50 µL of sample, 130 µL of methanol, 10 µL of potassium acetate and 10 µL of aluminum nitrate (10%) were mixed in a 96-well ELISA plate. For the blank, methanol (150 µL) was added to replace the extract. A calibration curve was created using different concentrations of quercetin (from 25 to 200 µg/ml). Absorbance readings were taken at 415 nm in microplate reader (Perkin Elmer, Enspire) and TFC was calculated and expressed as µg QE/mg.

2.4. Phytochemical identification by HRMS analysis

Before the analysis, all extracts were subjected to filtration by using a 0.45 µm filter. An Exploris 120 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) with an electrospray source and an Orbitrap analyzer was used for molecular identification. A reversed-phase C18 column with a flow rate of 1 mL/min and a runtime of 28 minutes was used for chromatographic separation. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and methanol (solvent B).

The mass spectrometer was coupled with a Vanquish HPLC system and autosampler (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA). The MS analyses were performed both in negative and positive ionization mode (3500 V and -4000) V. The working condition were the following: spray voltage 3500 V (positive polarity) and 4000 V (negative polarity), sheath gas 20 a. u., aux gas 8 a. u., sweep gas 1 a. u., ion transfer tube temperature 300°C, and vaporizer temperature 290°C. Full scan data were acquired in the mass range 100 - 1000 m/z, the RF lens was set to 70% of the maximum value and the orbitrap resolution was set at 60000. The MS/MS experiments were carried out in untargeted mode, subjected to MS fragmentation the ions with an intensity threshold of 2.1e5.

2.5. In vitro antioxidant assays

Four methods (DPPH, ABTS, phenanthroline, and ferric ion reducing power (FRAP) assays) were employed to offer a comprehensive evaluation of the extracts' antioxidant activity.

2.5.1. DPPH Radical scavenging test

The free radical scavenging activity was determined according to Blois (1958). The reaction involves the reduction of the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) by antioxidants through proton donation,

leading to a decrease in absorbance at 517 nm due to the decolorization and disappearance of the violet color (Conforti *et al.* 2005). The methanolic solution of DPPH (0.15 mM) was prepared. For each test, 40 μ L of the extracts (MeOH, EtOAc or n-BuOH) at different concentrations (0,0078-0,5 mg/mL) was mixed with 160 μ L of the DPPH solution. In parallel, the negative control was prepared by replacing the sample with methanol. The plates were incubated for 30 min at room temperature in the dark to determine the antioxidant activity (AA%), using the following equation:

$$AA (\%) = [(A\text{-control} - A\text{-sample}) / A\text{-control}] \times 100$$

Where

A-control: the absorbance of negative control.

A-sample: the absorbance of tested sample.

The IC₅₀ values, indicating the concentration needed to inhibit 50% of DPPH radicals, were determined from the linear regression of the DPPH inhibition percentage versus sample concentration. Moreover, to evaluate antioxidant effectiveness, the IC₅₀ values of the plant extracts were compared with those of the synthetic standard butylated hydroxyanisole (BHA).

2.5.2. Antioxidant activity against the ABTS radical

The antioxidant potential against the ABTS radical was investigated following the protocol described by Re *et al.* (1999). The ABTS⁺ solution was prepared by mixing 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate in water, followed by a reaction in the dark for 12 to 16 hours. The solution was then diluted with ethanol (EtOH) to achieve an absorbance of 0.700 at 734 nm. For the experiment, 40

μ L of sample prepared at different concentrations (0,0078-0,5 mg/mL) was added to 160 μ L of the ABTS⁺ radical solution. A negative control was prepared using the same procedure, replacing the samples with methanol. After incubation at room temperature for 10 minutes, the absorbance was determined at 734 nm. The percentage of ABTS⁺ radical inhibition was determined as follow:

$$\% \text{Radical scavenging effect} = [(A\text{-control} - A\text{-sample}) / A\text{-control}] \times 100$$

Where:

A-control: the absorbance of negative control.

A-sample: the absorbance of tested sample

Synthetic standards, such as BHA (butylated hydroxyanisole) and BHT (butylated hydroxytoluene), were used to compare the inhibitory percentages and the concentration required to inhibit 50% of the ABTS⁺ radical (IC₅₀ values) was measured from the graph of ABTS inhibition versus sample concentration.

2.5.3. Phenanthroline activity

The phenanthroline activity was measured in the present study using the Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008) methodology. In a 96-well microplate, the extract (10 μ L) at different concentrations (0.0625–4 mg/mL) was blended with FeCl₃ (50 μ L, 0.2%), phenanthroline (30 μ L, 0.5%) and MeOH (110 μ L). The absorbance was taken at 510 nm after conservation of plate in the dark for 20 minutes at 30°C to enable the reaction to finish. The data were expressed as A_{0.5} μ g/mL.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents in different extracts of *Achillea ligustica* (m \pm SD; n=3). Values followed by different superscripts in the same column show a significant difference (Tukey's test, p \leq 0.05)

Extract	Total phenolic compounds content (μ g GAE/mg Ext)	Flavonoids content (μ g QE/mg Ext)
MeOH extract	334.29 \pm 1.06 ^c	92.85 \pm 0.15 ^c
EtOAc extract	127.03 \pm 2.71 ^a	54.38 \pm 0.29 ^b
n-BuOH extract	151.25 \pm 2.39 ^b	27.85 \pm 0.29 ^a

2.5.4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP test, realized to evaluate the extracts' reducing power, was adapted from the protocol of Oyaizu. (1986). A mixture of 10 μ L aliquot of standard or each sample at different concentrations, 50 μ L of potassium ferricyanide (1%) and 40 μ L of phosphate buffer (pH 6.6) was stored at 50°C for 20 minutes. Following the incubation, 10 μ L of ferric chloride (0.1%) and 40 μ L of distilled water were blended to the wells. The measurement of absorbance was taken at 700 nm and the data were expressed as A_{0.5} μ g/mL and compared to the antioxidant standards α -tocopherol and ascorbic acid.

2.6. Brine shrimp lethality test

The lethality test using brine shrimp was realized following the methodology of Meyer *et al.* (1982). *Artemia salina* cysts (10 mg) were hatched in saline solution (3.8%) at 25–28°C under fluorescent lighting for 48 hours. After hatching, 100 μ L of a solution containing 10 *A. salina*

larvae, 80 μ L of seawater, and 20 μ L of each extract or positive control (potassium dichromate, 0.1%) were added in triplicate to the wells of a 96-well plate. Extracts were tested at various concentrations prepared from a stock solution (4 mg/mL). Plates were incubated for 24 hours under fluorescent lighting. After incubation, the percentage mortality at each dose was calculated after counting the number of surviving larvae and the mortality was expressed as lethal concentration (LC₅₀) (Concentration required to kill 50% of larvae) using Probit analysis in IBM SPSS Statistics version 25. Substances with LC₅₀ values below 1000 μ g/mL were considered toxic.

2.7. Statistical analysis

Results of this research were treated using the version 25 of IBM SPSS Statistics. All results were shown as the mean \pm SD and at p < 0.05 the differences were considered statistically significant. Many tests were used such as the Kolmogorov-Smirnov test to check the normality of data and Levene's to analyze the homogeneity of variances.

Also, the ANOVA and Tukey's test were used to compare the experimental groups, and the Probit analysis to calculate the lethal concentrations.

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic and flavonoid content

Based on the absorbance results (Table 1) obtained using the Folin-Ciocalteu reagent, the phenolic content of methanolic extract exhibited a higher concentration ($334.29 \pm 1.06 \mu\text{g GAE/mg Ext}$) compared to the ethyl

acetate ($127.03 \pm 2.71 \mu\text{g GAE/mg Ext}$) and n-butanol ($151.25 \pm 2.39 \mu\text{g GAE/mg Ext}$) extracts. Similarly, the flavonoid concentrations in the crude extracts were also determined, as shown in Table 1, indicating highest flavonoid content ($92.85 \pm 0.15 \mu\text{g QE/mg Ext}$) in methanolic extract, followed by the ethyl acetate ($54.38 \pm 0.29 \mu\text{g QE/mg Ext}$) and the n-butanol extracts ($27.85 \pm 0.29 \mu\text{g QE/mg Ext}$).

Table 2. Polyphenols detected and identified in different extracts of *Achillea ligustica*

Compounds	Molecular Formula	Mass [M- H] ⁻	Mode of Ionization	MeOH extract	EtOAc extract	n-BuOH extract
1/ Phenolic acids						
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	[M-H] ⁻	d	d	d
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	137.0244	[M-H] ⁻	d	d	d
Caffeic acid	C ₉ H ₇ O ₄	179.0346	[M-H] ⁻	d	d	d
Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	147.0451	[M-H] ⁻	d	nd	nd
p coumaric acid	C ₉ H ₇ O ₃	163.0404	[M-H] ⁻	d	d	d
Ferulic acid	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.0508	[M-H] ⁻	d	d	d
Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.0772	[M-H] ⁻	d	nd	nd
5-p- coumaroyl-hexoside	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	325.0924	[M-H] ⁻	d	d	d
3-caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	353.0846	[M-H] ⁻	nd	d	d
5-p-coumaroylquinic acid	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	337.0942	[M-H] ⁻	d	d	d
2/ Anthocyanins						
Cyanidin-3-O-galactoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	483.8268	[M-H] ⁻	d	d	nd
3/ Flavonoids						
Flavonols						
Quercetin 3-O-pentosyl hexoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.1308	[M-H] ⁻	d	d	d
Quercetin 3-O-(6"-Malonyl-hexoside	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	549.0884	[M-H] ⁻	d	nd	nd
Isorhamnetin-3-O glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1047	[M-H] ⁻	d	d	d
Flavan3-ols						
Catechin 3-O-hexoside	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	451.1256	[M-H] ⁻	d	d	nd
Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0702	[M-H] ⁻	d	d	d
Flavonoids aglycone						
Quercetin aglycone	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.0356	[M-H] ⁻	d	d	nd
Luteolin aglycone	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.2289	[M-H] ⁻	d	nd	nd
Apigenin	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.2295	[M-H] ⁻	d	d	d
kaempferol	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0405	[M-H] ⁻	d	nd	d
Flavonoids glycone						
Isoquercetine glucose	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	[M-H] ⁻	nd	d	d
Rutine glucoside	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1461	[M-H] ⁻	d	d	d
Rutindiglucose	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1461	[M-H] ⁻	d	d	d
Apigetrin	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0984	[M-H] ⁻	d	d	d
Puerarin	C ₂₁ H ₁₉ O ₉	415.1035	[M-H] ⁻	d	nd	nd
Apigenin 6,8 diglucoside	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1512	[M-H] ⁻	d	nd	nd
Kaempferol 3,7,4 triglucoside	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	771.1978	[M-H] ⁻	d	nd	nd
Luteolin-7-O glucoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0933	[M-H] ⁻	d	nd	d
Luteolin-7- Rutinoside	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1501	[M-H] ⁻	d	d	d
Apigenin -7-Oglucoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0984	[M-H] ⁻	d	d	d
Phloridzin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435.1297	[M-H] ⁻	nd	nd	d

d= detected, nd= not detected

3.2. Phytochemical Identification

The qualitative phytochemical analysis of *Achillea ligustica* using High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) confirmed the existence of several bioactive compounds, confirmed by their characteristic masses and ionization patterns. Thirty-one (31) polyphenolic compounds were found in the different extracts (methanol, ethyl acetate, and n-butanol). The resulting compounds owned to three groups: phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins. Table 2 provides a detailed list of the identified compounds.

3.2.1. Phenolic acids

The pharmacological effects of phenolics acids including antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties are well documented (Khatri *et al.* 2019), making plants a valuable resource for medicinal applications. In current study, ten (10) phenolic acids; Chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, 5-*p*-coumaroyl hexoside, ferulic acid and 5-*p*-coumaroylquinic acid were detected in our extracts. These compounds enhance the plant's antioxidant capacity, which could help protect the body from oxidative stress and chronic diseases. Among them, chlorogenic acid and caffeic acid are particularly well-known for their antimicrobial (Espindola *et al.* 2019), antioxidant and anti-inflammatory properties (Gu *et al.* 2023). Indeed, Rosmarinic acid and cinnamic acid, identified in the methanolic extract, exhibit antibacterial and antioxidant characteristics (Kernou *et al.* 2023) and contribute to the prevention of oncological diseases (Ruwizhi and Aderibigbe. 2020). Besides, 3-caffeoylquinic acid, present in both extracts (ethyl acetate and n-butanol extracts) and benzoic acid, found in the methanolic and ethyl acetate extracts are recognized for their antioxidant (Makori *et al.* 2021) and antifungal activities (Berne *et al.* 2015).

3.2.2. Flavonoids

Flavonoids and their glycosides are commonly associated with the antioxidant, antidiabetic, anticancer, and anti-inflammatory effects of medicinal plants (Panche *et al.* 2016). The studied medicinal plant exhibits a significant diversity of flavonoids, with twenty (20) compounds identified, including derivatives of flavonols such as isorhamnetin-3-*O*-glucoside, widely distributed in all extracts, which serves as an anti-inflammatory and antimicrobial agent (Gong *et al.* 2020). Quercetin-3-*O*-(6''-malonyl-hexoside) and quercetin-3-*O*-pentosyl hexoside, highly biologically active compounds (BAC), are identified in the methanolic extract and knowing for their essential roles in antioxidant and anti-inflammatory activities (Lesjak *et al.* 2018). Additionally, catechin and catechin-3-*O*-hexoside, belonging to flavan-3-ol derivatives, possess significant antioxidant activity, which can be useful in protecting the body against oxidative stress and chronic diseases (Coşarcă *et al.* 2019).

In terms of composition, methanol and ethyl acetate extracts from *Achillea ligustica* contain flavonoid aglycones such as quercetin, luteolin, apigenin, and kaempferol, which are also detected in the n-butanol

extract, along with their glycosides. These compounds are known for their significant implications in inflammation, heart disease, and cancer (Middleton *et al.* 2000). This group includes notable glycosides such as rutin derivatives (rutin glucoside and rutin diglucose), identified in all extracts and isoquercetin glucose, a strong antioxidant detected in ethyl acetate and n-butanol extracts. The cited compounds contribute to the plant's antidiabetic, anti-Alzheimer, and antimicrobial potential (Ganeshpurkar and Saluja. 2017).

The Apigenin derivatives (apigetrin, apigenin-7-*O*-glucoside, found in all extracts, and apigenin-6,8-diglucoside, identified in the methanol extract) are biologically active substances that showed antioxidant, anti-tumor, anti-inflammatory, cardioprotective, neuroprotective properties (Li *et al.* 2023). Kaempferol derivatives (kaempferol 3,7,4-triglucoside, found in the methanol extract) have gained recognition for their properties as an antioxidant, anti-inflammatory, bacteriostatic and neuroprotective (Parveen *et al.* 2023). Additionally, luteolin derivatives (luteolin-7-*O*-glucoside, detected in methanol and n-butanol extracts, and luteolin-7-rutinoside, found in all extracts) display numerous pharmacological properties, including antioxidant and antimicrobial activities (Lopez-Lazaro. 2009). Puerarin, detected in the methanol extract, is a powerful antioxidant capable of effectively removing toxins from the body, with notable antimicrobial and neuroprotective properties (Liu *et al.* 2023). Phloridzin, observed in the n-butanol extract, contributes significantly to the plant's high antioxidant potential. By reducing inflammation and oxidative damage, phloridzin plays a crucial role in the therapy of many illnesses, including cardiovascular and cancer disease (Khanam *et al.* 2022). Only one anthocyanin derivative (cyanidin-3-*O*-galactoside) was identified, exclusively in methanol and ethyl acetate extracts. This critical bioactive component is well-recognized for its antioxidant, cardioprotective (Kong *et al.* 2003), anti-inflammatory (Cui *et al.* 2021) and anti-thrombotic properties (Rechner and Kroner. 2005).

This study confirms that the bioactive compounds composition is induced by the extraction solvents. Methanol appears to be the most effective solvent, detecting 28 out of 31 compounds, suggesting its higher extraction potential. However, ethyl acetate and n-butanol extracts, both detecting 11 compounds, exhibit lower extraction efficiency, likely caused by variations in solvent polarity and the solubility of specific polyphenols in each solvent.

The obtained results are consistent with the literature, where several studies have employed modern chromatographic and spectroscopic techniques, to identify phenolic compounds in different *Achillea* species extracts. Agar *et al.* (2015) discovered many phenolic components in the methanol extracts of *Achillea coarctata*, *Achillea kotschyi*, and *Achillea lycaonica*, highlighting the phenolic richness of *Achillea spinulifolia* and *Achillea gonioccephala* and identifying compounds including quinic acid, chlorogenic acid, rosmarinic acid,

rutin, quercetin, luteolin, and apigenin. On the other hand, Dias *et al.* (2013) studied the methanolic extract of *Achillea millefolium* and found components belonging to two classes of natural compounds: phenolic acids (including derivatives of caffeoylquinic acid and dicaffeoylquinic acid) and flavonoids (including derivatives of apigenin, quercetin, luteolin, kaempferol, and isorhamnetin). Regarding previous studies on *Achillea ligustica*, Boubertakh *et al.* (2024) identified many substances including chlorogenic acid, luteolin, quercetin, apigenin, and rosmarinic acid in the hydroethanol extract. Additionally, Tzakou *et al.* (1995) identified apigenin, luteolin, and santin in methanolic and aqueous extracts. These outcomes are consistent with those of Tuberoso *et al.* (2009), who discovered many flavonoids, including quercetin, luteolin, and 6-hydroxykaempferol, in ethanolic extracts. These findings were further supported by the research of Venditti *et al.* (2015) on methanolic extracts, identifying various compounds, including luteolin, 7-O-methyl apigenin, caffeic acid, chlorogenic acid, apigenin-7-O-glucuronide, and quercetin-3-O-glucuronide. These results highlight the potential of *Achillea* species, including

Achillea ligustica, as a source of various bioactive substances with significant therapeutic characteristics.

3.3. Antioxidant activity

Table 3 illustrates the findings of antioxidant activity of the three extracts of *Achillea ligustica* compared to the standards.

3.3.1. DPPH assay

From the data reported in this work, increased antioxidant activity is indicated by a lower IC₅₀. Consequently, the ethyl acetate extract's antioxidant potential (IC₅₀ = 4.18 ± 0.06 µg/mL), obtained by the DPPH radical method, is higher than that of the n-butanol extract (IC₅₀ = 9.14 ± 0.11 µg/mL) and the commercial antioxidant BHA (IC₅₀ = 5.73 ± 0.41 µg/mL). These expected data can be explained by the higher content of flavonoids in the ethyl acetate extract (54.38 ± 0.29 µg QE/mg Ext), which is significantly lower in the n-butanol extract (27.85 ± 0.29 µg QE/mg Ext). The methanolic extract showed lower antioxidant activity (IC₅₀ = 21.14 ± 0.93 µg/mL) while presenting good flavonoid content (92.85 ± 0.15 µg QE/mg Ext).

Table 3. Antioxidant activity of various extracts of *Achillea ligustica* (m ± SD; n = 3). Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically by Tukey's test

Extracts and standards	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)	Phenanthroline A _{0.5} (µg/mL)	Reducing power A _{0.5} (µg/mL)
MeOH extract	21.14 ± 0.93 ^d	30.21 ± 2.70 ^c	4.60 ± 0.53 ^c	29.53 ± 0.13 ^c
EtOAc extract	4.18 ± 0.06 ^a	4.06 ± 0.04 ^{a,b}	3.93 ± 0.78 ^c	7.96 ± 0.92 ^a
n-BuOH extract	9.14 ± 0.11 ^c	6.96 ± 0.28 ^b	11.04 ± 0.20 ^d	10.20 ± 0.43 ^b
BHA	5.73 ± 0.41 ^b	1.03 ± 0.00 ^a	0.93 ± 0.07 ^a	NT
BHT	NT	1.59 ± 0.03 ^a	2.24 ± 0.17 ^b	NT
α-Tocopherol	NT	NT	NT	34.93 ± 2.38 ^d
Ascorbic acid	NT	NT	NT	6.77 ± 1.15 ^a

NT: not tested, BHA: Butylatedhydroxyanisole, BHT: Butylatedhydroxytoluene

3.3.2. ABTS assay

In relation to the ABTS radical, the both extracts ethyl acetate and n-butanol demonstrated the highest antioxidant activity (IC₅₀ = 4.06 ± 0.04 µg/mL and IC₅₀ = 6.96 ± 0.28 µg/mL, respectively), which is close to the antioxidant activity of the standards BHA (IC₅₀ = 1.03 ± 0.00 µg/mL) and BHT (IC₅₀ = 1.59 ± 0.03 µg/mL). This is possibly due to the capacity of these extracts to stabilize themselves by donating electrons or hydrogen to the ABTS radical. The methanolic extract showed lower antioxidant activity (IC₅₀ = 30.21 ± 2.70 µg/mL).

3.3.3. Phenanthroline assay

The results indicated significant antioxidant activity of ethyl acetate extract and the methanolic extract with A_{0.5} = 3.93 ± 0.78 µg/mL and A_{0.5} = 4.60 ± 0.53 µg/mL, respectively, close to the antioxidant activity of BHT (A_{0.5} = 2.24 ± 0.17 µg/mL) and BHA (A_{0.5} = 0.93 ± 0.07 µg/mL). While, the n-butanol extract showed lower antioxidant activity (A_{0.5} = 11.04 ± 0.20 µg/mL).

3.3.4. Reducing power assay

Using the reducing power assay method, the extracts' antioxidant capacity was statistically comparable to that

of α-tocopherol and ascorbic acid. However, the reducing capacity of all extracts was significantly different. In the FRAP assay, the ethyl acetate extract yielded the best values. The data indicated that the antioxidant potential of all extracts was found to be significantly higher than that of the reference α-tocopherol (A_{0.5} = 34.93 ± 2.38 µg/mL), with the values; methanol (A_{0.5} = 29.53 ± 0.13 µg/mL), ethyl acetate (A_{0.5} = 7.96 ± 0.92 µg/mL), and n-butanol (A_{0.5} = 10.20 ± 0.43 µg/mL). Moreover, the antioxidant activity (A_{0.5} = 7.96 ± 0.92 µg/mL) of the ethyl acetate extract being close to the inhibition capacity of the standard ascorbic acid (A_{0.5} = 6.77 ± 1.15 µg/mL).

The wide variety of phenolic acids (such as caffeic acid, ferulic acid and chlorogenic acid) and flavonoids (including quercetin derivatives and rutin glycosides) identified in *Achillea ligustica* confirms its potential as a therapeutic agents and a promising source of antioxidants. Indeed, the same phenolic compounds can exhibit different antioxidant effects depending on their concentration in the extracts studied (Shi *et al.* 2022), this can explain the differences in antioxidant activity in the different assays and extracts. Additionally, phenolic compounds display varying degrees of antioxidant activity depending on the

assay used (e.g., DPPH, ABTS, FRAP, phenanthroline, and others) (Tabart *et al.* 2009). Numerous *in vitro* studies demonstrate that phenolic compounds obtained from *Achillea* species act as non-enzymatic antioxidants, serving as excellent free radical scavengers. Conforti *et al.* (2005) observed that methanolic extracts obtained from *Achillea ligustica* using the DPPH assay had strong antioxidant activity (IC_{50} of 50 $\mu\text{g/mL}$), highlighting the plant's significant antioxidant properties. Similarly, several studies have used the DPPH reducing assay to investigate the antioxidant activity of other *Achillea* species. For instance, Varasteh-Kojourian *et al.* (2017) found that *Achillea biebersteinii* exhibited stronger antioxidant activity ($IC_{50} = 0.276 \pm 0.003 \text{ mg/mL}$) compared to *Achillea eriophora* ($IC_{50} = 0.703 \pm 0.023 \text{ mg/mL}$), though both were less effective than ascorbic acid.

To evaluate the capacity of *Achillea* species to scavenge ABTS radicals, Gevrenova *et al.* (2021) studied *Achillea aleppica* and *Achillea santolinoides* and found that methanolic extracts exhibited significantly stronger ABTS radical scavenging activity compared to ethyl acetate extracts. Specifically, the methanol extracts of *A. aleppica* and *A. santolinoides* showed values of $88.93 \pm 0.79 \text{ mg TE/g}$ and $42.06 \pm 0.40 \text{ mg TE/g}$ respectively, demonstrating methanol's superior ability to extract antioxidant compounds. In contrast, Ertaş *et al.* (2014) reported that compared to α -tocopherol, the standard antioxidant, which showed almost 90% inhibition, the moderate ABTS radical scavenging activity of *Achillea cappadocica* metanolic extract reaching 70% inhibition at 100 $\mu\text{g/mL}$.

Table 4. Effect of methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts of *Achillea ligustica* and the positive control potassium bichromate ($K_2Cr_2O_7$) on Brine shrimp

Extract	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)						$LC_{50} \mu\text{g/mL}$
	12.5	25	50	100	200	400	
	% Mortality						
MeOH extract	15 ± 0.71	30 ± 1.41	40 ± 0.00	50 ± 0.00	55 ± 0.71	75 ± 0.71	105.03 ± 3.30^b
EtOAc extract	10 ± 0.00	15 ± 0.71	20 ± 0.00	30 ± 0.00	35 ± 0.71	45 ± 0.71	582.78 ± 0.67^c
n-BuOH extract	5 ± 0.71	5 ± 0.71	10 ± 0.00	25 ± 0.71	30 ± 0.00	35 ± 0.71	664.25 ± 3.54^d
$K_2Cr_2O_7$	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)						$LC_{50} \mu\text{g/mL}$
	10	20	40	80			
% Mortality	0.00 ± 0.00		50 ± 10.00	80 ± 0.00	100 ± 0.00		26.490 ± 1.34^a

Several studies have assessed the reducing power of *Achillea* species using the FRAP assay. Özgen *et al.* (2004) found that *Achillea wilhelmsii*'s methanolic extract showed a concentration-dependent increase in reducing power, with values ranging from $2.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ at 50 $\mu\text{g/mL}$ to $13.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ at 500 $\mu\text{g/mL}$. However, the reducing power was relatively moderate compared to strong standard antioxidants. Georgieva *et al.* (2015) investigated *Achillea millefolium* and found that the decoction method provided the highest FRAP value ($132.71 \pm 1.29 \mu\text{M TE/g dw}$), outperforming microwave-assisted extraction ($76.41 \pm 0.53 \mu\text{M TE/g dw}$), highlighting the influence of extraction methods on the plant's antioxidant capacity.

In another study using the phenanthroline assay, Boubertakh *et al.* (2024) examined the hydro-ethanolic leaf extract (HEAL) of *Achillea ligustica*, which demonstrated moderate antioxidant activity ($A_{0.5} = 5.25 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$). However, HEAL was less effective compared to the standard antioxidant BHT. Furthermore, Amira *et al.* (2023) studied the antioxidant potential of the hydro-methanolic extract of *Achillea odorata* and found it exhibited strong antioxidant properties, with a phenanthroline $A_{0.5}$ value of $6.22 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ comparable to BHA value. These studies confirm that *Achillea* species, particularly *Achillea ligustica*, are promising sources of natural antioxidants with potential medicinal applications for combating oxidative stress.

3.4. Brine shrimp lethality test

Due to its ease of application, affordability, and reliability, the brine shrimp *Artemia salina* is widely used as test organisms in short-term toxicity investigations. This test provides preliminary information about the biological activities (cytotoxic, antitumor, and pesticidal properties) of natural products, guiding researchers toward more in-depth studies (Sleet and Brendel, 1983). The use of microplate technology allows for efficient testing of multiple samples and their respective dilutions (Solis *et al.* 1992). Meyer *et al.* (1982) established a relationship between toxicity and the average lethal dose (LC_{50}) of plant extracts on *A. salina* larvae. Values above 1000 $\mu\text{g/mL}$ are considered non-toxic. This study marks the first time extracts from *Achillea ligustica* were subjected to acute toxicity testing using *A. salina* larvae, along with determining the LC_{50} of each. At 400 $\mu\text{g/mL}$, the methanol extract demonstrated the highest larval mortality in *A. salina*, reaching 75%, while the ethyl acetate extract resulted in a 45% mortality rate. However, the n-butanol extract exhibited the lowest percentage of mortality, recorded at 35% at the same concentration (Figure 1). In the lethal concentration bioassay, the number of dead larvae was proportional to the increase in concentration.

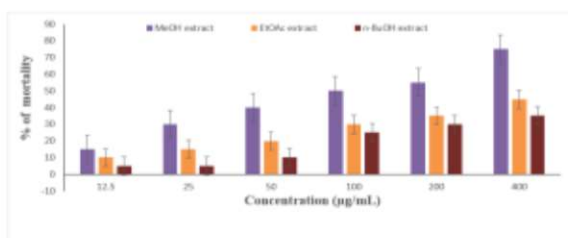


Figure 1. Percentage of mortality at different concentrations of the crude extracts of *Achillea ligustica* in Brine shrimp lethality assay

The results of the crude extract and commercial cytotoxic drug potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) toxicity test for brine shrimp are shown in **Table 4**. As signaled by Clarkson *et al.* (2004) and Meyer *et al.* (1982), and by comparing the results with the highly cytotoxic positive control potassium dichromate ($LC_{50} = 26.49 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$), the methanolic extract showed high toxicity against *A. salina* with a value of $LC_{50} = 105.03 \pm 3.30 \mu\text{g/mL}$. However, the LC_{50} values of both extracts ethyl acetate ($582.78 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$) and the n-butanol ($664.25 \pm 3.54 \mu\text{g/mL}$) showed low toxicity ($1000 \mu\text{g/mL} > LC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$). In this context, compounds in *Achillea* species, including *A. ligustica*, responsible for toxicity are possibly alkaloids (Raeisi *et al.* 2024) and saponins (Barda *et al.* 2021). These compounds are well-known for their toxic effects (Masi *et al.* 2022; Zong *et al.* 2015). Further studies on this species are needed to identify the compounds responsible for its potential toxicity and to validate its traditional use, ensuring public safety. It is also worth noting that many studies have shown extracts with cytotoxic effects to exhibit diverse biological activities, including antifungal (Niño *et al.* 2006), antibacterial (Brasileiro *et al.* 2006) and anti-cancer characteristics (Meyer *et al.* 1982).

4. Conclusion

The current research examined the chemical composition, the antioxidant and cytotoxic activities of *Achillea ligustica* sampled from Mila region (Algeria). The HRMS analysis revealed the richness of this plant on bioactive substances, including phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins. Depending on the extraction solvent, the extracts' levels of antioxidant activity varied, in certain assays, such as the reducing power assay, the highest antioxidant activity was demonstrated in ethyl acetate extract and often it outperforming commercial antioxidants. This demonstrates *A. ligustica*'s potential as a beneficial natural antioxidant source with potential uses in both industry and health. In terms of cytotoxicity, the brine shrimp lethality tests revealed that the n-butanol extract exhibited the lowest toxicological potential, followed by the ethyl acetate extract with moderate toxicity, and the methanolic extract, which showed the highest toxicity. The cytotoxic activity observed can be attributable to specific bioactive substances such as alkaloids and saponins, which warrant further investigation. These findings suggest that *Achillea ligustica* has a great potential as a source of bioactive compounds with potential medical applications. However, to gain

more knowledge of the mechanisms of action, safety, and possible applications of specific compounds, future research should concentrate on their isolation and structural clarification. For this herb to be used safely in both traditional and modern medicine, more toxicological analyses are also necessary.

Acknowledgements

This study was supported by the Algerian Fund for Scientific Research (Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas) and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (PRFU Projet to Pr. N. ZAIDI). The authors thank the Prof. SAKHRAOUI N. (University of Skikda) for the identification of the botanical species.

References

- Agar O., Dikmen M., Ozturk N., Yilmaz M., Temel H. and Turkmenoglu F. (2015). Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L. Species Growing in Turkey. *Molecules*, **20**(10), 17976–18000.
- Amira H., Benabdallah H., Mamache W., Benchikh F., Ounis R., Chawki B. and Amira S. (2023). Evaluation of the phytochemical content and antioxidant properties of different extracts of *Achillea odorata* L. *Bionatura*, **8**(3), 1–10.
- Barda C., Grafakou M. E., Tomou E.M. and Skaltsa H. (2021). Phytochemistry and Evidence-Based Traditional Uses of the Genus *Achillea* L.: An Update (2011–2021). *Scientia Pharmaceutica*, **89**(4), 50.
- Berne S., Kovačič L., Sova M., Kraševac N., Gobec S., Križaj I. and Komel R. (2015). Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: Design, synthesis, structure–activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**(15), 4264–4276.
- Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**(4617), 1199–1200.
- Boubertakh H., Kabouche Z., Boudechicha A., Madi A., Khalfallah A. and Kabouche A. (2024). RP–UHPLC–ESI–QTOF–MSⁿ analyses, antioxidant, antimicrobial, analgesic activities and toxicity of *Achillea ligustica* All. *Natural Product Research*, **1**(6), 1–6.
- Brasileiro B.G., Pizziolo V.R., Raslan D.S., Jamal C.M. and Silveira D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42**(2), 195–202.
- Clarkson C., Maharaj V.J., Crouch N.R., Grace O.M., Pillay P., Matsabisa M.G., Bhagwandin N., Smith P.J. and Folb P.I. (2004). In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**(2–3), 177–191.
- Conforti F., Loizzo M.R., Statti G.A. and Menichini F. (2005). Comparative Radical Scavenging and Antidiabetic Activities of Methanolic Extract and Fractions from *Achillea ligustica* ALL. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**(9), 1791–1794.
- Coşarcă S., Tanase C. and Muntean D.L. (2019). Therapeutic Aspects of Catechin and Its Derivatives – An Update. *Acta Biologica Marisensis*, **2**(1), 21–29.

- Cui Y., Lin Y., Meng X., Ma J., Deng H., Liu X., He X. and Zhao J. (2021). Cyanidin-3-galactoside from *Aronia melanocarpa* ameliorates PM10 induced pulmonary injury by modulating M1/M2 macrophage polarization and NRF2/Sirt1 MAPK signaling. *Journal of Functional Foods*, **78**, 104363.
- Dias M.I., Barros L., Dueñas M., Pereira E., Carvalho A.M., Alves R.C., Oliveira M.B.P.P., Santos-Buelga C. and Ferreira I.C.F.R. (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, **141**(4), 4152–4160.
- Ertuş A., Boğa M., Haşimi N., Yeşil Y., Gören A.C., Topçu G. and Kolak U. (2014). Antioxidant, anticholinesterase, and antimicrobial activities and fatty acid constituents of *Achillea cappadocica* Hausskn. et Bornm. *Turkish Journal of Chemistry*, **38**(4), 592–599.
- Espíndola K.M.M., Ferreira R.G., Narvaez L.E.M., Silva Rosario A. C.R., Da Silva A.H.M., Silva A.G.B., Vieira A.P.O. and Monteiro M.C. (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, **9**, 541.
- Ganeshpurkar A. and Saluja A.K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **25**(2), 149–164.
- Georgieva L., Gadjalova A., Mihaylova D. and Pavlov A. (2015). *Achillea millefolium* L.-phytochemical profile and in vitro antioxidant activity. *International Food Research Journal*, **22**(4), 1347–1352.
- Gevrenova R., Zengin G., Sinan K.I., Yildiztugay E., Zheleva-Dimitrova D., Picot-Allain C., Mahomoodally M.F., Imran M. and Dall'Acqua S. (2021). UHPLC-MS Characterization and Biological Insights of Different Solvent Extracts of Two *Achillea* Species (*A. aleppica* and *A. santolinoides*) from Turkey. *Antioxidants*, **10**(8), 1180.
- Gong G., Guan Y.-Y., Zhang Z.-L., Rahman K., Wang S.-J., Zhou S., Luan X. and Zhang H. (2020). Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **128**, 110301.
- Gu T., Zhang Z., Liu J., Chen L., Tian Y., Xu W., Zeng T., Wu W. and Lu L. (2023). Chlorogenic Acid Alleviates LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress by Modulating CD36/AMPK/PGC-1 α in RAW264.7 Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(17), 13516.
- Kernou O.-N., Azzouz Z., Madani K. and Rijo P. (2023). Application of Rosmarinic Acid with Its Derivatives in the Treatment of Microbial Pathogens. *Molecules*, **28**(10), 4243.
- Khanam S., Mishra Dr.A., Shahid A. and Pujari N.M. (2022). Therapeutic indication of Phloridzin: A new Gleam for metabolic disorders. *Phytomedicine Plus*, **2**(1), 100200.
- Khatri S., Paramanya A. and Ali A. (2019). Phenolic Acids and Their Health-Promoting Activity. In M. Ozturk & K. R. Hakeem (Eds.), *Plant and Human Health*, **2** (pp. 661–680). Springer International Publishing.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F. and Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **64**(5), 923–933.
- Kumar N. and Goel N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, **24**, e00370.
- Lesjak M., Beara I., Simin N., Pintać D., Majkić T., Bekvalac K., Orčić D. and Mimica-Dukić N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, **40**, 68–75.
- Li Z., Zhou J., Ji L., Liang Y. and Xie S. (2023). Recent Advances in the Pharmacological Actions of Apigenin, Its Complexes, and Its Derivatives. *Food Reviews International*, **39**(9), 6568–6601.
- Liu X., Huang R. and Wan J. (2023). Puerarin: A potential natural neuroprotective agent for neurological disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **162**, 114581.
- Lopez-Lazaro M. (2009). Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **9**(1), 31–59.
- Makori S.I., Mu T.-H. and Sun H.-N. (2021). Physicochemical properties, antioxidant activities, and binding behavior of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid with beta-lactoglobulin colloidal particles. *Food Chemistry*, **347**, 129084.
- Masi M., Di Lecce R., Mérendol N., Girard M.-P., Berthoux L., Desgagné-Penix I., Calabrò V. and Evidente A. (2022). Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreaticum maritimum*. *Toxins*, **14**(4), 262.
- Meyer B., Ferrigni N., Putnam J., Jacobsen L., Nichols D. and McLaughlin J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, **45**(05), 31–34.
- Middleton E., Kandaswami C. and Theoharides T.C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, **52**(4), 673–751.
- 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.
- Muselli A., Pau M., Desjobert J.-M., Foddai M., Usai M. and Costa J. (2009). Volatile Constituents of *Achillea ligustica* All. By HS-SPME/GC/GC-MS. Comparison with Essential Oils Obtained by Hydrodistillation from Corsica and Sardinia. *Chromatographia*, **69**(5–6), 575–585.
- Naeri H. and Shirzad H. (2013). Toxicity and safety of medicinal plants. *Journal of HerbMed Pharmacology*, **2**(2), 21–22.
- Niño J., Narváz D.M., Mosquera O.M. and Correa Y.M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**(4), 566–570.
- Orhan D.D. (2019). May *Achillea* Species Be a Source of Treatment for Diabetes Mellitus? In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (375–386). Elsevier.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, **44**(6), 307–315.
- Özgen U., Mavi A., Terzi Z. and Coşkun M. (2004). Antioxidant activities and total phenolic compound amount of some Asteraceae species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1**(3), 203–216.
- Panche A.N., Diwan A.D. and Chandra S.R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, **5**, e47.
- Parveen S., Bhat I.U.H. and Bhat R. (2023). Kaempferol and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential.

- Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **13**(10), 411–420.
- Raeisi H., Azimirad M., Asadi-Sanam S., Asadzadeh Aghdaei H., Yadegar A. and Zali M.R. (2024). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of *Achillea millefolium* L. extracts on *Clostridioides difficile* ribotype 001 in human intestinal epithelial cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **24**(1), 37.
- 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.
- Rechner A.R. and Kroner C. (2005). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, **116**(4), 327–334.
- Ruwizhi N. and Aderibigbe B.A. (2020). Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(16), 5712
- Shi L., Zhao W., Yang Z., Subbiah V. and Suleria H.A.R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, **29**(54), 81112–81129.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (**299**, 152–178). Elsevier.
- Sleet R.B. and Brendel K. (1983). Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia* nauplii for use in developmental toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **7**(5), 435–446.
- Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M. and Gupta M. (1992). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Journal of Natural Products*, **55**(7), 820–827
- 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.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O. and Dommes J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, **113**(4), 1226–1233.
- Tacias-Pascacio V.G., Castañeda-Valbuena D., Fernandez-Lafuente R., Berenguer-Murcia Á., Meza-Gordillo R., Gutiérrez L-F., Pacheco N., Cuevas-Bernardino J.C. and Ayora-Talavera T. (2022). Phenolic compounds in mango fruit: A review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **16**(1), 619–636.
- 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
- Tuberoso C.I.G., Montoro P., Piacente S., Corona G., Deiana M., Dessì M.A., Pizzi C. and Cabras P. (2009). Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **50**(3), 440–448.
- Tzakou O., Couladis M., Evmorfia V. and Loukis A. (1995). Leaf flavonoids of *Achillea ligustica* and *Achillea holosericea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**(5), 569–570.
- Varasteh-Kojourian M., Abrishamchi P., Matin M.M., Asili J., Eftehadi H. and Khosravitarbar F. (2017). Antioxidant, cytotoxic, and DNA protective properties of *Achillea eriophora* DC. and *Achillea biebersteinii* Afan. extracts: A comparative study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, **7**(2), 157–168.
- Venditti A., Guarcini L., Bianco A., Rosselli S., Bruno M. and Senatore F. (2015). Phytochemical analysis of *Achillea ligustica* All. from Lipari Island (Aeolian Islands). *Natural Product Research*, **30**(8), 912–919.
- Yılmaz M.A., Ertuş A., Yener İ., Türkmenoğlu F.P., Ölmez Ö.T., Öztürk M., Altun M., Çakır O., Tarhan A., Boğa M., Demirtaş İ.B., Alma M.H. and Temel H. (2022). Chemical fingerprints and bioactivities of 12 Anatolian *Achillea* species by LC-MS/MS with chemometric approach: Novel phytonutrients, natural food preservatives, and chlorogenic acid sources. *Turkish Journal of Botany*, **46**(5), 473–489.
- Zong J., Wang R., Bao G., Ling T., Zhang L., Zhang X. and Hou R. (2015). Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *Camellia oleifera* Abel. show anti-proliferative activity against tumor cells. *Fitoterapia*, **104**, 7–13.

Communications internationales:

MENASRI H., ZAIDI N. & KHADRI S., 2021. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mila (nord-est Algérien). Séminaire international sur les sciences naturelles et de la vie en ligne (webinaire). Le 19 et 20 Février 2021, Oran, Algérie

MENASRI H., ZAIDI N. 2022. Teneur en polyphénols et activité antioxydante des extraits des feuilles de *Borago Officinalis*. Séminaire international sur la valorisation des ressources agronomiques, écologiques et alimentaires. Le 18, 19 et 20 Octobre, 2022, Skikda, Algérie.

Communications nationales:

MENASRI H., ZAIDI N. & KHADRI S. 2022. Plantes d'intérêt médicinales dans les régions du Nord-est Algérien. Séminaire national sur la valorisation des bioressources végétales en Algérie. Le 07/06/2022, Khenchela, Algérie.

MENASRI H., HERMOUCHE A., ZAIDI N., 2023. Valorisation of natural resources and investigation of quantitative contents and in vitro antioxidant activity of a species of the Boraginaceae family of Algeria. Séminaire national en phytothérapie et pharmacognosie 14-15 Mars 2023. Université Ferhat Abas Sétif, Algérie.

