



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE  
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
**Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCCEN**



# THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT**

Spécialité : **Chimie des Produits Naturels Analyses et Applications**

Par :

***Mme BENHAMIDAT Lyna***

Sur le thème

---

**Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire de  
trois plantes de la famille des Astéracées : Investigation  
phytochimique et Activités biologiques**

---

Soutenue publiquement le 13/07/2022 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr ARRAR Zoheir	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr BENSALD Okkacha	Professeur	Université de Tlemcen	Co-Directeur de thèse
Mr CHERITI Abdelkrim	Professeur	Université de Bechar	Examinateur
Mme TABET ZATLA Amina	MCA	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr BOUSALEM Smain	Professeur	C. Univ de Ain Temouchent	Examinateur

# *Dédicaces*

« En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout ».

Albert Camus.



*En guise de reconnaissance envers mon DIEU le Tout Puissant et  
le Miséricordieux*

*Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de DIEU, qui  
m'a offert santé, force, volonté et patience pour accomplir ce  
travail de recherche et d'aller jusqu'au bout de mes rêves*

*Je dédie ce modeste travail pour le monde scientifique et  
universitaire*

*Espérant qu'elle lui sera bénéfique et utile.*

*« A la mémoire de mon Grand-Père ».*

*Qui m'a toujours conseillé et guidé vers le chemin de la réussite, et qui m'a toujours répété  
'La vie est un grand combat, il faut se battre'*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents que Dieu vous garde.*

*Aucune dédicace, ni remerciements ne sauraient exprimer ma considération, mon respect et mon amour éternel pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation. Vous avez toujours été pour moi une source de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi une référence et la lumière qui guide mon chemin.*

*Aujourd'hui je vous dédie avec fierté cette thèse qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention que vous m'avez tant réservée, je suis très heureuse de partager la joie de ma réussite avec vous. Puisse Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur, longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A Mes Chers Frères*

*En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible. Que Dieu, le tout puissant, vous accorde santé, succès et réussites.*

*À Mon cher mari*

*Je ne saurais exprimer ma profonde reconnaissance pour le soutien continu dont tu as toujours fait preuve. Tu m'as toujours encouragé, incité à faire de mon mieux, ton soutien m'a permis de réaliser mon rêve. Je te dédie ce travail avec mes vœux de réussite, de prospérité et de bonheur.*

*A Toute Ma Famille Et Belle Famille*

*Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma gratitude pour votre aide, soutien et vos encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour, la sympathie et la bonté exceptionnelle que vous m'avez tant apporté. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous comble de santé et bonheur.*

## *Remerciements*

***A notre Président de Thèse, Monsieur le Professeur : ARRAR Zoheir***

Qu'il nous soit ici permis de vous remercier très sincèrement pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.

Nous sommes particulièrement honorés de vous avoir comme président de ce Jury de Thèse.

***A notre Jury de Thèse,***

***Monsieur le Professeur : CHERITI Abdelkrim***

***Monsieur le Professeur : BOUSALEM Smain***

***Madame : TABET ZATLA Amina***

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites d'en être les rapporteurs.

Nous sommes très honorés d'avoir pu bénéficier de vos remarques éclairées et tenons à vous assurer de notre grande estime et de notre profonde gratitude.

Très sincère pensée à **Mr Boudjelefa Tabti** qui a laissé un grand vide au sein de l'Université de Tlemcen, son professionnalisme, gentillesse et bonne humeur nous ont accompagné toute ces années au quotidien. On ne vous oubliera jamais.

Sans oublié, **Mme Meriem Benyarou** qui est partie très tôt, son souvenir restera toujours graver dans nos cœurs.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma vive connaissance à **Mr Mohammed El Amine DIB**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté de m'encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour votre disponibilité, votre orientation, vos précieux conseils, les critiques constructives et la confiance que vous m'avez m'accordée pour la réalisation et la concrétisation de ce modeste travail. Votre compétence professionnelle incontestable, votre droiture dans l'exercice de profession et surtout vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.

Je remercie vivement **Mr Said GHALLEM**, Directeur du laboratoire des substances naturelles et bioactives, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire LASNABIO.

Je suis redevable à **Mme Fouzia MESLI**, Professeur à l'université de Tlemcen, qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude. Merci pour votre collaboration, votre contribution et votre disponibilité dans la réalisation du travail de la modélisation moléculaire.

Mes chaleureux remerciements vont à **Mr Nouredine CHOUKCHOU BRAHAM**, Professeur à l'université de Tlemcen, qui m'a toujours encouragé, bien conseillé et soutenu durant tout le cursus universitaire, toute ma gratitude.

Chaleureux remerciements vont également à **Mr Hocine ZIANI-CHERIF**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour sa sympathie, le dévouement et ses précieux conseils.

J'exprime toute ma reconnaissance à tous les Enseignants-Chercheurs de la filière de chimie de l'Université de Tlemcen, Mme Nouria MERAD, Mr Okkacha BENSAID, Mr Hocine ALLALI, Mr Chaouki SELLES, Mr Chawki ZIANI-CHERIF, pour vos multiples et précieux conseils pour le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je suis reconnaissante aux Docteurs **Nadia AISSAOUI** et **Sara ABBAD** pour leurs disponibilités, leurs générosités et leurs temps consacré pour la réalisation des travaux : tests antimicrobiens et la formulation galénique.

Je voudrais exprimer ma gratitude à **Mme Assia KENICHE**, Professeur de l'université de Tlemcen et **Mme Ibtissem EL-OUAR**, Professeur à l'université de Constantine, pour leurs aide et assistance dans la réalisation de l'activité neuroprotectrice.

Je remercie également **Mme Hafeda BENMAMMAR** et **Mr Brahim BABA-ALI** pour leur aide à l'échantillonnage et la caractérisation botanique de mes espèces. Sincères remerciements.

Mes remerciements vont à toute l'équipe et les ingénieurs du laboratoire **Kheira** et **Boumediene** pour leur pleine disponibilité et professionnalisme.

À vous mes chers amis et collègues **Radja. A**, **Wafaa. B** et **Sarah. H**, merci pour votre gentillesse, votre motivation, votre soutien moral, vos encouragements et tout particulièrement, pour l'humour et la bonne ambiance que votre présence a créée au sein du laboratoire. Sincères gratitude.

Rien ne serait possible sans l'aide administrative et logistique de **Mr Amine ATTAR** et **Mme Amina Tabet**, merci pour votre gentillesse, votre patience et votre aide dans les démarches administratives.

Ceux que je n'ai pas cités mais pour qui j'ai de l'affection recevez toute ma sympathie  
À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

# SOMMAIRE

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES ANNEXES

## LISTE DES ABREVIATION

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
I.1 Généralités, préparation et analyse des huiles essentielles .....	6
I.1.1 Historique.....	6
I.1.2 Généralités sur les huiles essentielles .....	7
I.1.3 La notion du chémotype ou chimiotype.....	9
I.1.4 Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles .....	9
I.1.5 Effet de synergisme et d'antagonisme .....	10
I.1.6 Analyse des huiles essentielles .....	11
a. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	12
b. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM) .....	13
c. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	14
I.1.7 Outils statistiques .....	14
I.2 Activités biologiques des huiles essentielles.....	15
I.2.1 Activité antioxydante : .....	15
I.2.2 Activité anti-inflammatoire : .....	16
I.2.3 Définition générale des gels .....	17
a. La classification .....	17
b. Les agents gélifiants .....	17
I.2.4 Activité antibactérienne : .....	18
I.2.5 Activité antifongique : .....	18
I.2.6 Activité neuroprotectrice : .....	19
I.3 Description botanique et ethnobotanique du genre <i>Centaurea</i> .....	21
I.3.1 Présentation de la famille des Astéracées .....	21
I.3.2 Descriptions botanique et ethnobotanique du genre <i>Centaurea</i> .....	21
I.3.3 Principaux métabolites secondaires identifiés dans le genre <i>Centaurea</i> .....	24
I.3.4 Utilisations traditionnelles .....	24

CHAPITRE II : ETUDE CHIMIQUE .....	25
II.1 Etude de l'huile essentielle de <i>Centaurea acaulis</i> .....	26
II.1.1 Lieux de récolte et rendements .....	26
II.1.2 Analyse préliminaire de l'huiles essentielle de la partie aérienne et racinaire de <i>C. acaulis</i> .....	28
II.1.3 Etude de la variabilité chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires de <i>C. acaulis</i> . .....	38
II.1.4 Etude de la composition chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de <i>C.</i> <i>acaulis</i> .....	40
II.2 Etude de l'huile essentielle de <i>Centaurea sulphurea</i> .....	42
II.2.1 Lieux de récolte et rendements .....	42
II.2.2 Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition des huiles essentielles. .....	42
II.2.3 Etude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires durant le cycle végétatif de la plante. ....	43
II.3 Etude de l'extrait à l'hexane de <i>Centaurea pullata</i> .....	48
II.3.1 Lieu de récolte et rendement en extrait.....	48
II.3.2 Etude de la composition chimique de l'extrait a l'hexane de la partie racinaire de <i>C.</i> <i>pullata</i> .....	48
CHAPITRE III : ETUDE BIOLOGIQUE .....	50
III.1 Activité antioxydante .....	51
III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....	52
III.1.2 Chélation du fer ferreux.....	54
III.1.3 Test de blanchissement du $\beta$ -carotène .....	55
III.2 Activité anti-inflammatoire .....	59
III.2.1 Essais préliminaires de la formulation d'un gel antiinflammatoire.....	62
III.3 Activité antimicrobienne .....	65
III.3.1 Activité antibactérienne : .....	65
III.3.2 Activité antifongique : .....	66
III.4 Activité neuroprotectrice .....	68
III.5 Etude <i>In-silico</i> de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>C. sulphurea</i> .....	71
III.5.1 Méthodes théoriques et computationnelles.....	71
III.5.2 Evaluation du docking moléculaire .....	73
III.5.3 Évaluation de la dynamique moléculaire.....	82
III.5.4 L'explorateur de propriétés OSIRIS .....	85



III.5.5 Evaluation <i>in silico</i> des propriétés ADME.....	86
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	88
PARTIE EXPERIMENTALE .....	93
REFERENCES.....	108
ANNEXES .....	118
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUE .....	125

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1 :</b> Répartition géographique et climatologique des huit échantillons de <i>C. acaulis</i> .....	27
<b>Tableau 2:</b> Composition chimique des huit échantillons d'huiles essentielles des parties aériennes de <i>C. acaulis</i> .....	30
<b>Tableau 3:</b> Déplacements chimiques des protons (CDCl <sub>3</sub> , 400.13 MHz).....	32
<b>Tableau 4:</b> Déplacements chimiques des carbones (CDCl <sub>3</sub> , 101.13 MHz) .....	33
<b>Tableau 5:</b> Composition chimique des huit échantillons d'huiles essentielles des parties racinaires de <i>C. acaulis</i> .....	37
<b>Tableau 6:</b> Composition chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de <i>C. acaulis</i> ...	40
<b>Tableau 7:</b> Variation du rendement en huiles essentielles de l'espèce <i>C. sulphurea</i> au cours des trois stades végétatifs. ....	42
<b>Tableau 8:</b> Composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de <i>C. sulphurea</i> en fonction de son suivi végétatif obtenus dans la station de Ain douze : .....	44
<b>Tableau 9:</b> Composition chimique des huiles essentielles de la partie racinaire de <i>C. sulphurea</i> en fonction de son suivi végétatif obtenue dans la station de Ain douze : .....	45
<b>Tableau 10:</b> Composition chimique de l'extrait hexanique de la partie racinaire de <i>C. pullata</i> ..	48
<b>Tableau 11:</b> Évaluation de l'activité anti-radicalaire des différents échantillons testés .....	52
<b>Tableau 12:</b> Évaluation de la capacité chélatrice des différents échantillons testés .....	54
<b>Tableau 13:</b> Évaluation du dosage de blanchiment de $\beta$ -carotène/acide linoléique des différents échantillons testés.....	56
<b>Tableau 14:</b> Pourcentages d'inhibitions de la dénaturation de l'albumine des huiles essentielles, des extraits et le diclofénac sodique analysés .....	60
<b>Tableau 15:</b> Pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines des gel testés.....	64
<b>Tableau 16:</b> Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques en papier .....	66
<b>Tableau 17:</b> Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des CMI : .....	67
<b>Tableau 18:</b> Résultats de l'activité neuroprotectrice des espèces <i>C. acaulis</i> , <i>C. pullata</i> et aploxène : .....	69
<b>Tableau 19:</b> Les propriétés et la minimisation de l'énergie des meilleurs ligands de l'huile essentielle de <i>C. sulphurea</i> .....	72
<b>Tableau 20:</b> Bilan énergétique des meilleurs complexes (enzyme-ligands) Kcal/mol .....	73
<b>Tableau 21:</b> S-score (énergies) et interactions entre les atomes des meilleurs inhibiteurs et les résidus du site actif de la cible catalase.....	76
<b>Tableau 22:</b> Les énergies des meilleurs inhibiteurs d'ADN.....	77
<b>Tableau 23:</b> Les énergies d'amarrage des meilleurs inhibiteurs de la CAT/ SOD/ GPx. ....	80
<b>Tableau 24:</b> Propriétés thermodynamiques calculées en réelles unités .....	82
<b>Tableau 25:</b> Propriétés OSIRIS des meilleurs ligands .....	85
<b>Tableau 26:</b> Les paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques des meilleurs composés. ....	86
<b>Tableau 27:</b> Composition des gels préparés avec différentes concentrations du principe actif.	104

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1.</b> Structures chimiques de quelques constituants monoterpéniques présents dans les huiles essentielles.....	8
<b>Figure 2.</b> Structures chimiques de quelques constituants sesquiterpéniques présents dans les huiles essentielles. ....	8
<b>Figure 3.</b> Structures chimiques de quelques constituants diterpéniques présents dans les huiles essentielles. ....	8
<b>Figure 4.</b> <i>Centaurea acaulis</i> L.....	22
<b>Figure 5.</b> <i>Centaurea Pullata</i> L.....	23
<b>Figure 6.</b> <i>Centaurea Sulphurea</i> Willd. ....	23
<b>Figure 7.</b> Spécimens de <i>C. acaulis</i> récoltés dans la wilaya de Tlemcen .....	27
<b>Figure 8.</b> Structures chimiques des principaux constituants de la partie aérienne de l'huile essentielle de <i>C. acaulis</i> .....	29
<b>Figure 9.</b> Spectre RMN du proton de l'aplotaxène .....	33
<b>Figure 10.</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C d'aplotaxène .....	34
<b>Figure 11.</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C DEPT 135 d'aplotaxène .....	34
<b>Figure 12.</b> Spectre Infrarouge d'aplotaxène.....	35
<b>Figure 13.</b> Spectre de masse d'aplotaxène .....	35
<b>Figure 14.</b> Structure de la molécule aplotaxène .....	36
<b>Figure 15.</b> L'analyse en composantes principales (ACP) des différents échantillons d'huiles essentielles de <i>C. acaulis</i> .....	39
<b>Figure 16.</b> Distribution de la variabilité chimique de la partie racinaire de <i>C. sulphurea</i> durant le cycle végétatif. ....	46
<b>Figure 17.</b> CI <sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène, et la combinaison aplotaxène-BHT déterminées par la méthode DPPH. ....	53
<b>Figure 18.</b> CI <sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène, et la combinaison aplotaxène-EDTA déterminées par la méthode de chélation du fer. ....	55
<b>Figure 19.</b> CI <sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène et la combinaison aplotaxène-BHT déterminées par la méthode du β-carotène .....	57
<b>Figure 20.</b> CI <sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène, et la combinaison entre aplotaxène et le médicament diclofénac.....	61
<b>Figure 21.</b> Gel blanc de CARBOPOL et le gel au principe actif aplotaxène.....	63
<b>Figure 22.</b> Les différentes préparations (doses) de l'hydrogel.....	63
<b>Figure 23.</b> CI <sub>50</sub> de l'Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase .....	70
<b>Figure 24.</b> La cavité enzymatique de la cible : 1dgb avec les résidus du site actif.....	73
<b>Figure 25.</b> Diagramme d'interaction 3D de la liaison du site actif (la surface de la cavité de l'enzyme : la catalase) avec le (Z)-phytol .....	75
<b>Figure 26.</b> Diagramme d'interaction 3D de la liaison du site actif (la surface de la cavité de l'enzyme : la catalase) avec l'eicosane .....	75
<b>Figure 27.</b> Modèle de l'amarrage moléculaire du site de la liaison la plus favorable des composés (a) L39 et (b) L42 avec le duplex d'ADN dodécamère de la séquence (CGCGAATTCGCG) <sub>2</sub> (PDB ID : 1BNA).....	79
<b>Figure 28.</b> Représentation 3D des meilleures poses des interactions entre les meilleurs ligands et leurs récepteurs.....	81

<b>Figure 29.</b> Docking du composé L39 (jaune) dans le site de liaison de la catalase.....	83
<b>Figure 30.</b> Docking du composé L39 (jaune) dans le site de liaison de la catalase.....	83
<b>Figure 31.</b> Résultats de simulation de la dynamique moléculaire du complexe .....	84

## LISTE DES ANNEXES

---

<b>Annexe 1:</b> Propriétés des ligands de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>C. sulphurea</i> .....	119
<b>Annexe 2:</b> Propriétés des ligands de l'huile essentielle de la partie racinaire de <i>C. sulphurea</i> ....	120
<b>Annexe 3:</b> Les énergies (Kcal/mol) (affinité de liaison) des complexes formés par les ligands de l'huile essentielle avec la cible de la catalase. ....	121
<b>Annexe 4 :</b> S-score (énergie) et interactions entre les ligands et les résidus du site actif de la cible catalase .....	122
<b>Annexe 5:</b> Les énergies de l'amarrage moléculaire des autres inhibiteurs d'ADN .....	123
<b>Annexe 6:</b> Profils d'interaction des autres ligands avec les antioxydants enzymatiques endogènes .....	123
<b>Annexe 7:</b> Propriétés OSIRIS des autres ligands .....	124

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
ACP	Analyse en Composantes Principales
HE	Huile Essentielle
HEcoll	Huile Essentielle Collective
Refs	Références
CPG/SM	Chromatographie en Phase Gazeuse Couplé à la Spectroscopie de Masse
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN <sup>13</sup> C	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone
J	Constante de Couplage
(RMN) m/z	Masse/Charge Electrique
SM	Spectrométrie de Masse
IR	Infrarouge
CI <sub>50</sub>	Concentration Nécessaire à 50 % d’Inhibition
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
BHT	Hydroxytoluène Butylé
EDTA	Acide Ethylènediaminetétraacétique
MOE	Molecular Operating Environment
1dgb	Code de la Catalase
DM	Dynamique Moléculaire
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
SOD	La Superoxyde Dismutase
GPx	La Glutathion Peroxydase
CAT	La catalase
OSIRIS	Serverless Portal System Signal Désignant Quatre Processus en Pharmacocinétique
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion.

***INTRODUCTION***  
***GENERALE***

La transmission du savoir-faire par nos aïeux en matière de soin par des plantes, s'est interrompue avec la médecine « moderne ». Seulement, ces dernières années, le secteur des plantes médicinales effectue un retour en force, s'appuyant sur les connaissances et les valeurs sûres, testées et approuvées par nos ancêtres.

La filière des PAM a suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine thérapeutique, grâce aux ressources naturelles provenant du règne végétal qui ont permis de grandes avancées en raison de leurs valeurs ajoutées dans la préparation de nombreux produits dans les domaines : pharmaceutiques, nutraceutiques et également la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. En effet, il est estimé que plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés dérivent directement ou indirectement des plantes. Ce pourcentage peut atteindre jusqu'à 50% lorsque l'ensemble des produits du marché parallèle est pris en considération, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles [1].

De nos jours, les huiles essentielles sont utilisées dans divers domaines par les chimistes, les biologistes et même les médecins dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de plus en plus inactifs, ou encore dans le développement de nouveaux additifs alimentaires alternatifs qui sont capable de ralentir la détérioration des aliments ou inhiber la croissance des pathogènes d'origine alimentaires et protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs [2].

D'autre part, l'inflammation conduit à la production excessive des radicaux libres responsable de la génération du stress oxydant et la libération des facteurs inflammatoires générant des complications. Le traitement est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), seulement ces derniers présentent des risques de toxicité gastro-intestinales et cardiovasculaires. Pour cela, il est nécessaire de rechercher d'autres molécules à effet antiinflammatoires ayant moins d'effets secondaires pour être utilisé particulièrement dans le traitement des inflammations chroniques [3].

Par ailleurs, la maladie d'Alzheimer est devenue un problème majeur de santé publique et plus particulièrement chez les personnes âgées. L'un des médicaments inhibiteurs de l'acétylcholinestérase le plus prometteur à ce jour est un alcaloïde tout comme la galanthamine, néanmoins, la plupart de ces médicaments provoquent un trouble du rythme cardiaque et causent des toxicités. Ces raisons justifient le souci de développement de nouvelles molécules inhibitrices de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase à partir des plantes, présentant à la fois une forte activité et une toxicité moindre [4].



À cet effet, la recherche des nouveaux agents thérapeutiques se lance fort. L'objectif est de découvrir des armes thérapeutiques efficaces à partir des produits naturels qui donnent une forte chance de découvrir une médication effective, contre les pathologies qui n'ont pas été traitées par l'effet thérapeutique directe, par une modification semi-synthétique ou encore par une nouvelle synthèse d'un modèle moléculaire à partir des substances naturelles.

L'Algérie par la diversité de ses milieux et de ses terroirs, dispose d'énormes potentialités végétales : méditerranéenne, saharienne et paléo tropicale. Elles sont représentées par 3139 espèces végétales comprenant 314 espèces assez rares, 30 espèces rares, 330 très rares et 600 endémiques, dont 64 sont typiquement sahariennes. Ainsi, 226 espèces sont menacées d'extinction et que la loi protège. Ces plantes endémiques constituent un réservoir immense de substances actives, ce qui peut conduire à la découverte de nouvelles molécules d'intérêts scientifiques. Par conséquent, l'exploitation de façon durable et éco-respectueuse de ces biomolécules est actuellement centrée sur le développement de nouvelles techniques [5].

Cependant, la problématique majeure émergente aujourd'hui vise la valorisation de la biomasse végétale qui reste à ce jour quasiment inexistante. A cette optique, l'une des voies de valorisation consiste à la connaissance et l'identification des ressources naturelles susceptible de fournir des composées possédant des propriétés biologiques et pharmacologiques exploitables.

Quant aux choix des espèces végétales à étudier et en mesure de répondre à cette thématique, nous avons choisi de prospecter des espèces du genre *Centaurea* appartenant à la famille des Astéracées en raison de sa place et son importance dans le règne des végétaux. Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, puisqu'ils possèdent un large éventail d'activités biologiques liées à leurs diverses structures aromatiques stables.

Compte tenu de l'intérêt pharmacologique et phytochimique du genre *Centaurea*, ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique de la valorisation et la caractérisation structurale des molécules bioactives accumulées par les trois espèces du genre *Centaurea* : *Centaurea acaulis*, *Centaurea pullata* et *Centaurea sulphurea*. Pour atteindre cet objectif, une stratégie reposant sur deux volets complémentaires sont développés :

#### **Un volet chimique qui consiste :**

- A préparer les échantillons des huiles essentielles par hydrodistillation et des extraits à l'hexane par macération à froid.
- Analyser la composition chimique des échantillons par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), la Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (CPG/SM) et la RMN monodimensionnelle.

- Caractériser le constituant majoritaire des huiles essentielles et des extraits qui s'est avéré absent de la bibliothèque de données « Aromes » propre au laboratoire de Corse.

#### **Un volet biologique qui vise à :**

- Etudier les propriétés antioxydantes, antiinflammatoires, antimicrobiennes et neuroprotectrices des matrices étudiées.
- Evaluer les éventuels effets de synergismes et/ou antagonismes de la combinaison de la molécule majoritaire avec les références synthétiques employées.
- Initier une étude *in-silico* dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs potentiels des enzymes endogènes (catalase (CAT), superoxyde dismutase (SODs), glutathion peroxydase (GPX)) et de la séquence d'ADN, afin de combattre les radicaux libres.
- Formuler un hydrogel pour des applications antiinflammatoires.

Cette thèse s'organise autour de quatre chapitres présentant successivement :

**Le premier chapitre**, décrit l'état de l'art, il concerne les descriptions botaniques et ethnobotaniques des espèces du genre *centaurea* et en particulier, les trois espèces qui font l'objet de notre étude. Dans un deuxième temps, nous explicitons la méthodologie développée par le laboratoire CPN (chimie des produits naturels) pour la caractérisation des constituants des huiles essentielles, et plus précisément, les principales techniques chromatographiques d'analyses et de caractérisations dont les méthodes d'analyses par RMN.

**Le deuxième chapitre**, présente les compositions chimiques des huiles essentielles (parties aériennes et racinaires) relatives aux trois espèces sélectionnées. Les résultats sont énumérés en trois parties distinctes. Nous décrivons ainsi les stratégies analytiques basées sur l'utilisation des techniques d'analyses complémentaires pour assurer l'identification du composé absent des bibliothèques de références. De plus, une étude de la variabilité chimique ainsi que le suivi végétatif des échantillons des huiles essentielles.

**Le troisième chapitre**, reporte la discussion des résultats des tests des activités biologiques, de plus les résultats des essais préliminaires de l'hydrogel.

**Le quatrième chapitre**, décrit l'aspect appliqué du travail qui reprend les méthodes de préparation des huiles essentielles et des extraits, les conditions expérimentales des diverses analyses ainsi que les protocoles expérimentaux des différents tests réalisés.

Ce manuscrit se termine par **une conclusion générale** qui résume l'ensemble des recherches et travaux effectués lors de cette thèse.

***CHAPITRE I : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE***

## I.1 Généralités, préparation et analyse des huiles essentielles

### I.1.1 Historique

Depuis les temps les plus anciens, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles afin de s'alimenter et se soigner, ce qui a poussé toutes les civilisations à les employer pour le traitement de diverses maladies. L'utilisation des huiles essentielles date depuis des millénaires, mais, durant le dernier siècle, elles ont été éclipsées à cause des progrès incroyables de la chimie et de la synthèse des molécules. Seulement, depuis une quinzaine d'années, elles reviennent sur le devant de la scène, poussées par les scandales sanitaires et l'évolution des consciences.

Avant Jésus-Christ, c'est autour du bassin méditerranéen considéré comme le berceau des huiles essentielles, que la science médicale va s'établir avec les grandes civilisations égyptiennes, babyloniennes, puis grecques et romaines. Seulement, c'est la civilisation égyptienne qui est aujourd'hui considérée comme la créatrice des huiles essentielles, pour leur savoir-faire pour soigner le corps et l'esprit avec les huiles essentielles [6].

En Grèce, les huiles essentielles servent dans la parfumerie. C'est Alexandre Le Grand qui importe les huiles essentielles en Grèce après sa conquête de l'Égypte. Par la suite, sous l'influence des Grecs, les Romains s'intéressent aux épices et aux huiles essentielles.

Au début du Moyen-Âge, les huiles essentielles n'étaient pas beaucoup utilisées puisqu'elles avaient une connotation de produits maléfiques. L'intérêt de ces derniers, renaît à l'époque des croisades, ils ont facilité les échanges commerciaux d'aromates et ont permis d'accroître les connaissances des techniques de la distillation [7].

Les pays arabes ont conservé pendant des millénaires le monopole du commerce des épices et ont contribué en grande partie au progrès des techniques d'extractions des huiles et des parfums, grâce à la création du serpentín permettant le refroidissement rapide de la vapeur aromatique. C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui produit la première huile essentielle pure ; celle de *Rosa centifolia*. Tout comme le Giovannil- Baptista Della Porta, dans son célèbre ouvrage "De destillatione" parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des arabes dans le domaine de la distillation.

Ce n'est qu'au XX<sup>ème</sup> siècle que les scientifiques commencent à s'intéresser à nouveau au domaine de l'aromathérapie qui est devenue par la suite une source précieuse et inestimable [8].

- En 1928, Le père de l'aromathérapie scientifique 'René-Maurice Gattefossé' publie un ouvrage "aromathérapie" décrivant la relation entre la structure biochimique de l'huile essentielle et son activité antimicrobienne.

- En 1929, Le pharmacien lyonnais ‘Sévelinge’, étudia les huiles essentielles en médecine vétérinaire et confirme le potentiel antibactérien élevé de ces substances aromatiques.
- En 1964, Le docteur ‘Valnet’, chirurgien militaire, vérifie l’efficacité anti-infectieuse des huiles essentielles directement sur le terrain lors de la guerre d’Indochine.
- En 1975, Le biochimiste français ‘Pierre Franchomme’, fonde le premier laboratoire spécialisé dans les huiles essentielles. Il met l’accent sur l’importance du chémotype afin de réduire les échecs thérapeutiques, minimiser les effets secondaires et les risques de toxicité [9].
- En 1991, Le pharmacien belge ‘Dominique Baudoux’, met en vente des synergies d’huiles directement prêtes à l’emploi pour les consommateurs.

L’aromathérapie est actuellement une pratique développée dans le monde entier. Toutefois, plusieurs études ont montré des utilisations massives des huiles essentielles dans différents domaines. À l’heure actuelle, on s’appuie encore très souvent sur ce savoir pour valoriser les plantes aromatiques et leurs produits dans un large axe « Plantes, Santé et Bien-être » [10].

### **I.1.2. Généralités sur les huiles essentielles**

#### **a. Définition d’une huile essentielle**

Le terme ‘huile essentielle’ a été inventé par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim au 16ème siècle, pour désigner un composé actif d’un remède naturel [11].

La commission de la Pharmacopée Européenne définit une huile essentielle comme un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d’une matière première d’origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d’eau, soit par distillation sèche ou soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Elle est généralement séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n’entraînant aucun changement significatif de sa composition » [12]. Malgré cela, au cours de l’extraction, un certain nombre de ses constituants va subir des transformations (réarrangement moléculaire, hydrolyse, etc...). Pour cela, il convient de bien différencier l’essence que l’on extrait et l’huile essentielle que l’on obtient.

#### **b. Composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont dotées d’un très grand nombre de constituants chimiques appartenant principalement à deux grandes familles biochimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [13]. Les composés terpéniques sont formés d’unités isopréniques  $(C_5H_8)_n$ , ils comprennent les monoterpènes en  $(C_5H_8)_2$ , les sesquiterpènes  $(C_5H_8)_3$  et les diterpènes  $(C_5H_8)_4$ . Ces composants peuvent contenir toutes les grandes fonctions de la chimie organique, ils peuvent être soit des hydrocarbures ou des



La caractérisation chimique de ces matrices nécessite alors des appareils analytiques performants et des méthodes adaptées capables d'identifier les constituants sans causer d'altérations ou des modifications sur leurs structures.

En générale, les principaux composants sont responsables des propriétés biologiques des huiles essentielles, mais il arrive qu'une combinaison de molécules modifie leur activité de manière significative [14].

### **I.1.3 La notion du chémotype ou chimiotype**

La notion de chémotype est un concept clé en aromathérapie. Les huiles essentielles chémotypées sont une forme de classification chimique, botanique et biologique de la molécule majoritaire d'une huile essentielle. Il est donc préférable de choisir une huile essentielle à chémotype lorsqu'on les emploie en thérapeutique.

La mise en évidence du chémotype s'explique par le fait qu'une même plante aromatique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat et son sol. A titre d'exemple : l'huile essentielle de thym dénombre au moins sept chémotypes qui couvrent un large éventail d'activités différentes. On distingue les chémotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et les chémotypes non phénoliques (géraniol, linalol,  $\alpha$ -terpinéol, 1,8-cinéole et thuyanol). Ainsi, une huile essentielle de *Thymus vulgaris* à carvacrole est connue pour son activité antiseptique majoritairement alors qu'une huile de *Thymus vulgaris* à thymol a des propriétés anti-infectieuses majeures [15].

### **I.1.4 Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles**

Une plante aromatique produit une huile essentielle de composition chimique différente aux propriétés pharmacologiques déterminées. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs : soit d'origine intrinsèque qui dépendent des caractéristiques génétiques de la plante ou soit d'origine extrinsèque qui sont liées aux conditions de la croissance et le développement de la plante.

#### **➤ Facteurs intrinsèques**

La biosynthèse est le premier paramètre influençant la composition chimique de la plante, autrement dit son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même plante peut avoir plusieurs chémotypes de profils chimiques différents (polymorphisme chimique). Un des exemples les plus courants de chimiotype est celui du *Thymus vulgaris*, une espèce morphologiquement homogène, qui compte huit chémotypes différents [16] sept dans les

garrigues du sud de la France (à thymol, à carvacrole, à géraniol, à linalol, à alpha-terpénol, à trans-4-thuyanol et à cis-8-myrcénol) et un en Espagne (à cinéol).

L'influence du stade végétatif [17,18] l'organe de la plante [19,20] les hybridations et les facteurs de mutation, [18] sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

#### ➤ **Facteurs extrinsèques**

Les facteurs externes tels que : l'origine géographique, la température, la quantité de lumière, l'humidité, le climat, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique et le rendement d'une huile essentielle [21].

Dans cette optique, plusieurs travaux ont été mis en évidence, exemples : le *Thym vulgaire* à géraniol ne produit cette molécule (géraniol) qu'en hiver alors que l'acétate de géranyle la remplacera en été [22]. Chez la *Mentha piperita*, les nuits tempérées conduisent à la formation du mentho-furanne, alors que les nuits froides favorisent la formation du menthol (composant majoritaire, de 30 à 55%) [6]. Il a été observé que les *Citrus* ont une proportion plus importante en huile essentielle quand on augmente la température [12].

Par ailleurs, certains chercheurs se sont préoccupés d'autres facteurs affectants beaucoup plus le rendement que la composition chimique notamment : les techniques de récolte, la durée de séchage et de stockage, la méthode d'extraction et les caractéristiques physiques tels que le pH et la durée d'extraction [23].

### **I.1.5 Effet de synergisme et d'antagonisme**

Les concepts de synergie et d'antagonisme sont relativement vieilles, antérieures à la découverte des antibiotiques. En effet, les premières constatations d'une interaction entre deux antibiotiques datent des années 1950, selon les travaux de Gunnison et al., qui ont défini les interactions comme synergiques, additives ou antagonistes [24].

La notion de l'effet synergique signifie l'interaction entre des constituants chimiques ou des structures biologiques qui se traduit par un effet totale supérieur à la somme des effets des composés individuels. Contrairement à l'effet antagoniste qui est produit par des actions opposées de deux ou plusieurs constituants chimiques.

Depuis la découverte des divers effets synergiques, antagonistes et leur importance dans les applications thérapeutiques, les interactions entre les principes actifs sont devenues des études importantes pour la recherche scientifique. En effet, les interactions synergiques diminuent la



dose des différents médicaments en combinaison, minimisant ainsi les effets secondaires causés par les concentrations élevées d'un seul médicament [25].

Les activités pharmacologiques des huiles essentielles peuvent être liées à leurs profils chimiques, à la possibilité d'interactions synergiques entre leurs composants, à leurs groupes fonctionnels et à la configuration chimique des composants qui les composent [26]. Etant un mélange de constituants complexes, cela représente un potentiel pour le développement des interactions synergiques ou antagonistes.

L'action synergique des antioxydants a connu une certaine attention grâce à des exo-interactions. Selon Yang et Liu, la combinaison d'un extrait de pomme et de quercétine 3- $\beta$ -D-glucoside présente une activité antiproliférative synergique vis-à-vis des cellules cancéreuses du sein [27]. L'association des extraits d'acérola de cerise, de soja, et de luzerne phytoestrogène, agissent en synergie pour inhiber l'oxydation du taux de cholestérol LDL *in vitro* [28]. Liao et Yin ont démontré que les combinaisons d'acide alpha-tocophérol et/ou ascorbique avec l'acide gallique, la catéchine, l'acide caféique, la myricétine et la quercétine ont une activité antioxydante plus élevée que chacun de ces constituants testés seuls contre l'oxydation des lipides [29].

Aujourd'hui, un intérêt s'impose sur la découverte de nouveaux agents de conservations naturels et efficaces [30]. Pour cela, comprendre les mécanismes de la fonctionnalité des mélanges d'antioxydants est important pour leur développement en tant que conservateurs. Avec le manque de nouveaux antibiotiques mis sur le marché et leur effet secondaire, de nouvelles stratégies alternatives pour faire face aux infections résultantes des bactéries résistantes aux médicaments sont en cours. Une approche possible pourrait consister à combiner les antibiotiques existants avec des constituants phytochimiques pour améliorer l'efficacité des antibiotiques. C'est le cas de cette étude, qui a émontré l'activité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, qui est due à la synergie entre les principaux composants comme le carvacrol et le thymol [31].

Dans cette partie du travail, l'approche proposée consiste à étudier la combinaison de la molécule majoritaire isolée avec les différentes références de synthèses employées dans les activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices afin de rechercher des éventuelles synergies.

### **I.1.6 Analyse des huiles essentielles**

L'analyse d'un mélange complexe de composés volatils implique généralement la séparation, l'identification et la détermination quantitative de ses constituants. Il s'agit d'une part, des techniques chromatographiques : chromatographie sur couche mince (CCM),

chromatographie sur colonne (CLC) et chromatographie en phase gazeuse (CPG) et d'autre part, des techniques d'identifications spectrales : spectrométrie de masse (SM), spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrophotométrie infrarouge (IR). Cependant, l'analyse d'un échantillon dont les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification, le couplage « en ligne » de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est privilégiée [32,33].

#### **a. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [34].

Réalisée expérimentalement en 1952 par James et Martin, la CPG s'est montrée une méthode des plus appropriées à la séparation et à l'identification des constituants des huiles essentielles car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. C'est une technique d'analyse quantitative qui fournit d'une part, le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé et qualitative d'autre part, sur la base des temps de rétention.

- **Principe**

En CPG, l'échantillon est injecté et vaporisé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur, lorsqu'un constituant de l'échantillon le traverse, un pic apparaît sur l'enregistreur [35].

- **Identification des composés**

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (Indices de Kováts IK) ou en programmation de température (Indices de rétention, Ir). L'identification consiste à comparer les indices de rétention à ceux des étalons purs injectés parallèlement (bibliothèque de référence propre au laboratoire ou des bibliothèques commerciales). Cependant, l'utilisation d'étalons et d'indices de rétention pour une analyse qualitative et quantitative des échantillons étudiés limite l'efficacité de la CPG et impose son couplage avec d'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse.

Cette dernière a la capacité d'identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser [34].

Actuellement, la CPG est un outil incontournable pour l'analyse des composés volatils en mélange, pareillement, elle peut être employée avec des molécules plus lourdes tels que : les stéroïdes et triterpènes, en appliquant une température isotherme élevée (CPG haute température CPGHT).

## **b. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM)**

Le couplage en ligne de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) est une technique sophistiquée qui permet d'effectuer simultanément la séparation la détection et l'identification des constituants en fonction de leur rapport masse/charge des différents constituants d'un mélange complexe [36]. Depuis 1975, les performances du couplage en ligne n'ont cessé d'évoluer permettant de conquérir plusieurs domaines tels que : agroalimentaire (aliments, eau), les produits pétroliers (carburants, matières synthétiques) et les produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine).

### **• Principe**

Pour l'analyse des huiles essentielles, le spectromètre de masse procède selon deux modes d'ionisation :

**CPG/SM en mode « Impact Electronique »** consiste à la formation d'ions positifs à partir d'un ion moléculaire  $M^+$  obtenu par interaction entre la vapeur d'un échantillon de masse  $M$  et un courant d'électrons (émis par un filament chauffé) accéléré sous vide et sous une différence de potentiel de 70 eV. Les fragments ioniques positifs ainsi obtenus, dont éventuellement l'ion moléculaire, constituent le spectre de masse du composé [34].

**CPG/SM en mode « Ionisation Chimique »** il s'agit d'un mode d'ionisation plus doux (15 eV) que l'impact électronique dans lequel il est recherché des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif. Elle peut se faire par transfert de proton, échange de charge, perte ou abstraction d'un hydrure [37]. La contribution à chacune de ces réactions d'ionisation dépend de la nature de la substance à analyser et du gaz réactant.

Le grand avantage de cette technique est sa flexibilité. En effet, en faisant varier les conditions expérimentales, à savoir la nature du gaz réactant, la pression et la température de la source, il est possible d'observer l'ion quasi-moléculaire des molécules [38]. La faible quantité d'énergie transférée lors de l'ionisation limite les fragmentations et permet ainsi une meilleure différenciation des isomères [39]. Cette technique a trouvé de nombreuses applications chimiques et biochimiques dans les domaines de l'environnement et du médical.

### **• Identification des composés**

L'appareillage CG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui rend possible l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG et ceci en comparant les spectres de masse obtenus avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées commerciales riches de plusieurs milliers de composés [40].

### c. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique riche et puissante qui permet d'extraire des informations structurales des molécules organiques afin de caractériser et d'identifier ces derniers. Cette analyse consiste à observer la réponse de certains atomes à un champ radio fréquence à travers un champ magnétique intense.

Dans le cas échéant ou une molécule s'avère plus difficilement identifiable, une purification en vue de réaliser une analyse structurale en RMN 2D doit être envisagée [41].

La RMN du carbone-13 constitue un véritable outil d'analyse des mélanges complexes naturels, elle présente dans la majorité des cas, les raies de résonance de carbones présentes dans la molécule. C'est une méthode complémentaire aux techniques conventionnelles développées [42,43].

### I.1.7 Outils statistiques

Les travaux de recherches actuels visant l'étude de la composition chimique des huiles et des fractions volatiles, intègrent l'analyse des paramètres responsables de la variabilité chimique induite par les critères environnementaux (altitude, nature du sol, climat), physiologiques (morphologie du végétal, stade végétatif) ou encore génétiques. Pour étudier la diversité en métabolites secondaires d'une plante, il est indispensable de réaliser un traitement statistique des données qualitatives et/ou quantitatives de la matrice constituée par les pourcentages normalisés et standardisés des constituants des mélanges volatils.

Ce traitement nécessite l'application d'un outil principal : l'Analyse en Composante Principale (ACP) [44]. Cette analyse permet d'avoir une vision synthétique, des similitudes et/ou des différences au sein d'un ensemble d'échantillons.

L'ACP est un outil permettant de convertir un nuage de points d'un espace multivarié en un nuage de points dans un espace à deux dimensions. Les points et les variables de cet espace sont projetés selon les deux axes perpendiculaires, les plus représentatifs de l'ensemble du nuage [45]. Concrètement, dans notre domaine d'étude, les variables sont généralement les pourcentages (normalisés ou standardisés) des constituants des huiles essentielles tandis que les points sont les diverses zones de récolte.

Dans notre cas, nous avons systématiquement établi les groupes les plus représentatifs en ACP, autrement dit, les affinités de chaque groupe avec les composés discriminants. *In fine*, et selon la classification ainsi faite, chaque échantillon a été confronté aux données de la matrice afin de contrôler les propositions du traitement statistique.

## **I.2 Activités biologiques des huiles essentielles**

Les vertus et bienfaits des huiles essentielles sont connues et employées depuis les temps les plus anciens pour leurs propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques, elles possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales, stimulantes, toniques et même irritantes. Seulement, cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. D'où l'intérêt de l'étude des activités thérapeutiques des huiles essentielles pour expliquer leurs actions et utilisations en médecine traditionnelle et les valoriser commercialement [46].

### **I.2.1 Activité antioxydante :**

Antioxydants, stress oxydant, radicaux libres et les espèces réactives d'oxygènes sont des termes qui ont envahi le monde des sciences biologiques et médicales. Toutefois, ces notions ne sont pas nouvelles puisqu'il faut rappeler qu'en 1969, les deux Américains Mc Cord et Fridovich ont isolé pour la première fois un système enzymatique détoxifiant dite antioxydant, à partir des globules rouges humains. Cette découverte sera le point de départ d'une importante recherche scientifique sur le stress oxydant et les antioxydants [47].

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres, la production excessive de ces derniers provoque des lésions directes de molécules biologiques, afin de contourner les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (EROs). La cellule fait appel à des systèmes de défense, celui des antioxydants, qui jouent un rôle crucial dans le traitement des dommages oxydatifs impliqués dans de très nombreuses maladies, y compris les maladies neurodégénératives [48].

À cet égard, de nombreux industriels et scientifiques se sont engagés à la recherche de nouveaux antioxydants naturels via des études épidémiologiques et cliniques. Ces derniers ont démontré l'implication du stress oxydant dans le développement d'un grand nombre de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, inflammatoires et le diabète. Le rôle du stress oxydant dans le vieillissement a été même évoqué [49].

En outre, les huiles essentielles et les fractions volatiles en tant que sources de constituants phénoliques naturels retiennent l'attention des chercheurs, étant donné que ces derniers peuvent être appliqués dans les industries agroalimentaires et les préparations pharmaceutiques, afin de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui sont la cause de risques potentiels pour la santé [50].

Par exemple, les huiles essentielles de cannelle, clou de girofle, basilic, d'origan et de thym ont prouvé leurs pouvoirs antiradicalaires et antioxydants via le test radicalaire DPPH [51]. Pareillement, l'huile essentielle de *Cannabis sativa* (L.) riche en (E)-caryophyllène et oxyde de caryophyllène présente une capacité antioxydante puissante [52]. En effet, il a été démontré que les espèces riches en ces constituants, possèdent une bonne activité antioxydante [53].

De plus, il est à signaler d'une part, que les propriétés antioxydantes des huiles essentielles ne sont pas attribuées seulement à leurs constituants majoritaires [52]. Les composantes minoritaires pourraient également contribuer en synergie [54]. D'autre part, la capacité antioxydante de certaines huiles essentielles pourrait être attribuée à des constituants autres que les composés phénoliques comme les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures et les éthers. Comme exemple : les composés soufrés ont été rapportés comme possiblement responsables de l'effet antioxydant, c'est le cas de l'huile essentielle de *Cotinus coggryria Scop* [55].

### **I.2.2 Activité anti-inflammatoire :**

L'inflammation est une réaction biologique qui implique un processus complexe de réactions enzymatiques, généralement bénéfique pour l'organisme puisqu'elle lui permet de se défendre contre une agression externe comme les agents pathogènes et de réparer les lésions tissulaires [56].

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, afin de réduire le gonflement et la douleur de l'inflammation. Ces molécules bien qu'étant efficaces, seulement elles présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation à long terme.

À cette raison, on a le plus souvent recours aux plantes médicinales qui sont très utilisées en médecine traditionnelle pour soulager les malades atteints de certaines affections inflammatoires telles que l'arthrite, l'asthme et les ulcères gastriques et duodénaux [57].

D'où les espèces du genre *Centaurea* qui font l'objet de notre étude : ces derniers sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle contre les maladies inflammatoires et la cicatrisation des plaies. Parmi ces espèces, on cite : *Centaurea iberica*, *Centaurea virgata Lam* et *Centaurea pterocaula Trautv* qui sont employées comme remède pour la cicatrisation des plaies [58].

En Afrique de l'Ouest, la partie aérienne de *Centaurea perrottetii DC* en poudre est appliquée pour la cicatrisation des plaies, tandis qu'en décoction elle est utilisée contre les maladies inflammatoires. Les sommités fleuries de *Centaurea cyanus L* en infusion sont employées pour soigner l'inflammation des yeux et de la peau [59].

En outre, les huiles essentielles ont également un rôle très important dans le traitement de l'inflammation en raison de leurs richesses en sources naturelles de composantes phénoliques. A titre d'exemple : les huiles essentielles possédant des aldéhydes, ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne, telle que l'huile essentielle de Gingembre [22]. Aussi, l'huile essentielle de Gaulthérie odorante qui est très utilisée dans les douleurs musculaires et les tendinites [11]. Ces substances actives, peuvent agir à plusieurs étapes dans la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion et la production des espèces oxygénées réactives [60].

### **I.2.3 Définition générale des gels**

Selon la Pharmacopée Européenne, 9<sup>ème</sup> édition, « les gels sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés ». Sur le plan physico-chimique, les gels peuvent être considérés comme un réseau tridimensionnel de macromolécules (agents gélifiants) renfermant des molécules d'eau [61]. Les chaînes polymères sont connectées entre elles, formant un réseau qui sert à retenir le liquide et qui donne au gel sa rigidité [62].

#### **a. La classification**

On distingue généralement deux types de gels :

- Les gels lipophiles (oléogels) : constitués généralement de la paraffine liquide additionnée de polyéthylène, ou des huiles végétales grasses gélifiées par la silice colloïdale.
- Les gels hydrophiles (hydrogels) : sont des préparations constituées de polymères hydrophiles dispersés dans l'eau purifiée et parfois additionnées d'excipients liquides hydrophiles tels que le glycérol, le propylène glycol ou l'éthanol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que : l'amidon, des dérivés de la cellulose et les carbomères.

Cependant, les hydrogels sont très répandus comme formes galéniques à usage cutané, particulièrement du fait de leur simple application sur la peau [63].

#### **b. Les agents gélifiants**

Les agents gélifiants des hydrogels peuvent être soit d'origine naturels tels que les amidons et les gommes, ou d'origine synthétiques tels que les polymères carboxyvinyliques (carbomères) et les dérivés cellulosiques. Ces derniers sont couramment employés dans la fabrication des gels

pharmaceutiques, en particulier le CARBOPOL qui est l'agent gélifiant de plusieurs spécialités pharmaceutiques [64].

Toutefois, il est très courant de trouver dans les formulations des hydrogels deux principales catégories d'additifs : les agents humectant, tels que le glycérol ou le propylène glycol dont le rôle est de retenir l'eau et éviter le craquellement des gels, et les agents conservateurs antimicrobiens essentiellement dans les préparations multidoses.

#### **I.2.4 Activité antibactérienne :**

Les plantes médicinales et leurs fractions volatiles, dévoilent une capacité antimicrobienne qui pourraient non seulement détruire ou inhiber la croissance des micro-organismes, notamment sur les souches antibio-résistantes mais aussi d'améliorer la sécurité alimentaire [65]. L'activité antibactérienne des huiles essentielles est attribuée aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. En effet, les molécules aromatiques possédant l'activité la plus importante sont les phénols contenus par exemple dans l'huile essentielle de clou de girofle [22]. Néanmoins, le mode d'action n'est pas clairement élucidé mais il semblerait que de par leurs hydrophobicités, qui leur donnent la particularité de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne, les huiles essentielles puissent se solubiliser altérant ainsi la structure et la fonctionnalité membranaires des bactéries [12].

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a fait l'objet de nombreux travaux. Sfeir *et al.*, ont évalué *in vitro* l'activité antibactérienne de 18 échantillons d'huiles essentielles à l'encontre de *Streptococcus pyogenes* via la méthode de diffusion sur disques. Ainsi, sur les 18 échantillons testés, 14 ont montré une activité antibactérienne à l'encontre de *Streptococcus pyogenes* et en particulier *Cinnamomum verum*, *Thymus vulgaris*, *origanum compactum* et *Satureja montana* [66]. Pareillement pour Andrade-Ochoa *et al.*, qui ont fait des essais sur plusieurs molécules issues des fractions volatiles à l'encontre de *Mycobacterium tuberculosis*. Toutes les molécules testées ont révélé une activité contre *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant le carvacrole, le thymol et l'acide cinnamique ont été les molécules les plus actives [67].

Lopez-Romero *et al.*, ont quant à eux démontré l'activité antibactérienne *in vitro* de plusieurs composants (carvéol, carvone, citronellol et citronellal) à l'encontre d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* [68].

#### **I.2.5 Activité antifongique :**

Dans le domaine de l'agroalimentaire et phytosanitaire, les huiles essentielles sont employées comme des agents de protection, contre les infections causées par les champignons



phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. En effet, ces derniers agissent sur un large spectre de moisissure et de levure, en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures [69].

L'action antifongique des constituants des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique par interaction avec les enzymes, suivie de la rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la destruction de la levure [70]. Toutefois, il s'est avéré que l'activité antifongique diminue selon le type de la fonction chimique : Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures. Or, les constituants actifs sont : les phénols monoterpéniques et aromatiques, les alcools monoterpéniques, les aldéhydes aromatiques, monoterpéniques et les lactones [6]. Par exemple :

- *Candida albicans* est sensible aux huiles essentielles d'origan, de thym vulgaire à thymol et de cannelle de ceylan.
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* est sensible aux huiles de sarriette et d'arbre à thé.
- *Pityriasis versicolor* est sensible aux huiles de lemongrass (le plus actif) et d'arbre à thé.

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis aux champignons pathogènes a fait l'objet de nombreux travaux [71], [72]. A titre d'exemple, certaines huiles essentielles sont actives *in vitro* sur les champignons responsables de mycoses et sur les levures du genre *Candida*. Parmi ces huiles on peut citer : *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Syzygium aromaticum* (giroflier) ou encore *Cinnamomun verum* (cannelle de Ceylan).

### **I.2.6 Activité neuroprotectrice :**

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des démences neurodégénératives. Elle est caractérisée par les pertes de mémoire, les dysfonctionnements cognitifs, le stress oxydatif, les dégénérescences neurofibrillaires, les troubles du comportement et les troubles neurologiques dans les zones du cerveau [73].

La découverte d'inhibiteurs d'enzymes est une stratégie importante pour trouver des médicaments efficaces pour le traitement de nombreuses maladies y compris la maladie d'Alzheimer (cholinestérases). En effet, l'inhibition du cholinestérase n'est pas seulement la base du traitement de la maladie d'Alzheimer mais est également considérée comme une stratégie prometteuse pour le traitement de la démence, de la myasthénie et de la maladie de parkinson.

Deux cholinestérases ont été identifiées chez l'être humain, elles se distinguent par leur origine, leur structure, leur lieu de synthèse et leur fonction physiologique. La première est l'acétylcholinestérase (AChE), son rôle physiologique est d'assurer le fonctionnement des synapses acétylcholinergique, tout en évitant l'accumulation du neurotransmetteur. Tandis que la seconde butyrylcholinestérase (BChE) représente la cholinestérase prédominante du cerveau, son rôle physiologique n'est actuellement pas connu [74].

Bien que cette classe de produits chimiques ait démontré son efficacité pour cette pathologie, néanmoins elle a dévoilé aussi ses limites. Effectivement, plusieurs inhibiteurs de l'AChE tels que la tacrine, le donépézil, et la galanthamine ont été approuvés par la US Food and Drug Administration (US-FDA). Seulement des rapports ultérieurs déclarent que ces médicaments ont des effets indésirables, notamment les troubles gastro-intestinaux et des problèmes liés à la biodisponibilité.

À cet égard, le développement et la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels de la cholinestérase, sûr et dotés de meilleures propriétés, est donc nécessaire pour la prévention et le traitement de la maladie.

Pour cela, les huiles essentielles ont été proposées comme une stratégie alternative de prévention et de traitement contre le vieillissement et les troubles neurodégénératifs. De nombreuses études ont rapporté le potentiel neuroprotecteur des huiles essentielles et leurs composantes [75]. A titre d'exemple, les huiles essentielles de : *Cinnamomum sp.* [76] *Salvia sp.* [77], *Lavandula sp.* [78] et *Artemisia sp.* [79].

Par ailleurs, il a été rapporté que l' $\alpha$ -pinène, le linalol, le  $\beta$ -caryophyllène et l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène ont une activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) [80]. De plus, l'huile essentielle de *C. serpyllifolium* constituée de l' $\alpha$ -pinène, le 1,8-cinéole, le limonène et le caryophyllène a montré que ces constituants en synergie sont de puissants inhibiteurs de l'AChE [81].

## **I.3 Description botanique et ethnobotanique du genre *Centaurea***

### **I.3.1 Présentation de la famille des Astéracées**

La famille des Astéracées (synonyme : Composées) est la plus vaste de la flore du monde, avec près de 17 tribus et environ 25 000 espèces groupées en 1300 genres répandues à travers notre planète. En Algérie, elle compte environ 408 espèces réparties en 109 genres et plus. Les principaux genres du point de vue le nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), et *Centaurea* (600 espèces) [82].

Elle est caractérisée principalement par des plantes herbacées, des arbustes ou sous arbrisseaux et parfois des arbres. Il s'agit d'une famille cosmopolite, elle est distribuée dans les régions tropicales, subtropicales semi-arides et les régions tempérées [83].

Cette vaste famille est économiquement importante étant donné que plusieurs de ses espèces sont utilisées en cosmétiques et en pharmacie, tels que : l'armoise (*Artemisia vulgaris*), la camomille (*Matricaria chamomilla* L.), le millefeuille (*Achillea millefolium*) et le pissenlit (*Taraxacum officinale*). De plus, cette famille possède des plantes alimentaires, tels que : la laitue (*Lactuca*), l'artichaut (*Cynara*), l'endive, l'estragon et le tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le zinnia, le chrysanthème et l'aster [84].

### **I.3.2 Descriptions botanique et ethnobotanique du genre *Centaurea***

Le genre *Centaurea* (tribu *Cynareae*) appartenant à la famille des Astéracées est l'un des genres les plus répandus dans le monde. Il est reparti non seulement sur le territoire algérien avec près de 45 espèces mais aussi en Europe, Asie, Afrique, Amérique du nord et Australie avec environ 700 espèces et 600 sous-espèces [85].

Selon **Quezel et Santa (1963)**, les *centaurées* sont des espèces herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Comme pour toutes les composées, les fleurs ou fleurons, sont disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes, celle de la périphérie s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le violet et le pourpre, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (le plus souvent) ou épineuses [86].

Les espèces de ce genre se rencontrent sur différents types d'habitats comme : les déserts et les semi-déserts, les pentes raides, les hautes montagnes, les terres arables, les zones à inondations périodiques, les zones sèches et partiellement exposées au soleil [87]. Toutefois, de point de vue taxonomique, ce genre est jugé difficile en raison de la grande variabilité caryologique, morphologique et des confusions nomenclaturales.

#### a. Description botanique de *Centaurea acaulis*

*Centaurea acaulis* L., (synonyme de *Menomphalus acaulis* (L) Pomel) est une magnifique *centaurea* qui semble surgie de terre. Son nom vernaculaire arabe est : Nagour ou Neggar, et la partie racinaire se nomme : REJAGNOU [86]. Cette espèce endémique Algéro-tunisienne est naturalisée en Espagne et en Sicile, mais très rare en France [88].

C'est une plante saharienne vivace qui s'expose en plein soleil. Son développement est très lent, ne peut être appelé à figurer parmi les espèces tinctoriales cultivées. Elle est glabre, multicaule, élancée et rigide. Les fleurs sont jaunes ou jaunâtres et les feuilles lancéolées, entières lobulées à la base, coriaces et pétiolées. Cette espèce possède de gros capitules bractées avec 3-7 épines latérales courtes et les akènes sont jaune clair, soit sans aigrette soit à aigrette double [89]. Elle nécessite un sol drainant. Tolère les sols pauvres et la sécheresse. Suffisamment robuste pour réussir en extérieur dans de nombreuses parties du pays [90].



**Figure 4.** *Centaurea acaulis* L

#### b. Description botanique de *Centaurea pullata*

En latin, *Pullata* vient de « *Pullatus* » ce qui signifie la couleur noire, cette attribution de nom est dû aux bordures noires des bractées. Elle est aussi appelée *Melanoloma Pullatum* L, *Centauree* en deuil, et bordée de noire. Ses noms arabes sont : Seguia, Achbet el Ganfoud, Djouz, Achbet Ennça et chham El Aoud [91].

En Algérie, cette espèce est répartie dans les lieux frais, les pâturages, les talus herbeux et au bord des routes du littoral dans la région de Tell Selon Quezel et Santa. C'est une plante qui pousse en Europe occidentale, en Afrique du Nord, en France et en Espagne [92].

*C. Pullata* est une plante annuelle, bisannuelle ou vivace, de taille très variable. C'est une espèce très polymorphe quant à la couleur des fleurs du capitule, qui sont généralement purpurines, parfois jaune pâle ou blanchâtre. Les feuilles velues souvent entières, les fruits blanchâtres sont couverts de poils et les tiges varient de 10 à 50 cm de hauteur [91].



**Figure 5.** *Centaurea Pullata L.*

**c. Description botanique de *Centaurea sulphurea***

*Centaurea sulphurea* est une espèce originaire du sud-ouest de l'Europe. Ce chardon a été introduit accidentellement en Californie en 1923 [93]. Son aire de répartition est très restreint en Espagne et au Maroc. Elle est synonyme de : l'étoile de silice, chardon étoilé sicilien ou *centaurée étoilée*. Ses noms vernaculaires arabe sont : Bejjâ nhal et Bûneggir. Non répertoriée dans les flores classiques, nous avons très peu d'informations sur cette plante [94].

Cette espèce herbacée annuelle est une plante rigide de 40-60cm. Ses fleurs sont jaunes soufrés épineuses non rayonnantes, terminaux et solitaires. Les feuilles sont vertes-bleutés. Les tiges sont soit simples, soit rameuses et divariquées. Le capitule est à bractée à marge apicale muni de 2-3 paires de cils épineux latéraux et d'une épine médiane non ramifiée, souvent noirâtre à la base [95]. Elle se rencontre souvent dans les champs, les pâturages et les clairières.



**Figure 6.** *Centaurea Sulphurea Willd.*

### **I.3.3 Principaux métabolites secondaires identifiés dans le genre *Centaurea***

Les investigations phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *centaurée*, montrent qu'ils sont une source importante dans le règne végétal, ils produisent de nombreux métabolites secondaires aux structures et fonctions très variés, particulièrement les lactones sesquiterpéniques, les flavonoïdes, les composés acétyléniques, les alcaloïdes et les stéroïdes.

Les composés qui caractérisent ce genre sont connus par la diversité de leurs activités biologiques, notamment l'activité antioxydante, anti-tumeur, antimicrobienne, hypothermique et cytotoxique [96]. De plus, ils jouent un rôle de défense contre les herbivores.

### **I.3.4 Utilisations traditionnelles**

Ce genre est connu depuis longtemps dans la médecine populaire par sa richesse en substances naturelles curatives, utilisées contre plusieurs maladies [96]. *Centaurea pullata*, a un effet analgésique contre les douleurs abdominales, elle est principalement utilisée pour augmenter la tension artérielle. Ainsi, elle est couramment utilisée en Algérie comme assaisonnement et dans la préparation d'un plat traditionnel local appelé « El Hammama » [97].

Les feuilles fraîches de *Centaurea sulphurea* sont appliquées en cataplasme pour soigner les blessures [98]. Par ailleurs, *Centaurea acaulis* a des propriétés astringentes, anti-inflammatoires et antipyrétiques. En usage interne, la racine desséchée est employée pour arrêter les hémorragies et provoquer les vomissements. Elle guérit les œdèmes, l'épilepsie et la manie. Aussi, on l'emploie dans le traitement des rhumes, des vertiges, des céphalées et des paralysies. En frictions ou en cataplasmes, la plante semble intervenir dans le traitement de la gale, les boutons d'acné, les chancres syphilitiques, les abcès et les furoncles [99].



# **CHAPITRE II :** **ETUDE CHIMIQUE**

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la description de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits à l'hexane de trois espèces du genre *Centaurea* appartenant à la famille des astéracées. Pour ce faire, nous avons établie une approche analytique basée sur la séquence analytique présentée dans le premier chapitre.

Plus précisément, il s'agit d'étudier la variabilité chimique à travers différents sites de récoltes et d'évaluer la composition chimique tout au long du cycle de vie du végétal. De plus, l'isolement, la purification et l'identification du constituant absent de la banque des données, afin de le caractériser et produire des connaissances scientifiques relatifs à ce constituant.

## **II.1 Etude de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis***

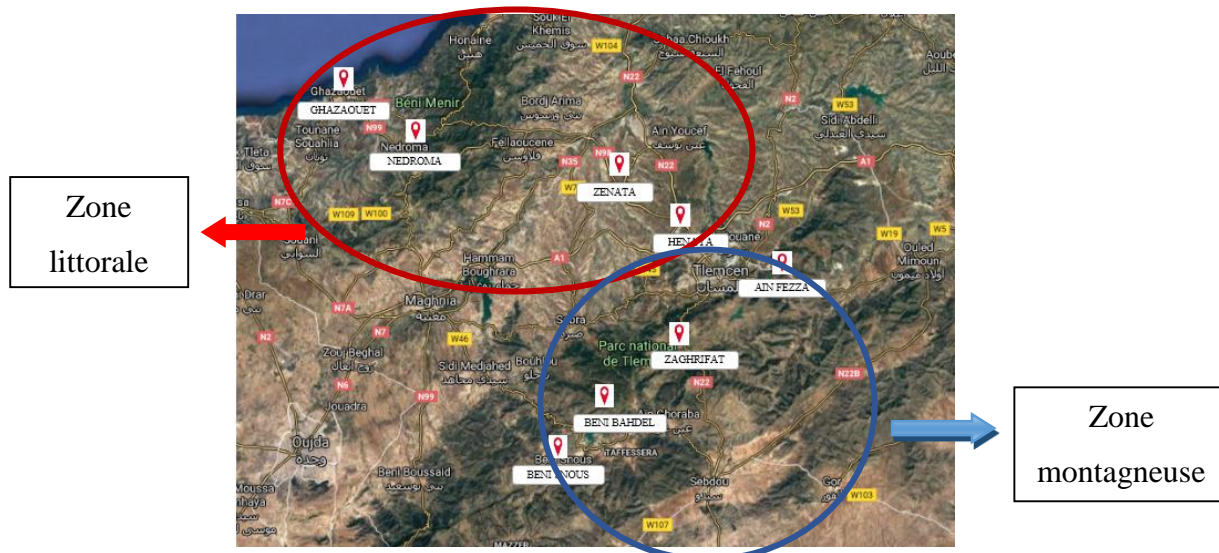
D'après la recherche bibliographique effectuée, une seule publication traite la composition chimique de la partie aérienne de *Centaurea choulettiana* Pomel (synonyme de : *C. acaulis* L) récoltée à M'sila. Les résultats de cette étude ont révélé une composition chimique différente qui est caractérisée par une forte proportion en sesquiterpènes oxygénés, dont le constituant majoritaire : le Phthalate [100].

À notre connaissance, nous décrivons pour la première fois l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires réalisée à partir de spécimens en pleins floraison, localisés dans huit stations de la région Ouest de l'Algérie. En complément, nous nous sommes intéressés à l'étude de la caractérisation chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de cette espèce.

### **II.1.1 Lieux de récolte et rendements**

Les échantillons des parties aériennes et racinaires de l'huile essentielle de *C. acaulis* ont été récoltés sur (08) sites de la région de Tlemcen (Algérie) où elle pousse de façon spontanée. Ces lieux sont repartis en deux zones principales (Figure 7, Tableau 1). Les stations S1 à S4 proviennent des zones littorales (altitude entre 36 à 428 m), et les stations S5 à S8 sont situées dans des zones montagneuses (altitude entre 600 à 980 m).





**Figure 7.** Spécimens de *C. acaulis* récoltés dans la wilaya de Tlemcen

Il est à noter que les rendements d'extractions des huiles ont été calculés par rapport à la masse sèche de la plante. En effet, les huiles essentielles extraites des parties aériennes ont donné une huile jaune pâle avec des rendements variables de 0,2 à 0,6%, tandis que les huiles extraites des parties racinaires ont donné une huile jaune avec des rendements légèrement plus élevés (0,2-0,7%) (Tableau 1). Certaines informations concernant les huit sites de récoltes (origines, altitudes et rendements) sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1 :** Répartition géographique et climatologique des huit échantillons de *C. acaulis*

Zones	Sites de récoltes	N° Voucher	Coordonnées GPS	Climats	Alt (m)	Rendements en huiles essentielles %		
						Parties aériennes	Parties racinaires	
Zone 1	S1	GHAZAOUET	C.a 0118	35°06'48"N;1°50'04"O		36	0,6	0,7
	S2	NEDROMA	C.a 0218	35°01'38"N;1°09'45"O	Humide	185	0,3	0,6
	S3	ZENATA	C.a 0318	34°70'03"N;1°27'30"O		280	0,6	0,5
	S4	HANNAYA	C.a 0418	34°58'90"N;1°27'15"O		428	0,5	0,5
S5	AIN FEZZA	C.a 0518	34°86'70"N;1°23'30"O	900		0,4	0,5	
Zone 2	S6	ZAREFET	C.a 0618	34°52'20"N;1°19'08"O	Humide et plus Frais	980	0,2	0,2
	S7	BENI BAHDEL	C.a 0718	34°43'00"N;1°31'00"O		600	0,3	0,4
	S8	BENI SNOUS	C.a 0818	34°39'22"N;1°33'04"O		850	0,2	0,3

D'après le tableau 1 : on remarque que les rendements les plus élevés (0,6-0,7%) ont été observés pour les échantillons de la station S1 située à basse altitude (36 m) avec un climat humide, en revanche les rendements les plus faibles (0,2-0,2%) ont été obtenus pour les échantillons de la station S6 située à haute altitude (980 m) avec un climat humide et plus frais, pour les deux parties de la plante, respectivement.

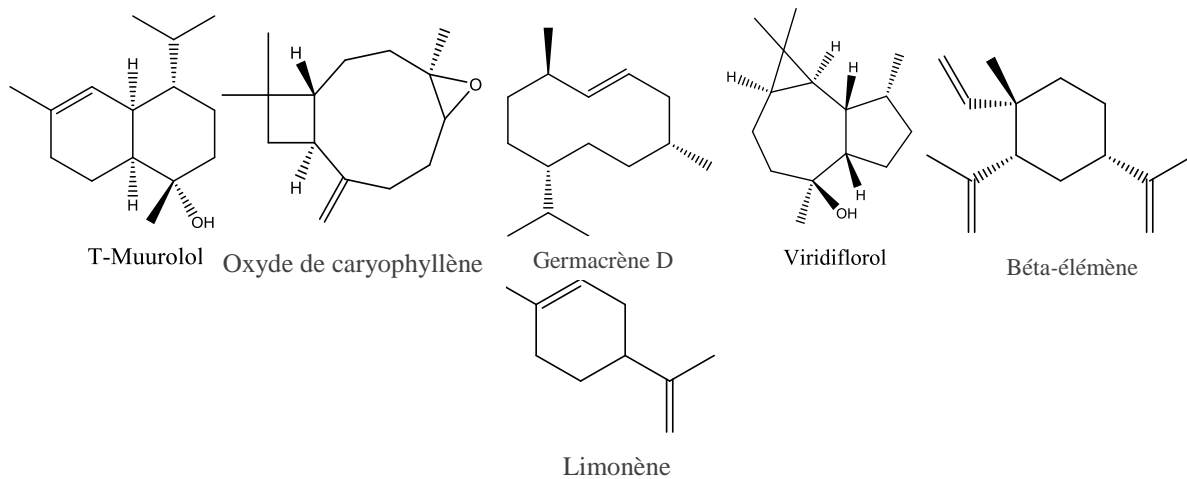
D'après ces résultats, on remarque une corrélation positive entre l'augmentation en huile essentielle et les faibles altitudes. Par conséquent, la culture de cette espèce dans des sites littoraux, de basse altitude et de climat humide, semble être appropriée pour l'obtention de rendements en huiles essentielles optimaux.

### **II.1.2 Analyse préliminaire de l'huiles essentielle de la partie aérienne et racinaire de *C. acaulis***

L'analyse préliminaire des parties aériennes et racinaires de 08 échantillons d'huiles essentielles individuelles a permis d'obtenir des profils chromatographiques qualitativement similaires se différenciant toutefois par les teneurs des constituants majoritaires. Tous les échantillons des huiles essentielles individuelles ont été rassemblés afin de constituer un échantillon collectif noté 'HEcoll'. Ce dernier a été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne afin de détailler et améliorer l'analyse de la composition chimique qui a été réalisée par CPG et CPG/SM.

L'analyse préliminaire de l'huile essentielle collective des parties aériennes a permis l'identification de 81 composés représentant 93,7% de la composition chimique totale du mélange (Tableau 2). L'huile collective est caractérisée par l'abondance des composés sesquiterpéniques, d'où les composés oxygénés (31,4%) sont largement supérieurs aux composés hydrocarbonés (22,7%). Les principaux composants de cette classe sont le  $\tau$ -muurolol (8,8%), l'oxyde de caryophyllène (5,9%),  $\beta$ -élémane (3,4%), germacrène D (3,5%) et le viridiflorol (3,7%). Suivie des composés monoterpéniques, dont les hydrocarbonés (13,7%) sont supérieurs comparés aux oxygénés (7,1%). Le principal constituant de cette classe est le limonène (11,1%). Cependant, les constituants non-terpéniques étaient présents en faible quantités (15,6%) avec l'acide hexadécanoïque (4,6%) comme constituant principal (Tableau 2).

Tous les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention et spectres de masse avec ceux enregistrés dans la bibliothèque « Aromes » propre au laboratoire de Corse.



**Figure 8.** Structures chimiques des principaux constituants de la partie aérienne de l'huile essentielle de *C. acaulis*

**Tableau 2:** Composition chimique des huit échantillons d'huiles essentielles des parties aériennes de *C. acaulis* :

No, <sup>a</sup>	Composés	RIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	HE coll <sup>e</sup>	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	Identification <sup>f</sup>
1	$\alpha$ -Pinène	930	931	1022	1,6	2,9	3,9	4,1	3,2	0,2	0,1	0,2	0,1	IR, SM
2	Sabinène	964	964	1113	0,4	0,3	0,7	2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	IR, SM
3	$\beta$ -Pinène	970	972	1110	0,9	1,4	0,5	1,2	0,4	0,4	0,2	1,3	2,1	IR, SM
4	Myrcène	981	976	1159	1,9	3,3	4,5	3,2	1,6	0,1	0,2	0,6	0,5	IR, SM
5	2-pentylfuran	982	983	1231	1,9	2,0	2,6	2,2	1,1	2,6	2,3	1,4	1,0	IR, SM
6	p -Cymène	1014	1011	1268	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,2	IR, SM
7	Limonène	1025	1020	1199	11,1	5,3	1,9	5,1	3,1	19,2	22,1	17,5	15,2	IR, SM
8	Z- $\beta$ -Ocimène	1026	1024	1230	0,3	0,2	0,5	1,1	0,1	tr	tr	0,1	0,2	IR, SM
9	E- $\beta$ -Ocimène	1037	1034	1247	0,4	0,1	0,5	1,9	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	IR, SM
10	$\beta$ -Terpinène	1045	1047	1250	0,4	0,2	1,0	1,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	IR, SM
11	Cis-6-Nonénal	1080	1083	1394	1,3	1,3	1,5	0,8	0,9	1,0	1,6	1,8	1,2	IR, SM
12	Nonanal	1083	1082	1394	1,3	0,5	1,7	0,4	2,5	0,6	3,2	1,2	0,5	IR, SM
13	Linalol	1088	1087	1934	0,7	0,3	0,3	2,0	0,1	0,1	0,2	2,1	0,6	IR, SM
14	$\alpha$ -Pinène-oxide	1098	1096	1387	0,3	0,2	0,1	0,5	1,1	0,3	0,1	0,3	tr	IR, SM
15	$\alpha$ -Campholenaldehyde	1107	1103	1485	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	IR, SM
16	trans-Pinocarvéol	1126	1125	1650	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	IR, SM
17	Cis- verbénol	1132	1127	1655	2,6	2,9	1,2	3,2	2,5	2,6	3,6	2,5	2,1	IR, SM
18	Pinocarvone	1136	1136	1558	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	IR, SM
19	$\alpha$ -Pinocamphone	1141	1151	1535	0,5	0,3	0,5	tr	0,1	0,2	0,4	0,3	2,0	IR, SM
20	cis-6-Nonén-1-ol	1152	1156	1687	0,2	0,2	0,3	tr	0,5	0,3	tr	0,1	tr	IR, SM
21	cis-2-Nonén-1-ol	1158	1158	1688	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	1,0	0,2	0,2	IR, SM
22	Terpinène-4-ol	1164	1161	1600	0,2	0,5	0,4	tr	0,3	0,3	tr	0,1	tr	IR, SM
23	Méthyl salicylate	1170	1173	1731	0,1	0,1	tr	tr	0,3	0,1	tr	0,2	0,1	IR, SM
24	Myrténal	1172	1173	1628	0,5	0,2	0,5	0,1	1,1	0,1	0,6	0,5	1,2	IR, SM
25	$\alpha$ -Terpinéol	1175	1179	1700	0,1	0,1	0,3	tr	0,1	0,1	tr	0,2	0,3	IR, SM
26	Safranale	1177	1177	1621	0,1	0,2	0,2	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	IR, SM
27	Myrténol	1182	1183	1789	0,2	0,3	0,5	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1	IR, SM
28	Verbénone	1183	1184	1707	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	0,2	tr	0,2	0,1	IR, SM
29	Décane	1185	1186	1498	0,8	0,1	0,8	1,3	1,3	1,1	0,6	0,1	1,2	IR, SM
30	$\alpha$ -Campholéol	1186	1187	1782	0,3	tr	0,2	0,3	0,8	0,1	0,6	0,2	tr	IR, SM
31	trans-Carveol	1201	1196	1832	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	tr	0,2	IR, SM
32	Carvone	1222	1222	1739	0,3	0,1	0,2	0,1	tr	0,6	0,5	0,4	0,3	IR, SM
33	carvacrol méthyl-éther	1229	1231	1603	0,0	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,2	tr	IR, SM
34	Pipéritone	1230	1232	1730	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	0,1	IR, SM
35	Tridécane	1300	1300	1300	0,8	tr	0,5	1,6	0,3	0,2	1,2	1,6	1,5	IR, SM
36	Acétate de néryle	1341	1342	1725	0,2	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	IR, SM
37	Acétate de géranyle	1367	1361	1752	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	tr	tr	IR, SM
38	$\alpha$ -Copaène	1373	1379	1458	0,6	0,6	1,1	0,6	0,4	1,7	0,6	tr	tr	IR, SM
39	$\beta$ -Elémène	1385	1388	1589	3,4	0,6	0,1	3,0	0,1	0,1	7,5	8,0	7,7	IR, SM
40	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1418	1424	1580	1,7	8,4	3,5	3,4	3,9	0,6	0,1	0,2	tr	IR, SM
41	$\alpha$ -Humulène	1449	1456	1635	0,7	2,0	0,8	0,7	1,2	1,3	tr	tr	tr	IR, SM
42	$\beta$ -Ionone	1464	1466	1936	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,1	tr	tr	tr	IR, SM
43	$\beta$ -Muuroolène	1471	1471	1681	3,4	0,3	0,5	1,3	1,2	5,4	4,3	6,5	8,5	IR, SM
44	Dodécane	1472	1475	1971	0,3	tr	0,4	0,8	0,6	0,9	tr	tr	tr	IR, SM
45	Germacrène D	1477	1480	1704	3,5	8,7	1,5	2,1	1,2	1,3	5,1	1,6	6,5	IR, SM
46	$\beta$ -Sélinène	1481	1483	1712	0,7	tr	1,2	2,6	0,7	0,8	tr	tr	tr	IR, SM
47	4-epi-cubébol	1487	1486	1870	0,3	tr	0,4	0,8	0,8	0,9	tr	tr	tr	IR, SM
48	Bicyclogermacrène	1490	1494	1727	0,6	tr	1,0	0,7	0,6	2,5	tr	tr	tr	IR, SM
49	$\alpha$ -Muuroolène	1491	1496	1719	0,1	0,4	0,2	0,1	0,6	0,2	tr	tr	tr	IR, SM
50	$\alpha$ -Sélinène	1493	1495	1500	0,3	tr	1,3	0,3	0,9	0,1	tr	tr	tr	IR, SM

51	E,E- $\alpha$ -Farnésène	1506	1498	1744	0,3	tr	0,3	0,4	0,8	0,6	tr	tr	tr	IR, SM
52	$\beta$ - Cadinène	1509	1507	1752	0,1	tr	0,1	0,2	0,9	0,5	tr	tr	tr	IR, SM
53	Trans-Calamenène	1511	1512	1816	1,2	tr	0,1	0,5	0,2	1,9	0,2	3,5	0,1	IR, SM
54	$\delta$ -Cadinène	1513	1516	1752	0,8	1,7	1,1	0,5	0,3	0,2	1,3	1,1	0,5	IR, SM
55	$\alpha$ -Cadinène	1539	1535	1743	0,4	tr	1,3	0,7	0,1	0,8	tr	tr	tr	IR, SM
56	$\beta$ -Calacorène	1541	1548	1939	0,1	tr	0,4	0,2	0,2	tr	tr	0,2	tr	IR, SM
57	E- nérolidol	1550	1564	2037	0,6	tr	1,1	0,1	tr	tr	1,2	1,5	0,9	IR, SM
58	1,5-Epoxy-salvial-4(14)-ène	1552	1560	1948	0,4	0,6	0,5	0,2	0,5	1,2	0,1	0,2	tr	IR, SM
59	(Z)-Hex-3-ényle benzoate	1554	1552	2088	0,0	tr	tr	0,3	tr	tr	tr	tr	tr	IR, SM
60	Germacrène D-4-ol	1567	1573	2025	0,7	0,1	0,2	1,6	1,2	0,2	0,8	0,7	0,5	IR, SM
61	Spathulénol	1568	1557	2119	1,9	0,5	0,2	0,8	0,6	1,2	2,3	2,6	3,1	IR, SM
62	Oxyde de caryophyllène	1571	1576	1980	5,9	6,8	9,9	6,2	8,4	1,8	2,2	2,5	2,6	IR, SM
63	Globulol	1578	1580	2074	0,9	0,5	0,2	0,6	0,8	1,3	1,3	1,2	1,0	IR, SM
64	Salvial-4(14)-en-1-one	1579	1578	1592	1,3	0,1	1,9	0,8	2	4,3	0,5	0,4	0,2	IR, SM
65	Tridecanol	1580	1856	2035	0,1	0,1	tr	0,2	tr	0,2	tr	tr	tr	IR, SM
66	Viridiflorol	1585	1591	2089	3,7	5,5	8,6	6,5	8,1	0,4	0,2	0,1	0,3	IR, SM
67	$\beta$ -Aplophenone	1591	1593	2023	1,3	tr	0,6	0,8	3,5	1,8	2,1	0,9	0,8	IR, SM
68	2-Epoxide humulène	1594	1601	2044	2,0	1,5	2,1	1,7	2,9	2,8	1,6	2,2	1,5	IR, SM
69	epi-Cubébol	1623	1624	2059	1,9	1,0	2,5	2,3	2,1	1,9	2,2	2,0	1,0	IR, SM
70	$\tau$ -Cadinol	1628	1632	2169	0,8	1,5	1,8	1,1	0,8	0,6	0,2	0,1	0,2	IR, SM
71	$\tau$ -Muurolol	1636	1634	2143	8,8	3,1	3,9	2,5	4,5	12,6	13,6	17,2	14,2	IR, SM
72	$\beta$ -Eudésmol	1639	1644	2232	2,2	2,8	1,6	2,2	2,0	2,8	1,9	1,5	2,1	IR, SM
73	$\alpha$ -Cadinol	1642	1645	2231	1,5	5,4	4,5	3,8	4,5	0,7	0,3	0,6	0,2	IR, SM
74	$\alpha$ -Eudésmol	1654	1653	2220	1,2	1,3	2,0	1,7	1,4	1,1	0,9	0,6	0,4	IR, SM
75	14-Hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllène	1657	1656	2111	0,2	0,6	tr	0,1	0,4	0,2	tr	0,1	0,1	IR, SM
76	Eudésma-4(15),7-dièn-1- $\beta$ -ol.	1673	1672	2347	0,9	tr	tr	3,0	0,2	1,1	0,8	0,5	2,5	IR, SM
77	Cis-trans Farnésol	1682	1682	1687	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	0,2	0,1	tr	0,1	IR, SM
78	Hexahydrofarnesyl acétone	1829	1831	2698	0,4	0,5	0,6	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,1	IR, SM
79	Acide hexadécanoïque	1958	1954	2824	4,6	10,8	7,6	7,3	6,3	1,2	1,3	1,6	1,2	IR, SM
80	(Z)-phytol	2069	2080	2572	0,9	0,1	3,2	0,2	tr	1,5	tr	0,1	1,8	IR, SM
81	(E)-phytol	2100	2107	2617	2,2	1,1	1,2	1,3	1,8	4,3	5,6	4,8	5,6	IR, SM

Identification %	93,7	91,1	97,1	98,8	91,1	96,1	98,7	97,9	95,9
Monoterpènes oxygénés	7,1	6,5	6,6	8,2	8,5	6,4	7,4	8,6	8,1
Monoterpènes hydrocarbonés	13,7	13,4	13,3	19,6	8,7	20,1	22,9	20,1	18,5
Sesquiterpènes hydrocarbonés	22,7	23,0	14,6	17,1	14,1	18,4	19,1	21,1	23,3
Sesquiterpènes oxygénés	31,4	31,4	41,7	36,3	44,1	35,9	32,3	34,9	31,7
Composés non-terpéniques	15,6	15,6	16,1	15,3	13,9	8,6	11,4	8,3	6,9
Diterpènes oxygéné	3,2	1,2	4,8	2,3	2,6	6,7	5,6	4,9	7,4

Stations: (A1) Ghazaouat, (A2) Nedroma, (A3) Zenata, (A4) Hennaya, (A5) Ain fezza, (A6) Zarifet, (A7) Beni bahdel, (A8) Beni snous,

<sup>a</sup> L'ordre d'élution donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax

<sup>e</sup> Huile essentielle collective

<sup>f</sup> IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique,

HE coll : Huile essentielle collective,

L'analyse de routine de l'huile essentielle collective des parties racinaires a conduit à l'identification de 52 constituants représentant 94,8% de la composition chimique du mélange. Cependant, nos bibliothèques spectrales se sont avérées non opératoires pour identifier le composant majoritaire de l'huile essentielle (N°46 du Tableau 3).

Afin d'assurer l'identification du composé majoritaire, l'acquisition des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , spectre de masse et IR ont été réalisés directement sur la fraction hydrocarbonée dans laquelle le constituant majoritaire a été concentré et obtenue avec un rendement moyen de (0,5 g) à la suite de la séparation de l'huile essentielle collective par chromatographie sur colonne. Par la suite, à partir des spectres obtenus, nous avons procédé à l'extraction des valeurs des déplacements chimiques de la molécule.

### ➤ Spectre RMN $^1\text{H}$

Le spectre RMN $^1\text{H}$  affiche trois unités d'alcènes 1,2-disubstituées et une double liaison terminale ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ) correspondant aux signaux à 5.26-5.46 (6H) et à 5.74-5.88(1H) ppm qui apparaissent comme un doublet de doublet de triplet avec  $J(\text{H}, \text{H})=16,9 ; 10,2$  et  $6,7$  Hz. Deux groupements  $\text{CH}_2$  doublement allyliques et trois groupements  $\text{CH}_2$  monoallyliques correspondant à 2 multiplets aux signaux  $\delta\text{H}=2.74-2.87$  ppm (4H) et  $\delta\text{H}=2.0-2.16$  ppm(6H), tableau 3. Le triplet à  $\delta\text{H}=0,98-1,02$  ppm (3H,  $J=7,5\text{Hz}$ ) correspondant au groupe  $\text{CH}_3$  du groupement  $\text{CH}_3\text{CH}_2$  attaché à un centre oléfinique. (Figure 9).

**Tableau 3:** Déplacements chimiques des protons ( $\text{CDCl}_3$ , 400.13 MHz)

Protons	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	Attribution	Constante de couplage (Hz)
26, 27, 28	0.98-1.02	3H, t	$J = 7.5$
6,7,8,9,10,11	1.23-1.46	6H, m	
4,5,12,13,24,25	2.0-2.16	6H, m	
16,17,20,21	2.74-2.87	4H, m	
2	4.89-4.97	1H, ddt	$J = 1.2, 2.3, 10.2$ Hz
1	4.94-5.04	1H, ddt	$J = 1.5, 2.2, 17.1$ Hz
14,15,18,19,22,23	5.26-5.46	6H, m	
3	5.74-5.88	1H, ddt	$J = 6.7, 10.2, 16.9$ Hz

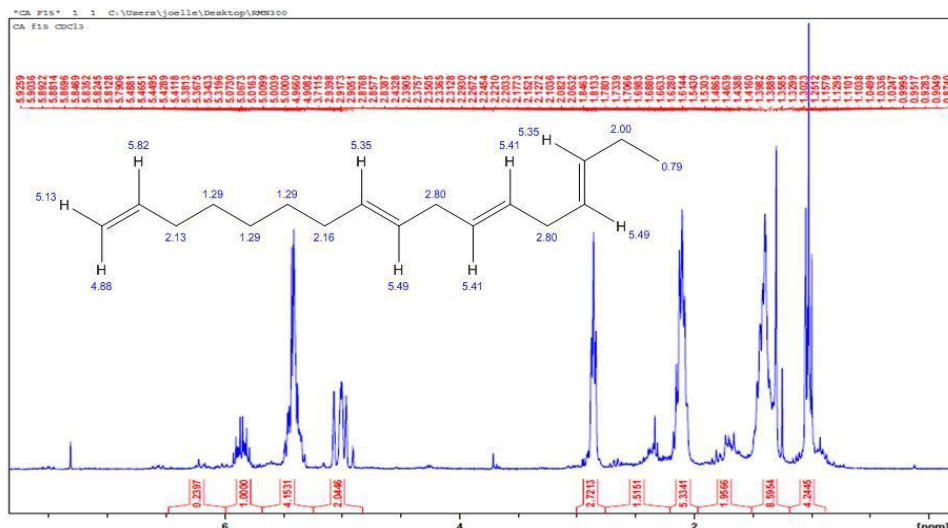



Figure 9. Spectre RMN du proton de l'apolotaxène

➤ Spectre RMN <sup>13</sup>C

Les données de RMN<sup>13</sup>C ont montré la présence de 17 atomes de carbones, dont huit carbones éthyléniques, (deux carbones proviennent d'un vinyle terminal ; δ= 115,2-139,0). (Tabelau 4, Figure 10).

Le spectre DEPT 135 a confirmé la présence de sept groupes CH oléfiniques, un groupe méthylidène, huit groupes alkyle CH<sub>2</sub> et un groupe méthyle (δ= 14,2-35,0). Les valeurs des déplacements chimiques oléfiniques suggèrent l'absence de fonction organique oxygénée. (Figure 11).

Tableau 4: Déplacements chimiques des carbones (CDCl<sub>3</sub>, 101.13 MHz)

Carbones	RMN <sup>13</sup> C δ (ppm)	RMN <sup>13</sup> C δ (litt)	(Z,Z,Z)-Heptadeca- 1,8,11,14-tetraene. 
1	115,2	115,7	
2	139,1	139,1	
3	33,9	33,8	
4	29,7	29,8	
5	29,8	29,5	
6	30,0	30,7	
7	33,8	33,9	
8	130,2	130,3	
9	127,1	127,3	
10, 13	35,0	35,7	
11, 12	128,8	128,4	
14	128,2	128,0	
15	132,2	132,0	
16	20,5	20,6	
17	14,2	14,3	

δ (litt) : Déplacements chimiques décrits dans la littérature [101], [102] ;  
 δ : Déplacements chimiques observés dans le spectre.

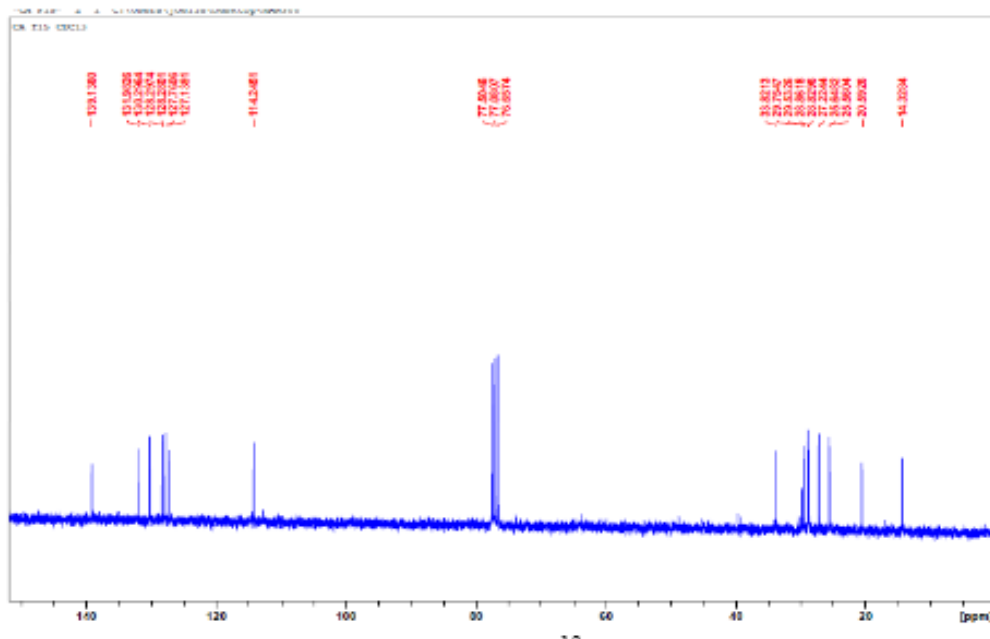


Figure 10. Spectre RMN<sup>13</sup>C d'aplotaxène

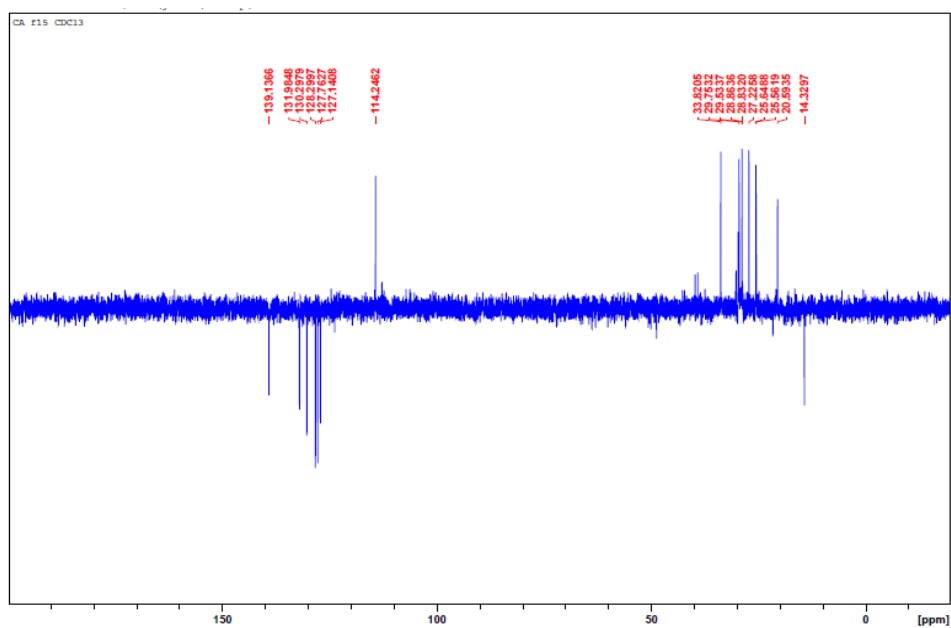


Figure 11. Spectre RMN<sup>13</sup>C -DEPT 135 d'aplotaxène



### ➤ Spectre IR

Les bandes caractéristiques en Infrarouge sont :  $\nu = 3290 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux C-H éthyléniques,  $\nu = 2900\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$  correspond au C-H alcanes,  $\nu = 1640 \text{ cm}^{-1}$  correspond au C=C éthyléniques.

De plus, plusieurs bandes dans les alentours de  $\delta = 915 \text{ cm}^{-1}$  correspondent aux bandes de déformations des C-H éthyléniques en dehors du plan. (Figure 12).

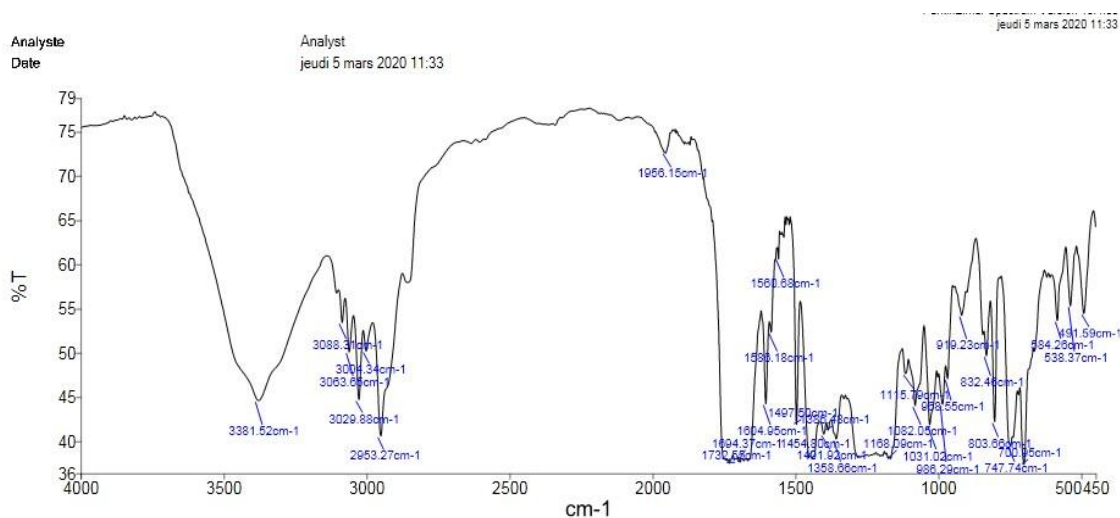


Figure 12. Spectre Infrarouge d'aplotaxène

### ➤ Spectre de Masse

Le spectre de masse de l'aplotaxène affiche que, le pic de base est de 79 m/z et le poids moléculaire de cette molécule est de 232 m/z. (Figure 13).

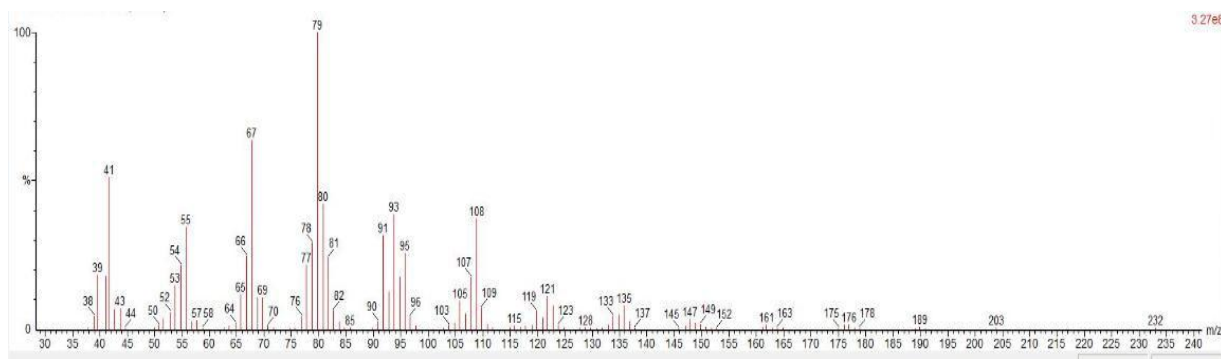
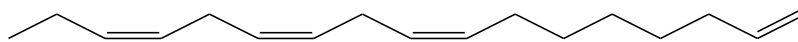


Figure 13. Spectre de masse d'aplotaxène

En conclusion, la comparaison des données spectrales du RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, infrarouge et spectre de masse de notre composé avec ceux décrites dans la littérature [101], [102] a conduit à la confirmation non ambiguë du constituant aplotaxène. (Figure 14).



**Figure 14.** Structure de la molécule aplotaxène

L'huile essentielle collective des parties racinaires a été largement dominée par les composés non terpéniques (62,1 %) qui représentent plus de la moitié de la composition chimique. Les principaux composants sont aplotaxène (51,6 %) et l'oxyde de caryophyllène (10,9 %). (Tableau 5).

**Tableau 5:** Composition chimique des huit échantillons d'huiles essentielles des parties racinaires de *C. acaulis* :

No, <sup>a</sup>	Composés	/RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	HE coll	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6	PR7	PR8	Identification <sup>f</sup>
1	Hexanal	768	770	1055	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	IR, SM
2	$\alpha$ -Pinène	930	931	1022	0,4	0,1	0,1	0,3	0,4	0,3	0,5	0,6	0,8	IR, SM
3	cis-3-Heptén-1-ol	935	939	1473	3,7	2,6	5,5	3,7	2,9	2,7	3,0	5,6	4,3	IR, SM
4	$\beta$ -Pinène	970	972	1110	1,8	0,1	0,3	tr	3,1	tr	3,1	4,0	4,1	IR, SM
5	2-pentylfuran	982	983	1231	0,3	0,2	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,2	0,3	IR, SM
6	Limonène	1025	1020	1199	0,5	0,1	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,8	1,2	IR, SM
7	trans-Pinocarvéol	1126	1125	1650	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	IR, SM
8	cis-Verbénol	1132	1127	1655	0,1	0,1	0,1	0,2	tr	0,2	0,2	0,1	tr	IR, SM
9	$\alpha$ -pino-Camphone	1141	1151	1535	0,3	0,8	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,1	0,4	IR, SM
10	cis-6-Nonén-1-ol	1152	1156	1687	0,5	0,2	1,3	0,1	tr	0,1	0,1	1,5	1,1	IR, SM
11	Terpinén-4-ol	1164	1161	1600	0,1	0,1	0,1	0,2	tr	0,2	0	0,2	0,1	IR, SM
12	Salicylate de méthyle	1170	1173	1731	0,8	0,1	1,6	0,3	0,3	0,3	0,3	1,5	1,8	IR, SM
13	$\alpha$ -Campholéol	1186	1187	1782	0,1	0,2	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	IR, SM
14	trans-Carveol	1201	1196	1832	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	IR, SM
15	3-Decen-2-one	1221	1219	1601	0,4	0,6	0,5	0,4	0,1	0,4	0,1	0,8	0,5	IR, SM
16	Pipéritone	1230	1232	1730	0,7	0,9	0,8	0,6	0,9	0,6	0,9	0,5	0,5	IR, SM
17	Tridécane	1300	1300	1300	0,3	0,2	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,7	0,7	IR, SM
18	Acétate de néryle	1341	1342	1725	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	IR, SM
19	$\beta$ -Elémène	1385	1388	1589	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	IR, SM
20	trans Caryophyllène	1418	1424	1587	3,4	2,5	3,6	4,8	3,0	5,4	1,8	2,8	3,0	IR, SM
21	$\alpha$ -Humulène	1449	1456	1635	0,2	0,2	0,1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	IR, SM
22	$\beta$ -Ionone	1464	1466	1936	1,0	0,4	0,1	1,4	2,3	1,2	2,1	0,1	0,2	IR, SM
23	$\gamma$ -Muuroolène	1471	1471	1681	0,2	0,3	0,2	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,1	IR, SM
24	Germacrène D	1477	1480	1704	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	IR, SM
25	$\beta$ -Sélinène	1481	1483	1712	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,5	0,4	0,2	IR, SM
26	4-epi-Cubébol	1487	1486	1870	2,6	1,9	2,8	2,6	3,2	3,1	2,8	1,8	2,9	IR, SM
27	$\alpha$ -Sélinène	1493	1495	1500	0,4	0,2	0,8	0,1	0,2	0,2	0,3	0,6	0,5	IR, SM
28	E,E- $\alpha$ -Farnésène	1506	1498	1744	0,4	0,6	0,3	0,5	0,6	0,4	0,5	0,2	0,1	IR, SM
29	$\gamma$ -Cadinène	1509	1507	1752	0,2	0,5	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	IR, SM
30	$\alpha$ -Calacorène	1528	1531	1895	0,4	0,1	0,9	0,3	0,3	0,2	0,1	0,7	0,5	IR, SM
31	$\alpha$ -Cadinène	1539	1535	1743	0,2	tr	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	IR, SM
32	$\beta$ -Calacorène	1541	1548	1939	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	IR, SM
33	(Z)-Hex-3-ényle benzoate	1554	1552	2088	0,3	0,6	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	IR, SM
34	Germacrène D-4-ol	1567	1573	2025	0,7	0,7	0,9	0,4	0,7	0,4	0,9	0,7	1,0	IR, SM
35	Caryophyllène oxide	1571	1576	1980	10,9	14,6	13,8	8,0	6,9	7,9	7,2	14,0	14,7	IR, SM
36	Salvial-4(14)-en-1-one	1579	1578	1592	0,8	1,9	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	1,8	1,5	IR, SM
37	Tridécanol	1580	1586	2032	0,9	0,2	0,5	1,2	1,3	1,6	1,4	0,5	0,7	IR, SM
38	Viridiflorol	1585	1591	2089	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,6	0,2	IR, SM
39	$\beta$ -Aplopenone	1591	1593	2023	1,1	2,6	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	2,5	1,8	IR, SM
40	2-Epoxide humulène	1594	1601	2044	0,3	0,2	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	IR, SM
41	$\gamma$ -Eudésmol	1617	1619	2197	0,3	0,4	0,2	0,1	tr	0,2	0,1	0,6	0,8	IR, SM
42	Oxyde d'aromadendrène 2	1619	1618	2002	0,7	0,7	0,9	0,6	0,5	0,5	0,4	0,9	0,9	IR, SM
43	$\tau$ -Muurolol	1636	1634	2143	0,6	0,4	1,6	0,4	0,2	0,5	0,1	0,5	0,9	IR, SM
44	$\beta$ -Eudésmol	1639	1644	2232	1,2	1,1	1,1	1,3	1,2	0,9	1,6	1,0	1,3	IR, SM
45	$\alpha$ -Cadinol	1642	1645	2231	0,5	0,5	0,1	0,1	0,6	tr	0,5	0,8	1,2	IR, SM
46	Aplotaxène	/	1663	/	51,6	46,3	43,3	61,6	60,6	59,2	58,3	42,5	40,6	IR, SM, RMN
47	Eudesma-4(15)-7-diène-1-beta-ol	1669	1672	2347	0,3	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1	0,2	0,1	0,6	IR, SM
48	Pentadécane	1700	1700	1700	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	IR, SM
49	Acide tétradécanoïque	1748	1754	2163	1,8	1,6	1,5	2,1	2,0	3,4	1,8	1,1	0,9	IR, SM

50	Acide hexadécanoïque	1958	1954	2223	1,1	1,4	1,2	1,4	1,2	0,6	0,5	1,2	1,3	IR, SM
51	(Z)-phytol	2069	2080	2572	1,7	1,8	1,8	1,6	1,2	1,5	1,8	1,8	2,0	IR, SM
52	(E)-phytol	2100	2107	2617	0,5	0,2	0,1	0,4	0,3	0,1	0,1	2,0	1,1	IR, SM
<b>Identification %</b>					<b>94,8</b>	<b>89,2</b>	<b>90,8</b>	<b>97,3</b>	<b>96,1</b>	<b>95,5</b>	<b>93,7</b>	<b>99,2</b>	<b>97</b>	
Monoterpènes oxygénés					1,5	1,8	1,8	1,5	1,4	1,5	1,6	1,6	1,0	
Monoterpènes hydrocarbonés					2,7	0,3	0,6	0,6	3,9	0,6	4,1	5,4	6,1	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					6,2	5,4	7,1	7,0	5,6	7,9	4,8	6,2	5,4	
Sesquiterpènes oxygénés					20,1	25,2	22,6	14,3	14,5	14,4	14,8	25,6	28,2	
Composés non-terpéniques					62,1	54,5	56,8	71,9	69,2	69,5	66,5	56,6	53,2	
Diterpènes oxygénés					2,2	2,0	1,9	2,0	1,5	1,6	1,9	3,8	3,1	

<sup>a</sup> L'ordre d'éluion donné sur colonne apolaire (Rtx-1)  
<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature  
<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1  
<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax  
<sup>e</sup> Huile essentielle collective  
<sup>f</sup> IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique,  
HE coll : Huile essentielle collective,

Tous les composants ont été identifiés par CG et CG-SM, sauf le principal constituant aplotaxène qui a été identifié par RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, IR et spectre de masse.

Contrairement aux parties aériennes, la composition chimique des huiles essentielles des parties racinaires est complètement différente.

### II.1.3 Etude de la variabilité chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires de *C. acaulis*.

L'étude de la variabilité chimique de huit échantillons (S1-S8) de *C. acaulis* collectés à l'état sauvage dans différentes localités de la région de « Tlemcen » pendant la période de floraison a été réalisée à l'aide d'un outil statistique.

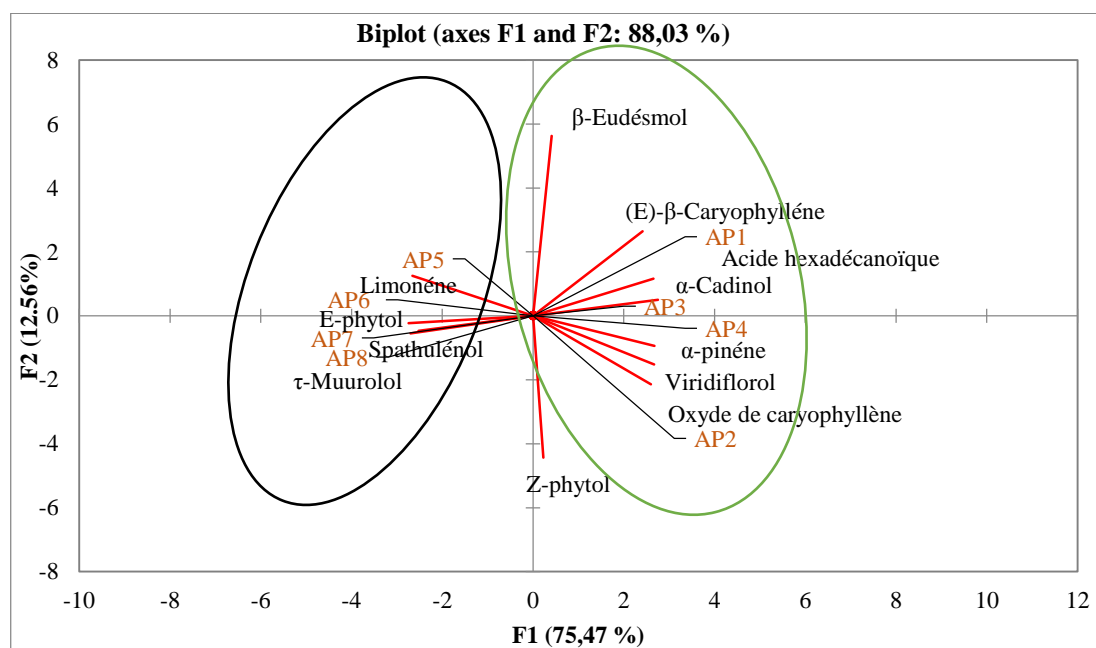
L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à partir des données environnementales des lieux de récoltes qui sont corrélées aux données des constituants d'huiles essentielles les plus discriminantes.

Les résultats obtenus affichent que les huiles essentielles des parties racinaires n'ont montré aucune variabilité dans la composition chimique. Les principaux constituants tels que l'aplotaxène et l'oxyde de caryophyllène varient de 40,6 à 61,6 % et de 6,9 à 14,7 % respectivement, (Tableau 5). En revanche, la représentation de l'ACP des huiles essentielles des parties aériennes, décrivant plus de 80% de la variance totale (75,45 % et 12,56 %, respectivement) a confirmée l'existence de deux principaux groupes d'huiles essentielles (figure 15) présentant douze constituants considérés comme discriminant.

Le groupe I (S1- S4) rassemble les échantillons récoltés dans la zone 1. Cette zone est constituée principalement par les teneurs élevées en :  $\beta$ -Eudésmol (1,5-2,8%),  $\alpha$ -Cadinol (0,2-5,4), (E)- $\beta$ -caryophyllène (3,4-8,4%), acide Hexadécanoïque (6,3-10,8%),  $\alpha$ -pinène (2,9-4,1%), viridiflorol

(5,5-8,6%) et l'oxyde de caryophyllène (6,2-9,9%). Le groupe II (S5- S8) rassemble les échantillons provenant de la zone 2 qui est caractérisée par les teneurs élevées en limonène (15,2-19,2%),  $\tau$ -muurolol (12,6- 17,2%), (E)-phytol (4,3-5,6%) et spathuléol (1,2-3,1%).

La corrélation des lieux de récoltes et des compositions chimiques des échantillons individuels montre qu'il est difficile d'attribuer ces variations à des facteurs environnementaux.



**Figure 15.** L'analyse en composantes principales (ACP) des différents échantillons d'huiles essentielles de *C. acaulis*

En comparaison avec la littérature, il apparaît que la composition chimique des parties aériennes de nos huiles est nettement différente à celles des autres espèces du genre *Centaurea* décrites dans la littérature. En effet, l'acide hexadécanoïque, germacrène D, l'oxyde de caryophyllène et  $\beta$ -eudésmol étaient les composants prédominants dans l'espèce étudiée. Alors que *C. iconiensis* présente l'undécène comme principal constituant [103] ; *C. damascena* en Jordanie distingue le fokiéol [104] ; *C. grinensis* Reuter en Croatie révèle le 2-méthoxy-4-vinylphénol [105] de même *C. irritans* en Iran expose le Géraniol [106].

Dans cette étude, nous avons trouvé des différences significatives dans les rendements et la composition chimique des huiles essentielles de *Centaurea acaulis*, recueillies à partir de huit stations. Les différences observées dans la caractérisation chimique des échantillons des deux populations provenant de deux zones géographiques distinctes peuvent être dues à plusieurs facteurs extérieurs qui sont susceptibles d'influencer son développement.

A titre d'exemple : la situation géographique, les structures génétiques ou encore les facteurs écologiques. Ces derniers, peuvent faire grandement varier l'huile essentielle produite d'une façon quantitative et qualitative, ce qui peut amener a des répercussions importantes sur le marché mondial [107].

#### II.1.4 Etude de la composition chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de *C. acaulis*

L'analyse CPG et CPG/SM de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de *C. acaulis* a permis l'identification de 09 constituants représentant 92,6% de la composition totale. Le mélange est constitué de 22,3 % de composés oxygénés et 70,3% de composés hydrocarbonés.

Tous les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétentions et spectres de masse avec ceux répertoriés dans la bibliothèque « Aromes » du laboratoire de Corse, mis à part le composant aplotaxène qui a été identifié par RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, IR et spectre de masse.

**Tableau 6:** Composition chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de *C. acaulis*

No. <sup>a</sup>	Composés	IRI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Ext Hex <sup>e</sup>	Identification <sup>f</sup>
1	9-oxabicyclo[6,1,0]nonane	970	965		9,2	IR, SM
2	Isocaryophyllène	1407	1400		6,0	IR, SM
3	Trans-caryophyllène	1424	1414	1587	4,3	IR, SM
4	Trans- $\alpha$ -Bergamotene	1432	1428		2,2	IR, SM
5	Alpha humulène	1456	1458	1719	0,8	IR, SM
6	2-Tridécanone	1477	1486		4,8	IR, SM
7	Pentadécane	1500	1500		0,1	IR, SM
8	Oxyde de caryophyllène	1998	1566	1980	8,3	IR, SM
9	Aplotaxène	/	1663	/	56,9	IR, SM,RMN
<b>Taux d'identification %</b>		-			<b>92,6</b>	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					13,3	
Sesquiterpènes oxygénés					8,3	
Non-terpéniques hydrocarbonés					57,0	
Non-terpénique oxygéné					14,0	

<sup>a</sup> L'ordre d'élution donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax

<sup>e</sup> Extrait a l'hexane

<sup>f</sup> IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

L'extrait à l'hexane a démontré la prédominance des constituants non-terpéniques (71.0%), d'où le composé majoritaire : aplotaxène avec un taux de 56,9%, suivi par le 9-oxabicyclo [6,1,0] nonane (9,2 %) et le 2-tridécanone (4,8 %). La deuxième classe dominante est celle des composés sesquiterpéniques (21,6 %). Les principaux composants sont : l'oxyde de

caryophyllène (8,3 %), l'isocaryophyllène (6,0 %), le trans-caryophyllène (4,3 %) et le trans- $\alpha$ -bergamotène (2,2 %) (Tableau 6).

Par conséquent, nous constatons que l'extrait à l'hexane se démarque de l'huile essentielle par la présence des constituants non-terpéniques. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur la caractérisation chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de *C. acaulis*.

## II.2 Etude de l'huile essentielle de *Centaurea sulphurea*

À notre connaissance, c'est le premier travail qui traite la composition chimique de la partie aérienne et racinaire de l'huile essentielle de *C. Sulphurea* originaire du sud-ouest de l'Europe. Les deux études antérieures trouvées dans la littérature concernent la caractérisation des métabolites secondaires issus des extraits aux solvants. La première décrit la présence d'une nouvelle lactone sesquiterpénique [108] et la seconde a permis l'identification de cinq flavonoïdes issus des extraits de la plante [109]. Dans cette partie, nous exposons la caractérisation chimique ainsi que l'effet du suivie végétatif sur le rendement et la composition des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires de *C. sulphurea* récoltées dans l'Ouest Algérien (Tlemcen).

### II.2.1 Lieux de récolte et rendements

L'espèce *C. sulphurea* a été collectée au mois de juin 2020 dans la région de Ain-Douze [34°96'11"N; 1°39'46"O]. Les huiles des parties aériennes et racinaires ont été extraites par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger durant 5 h. L'huile essentielle extraite des parties aériennes a donné une huile jaune pâle avec un rendement variant de 0,05 à 0,25%. En revanche, l'huile extraite des parties racinaires a affiché une huile jaune avec un rendement légèrement plus élevée de 0,15 à 0,38% par rapport à la masse du végétal sèche (Tableau 7).

### II.2.2 Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition des huiles essentielles.

Afin d'étudier les processus de production des métabolites secondaires au cours du suivie végétatif du végétal : stade végétatif, stade de floraison et stade de pleine floraison. Nous avons suivi l'évolution de la composition chimique ainsi que les rendements obtenus des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires produites du mois d'avril au mois de juin sur la même station (Ain douze), province de Tlemcen. En effet : stade végétatif (Avril), stade de floraison (Mai) et stade de pleine floraison (Juin).

**Tableau 7:** Variation du rendement en huiles essentielles de l'espèce *C. sulphurea* au cours des trois stades végétatifs.

Mois	Stades	Rdts en huiles essentielles (%)		Température (°C)
		P. aériennes	P. souterraines	
Avril	Stade végétatif	0,05	0,15	13
Mai	Stade du bourgeonnement florale	0,16	0,29	25
Juin	Stade de la floraison	0,25	0,38	36



Au cours des trois stades de croissance, un changement significatif du rendement en huile essentielle a été observé pour la partie aérienne. En effet, la plus faible quantité d'huile essentielle est produite par le végétal durant la phase de début de croissance (0,05%). Puis elle a augmenté de façon progressive au début du stade du bourgeonnement floral (0,16%) pour atteindre (0,25%) au stade de la pleine floraison. Contrairement à la partie racinaire, le rendement le plus faible (0,15%) a été observé au cours du premier stade végétatif. Ensuite, il a augmenté sensiblement à l'approche du stade du bourgeonnement floral (0,29%). Puis, de manière significative durant le stade de la floraison pour atteindre un taux de (0,38%) (Tableau 7). Cette variation du rendement peut être expliquée par les modifications phénologiques que subit la plante durant le cycle végétatif [110,111].

### **II.2.3 Etude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires durant le cycle végétatif de la plante.**

Les huiles essentielles des parties aériennes de *C. sulphurea* récoltées durant les trois stades, ont été analysées par CPG et CPG/SM et identifiées par comparaison de leurs indices de rétention et spectres de masse avec ceux de la bibliothèque "Aromas" propre au laboratoire de l'Université de Corse. Afin d'examiner l'évolution des huiles de cette plante pendant son cycle végétatif, nous avons étudié la variation de la composition chimique entre le mois d'avril et juin c'est à dire de l'état végétatif jusqu'à la pleine floraison. Trois prélèvements ont été effectués, les résultats des compositions chimiques sont illustrés dans le tableau 8.

Ainsi, huit monoterpènes hydrocarbonés, neuf sesquiterpènes hydrocarbonés, trois monoterpènes oxygénés, seize sesquiterpènes oxygénés, quatre diterpènes oxygénés et deux composés non terpéniques ont été identifiés.

Tout au long du cycle végétatif (avril-juin), l'huile essentielle a été caractérisée par un taux élevé de composés sesquiterpènes oxygénés, tels que : l'oxyde de caryophyllène (10,5-29,6%), le viridiflorol (4,9-12,8%) et humulène époxyde 2 (3,7-6,5%).

L'huile essentielle produite à partir du végétal pris en début du cycle végétatif (avril) et bourgeonnement floral (mai) présente un faible taux de composés hydrocarbonés monoterpéniques et sesquiterpéniques, avec des pourcentages variant de 5,9-9,6% et 2,9-4,8%. Puis au stade de la floraison, ils ont augmenté à 20,6% et 10,9%, respectivement. De plus, les composés diterpéniques ont augmenté de 5,3 à 9,0% ainsi, le constituant dominant de cette classe est le (E)-phytol avec un taux de 5,2%. En revanche, cette huile voit sa proportion en composés non-terpéniques chuter brutalement passant de 14,9 à 4,4%, les composés majoritaires de cette classe sont les hydrocarbures : hénéicosane (7,3%) et eicosane (6,5%). (Tableau 8).

**Tableau 8:** Composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *C. sulphurea* en fonction de son suivi végétatif obtenus dans la station de Ain douze :

No. <sup>a</sup>	Composés	/RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Avril	Mai	Juin	Identification <sup>e</sup>
1	α-Pinène	936	931	1022	3,1	1,7	13,2	IR, SM
2	Sabinène	973	966	1120	-	0,5	5,6	IR, SM
3	β-pinène	978	970	1110	-	0,1	0,9	IR, SM
4	Myrcène	987	981	1159	1,7	0,9	0,2	IR, SM
5	p-cymène	1015	1011	1265	2,7	0,4	0,3	IR, SM
6	Limonène	1023	1022	1197	4,8	2,7	0,7	IR, SM
7	(Z)-β-Ocimène	1024	1026	1230	-	0,1	0,3	IR, SM
8	(E)-β-Ocimène	1041	1037	1247	-	0,4	0,2	IR, SM
9	Nonanal	1083	1083	1394	0,7	0,7	0,5	IR, SM
10	Linalool	1081	1088	1544	1,2	tr	tr	IR, SM
11	Terpinen-4-ol	1164	1162	1590	-	0,2	0,1	IR, SM
12	Méthyl-Salicylate	1173	1170	1731	-	0,1	0,2	IR, SM
13	Décane-1-ol	1185	1185	1498	-	0,2	0,3	IR, SM
14	α-Copaène	1379	1375	1488	-	0,6	3,5	IR, SM
15	(E)-β-Caryophyllène	1424	1418	1591	2,9	1,9	3,4	IR, SM
16	α-Humulène	1456	1450	1665	-	0,4	0,6	IR, SM
17	Germacrène-D	1480	1478	1704	-	0,8	1,1	IR, SM
18	β-Sélinène	1483	1482	1712	-	0,6	0,8	IR, SM
19	4-epi-Cubebol	1487	1487	1870	-	0,2	0,6	IR, SM
20	Bicyclodermacrène	1494	1491	1727	-	0,1	0,3	IR, SM
21	α-Muuroolène	1496	1493	1719	-	0,1	0,5	IR, SM
22	β-Cadinène	1507	1506	1752	-	0,1	0,2	IR, SM
23	δ-Cadinène	1516	1515	1752	-	0,2	0,5	IR, SM
24	3-(Z)-Hexényl-benzoate	1554	1550	2088	0,4	0,2	tr	IR, SM
25	Germacrène-D -4-ol	1573	1567	2025	1,3	1,2	0,5	IR, SM
26	Oxyde de caryophyllène	1576	1571	1980	29,6	27,6	10,5	IR, SM
27	Salvial-4(14)-en-1-one	1584	1580	1996	2,2	2,1	0,2	IR, SM
28	Viridiflorol	1591	1584	2089	12,8	11,5	4,9	IR, SM
29	Humulène époxyde 2	1601	1599	2044	3,9	3,7	6,5	IR, SM
30	γ-Eudésmol	1619	1617	2197	2,3	0,9	0,1	IR, SM
31	Epi-cubénol	1624	1623	2059	-	1,9	0,1	IR, SM
32	τ-Muurolol	1634	1630	2103	-	2,1	3,2	IR, SM
33	β-Eudésmol	1644	1640	2232	0,7	7,2	8,5	IR, SM
34	α-Cadinol	1645	1641	2232	0,6	1,1	3,5	IR, SM
35	α-Eudésmol	1653	1649	2220	1,4	2,6	4,5	IR, SM
36	(Z,Z)-Farnésol	1653	1653	2163	0,6	3,1	6,5	IR, SM
37	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1672	1670	2347	0,2	3,2	3,2	IR, SM
38	Tétradécane-1-ol	1676	1696	2105	-	0,9	0,5	IR, SM
39	(Z)-Phytol	2080	2081	2572	0,1	0,1	0,5	IR, SM
40	Héneicosane	2100	2099	2101	7,3	2,1	0,2	IR, SM
41	(E)-Phytol	2114	2113	2591	5,2	6,3	8,5	IR, SM
42	Eicosane	2200	2201	2200	6,5	1,1	0,2	IR, SM
<b>Taux d'identification %</b>					<b>92,2</b>	<b>91,9</b>	<b>96,1</b>	
Monoterpènes oxygénés					3,9	1,2	1,1	
Monoterpènes hydrocarbonés					9,6	5,9	20,6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					2,9	4,8	10,9	
Sesquiterpènes oxygénés					55,6	68,4	50,1	
Composés non-terpéniques					14,9	5,2	4,4	
Diterpènes oxygénés					5,3	6,4	9,0	

<sup>a</sup> L'ordre d'éluion donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature Masse en mode impact électronique

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtf-wax

<sup>e</sup>IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de

Les huiles essentielles de la partie souterraine récoltées durant les trois stades, ont été analysées par CPG et CPG/SM, la composition chimique est présentée dans le tableau 9. Dix-huit constituants représentant 95,1% au stade végétatif, 90,9% au stade du bourgeonnement floral et 91,7% au stade de la floraison, ont été détectés.

L'huile essentielle extraite durant la période du mois d'avril c'est-à-dire la période du stade végétatif, est principalement constituée de composés non terpéniques (35,8%) et sesquiterpènes oxygénés (33,2%), suivis par les sesquiterpènes hydrocarbonés (10,6%) et diterpènes oxygénés (10,3%). Néanmoins, les constituants monoterpéniques sont présents en faible rendements. Les principaux constituants de cette classe sont : l'oxyde de caryophyllène (32,1%), l'aplotaxène (27,9%) et le (E)-phytol (10,3%). (Tableau 9).

**Tableau 9:** Composition chimique des huiles essentielles de la partie racinaire de *C. sulphurea* en fonction de son suivi végétatif obtenue dans la station de Ain douze :

No. <sup>a</sup>	Composés	/RIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	Avril	Mai	Juin	Identification <sup>e</sup>
1	(E)-3-hexène -1-ol	812	791	1966	0,4	Tr	0,3	IR, SM
2	(Z)-3-hexène-1-ol	831	825	1380	0,2	Tr	0,1	IR, SM
3	$\alpha$ -Thuyène	922	923	1023	0,6	1,7	0,3	IR, SM
4	$\beta$ -Pinène	978	970	1110	3,9	2,5	8,1	IR, SM
5	Méthyl-Salicylate	1173	1170	1731	0,7	0,9	0,5	IR, SM
6	Décane-1-ol	1185	1185	1498	2,4	Tr	0,8	IR, SM
7	3-Decen-2-one	1219	1221	1601	1,3	0,5	0,4	IR, SM
8	Géranyle acétate	1361	1367	1752	tr	0,1	0,3	IR, SM
9	$\alpha$ -Copaène	1379	1375	1488	0,1	0,1	0,2	IR, SM
10	Dodécanal	1389	1390	1695	3,4	Tr	0,2	IR, SM
11	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1424	1418	1591	6,5	8,8	16,6	IR, SM
12	$\alpha$ -Humulène	1456	1450	1665	0,5	0,1	tr	IR, SM
13	Germacrène-D	1480	1478	1704	3,5	3,3	1,1	IR, SM
14	Oxyde de caryophyllène	1576	1571	1980	32,1	19,1	14,6	IR, SM
15	Humulène époxyde 2	1601	1599	2044	1,1	10,6	3,5	IR, SM
16	Aplotaxène	1663	1661	-	27,9	15,5	10,5	IR, SM, RMN
17	Acide Hexadécanoïque	1958	1954		0,2	12,3	5,6	IR, SM
18	(E)-Phytol	2114	2113	2591	10,3	15,4	28,6	IR, SM
<b>Taux d'identification %</b>					<b>95,1</b>	<b>90,9</b>	<b>91,7</b>	
Monoterpènes hydrocarbonés					4,5	4,2	8,4	
Monoterpènes oxygénés					0,7	0,9	0,5	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					10,6	12,3	17,9	
Sesquiterpènes oxygénés					33,2	29,8	18,4	
Diterpènes oxygénés					10,3	15,4	28,6	
Composés non-terpéniques					35,8	28,3	17,9	

<sup>a</sup> L'ordre d'élution donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature

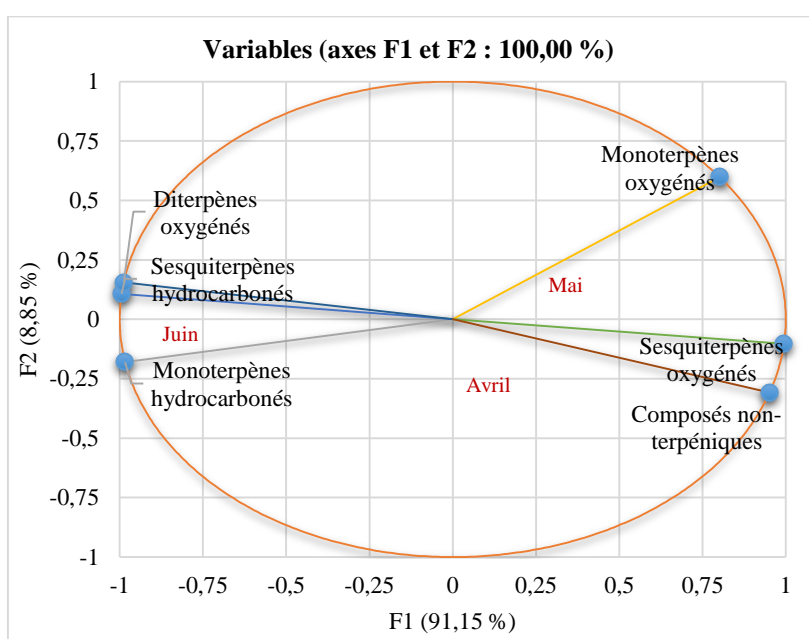
<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtf-wax

<sup>e</sup>IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

Au moment du bourgeonnement floral (mai), l'huile essentielle était dominée par les composés oxygénés sesquiterpéniques (29,8%) et non terpéniques (28,3%), suivis par les diterpènes oxygénés (15,4%) et sesquiterpènes hydrocarbonés (12,3%). Les principaux composants étaient : l'oxyde de caryophyllène (19,1%), l'aplotaxène (15,5%), le (E)-phytol (15,4%) et l'acide hexadécanoïque (12,3%).

Pareillement, au stade de la floraison (juin), l'huile de la partie souterraine était caractérisée par les diterpènes oxygénés (28,6%), suivie des sesquiterpènes oxygénés (18,4%), des sesquiterpènes hydrocarbonés et des composés non terpéniques avec un taux de (17,9%), ainsi une petite quantité de monoterpènes hydrocarbonés (8,4%). Les principaux constituants sont : le (E)- phytol (28,6%), le (E)- $\beta$ -caryophyllène (16,6%), l'oxyde de caryophyllène (14,6%), l'aplotaxène (10,5%) et  $\beta$ -pinène (8,1%).



**Figure 16.** Distribution de la variabilité chimique de la partie racinaire de *C. sulphurea* durant le cycle végétatif.

Il est à noter que les rendements en huiles essentielles varient fortement en fonction du stade physiologique. Une augmentation significative des sesquiterpènes hydrocarbonés a été observée avec un taux de 10% au stade végétatif à 18% au stade de la floraison, contrairement aux oxygénés qui ont diminué (33% à 18%). Cependant, l'oxyde de caryophyllène et l'aplotaxène, ont montré une diminution significative de leurs pourcentages pendant le suivi végétatif (32 à 14%) et (27 à 10%), respectivement.

La teneur en diterpènes oxygénés a augmenté de manière significative aux stades du bourgeonnement et de la floraison, avec un pourcentage de 15,4% et 28,6%, respectivement. Alors que la teneur en composés non terpéniques a diminué progressivement (35,8% à 17,9%) au stade de la floraison. (Figure 16).

À cet optique, cette étude nous a permis d'observer l'influence du facteur climatique sur la production d'huile essentielle, cela nous a mené à conclure que tous les constituants sont susceptibles de voir leur concentration varier à travers les saisons de récoltes.

À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur la composition chimique des parties aériennes et racinaires des huiles essentielles de *C. sulphurea*.

## II.3 Etude de l'extrait à l'hexane de *Centaurea pullata*

D'après la littérature, l'extrait à l'hexane de l'espèce *centaurea pullata* préparé à partir du végétal provenant de l'ouest Algérien n'a jamais fait l'objet d'étude. Dans cette partie, nous présentons la composition chimique de l'extrait à l'hexane issus de la partie racinaire de cette espèce.

### II.3.1 Lieu de récolte et rendement en extrait

Les échantillons de la partie racinaire de *C. pullata* ont été recueillis en mois de Mai 2019 dans la forêt de Lalla setti [1030 m, 34° 51' 45''N 1° 18' 56''E] Tlemcen (Algérie), où elle pousse de façon spontanée. Les parties racinaires ont été soumises à une extraction à l'hexane par macération à froid jusqu'à épuisement. Après évaporation et filtration, un extrait de couleur jaune a été récupéré avec un rendement de 1,90% par rapport à la masse du végétal sèche.

### II.3.2 Etude de la composition chimique de l'extrait à l'hexane de la partie racinaire de *C. pullata*

L'analyse CPG et CPG/SM de la partie racinaire de l'extrait à l'hexane a révélé la présence de 08 constituants représentant 94,0% de la composition totale (Tableau 10). L'extrait est caractérisé par la famille des composés non-terpéniques, dont les hydrocarbonés 80,3% sont majoritaires par rapport aux oxygénés 13,7%. Le constituant dominant et qui représente plus de la moitié de la composition chimique est l'aplotaxène avec un taux de 80,3%.

**Tableau 10:** Composition chimique de l'extrait hexanique de la partie racinaire de *C. pullata*

No. <sup>a</sup>	Composés	IRI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Ext- Hex <sup>e</sup>	Identification <sup>f</sup>
1	2-décanone	1178	1180		2,2	IR, SM
2	Dodécanol	1472	1468		0,1	IR, SM
3	Tridécanol	1580	1578		0,5	IR, SM
4	Aplotaxène	1661	1667		80,3	IR, SM, RMN
5	9-tétradécen-1-ol	1664	1656		1,2	IR, SM
6	Acide hexadécanoïque	1942	1941	2916	1,6	IR, SM
7	Palmitate d'éthyle	1975	19		4,0	IR, SM
8	Linoléate d'éthyle	2136	2139		4,1	IR, SM
<b>Taux d'identification %</b>					<b>94,0</b>	
Non-terpéniques hydrocarbonés					80,3	
Non-terpénique oxygéné					13,7	

<sup>a</sup> L'ordre d'élution donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>b</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax

<sup>e</sup> Extrait à l'hexane

<sup>f</sup> IR : Indices de Rétention ; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

## Discussions :

Lors de ce chapitre, nous avons étudié la caractérisation chimique de trois espèces du même genre, qui se différencient par la morphologie telle que la coloration des fleurs.

Cependant, l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des deux variétés a présenté une différence dans l'abondance des composés majoritaires. En effet, les principaux constituants de la partie aérienne de l'huile essentielle de *C. acaulis* étaient le  $\tau$ -muurolol et le limonène, tandis que ceux de *C. sulphurea* étaient : l'oxyde de caryophyllène et le viridiflorol. De ce fait, la même espèce/variété est capable de produire des huiles essentielles de compositions différentes [112]. Par ailleurs, les huiles essentielles des parties racinaires sont dominées par le même constituant : apotaxène, un hydrocarbure aliphatique tetra-insaturé qui a été reporté initialement dans les racines de *Saussurea lappa* [113].

En comparaison avec la littérature, les travaux antérieurs affichent que les principaux constituants des huiles essentielles des espèces du genre *Centaurea* se caractérisent par la présence des constituants monoterpéniques (aspinène, terpinène et carvacrole) ; sesquiterpéniques (caryophyllène, eudésmol et germacrène) ; les hydrocarbures (tricosane, pentacosane et heptacosane) et les d'acides gras (acide hexadécanoïque, acide tétradécanoïque et acide dodécanoïque) [114-116].

Les variations de la composition chimique de l'huile essentielle d'une plante aromatique dépendent de plusieurs facteurs tels que : les conditions climatiques, les lieux géographiques, le génotype, la période du cycle végétatif, le stade de développement et la transformation des matières végétales avant l'extraction des substances volatils [107]. Les stressés biotiques et abiotiques exercent également une influence importante sur la production des métabolites secondaires ce qui affectent la croissance des plantes et modifient leurs propriétés biochimiques [117,118]. De la même façon pour le rendement, il est fortement influencé par les conditions écologiques et climatiques, l'emplacement de la culture, le stade de développement, les méthodes de récolte et le séchage après récolte [119]. Ces facteurs sont susceptibles d'influencer et varier d'une façon quantitative mais aussi qualitative l'huile essentielle extraite.

***CHAPITRE III :***  
***ETUDE BIOLOGIQUE***



L'intérêt des plantes aromatiques et médicinales (PAM) s'est accru récemment, à cause de leurs utilisations massives en raison de leurs effets thérapeutiques issues des métabolites secondaires bioactifs [120]. Elles jouent un rôle très important dans le domaine du développement des médicaments [121,122]. La famille des astéracées englobe de nombreuses variétés et espèces, qui certains d'entre elles ont été étudiées depuis longtemps et investiguées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et pour leurs activités antioxydantes [123,124].

Actuellement, la valorisation des huiles essentielles est devenue un facteur de développement économique lucratif. À cet égard, de nombreux pays émergents, tentent de s'élargir dans ce domaine. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et pharmacologique de trois espèces du genre *centaurea*. Il s'agit des plantes poussant à l'état spontané dans l'ouest algériens mais dont les vertus thérapeutiques restent méconnues.

### **III.1 Activité antioxydante**

L'évaluation du pouvoir antioxydant est un paramètre largement utilisé pour caractériser l'effet bénéfique des plantes. En effet, plusieurs espèces utilisées en médecine traditionnelle sont dotées de propriétés antioxydantes intéressantes. Ceci vient du fait que le stress oxydant est relié à plusieurs problèmes de santé et que l'idée derrière l'utilisation des recettes traditionnelles est le traitement et la prévention de ces maladies. D'autres part, la préservation des produits cosmétiques et alimentaires de manière efficace et écologique a été un axe de recherche important pour l'industrie, conséquemment il est devenu très intéressant de trouver des antioxydants naturels alternatives aux antioxydants synthétiques afin de protéger les aliments et leurs rancissements [125].

Depuis de nombreuses années, les huiles essentielles ne sont pas utilisées seulement en monothérapie, mais en combinaison afin d'évaluer leurs effets synergiques ou antagonistes [126]. L'effet synergique possible produit par la combinaison de ces derniers, a été qualifié de stratégie efficace pour réduire ou inhiber le processus naturel d'oxydation des aliments [127].

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit *in vivo*, sur des organismes vivants, soit *in vitro*, en appliquant des tests qui miment le phénomène physiologique à l'aide des dosages colorimétriques et/ou fluorimétriques [128].

Compte tenu de la nature diversifiée des antioxydants et de la complexité des processus d'oxydation, il n'y a pas une méthode commune par laquelle la capacité antioxydante peut être mesurée quantitativement et de façon bien précise, il est donc important d'utiliser plusieurs méthodes d'analyses et différents substrats pour évaluer l'efficacité des antioxydants. Il faut généralement combiner les résultats des différents tests pour avoir une indication précise sur la capacité antioxydante [121].

À notre connaissance, aucun travail relatif aux activités antioxydantes des huiles essentielles et extraits des plantes étudiées est rapporté dans la littérature. Il s'agit donc dans cette étude de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des huiles essentielles, apilotaxène, des extraits à l'hexane et la combinaison entre apilotaxène- Références (EDTA, BHT) à l'aide de trois techniques chimiques différentes : l'évaluation de la méthode anti-radicalaire par DPPH, la chélation des ions ferreux et le blanchissement du  $\beta$ -carotène.

### III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le pouvoir antioxydant des échantillons des espèces étudiées vis-à-vis du radical DPPH a été mesuré spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm [129]. Ce test simple permet alors de fournir des informations sur la capacité des constituants à donner un électron ce qui contribue à comprendre le mécanisme d'action des antioxydants [130]. Les résultats de l'évolution de cette activité indique qu'elle est dose-dépendante ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre la concentration des échantillons et le taux d'inhibition dans le milieu réactionnel.

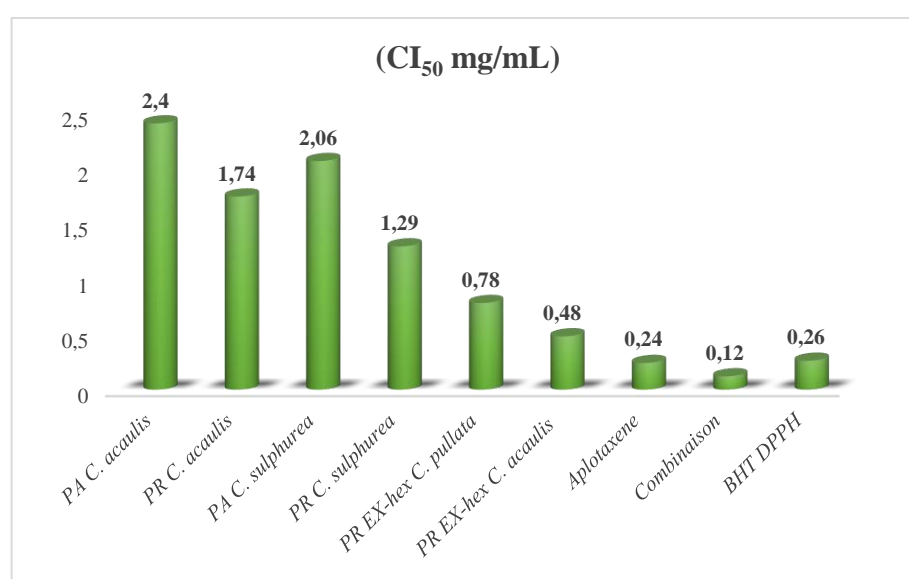
À la concentration de 15 mg/mL, un effet anti radicalaire maximal de 89% et 70% a été exercé par les extraits à l'hexane des deux espèces *C. acaulis* et *C. pullata*, respectivement. En revanche les huiles essentielles de *C. acaulis* et *C. sulphurea* ont exprimé une activité moindre avec des pourcentages d'inhibitions comprises entre 59 % et 68%. Cependant, le pouvoir antioxydant le plus élevé a été attribué à l'apilotaxène avec un taux d'inhibition de 98% contre 94 % du control BHT. (Tableau 11).

**Tableau 11:** Évaluation de l'activité anti-radicalaire des différents échantillons testés

Échantillons		Activité antioxydante							
Concentrations (mg/mL)		0,2	0,4	0,6	1,0	2,5	5,0	10	15
PA <i>C. acaulis</i>	Inhibition du DPPH [%]	43,0± 0,005	46,2± 0,004	48,2± 0,005	50,2± 0,003	53,1± 0,008	56,3± 0,016	57,9± 0,002	59,9± 0,014
	Inhibition du DPPH [%]	46,1± 0,002	48,2± 0,001	49,7± 0,010	50,8± 0,016	51,3± 0,011	53,6± 0,024	57,2± 0,002	59,5± 0,007
PA <i>C. sulphurea</i>	Inhibition du DPPH [%]	42,2± 0,001	44,9± 0,004	47,8± 0,004	51,6± 0,009	54,7± 0,009	56,6± 0,024	60,9± 0,016	68,2± 0,004
	Inhibition du DPPH [%]	46,1± 0,036	48,2± 0,018	49,9± 0,016	51,1± 0,011	52,6± 0,016	54,4± 0,007	58,4± 0,017	62,0± 0,009
PR EX-hex <i>C. pullata</i>	Inhibition du DPPH [%]	41,4± 0,002	47,1± 0,003	51,2± 0,004	54,3± 0,004	56,1± 0,006	59,3± 0,004	64,4± 0,006	70,4± 0,391
	Inhibition du DPPH [%]	41,8± 0,074	44,6± 0,004	51,1± 0,003	55,9± 0,066	60,2± 0,007	68,5± 0,004	80,2± 0,004	89,5± 0,007
Concentrations (mg/mL)		0,2	0,4	0,6	1,0	2,5	5,0	10	15

<b>Aplotaxene</b>	Inhibition du DPPH [%]	40,3±	44,8±	50,7±	58,8±	63,2±	73,9±	90,5±	98,0±
		0,002	0,004	0,004	0,000	0,019	0,014	0,026	0,003
	<b>Concentrations (mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>5,0</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>BHT<sub>DPPH</sub></b>	Inhibition du DPPH [%]	40,2±	45,3±	52,5±	57,3±	62,9±	70,3±	83,6±	94,1±
		0,118	0,007	0,031	0,001	0,004	0,006	0,004	0,003
	<b>Concentrations (mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>5,0</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>Combinaison</b>	Inhibition du DPPH [%]	42,9±	47,2±	51,9±	55,8±	57,9±	62,5±	69,9±	75,3±
		0,003	0,002	0,004	0,000	0,003	0,005	0,002	0,042

La concentration inhibitrice maximale  $CI_{50}$  exprime la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre DPPH• dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de la  $CI_{50}$  est faible plus l'activité anti radicalaire reflète une meilleure action protectrice. La figure ci-dessous affiche les résultats des  $CI_{50}$  obtenues par les différents échantillons.



**Figure 17.**  $CI_{50}$  des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène, et la combinaison aplotaxène-BHT déterminées par la méthode DPPH.

Nous remarquons que les huiles essentielles des parties racinaires de *C. acaulis* ( $CI_{50} = 1,74$  mg/mL) et *C. sulphurea* ( $CI_{50} = 1,29$  mg/mL) ont indiqué une forte activité dans l'extinction du radical DPPH• par rapport aux parties aériennes ( $CI_{50} = 2,4$  mg/mL et  $2,06$  mg/mL, respectivement). Il en est de même pour les extraits à l'hexane de *C. pullata* et *C. acaulis* qui ont présenté un pouvoir antioxydant très intéressant avec des  $CI_{50}$  de  $0,78$  mg/mL et  $0,48$  mg/mL, respectivement. (Figure 17).

Aplotaxène a été doté d'une très forte inhibition du radical DPPH ( $CI_{50} = 0,24$  mg/mL) presque similaire à celle de l'antioxydant synthétique BHT ( $CI_{50} = 0,26$  mg/mL).

Cependant, la combinaison aplotaxène-BHT a montré une augmentation significative avec un effet synergique remarquable, en effet, la plus faible valeur de la  $CI_{50} = 0,12$  mg/mL reflète sa meilleure activité anti-radicalaire, presque 2 fois supérieure que le BHT. (Figure 17).

### III.1.2 Chélation du fer ferreux

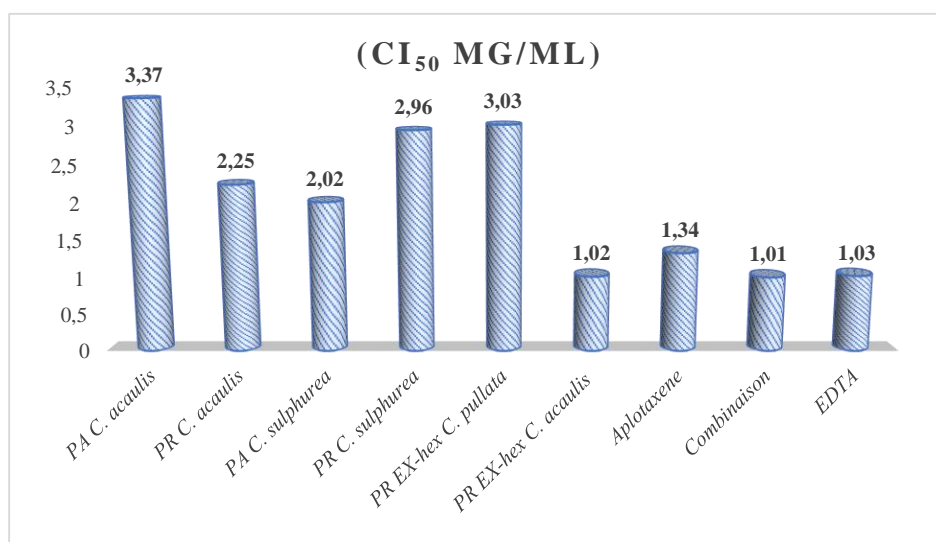
La formation du complexe de la ferrozine et du fer ferreux de couleur rouge, est présentée par un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe (Fe<sup>2+</sup>-Ferrozine) est perturbée, ce qui aboutit à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement [131].

Ce test permet de mettre en évidence la capacité chélatrice des huiles essentielles, aplotaxène et les extraits à l'hexane des espèces étudiées. Les résultats obtenus affichent que tous les échantillons ainsi que la combinaison aplotaxène-EDTA, possèdent une bonne activité chélatrice tout en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine (dose dépendante en comparaison avec l'EDTA).

**Tableau 12:** Évaluation de la capacité chélatrice des différents échantillons testés

Échantillons		Activité antioxydante							
		Concentrations (mg/mL)	0,2	0,4	0,6	1,0	2,5	5,0	10
PA <i>C. acaulis</i>	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	28,1± 0,004	31,7± 0,002	38,2± 0,007	44,6± 0,003	48,0± 0,014	53,4± 0,004	57,2± 0,008	60,1± 0,008
	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	17,7± 0,035	20,1± 0,020	25,0± 0,081	28,0± 0,065	44,3± 0,075	59,2± 0,010	83,4± 0,014	87,5± 0,013
PA <i>C. sulphurea</i>	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	16,7± 40,06	17,4± 0,023	20,0± 0,017	27,4± 0,039	47,1± 0,031	81,1± 0,025	82,0± 0,015	86,4± 0,000
	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	11,8± 0,031	20,8± 0,077	28,0± 0,084	28,9± 40,12	38,8± 0,081	50,9± 0,215	74,9± 0,000	80,7± 0,060
PR EX-hex <i>C. pullata</i>	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	10,7± 0,011	16,3± 0,014	27,1± 0,004	33,2± 0,007	51,9± 0,006	62,4± 0,001	67,3± 0,014	67,5± 0,106
	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	32,1± 0,008	43,8± 0,011	46,0± 0,009	51,4± 0,016	56,1± 0,028	64,6± 0,012	71,1± 0,002	75,1± 0,003
Aplotaxène	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	13,8± 0,028	17,8± 0,063	40,9± 0,009	45,7± 0,011	62,3± 0,010	74,8± 0,001	88,0± 0,015	98,3± 0,005
	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	20,0± 0,014	30,7± 0,011	48,4± 0,027	54,7± 0,000	65,5± 0,002	70,0± 0,012	83,2± 0,009	93,8± 0,009
EDTA	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	20,0± 0,014	30,7± 0,011	48,4± 0,027	54,7± 0,000	65,5± 0,002	70,0± 0,012	83,2± 0,009	93,8± 0,009
	Inhibition de la capacité chélatrice [%]	14,3± 0,009	23,1± 0,021	39,7± 0,005	58,7± 0,038	75,0± 0,039	83,8± 0,005	95,9± 0,026	98,7± 0,002

Des effets chélateurs maximaux compris entre 60% et 86% ont été atteints par les huiles essentielles des parties aériennes et racinaires ainsi que les extraits à l'hexane, à la concentration de 15 mg/mL. La référence synthétique EDTA exerce un effet chélateur de 93%. L'association du EDTA avec l'aplotaxène a révélé une meilleure activité de chélation des métaux avec un pourcentage supérieur à 98%. (Tableau 12). La concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur (CI<sub>50</sub>) est présentée dans la figure ci-dessous :



**Figure 18.** CI<sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, apilotaxène, et la combinaison apilotaxène-EDTA déterminées par la méthode de chélation du fer.

D'après cette figure, on remarque que tous les échantillons étudiés possèdent une activité chélatrice prometteuse. En revanche, la combinaison entre l'apilotaxène (CI<sub>50</sub>= 1,34 mg/mL) et EDTA (CI<sub>50</sub>= 1,03 mg/mL) a donné un effet synergétique avec un meilleur effet chélateur (CI<sub>50</sub> de 1,01 mg/mL) (Figure 18). Cette association combinant la molécule et la référence synthétique a montré un effet synergique intéressant, ce qui est d'une grande importance, car la chélation des métaux de transitions possède un grand potentiel et intérêt dans la recherche de l'industrie alimentaire [102].

### III.1.3 Test de blanchissement du β-carotène

Dans l'essai de blanchissement du β-carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylènes de l'acide linoléique. Ensuite, le radical libre va oxyder le β-carotène hautement insaturé. La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du β-carotène par les hydro-péroxydes qui sont neutralisés [132].

Ce fait est utilisé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits et des huiles essentielles par rapport aux antioxydants synthétiques bien connus, tels que le BHT et BHA [133].

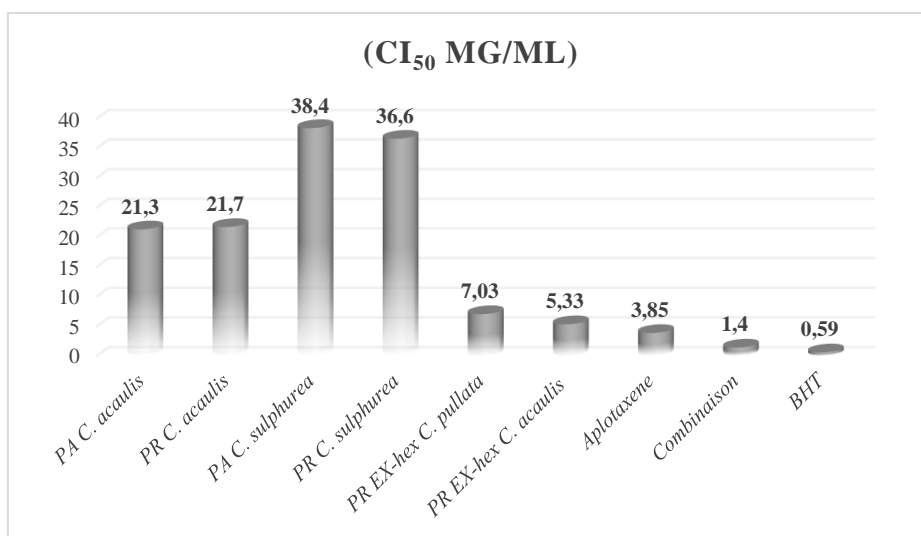
Le pourcentage d'inhibition des différents échantillons en fonction des concentrations testées est représenté dans le tableau 13. La capacité des échantillons d'huiles ou extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides est indiquée par l'abaissement de l'absorbance dans le temps.

**Tableau 13:** Évaluation du dosage de blanchiment de  $\beta$ -carotène/acide linoléique des différents échantillons testés

Échantillons		Activité antioxydante							
Concentrations (mg/mL)		0,5	10	15	25	35	38		
PA <i>C. acaulis</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	10,1±	30,9±	43,0±	59,8±	70,1±	85,6±		
		0,018	0,026	0,009	0,021	0,019	0,058		
PR <i>C. acaulis</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	17,3±	21,3±	39,5±	59,8±	69,8±	86,7±		
		0,026	0,036	0,002	0,065	0,000	0,019		
Concentrations (mg/mL)		5,0	10	15	25	35	38		
PA <i>C. sulphurea</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	9,5±	14,6±	20,8±	33,2±	43,3±	52±		
		0,021	0,017	0,017	0,036	0,013	0,029		
PR <i>C. sulphurea</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	13,1±	16,7±	21,7±	33,2±	45,5±	55,7±		
		0,007	0,009	0,002	0,009	0,016	0,019		
Concentrations (mg/mL)		0,2	0,4	0,6	1,0	2,5	5,0	10	15
PR EX-hex <i>C. pullata</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	14,6±	19,2±	24,5±	32,2±	41,3±	52,5±	60,7±	75,0±
		0,007	0,007	0,002	0,004	0,027	0,004	0,002	0,044
PR EX-hex <i>C. acaulis</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	13,5±	17,8±	27,6±	38,9±	52,4±	62,3±	73,9±	80,5±
		0,013	0,003	0,007	0,004	0,022	0,034	0,028	0,007
Concentrations (mg/mL)		0,2	0,4	0,6	1,0	2,5	5,0	10	15
Aplotaxène	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	18,0±	26,7±	32,6±	43,3±	53,9±	67,1±	72,1±	>100
		0,002	0,028	0,024	0,026	0,001	0,001	0,015	
Concentrations (mg/mL)		0,1	0,5	1,0	3,0	5,0	8,0		
BHT B-carotène	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	42,5±	46,7±	57,1±	65,7±	76,6±	85,9±		
		0,032	0,017	0,021	0,003	0,038	0,041		
Concentrations (mg/mL)		0,1	0,5	1,0	3,0	5,0	8,0		
Combinaison	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène [%]	37,3±	47,6±	53,3±	58,8±	65,0±	82,0±		
		0,007	0,001	0,012	0,055	0,025	0,039		

Les résultats de blanchissement du  $\beta$ -carotène ont révélé que les plus faibles activités ont été obtenues par les huiles essentielles de *C. acaulis* (80 %) avec une  $CI_{50}$  de 21 mg/mL et *C. sulphurea* (50 %) avec une  $CI_{50}$  de 38 mg/mL, à la concentration de 38 mg/mL. Tandis que les activités les plus élevées sont développées par les extraits à l'hexane de *C. acaulis* et *C. pullata* avec des pourcentages de 80% ( $CI_{50} = 5,33$  mg/mL) et 75% ( $CI_{50} = 7,03$  mg/mL) respectivement, à la concentration de 15 mg/mL. Néanmoins, la référence synthétique BHT reste la plus active avec une  $CI_{50}$  égale à 0,59 mg/mL. (Tableau 13 ; Figure 19).

L'association de l'aplotaxène ( $CI_{50}= 3,85\text{mg/mL}$ ) avec le BHT a révélé une bonne capacité antioxydante ( $CI_{50}= 1,40\text{ mg/mL}$ ), mais qui reste inférieur comparé à la référence synthétique ( $CI_{50}= 0.59\text{ mg/mL}$ ). (Figure 19).



**Figure 19.**  $CI_{50}$  des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aploxène et la combinaison aploxène-BHT déterminées par la méthode du  $\beta$ -carotène

Les résultats de la combinaison peuvent être attribués à la molécule apolaire « aploxène » car, Frankel et al., ont démontré que le test de blanchiment  $\beta$ -carotène/acide linoléique est similaire à un système d'émulsion des lipides dans l'eau. Par conséquent, ils ont suggéré que les antioxydants apolaires ont des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant ainsi l'oxydation du  $\beta$ -carotène et la prévention de la formation des radicaux lipidiques [134].

### Discussion :

Dans la présente étude, tous les échantillons d'huiles essentielles, extraits à l'hexane, aploxène et la combinaison aploxène-Refs ont révélé une forte activité antioxydante avec des  $CI_{50}$  proches à ceux des témoins utilisés : BHT et EDTA. Ces résultats ouvrent une perspective prometteuse pour leurs utilisations dans différents domaines tels que l'agroalimentaire, la cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique.

Les potentiels antioxydants des parties aériennes des huiles essentielles peuvent être reliés à leurs profils chimiques, en particulier aux pourcentages relativement élevés en constituants majoritaires phénoliques tels que : le limonène, l'oxyde de caryophyllène, le tau-muurolol, le viridiflorol et (E)-phytol. Néanmoins, il existe des huiles essentielles contenant des constituants non phénoliques qui expriment un comportement antioxydant, ceci s'explique par

la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et d'autres constituants volatils, notamment les terpènes oxygénés qui les rendent de bons réducteurs, piègeurs de radicaux libres et chélateurs [135].

Toutefois, il est important de signaler que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires qui sont responsables de l'activité, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste en milieu oxydant pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [136].

Nous avons ainsi supposé que les propriétés antioxydantes des parties racinaires des huiles essentielles et des extraits sont imputables au constituant majoritaire l'aplotaxène. Seulement, en raison des interactions moléculaires il semble délicat d'attribuer l'activité d'une huile essentielle sur la seule base de sa caractérisation chimique. Pour cela, nous avons entrepris une approche plus ciblée visant à étudier la capacité antioxydante de la molécule majoritaire. Les résultats de ce dernier ont révélé une forte activité antioxydante, avec des  $CI_{50}$  presque proche des références synthétiques. A notre connaissance, aucune information relative à l'activité antioxydante de ce constituant n'a été rapportée dans la littérature.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de la combinaison de l'aplotaxène avec les références synthétiques (EDTA et BHT), a révélé des effets antioxydants synergiques prometteurs tout en diminuant la concentration inhibitrice demi-maximale. Cette association a la capacité de réduire et inhiber le processus naturel d'oxydation via des interactions synergiques importantes, qui sont même supérieures à certaines des normes utilisées. Selon les travaux antérieurs, il a été prouvé que l'association de l'huile essentielle d'*ajowan* avec le *caraway* a présenté une forte capacité antioxydante avec un effet synergique par rapport aux huiles individuelles testées seules [137]. Aussi pour le mélange des huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* qui ont révélé une bonne activité antioxydante qui dépasse celle exprimée pour chaque huile testée individuellement [138].

Ces résultats sont très prometteurs pour des applications de conservation des aliments, puisque les effets secondaires indésirables des antioxydants synthétiques sont largement connus, à savoir la cancérogenèse [139].



### III.2 Activité anti-inflammatoire

Les anti-inflammatoires classiques et synthétiques comme les corticoïdes, sont utilisés pour réduire et traiter l'inflammation tout en agissant sur de nombreux métabolismes et fonctions de l'organisme. En raison de leur puissante activité, ils augmentent la production de la lipocortine inhibant ainsi la phospholipase A2 et donc la libération de l'acide arachidonique. Seulement, l'utilisation prolongée de ces agents, diminuent fortement la migration des monocytes-macrophages et polynucléaires vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, les cytokines et les ions superoxydes, ceux qui conduits à des effets secondaires indésirables comme : le risque de la toxicité gastro-intestinale et la toxicité cardiovasculaire [140]. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des médicaments alternatifs et naturels à base de plantes médicinales pour le traitement des maladies inflammatoires, d'où l'intérêt de notre étude.

À notre connaissance, aucune étude sur l'évaluation de la capacité anti-inflammatoire *in vitro* par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines des espèces étudiées n'a été rapportée dans la littérature. Il s'agit alors de mettre en évidence le pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles, des extraits à l'hexane, l'aplotaxène et la combinaison entre l'aplotaxène et le médicament standard : diclofénac de sodium.

#### ▪ La dénaturation protéique

La dénaturation protéique est un processus dans lequel les protéines perdent leurs structures secondaires et tertiaires par application d'un stress externe ou d'un composé chimique comme exemple : un sel inorganique concentré, un solvant organique, de la chaleur ou encore leurs fonctions biologiques, ce qui peut conduire à la production d'auto-antigènes. Le mécanisme de la dénaturation consiste à l'altération électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintient la structure tridimensionnelle des protéines [141]. En effet, l'albumine peut subir des changements de conformation associés à un mauvais repliement de la structure 3D provoquant le processus d'agrégation sous l'action d'un traitement thermique [142]. Notre objectif est de rechercher de nouveaux principes actifs individuels ou en synergie à effet anti-inflammatoire afin de minimiser et empêcher la dénaturation protéique.

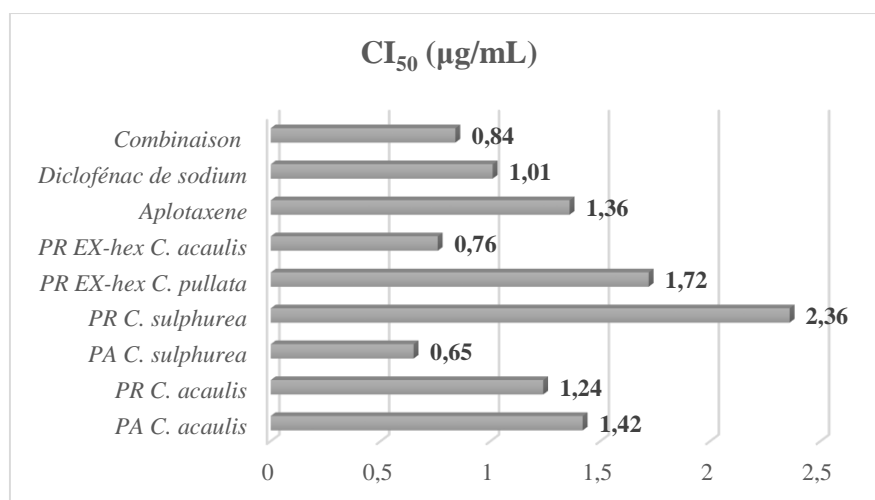
Le tableau 14 présente la variation du pourcentage de protection vis-à-vis à la dénaturation thermique de l'albumine à différentes concentrations (0,2 à 2,5 mg/mL). Ces résultats sont comparés à ceux enregistrés par le diclofénac, considéré dans ce test comme médicament de référence.

**Tableau 14:** Pourcentages d'inhibitions de la dénaturation de l'albumine des huiles essentielles, des extraits et le diclofénac sodique analysés

Inhibiteurs (%) ±SD (µg/mL)	200	400	600	1000	2000	2500
Concentrations (µg/mL)						
<b>PA <i>C. acaulis</i></b>	28,4±0,008	33,5±0,007	41,6±0,004	45,2±0,405	55,4±0,006	67,8±0,001
<b>PR <i>C. acaulis</i></b>	17,2±0,012	26,8±0,007	37,2±0,104	48,2±0,107	68,2±0,007	82,7±0,020
<b>PA <i>C. sulphurea</i></b>	18,9±0,003	29,9±0,007	54,0±0,023	70,0±0,009	75,1±0,050	77,6±0,006
<b>PR <i>C. sulphurea</i></b>	15,3±0,004	19,7±0,008	21,1±0,000	24,0±0,014	45,2±0,002	52,5±0,016
<b>PR EX-hex <i>C. pullata</i></b>	8,45±0,114	17,9±0,118	24,3±0,125	28,8±0,132	56,7±0,126	70,2±0,045
<b>PR EX-hex <i>C. acaulis</i></b>	16,4±0,029	36,5±0,052	37,0±0,004	56,3±0,009	69,5±0,012	88,0±0,029
<b>Aplotaxène</b>	11,7±0,008	25,5±0,022	33,1±0,010	47,5±0,023	65,2±0,024	77,3±0,045
<b>Diclofénac de sodium</b>	20,0±0,094	37,9±0,015	43,4±0,146	56,5±0,028	75,5±0,126	80,3±0,016
<b>Combinaison</b>	20,0±0,014	39,3±0,010	48,9±0,040	65,5±0,016	78,6±0,004	90,3±0,020

Les résultats obtenus ont révélé une inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines (albumine) par les différents échantillons testés. Les huiles essentielles de *C. acaulis* et *C. sulphurea* ont exprimé des pourcentages de protection allant de 52,5 à 82,7% par rapport au diclofénac 80,3% respectivement, à des concentrations variant de 0,2 à 2,5 mg/mL. Comparativement aux extraits qui ont affiché des valeurs de protection relativement plus élevées 70,2% et 88,0%, aux mêmes concentrations.

Cependant, la combinaison entre l'aplotaxène et le diclofénac a présenté une protection relativement supérieure (90,3%) à la même concentration (2,5 mg/L). (Tableau 14).



**Figure 20.** CI<sub>50</sub> des huiles essentielles, extraits à l'hexane, aplotaxène, et la combinaison entre aplotaxène et le médicament diclofénac.

La valeur de la CI<sub>50</sub> de la combinaison de l'aplotaxène avec le médicament de référence diclofénac (CI<sub>50</sub>= 0,84 µg/mL) s'est avérée supérieure par rapport au diclofénac (CI<sub>50</sub>= 1,01 µg/mL) et l'aplotaxène testé seule (CI<sub>50</sub>= 1,36 µg/mL). (Figure 20).

### Discussion :

D'après les résultats, on constate que les différents échantillons testés sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. En général, les effets anti-inflammatoires des huiles essentielles sont attribués à leurs structures terpénoïdes : myrcène et limonène [143], β-caryophyllène et α-humulène [144,145] de même pour l'alcool terpinen-4-ol [146]. Bien que ces deux constituants β-caryophyllène et α-humulène sont présents en faible quantité, seulement il ne faut pas négliger leurs rôles, puisque cette combinaison est déjà utilisée sur le marché brésilien pour une préparation anti-inflammatoire topique [147].

D'autre part, l'activité inhibitrice de la dénaturation de l'albumine des extraits est peut-être attribuée à la présence des différents métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes, les tannins ou lactones sesquiterpéniques contenues dans les espèces du genre *centaurées* étudiées. Certains flavonoïdes possèdent une activité inhibitrice puissante contre une variété d'enzymes telles que : la phospholipase A2, la protéine tyrosine kinase et la protéine kinase C [148]. Idem pour les lactones sesquiterpéniques qui ont été rapportées comme des agents anti-inflammatoires [149].

Par ailleurs, une activité anti-inflammatoire avec un effet synergique a été observée pour la combinaison du médicament standard diclofénac de sodium avec l'aplotaxène, leur association a été très efficace par rapport aux molécules individuelles. Selon Antonio C. Siani et Al., l'essai anti-inflammatoire *in-vivo* de la combinaison de deux huiles essentielles *Syzygium*

*cumini Skells* et *P. guajava L*, a été très efficace contrairement aux huiles individuelles testées seules [150]. Cette synergie peut s'expliquer par la présence des structures terpéniques telles que l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -caryophyllène contenues dans les huiles essentielles. En effet, le constituant  $\alpha$ -pinène peut avoir des actions synergiques en présence des squelettes mono et sesquiterpéniques. Toutefois, des études *in-vivo* sont nécessaires pour confirmer l'activité anti-inflammatoire de l'aplotaxène, de même, déterminer les mécanismes et les électeurs derrière ces actions anti-inflammatoires.

D'après la littérature, aucune étude sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines n'a été rapporté par d'autres auteurs sur les espèces étudiées pour pouvoir comparer nos résultats, mais de nombreuses études selon [59, 151,152] ont signalé l'effet anti-inflammatoire *in-vivo* des extraits aux solvants des espèces du genre *Centaurea*.

### **III.2.1 Essais préliminaires de la formulation d'un gel antiinflammatoire**

Dans le but de proposer une formulation topique d'un hydrogel à base du constituant applotaxène, isolé de l'huile essentielle de la partie racinaire de *C. acaulis*, il s'est avéré nécessaire de définir la dose adéquate à introduire dans la préparation galénique à des fins d'activité anti-inflammatoire. Pour ce faire, des tests pharmacologiques *in vitro* préliminaires pour comparer l'activité anti-inflammatoire ont été réalisés sur ce gel, le gel à blanc et le gel à action anti-inflammatoire commercialisé : Diclofénac de sodium.

#### **a. Contrôle de qualité du gel**

Les paramètres examinés à l'œil nu étaient notamment les caractères macroscopiques de la préparation, notamment :

#### **b. Couleur, odeur et la consistance**

La couleur du gel dépend de la quantité du principe actif, plus il est dosé, plus la couleur est foncée (Figure 22). L'odeur est boisée et la consistance est molle, elle ramollit aussitôt au contact de la peau.



**Figure 21.** Gel blanc de CARBOPOL et le gel au principe actif aplotaxène.



**Figure 22.** Les différentes préparations (doses) de l'hydrogel.

### c. Homogénéité

La vérification de l'homogénéité de l'hydrogel s'est effectuée en l'étalant en couche mince sur un verre à montre à l'aide d'une spatule (Figure 30). La méthode de préparation a permis d'obtenir un hydrogel avec une très bonne homogénéité or une répartition régulière de la molécule.



**Figure 30.** Consistance de l'hydrogel à base d'aplotaxène.

### III.2.2 Résultats du test anti-inflammatoire du gel :

Le test anti-inflammatoire de l'hydrogel a base du principe actif aplotaxène, à différentes doses (5%, 1%, 0,5% et 0,1%) (Tableau 15), a été réalisé par la méthode de la dénaturation des protéine *in-vitro*, dans les mêmes conditions du contrôle : diclofénac de sodium. Les résultats obtenus sont énumérés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 15:** Pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines des gel testés.

<b>Doses</b> <b>Echantillons</b>	<b>5%</b>	<b>1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,1%</b>
Hydrogel	>100	64,7	43,8	31,1
Gel Diclofénac	>100	50,4	26,2	11,1

Compte tenu des résultats obtenus, on remarque que le premier essai de la préparation du gel a 5%, a affiché des taux supérieurs à 100%. Ce qui nous a conduits à diminuer les concentrations (doses) du gel. Cependant, le deuxième essai de la préparation du gel a des doses moindres : 1%, 0,5% et 0,1% a révélé des taux d'inhibitions (64,7% ; 43,8% et 31,1%) supérieur à celui contrôle : diclofénac de sodium (50,4% ; 26,2% et 11,1%), respectivement.

### Discussion

Considérant les résultats captivants de ces tests préliminaires, nous proposons alors de fabriquer un gel naturel contenant 1% du principe actif aplotaxène pour avoir une efficacité équivalente ou même meilleur à celui du gel commerciale diclofénac de sodium 1%. (Tableau 15).

Les essais préliminaires de la formulation avaient pour objectif de démontrer la faisabilité d'un hydrogel a base du principe actif aplotaxène. Des gels à base de Carbopol a différentes doses ont été préparés avec succès au niveau de la paillasse. En outre, cette formulation doit être considérée comme un essai préliminaire de faisabilité. Sa réalisation satisfaisante autorise à penser qu'une optimisation et une fabrication substantielle du gel sont envisageables.

### III.3 Activité antimicrobienne

Plusieurs pathologies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives ont été attribuées aux radicaux libres. L'utilisation excessive des antibiotiques a entraîné une résistance et efficacité remarquable contre ces maladies, ce qui a engendré un autre problème affectant la santé publique [153]. A cet effet, une forte demande de développement de nouveaux antibiotiques a été sollicitée par les consommateurs contre les agents pathogènes. Pour cela, une approche est en cours de développement, elle consiste à combiner les antibiotiques avec des additifs naturels ou des antimicrobiens issus des composés bioactifs présents dans la nature [154]. De nos jours, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus à l'utilisation des médicaments naturels à base de plantes ayant des propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales [155]. Dans le cadre de la recherche de nouveaux constituants bioactifs pour lutter contre les infections microbiennes, la présente étude a pour but d'évaluer les effets antimicrobiens de chaque échantillon d'huile essentielle ainsi que l'aplotaxène contre un panel de microorganismes pathogènes d'importance clinique, également déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution sur microplaque du Mueller Hinton.

Cette étude sera complétée par la détermination des éventuels effets synergiques de l'association de l'aplotaxène avec les antibiotiques de références employés.

L'activité antimicrobienne a été évaluée contre 4 souches bactériennes, deux à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), deux à Gram positif : *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et *Staphylococcus. Aureus* (ATCC25923), et deux levures fongiques : *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Candida albicans* (IPP 444).

#### III.3.1 Activité antibactérienne :

Les bactéries à Gram négative sont moins sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram-positif. En effet, les lipopolysaccharides hydrophiles (LPS) contenant dans la membrane externe des bactéries à Gram-négative, agissent comme une barrière contre les macromolécules et les composés hydrophobes, de même l'espace périplasmique contient des enzymes capables de dégrader les molécules étrangères [156]. Également, les bactéries à Gram négatives possèdent des pompes à efflux qui réduisent les taux cellulaires d'antibiotiques [157]. Les résultats de cet essai ont révélé que les huiles essentielles de *C. acaulis* et *C. sulphurea* se sont avérées inefficace et sans effet contre les microorganismes testés. En revanche, l'aplotaxène possède une activité modérée contre *S. aureus* et *E. coli* avec des zones d'inhibitions de  $12,2 \pm 0,8$  mm (CMI=  $1,5 \pm 0,4$  g/L) et  $11,1 \pm 0,5$  mm (CMI supérieure à  $2,5$  g/L), respectivement.

Dans la présente étude, la combinaison de l'aplotaxène avec la Gentamicine à améliorer l'activité vis-à-vis à la bactérie Gram positif *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 14,2±0,4 mm (CMI= 1,5±0,2 g/L), et à la bactérie Gram négatif *E. coli* avec une zone d'inhibition de 13,1±0,6 mm (CMI= 2,1±0,2 g/L), mais elle reste inférieur par rapport au médicament : la Gentamicine qui représente une zone d'inhibition de 33±0,0 mm. (Tableaux 16, 17).

### III.3.2 Activité antifongique :

D'après les résultats, on remarque que les huiles essentielles des parties aériennes et racinaires ont affiché des diamètres d'inhibition mesurés de 9,0±0,5 à 24,4±0,6 mm contre la levure *C. albicans* ATCC10231 et de 7,0±0,5 à 16,0±0,5 mm contre *C. albicans* IPP444. (Tableau 16). Cependant, la molécule aplotaxène a présenté un effet inhibiteur remarquable sur la croissance des levures *C. albicans* ATCC10231 et IPP444 avec des CMI de 0,4 et 1,5 g/L, respectivement (Tableau 17).

**Tableau 16:** Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques en papier

Microorganismes	Huiles essentielles				Molécule Aplotaxène	Combinaison Aplotaxène- Gent	Références Gent 10 µg
	PA C. <i>acaulis</i>	PR C. <i>acaulis</i>	PA C. <i>sulphurea</i>	PR C. <i>sulphurea</i>			
<i>S. aureus</i> ATCC25923	7,5±0,5	7,2±0,5	7,0±0,5	7,0±0,5	12,2±0,8	14,2±0,4	33±0,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	/	/	/	/	/	/	25±0,0
<i>E. coli</i> ATCC25912	8,1±0,6	7,5±0,5	7,0±0,5	8,0±0,5	11,1±0,5	13,1±0,6	23±0,0
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	/	/	/	7±0	/	/	13±0,0
	PA C. <i>acaulis</i>	PR C. <i>acaulis</i>	PA C. <i>sulphurea</i>	PR C. <i>sulphurea</i>	Aplotaxène	Aplotaxène- Am B	Am B 0,2 mg
<i>C. albicans</i> ATCC10231	23,1±0,6	24,4±0,6	9,0±0,5	10,0±0,5	25,5±0,8	28,2±1,1	30±0,0
<i>C. albicans</i> IPP444	8,2±0,5	10,1±0,5	7,0±0,5	16,0±0,5	13,5±0,4	14,2±0,8	30±0,0

Les essais sont réalisés en duplicata, (n=2) ; mm : millimètre ; Gent : Gentamicine, Am B : Amphotéricine B  
PA : partie aérienne, PR : partie racinaire.

Il est à noter que la combinaison entre l'aplotaxène-Amphotéricine B à améliorer significativement l'activité antimicrobienne. Un effet inhibiteur très important contre les levures *C. albicans* ATCC10231 et IPP444 avec des zones d'inhibitions de 28,2±1,1 mm et 14,2±0,8 mm, ce qui a été confirmé par la diminution significative des valeurs des CMI, soit 0,2 et 0,4 g/L, respectivement. Ces derniers sont comparables à ceux de l'antibiotique Amphotéricine B (0,4g/L et 0,8g/L, respectivement) (Tableaux 16,17).





Cependant, on peut constater que l'activité antimicrobienne dépend de la qualité de l'huile essentielle d'une part et du type de microorganisme ciblé d'autre part, ceci est variable d'une souche bactérienne à une autre [163] et d'un certain nombre de facteurs tels que le solvant et la méthode d'extraction [164].

À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques en papiers et la méthode des concentrations minimales inhibitrices des espèces étudiées.

### **III.4 Activité neuroprotectrice**

La cholinestérase est une enzyme essentielle pour le bon fonctionnement du système nerveux, elle maintient le niveau physiologique d'un neurotransmetteur clé appelé acétylcholine (ACh). Néanmoins, dans une situation pathologique, cette enzyme peut être responsable d'un niveau anormal d'AChE en raison d'une hydrolyse excessive et plusieurs études ont montré que le manque d'AChE pourrait conduire à des effets secondaires tels que : les troubles de la mémoire, les troubles gastro-intestinaux et à la démence. C'est pourquoi il est devenu crucial de trouver de nouveaux traitements inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase à partir des ressources naturelles qui sont tout aussi efficaces et sans effets secondaires pour la maladie d'Alzheimer [165].

L'utilisation des plantes pour traiter les maladies neurodégénératives pourrait être une bonne alternative. Une étude récente a montré que les composés naturels contenus dans les plantes, notamment les phénoliques pouvaient arrêter l'agrégation de la  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) induite par l'acétylcholinestérase via l'inhibition de la toxicité de la protéine  $\beta$ -amyloïde, qui est l'une des principales causes de la maladie d'Alzheimer [166].

Les huiles essentielles ont été également proposées comme stratégies sous-jacentes de prévention et de traitement du vieillissement et des troubles neurodégénératifs [167].

#### **III.4.1 Les inhibiteurs des cholinestérases :**

Aujourd'hui, l'évaluation de l'activité inhibitrice enzymatique des produits naturels est considérée comme l'une des stratégies les plus importantes pour trouver des constituants efficaces pour le traitement de nombreuses maladies notamment la maladie d'Alzheimer.

À notre connaissance, aucune étude sur l'évaluation de l'effet neuroprotecteur *in vitro* par les tests d'inhibition enzymatiques des cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) des espèces *C. acaulis* et *C. pullata* n'a été rapportée dans la littérature. Il s'agit alors de mettre en évidence la capacité neuroprotectrice des extraits de *C.*

*acaulis*, *C. pullata*, aplotaxène et la combinaison entre l'aplotaxène et le médicament standard : la Galanthamine.

Le pourcentage d'inhibition des échantillons en fonction des concentrations testées est représenté dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 18:** Résultats de l'activité neuroprotectrice des espèces *C. acaulis*, *C. pullata* et aplotaxène :

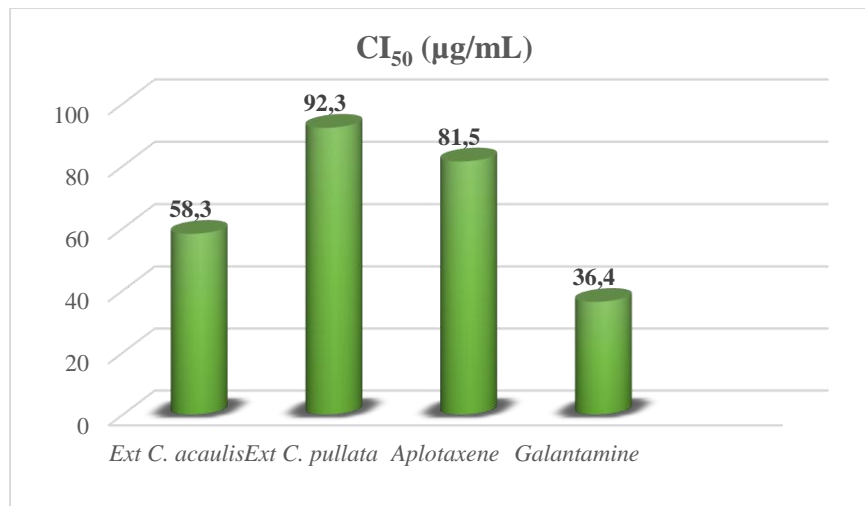
Concentrations µg/mL	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase						
	3,125	6,25	12,5	25,0	50,0	100,0	CI <sub>50</sub> µg/mL
<b>Echantillons</b>							
Ext <i>C. acaulis</i>	/	/	/	/	/	/	/
Ext <i>C. pullata</i>	/	/	/	/	/	/	/
Aplotaxène	/	/	/	/	/	/	/
Galantamine	35,93 ± 2,28	43,77 ± 0,00	68,50 ± 0,31	80,69 ± 0,41	85,78 ± 1,63	91,80 ± 0,20	6,82 ± 0,8
Combinaison	/	/	/	/	/	/	/
	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase						
Ext <i>C. acaulis</i>	15,2± 0,2	24,3± 0,6	36,3± 1,6	45,1± 1,1	49,5± 2,1	72,6± 1,8	58,3±1,2
Ext <i>C. pullata</i>	13,3± 0,1	18,3± 0,2	26,3± 1,2	35,1± 2,1	47,5± 1,1	69,6± 1,9	92,3±1,1
Aplotaxène	Na	Na	10,3± 0,3	28,4± 0,6	43,2± 2,6	58,6± 1,6	81,5±1,3
Galantamine	3,3± 0,6	6,93± 0,6	24,3± 2,9	45,1± 2,6	63,9± 2,8	73,6± 0,8	36,4±1,7
Combinaison	/	/	/	/	/	/	/

Reference : Galantamine ; Ext : extrait à l'hexane ; Combinaison : Galantamine + Aplotaxene

D'après les résultats obtenus, on remarque que les échantillons testés n'ont montré aucune inhibition contre l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), tandis qu'ils ont inhibé sélectivement la butyrylcholinestérase (BChE) à des niveaux modérés.

Une variation remarquable a été observée pour les deux extraits, en effet, à la concentration de 100 µg/mL, la plus grande activité a été observée par l'extrait de *C. acaulis* avec un taux d'inhibition de 72,6% (CI<sub>50</sub>=58,3 µg/mL), presque similaire à la référence synthétique 73,6% (CI<sub>50</sub>=36,4 µg/mL), contrairement à l'extrait de *C. pullata* qui a inhibé avec un taux moindre de 69,6% (CI<sub>50</sub>=92,3 µg/mL). (Tableau 18, Figure 23).

D'autre part, l'aplotaxène a affiché une faible inhibition avec un taux de 58,6% (CI<sub>50</sub>=81,5 µg/mL) comparé à sa combinaison avec la Galanthamine qui n'a démontré aucune inhibition.



**Figure 23.** CI<sub>50</sub> de l'Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase

### Discussion :

Les échantillons testés n'ont montré aucun effet inhibiteur contre l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme a une affinité presque exclusivement spécifique pour son substrat naturel. En revanche, des résultats modérés ont été obtenus contre la butyrylcholinestérase (BChE) qui a une affinité beaucoup plus large et peut donc hydrolyser un grand nombre d'esters synthétiques et naturels [168].

L'activité inhibitrice des parties racinaires des extraits peut être attribuée d'une part au constituant majoritaire aplotaxène qui représente un taux plus de (50%), et d'autre part aux constituants minoritaires tels que : le palmitate d'éthyle, linoléate d'éthyle ou encore l'isocaryophyllène, trans-caryophyllène et caryophyllène oxyde qui ont déjà été rapportés comme des antiAChE [169]. Aucune étude sur l'évaluation des effets inhibiteurs des cholinestérases de ces extraits n'est rapportée dans la littérature pour pouvoir comparer nos résultats. En outre, des études sur d'autres espèce du genre *Centaurea* ont révélé leurs effets inhibiteurs contre les cholinestérases, en effet, une étude menée par Aktumsek et al., sur trois espèces du genre *centaurea* : *C. polypodiifolia* var, *pseudobehen*, *C. pyrrhoblephara*, et *C. antalyense*, a montré que ces derniers ont affiché une activité inhibitrice modérée de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase [114]. Selon Bensaad et Al., les propriétés anticholinestérasiques de l'extrait de *C. tougourensis* pourraient être attribuées à ses constituants, et en particulier : les flavonoïdes, les triterpènes, les alcaloïdes et les saponines [165].

Actuellement, l'activité butyrylcholinestérase (BChE) représente un grand intérêt, car au stade avancé de la maladie d'Alzheimer, la concentration d'acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme clé dans la dégradation de l'acétylcholine, diminue brusquement (jusqu'à 85 %), tandis que le niveau de BChE reste le même, et ce dernier représente le cholinestérase prédominant dans le

cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [81,170]. C'est pourquoi ces recherches ont ciblé la BChE comme une nouvelle approche pour intervenir dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

### **III.5 Etude *In-silico* de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *C. sulphurea***

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique « Drug design » [171]. Ces méthodes sont utilisées pour optimiser les produits chimiques, étudier la sélectivité d'un médicament vis-à-vis d'une cible spécifique, de même, elles sont adoptées pour estimer les propriétés physico-chimiques et les paramètres pharmacocinétiques tels que : la solubilité, la biodisponibilité et la toxicité. Bien qu'ils aident les approches expérimentales à la découverte de nouveaux médicaments, seulement, ils ne sont pas encore suffisamment précis pour les remplacer [172].

La modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire est une méthode de calcul qui permet de prédire la liaison du complexe (protéine-ligand) ainsi la conformation la plus favorable formant le complexe le plus stable. Également, elle permet de représenter, d'interpréter et de prédire les structures et les fonctions biomoléculaires [173]. Par conséquent, comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. Pareillement, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective.

L'axe principal de ce travail se situe dans le domaine de bio-informatique et plus précisément, la recherche de nouveaux agents antioxydants parmi les constituants de l'huile essentielle de la partie aérienne et racinaire de *C. sulphurea*. L'intérêt principal est de développer des inhibiteurs potentiels contre trois enzymes endogènes : la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SODs), le glutathion peroxydase (GPX) ainsi que la séquence de l'ADN, afin de combattre les radicaux libres et protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs impliqués dans de très nombreuses maladies.

#### **III.5.1 Méthodes théoriques et computationnelles**

La minimisation de l'énergie et les propriétés des meilleurs ligands de l'huile essentielle de la partie aérienne et racinaire de *C. sulphurea* obtenues par le logiciel MOE, sont indiquées dans le tableau 19. Les propriétés des autres ligands sont énumérées en annexes 1-2.

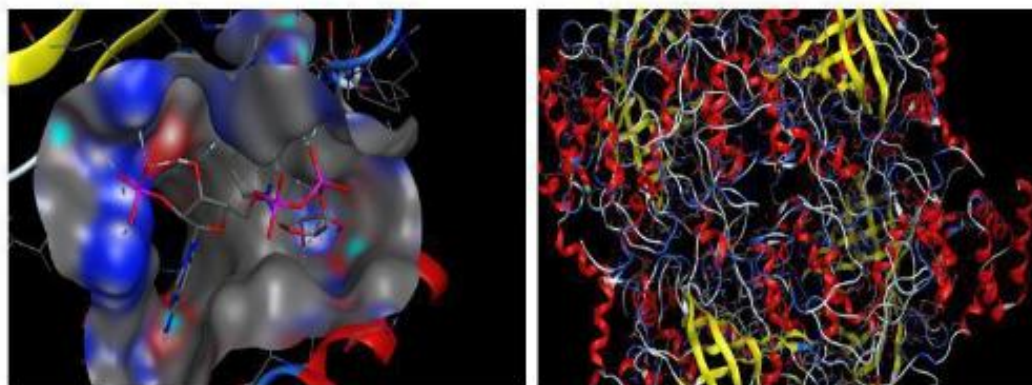
**Tableau 19:** Les propriétés et la minimisation de l'énergie des meilleurs ligands de l'huile essentielle de *C. sulphurea*.

Ligands	Composés	Toxicité	LogP	Energies (Kcal/mol)	LogS	Hdon+Hacc	Flexibilité
L22	β-Cadinène	No	4,58	2,60161e+001	-4,67	don:0; acc:0	1 out 1
L23	δ-Cadinène	No	4,58	2,95608e+001	-5,17	don:0; acc:0	1 out 1
L24	3-(Z)-Hexenylbenzoate	No	3,20	3,01393e+001	-3,30	don:0; acc:1	6 out 6
L30	γ-Eudésmol	No	4,06	3,84759e+001	-3,67	don:1; acc:1	1 out 1
L33	β-Eudésmol	No	3,92	4,47669e+001	-4,36	don:1; acc:1	1 out 1
L36	(Z,Z)-Farnésol	No	4,40	1,60145e+001	-4,25	don:1; acc:1	7 out 7
L39	(Z)-Phytol	No	6,36	1,72039e+001	-8,27	don:1; acc:1	13 out 13
L40	Héneicosane	No	8,44	-8,49952e+000	-10,66	don:0; acc:0	18 out 18
L42	Eicosane	No	8,05	-8,29676e+000	-10,15	don:0; acc:0	17 out 17
L50	Acétate de géranyle	No	3,24	9,02954e+000	-3,02	don:0; acc:1	6 out 6
L58	Aplotaxène	No	5,98	1,22114e+001	-7,27	don:0; acc:0	11 out 11
L59	Acide Hexadécanoïque	No	5,55	-1,46061e+001	-6,49	don:2; acc:1	14 out 14
L60	(E)-Phytol	No	8,27	1,77210e+001	-6,36	don:1; acc:1	13 out 13

LogP : Coefficient de partage octanol/eau ; Log S : Coefficient de solubilité ; Hdon et Hacc : nombre de donneurs et accepteurs possibles de liaisons hydrogène, (la capacité de liaison hydrogène d'un soluté médicamenteux est reconnue comme un déterminant crucial de la perméabilité, un potentiel élevé de liaison hydrogène est souvent lié à une faible perméabilité et absorption) ; flexibilité : nombre de liaisons rotatives

D'après le tableau 16, on remarque que les composés (Z)-phytol, héneicosane, eicosane, aplotaxène et (E)-phytol affichent les plus grandes valeurs de LogP et les plus petites valeurs de LogS, c'est-à-dire une bonne solubilité dans l'eau et donc une meilleure perméabilité à travers les membranes cellulaires. Cependant, les ligands : L39, L40, L42, L59 et L60 possèdent des valeurs de flexibilité (angle de torsion) élevées : 13 out 13, 18 out 18, 17 out 17 et 14 out 14 comparés aux autres ligands, ce qui explique que ces constituants sont plus flexibles. Par conséquent, on constate que la croissance de l'angle de torsion dépend du nombre de liaison du ligand.

La structure complète du récepteur avec sa cavité enzymatique et les résidus du site actif a été obtenue par la méthode de diffraction des rayons X (Figure 24).



**Figure 24.** La cavité enzymatique de la cible : 1dgb avec les résidus du site actif.

Le code d'enzyme a été téléchargé via la base de données PDB (<https://www.rcsb.org>).

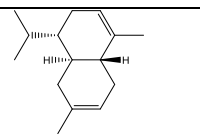
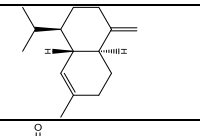
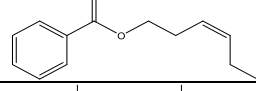
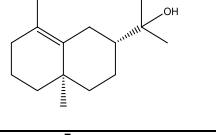
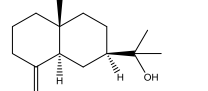
### III.5.2 Evaluation du docking moléculaire

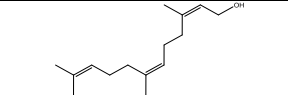
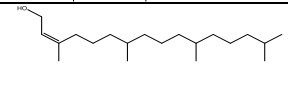
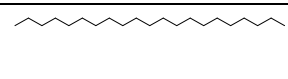
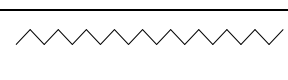
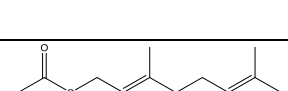
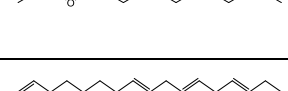
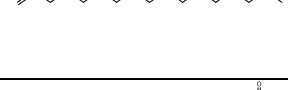
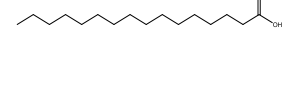
#### III.5.2.1 Interaction avec la catalase, les antioxydants enzymatiques endogènes et la séquence d'ADN

##### ➤ Interaction avec la catalase

Le bilan énergétique des meilleurs complexes formés par les meilleurs ligands avec la cible de la catalase est affiché dans le tableau 20. Les énergies des autres complexes sont mentionnées en annexe 3.

**Tableau 20:** Bilan énergétique des meilleurs complexes (enzyme-ligands) Kcal/mol

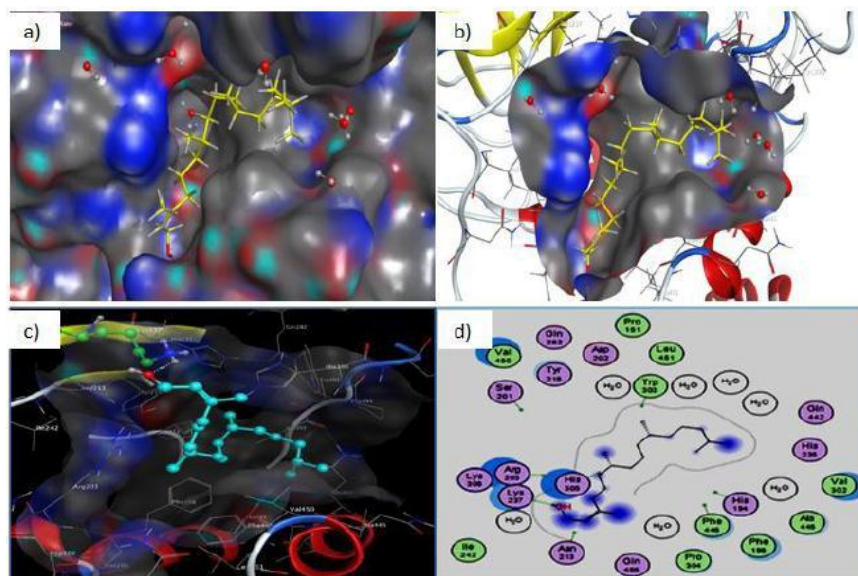
Ligands	Structures chimiques	Énergie de liaison (Kcal/mole)	Rmsd - refine	Energy-Conf	Energy-Place	Energy-Refine	RMSD
$\beta$ -Cadinène		-5,528	2,355	43,482	-52,984	-15,390	1,327
$\delta$ -Cadinène		-5,351	1,159	16,569	-47,146	-15,205	0,086
3-(Z)-Hexenyl-benzoate		-5,478	1,930	27,476	-48,967	-16,140	0,237
$\gamma$ -Eudésmol		-5,286	1,428	40,253	-54,067	-16,033	0,282
$\beta$ -Eudésmol		-5,070	2,654	8,3214	-51,109	-14,573	0,204

(Z,Z)-Farnésol		-5,717	2,840	30,338	-50,508	-18,749	0,246
(Z)-Phytol		-7,184	2,225	24,944	-67,679	-22,707	0,306
Héneicosane		-6,809	2,181	16,027	-58,416	-20,155	0,237
Eicosane		-7,158	1,879	14,769	-40,716	-19,400	0,150
Acétate de géranyle		-5,268	1,295	18,100	-51,625	-15,292	0,231
Aplotaxène		-6,130	1,630	37,518	-53,907	-19,592	0,281
Acide Hexadécanoïque		-6,266	1,053	79,371	-61,458	-20,364	0,310
(E)-Phytol		-6,908	1,747	24,898	-63,211	-19,590	0,321
<b>Binding Energy</b> : Énergie de liaison ; <b>Rmsd –refine</b> : la déviation de la racine de la moyenne des carrés ; <b>Energy –Conf</b> : Énergie de configuration ; <b>Energy – Place</b> : Énergie de place ; <b>Energy – Refine</b> : Énergie d'affinement ; <b>RMSD</b> : Déplacement quadratique moyen.							

Les résultats obtenus montrent que le score d'énergie de tous les complexes formés (1dgb - inhibiteurs) était compris entre -3,819 et -7,184 Kcal/mol (Tableau 20+ Annexes 3-4). Ainsi, parmi les meilleurs constituants testés, le (Z)-phytol (L39, figure 25) a été prédit comme le plus fort liant du récepteur de la catalase (1 dgb) qui forme le complexe (1dgb-L39) le plus stable avec une énergie de liaison la plus faible -7,184 Kcal/mol, suivie du composé eicosane (L42, figure 21) avec une énergie de -7,158 Kcal/mol.

De plus, on constate que les complexes formés par les meilleurs ligands L39 et L42 possèdent un score d'énergie plus faible par rapport aux complexes formés par les contrôles (témoins synthétiques) : hydroxytoluène butylé (BHT) et l'acide éthylène diamine tétra- acétique (EDTA), dont l'énergie libre de liaison était de -5,052 et -5,591 Kcal/mol, respectivement. (Annexe 5).

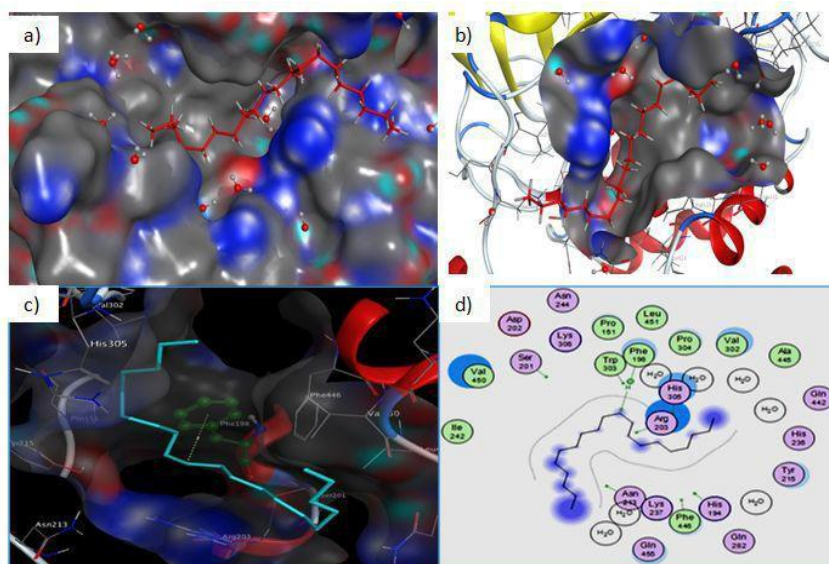




### L39

**Figure 25.** Diagramme d'interaction 3D de la liaison du site actif (la surface de la cavité de l'enzyme : la catalase) avec le (Z)-phytol

Avec la poche (b) ; sans la poche (c) ; mode de liaison du (Z)-phytol sous forme de diagramme 2D (d) ; schémas de la liaison du (Z)-phytol dans le site actif de la catalase, où il apparaît en modèle du bâtonnet en rose tandis que la surface de la catalase est représentée en bleu rouge vert (a).



### L42

**Figure 26.** Diagramme d'interaction 3D de la liaison du site actif (la surface de la cavité de l'enzyme : la catalase) avec l'eicosane

Avec la poche (b) ; sans la poche (c) ; mode de liaison de l'eicosane sous forme de diagramme 2D (d) ; schémas de la liaison de l'eicosane dans le site actif de la catalase, où il apparaît en modèle du bâtonnet en rose tandis que la surface de la catalase est représentée en bleu rouge vert (a).

Les résultats des interactions entre les atomes des meilleurs ligands et les résidus du site actif obtenus par l'amarrage moléculaire, sont présentés dans le tableau 21. Les résultats des autres complexes sont mentionnés en annexe 4.

**Tableau 21:** S-score (énergies) et interactions entre les atomes des meilleurs inhibiteurs et les résidus du site actif de la cible catalase.

Liasons entre atomes des composés et résidus du cite actif									
N°	Composés	S-score (kcal/mol)	Les atomes du composé	Les Atomes récepteurs	Les résidus récepteurs	Types d'interactions	Distances (Å)	Energies (kcal/mol)	
<b>Catalase (Cat)</b>									
L59	Acide Hexadécanoïque	-6,266	6-ring	OH	TYR 215	H-accepteur	2,26	63,6	
L60	(E)-Phytol	-6,882	O1	1	O	HOH 1533	H-accepteur	3,51	-0,6
			O1	1	O	HOH 1558	H-accepteur	2,88	-0,3
L39	(Z)-Phytol	-7,184	O1	NZ	LYS237	H-accepteur	3,11	-1,80	
L40	Héneicosane	-6,900	C	12	5-ring	HIS 305	H-pi	3,62	-0,7
L42	Eicosane	-7,158	C-11	6-ring	PHE198	H-pi	4,45	-0,60	

S-score : Énergie de liaison ; Acides aminés : (TYR : Tyrosine, LYS : Lysine, HIS : Histidine ARG : Arginine, PHE : Phénylalanine.). C : carbone, O : Oxygène, N : Azote, H : Hydrogène.

Le meilleur ligand (Z)-Phytol interagit avec l'acide aminé LYS237 via l'interaction H-accepteur, a une distance de 3,11 Å et une énergie de -1,80 Kcal/mol. Le deuxième meilleur ligand interagit avec l'acide aminé PHE198 par l'interaction H-Pi, a une forte distance de 4,45Å et une énergie de -0,60 Kcal/mol. Aussi, l'acide hexadécanoïque L59 a interagi avec deux acides aminés TYR 215 et HOH 1533 (H-accepteur) a des distances de 2,26 et 3,51 Å et des énergies de 63,3 et -0,6 Kcal/mol. Également, les ligands héneicosane et (E)-phytol L40 et L60 ont interagi avec HIS 305 (H-pi) et HOH 1558 (H-accepteur) à des distances de 3,62 et 2,88 Å, et des énergies de -0,7 et -0,3 Kcal/mol, respectivement. (Tableau 21).

En s'en rapportant aux résultats obtenus, tous les composés testés ont présenté des liaisons d'hydrogènes stables. En outre, les recherches de Sawar [174], [175] ont rapporté que la liaison halogène qui est similaire à la liaison d'hydrogène, joue un rôle vital pour les systèmes biologiques et chimiques. En effet, les ajouts des halogènes augmentent non seulement les propriétés physico-chimiques mais également l'affinité de liaison [176].

L'affinité de liaison des ligands (Z)-phytol, eicosane, héneicosane, (E)-phytol et l'acide hexadécanoïque L39, L42, L40, L60, et L59 a considérablement augmentée à -7,184, -7,158, -6,900, -6,882, et -6,266 kcal/mol, respectivement. Ainsi, une liaison hydrogène améliorée est observée pour les ligands L39 et L42, contribuant non seulement à l'augmentation de l'affinité de liaison, mais aussi à l'amélioration de sa spécificité.

Cette observation nous a permis de confirmer que les constituants oxygénés diterpéniques (L39 et L42) se lient à la liaison souhaitée de la protéine réceptrice par l'amarrage moléculaire.

### ➤ Interaction avec la séquence d'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent conduire à des modifications de l'ADN de plusieurs façons : fragmentation des bases de l'ADN, la rupture d'un simple ou double brin, de la purine, de la pyrimidine ou du sucre [177]. La plupart de ces modifications sont très pertinentes et peuvent conduire à la carcinogenèse, le vieillissement, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et auto-immunes [178].

À cette thématique, l'objectif de cette étude a été d'élucider les interactions des meilleurs inhibiteurs obtenus par l'amarrage moléculaire avec la séquence de l'ADN, afin de valider les interactions avec les sites nucléotides et leurs affinités.

Les résultats de l'amarrage moléculaire de la séquence d'ADN (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> dodécamère (PDBID :1BNA) sont énumérés dans le tableau 22. Les énergies et interactions des autres composés sont énumérées en annexe 5.

**Tableau 22:** Les énergies des meilleurs inhibiteurs d'ADN

Ligands	Composés	DE*(kcal/mol) ADN	DE*(kcal/mol) Catalase	ETOR (kJ)	VDW (kJ)	EIE (kJ)
Ligands de control	BHT31404	-4,743	-5,052	330,721	413,487	-1942,09
	EDTA6049	-4,965	-5,591	330,722	413,486	-1942,09
Lref	NADPH	-5,900	-8,043	330,722	413,486	-1942,09
L39	(Z)-Phytol	-6,978	-7,184	330,723	413,317	-1942,01
L40	Héneicosane	-6,819	-6,809	330,724	413,316	-1942,01
L42	Eicosane	-6,858	-7,158	330,724	413,316	-1942,01
L59	Acide Hexadécanoïque	-6,516	-6,266	330,725	413,315	-1942,01
L60	(E)-Phytol	-6,425	-6,908	330,720	413,488	-1942,09

\* DE : énergie Docking (Liaison) ; ETOR : Énergie de torsion ; VDW : Van der Waals ; EIE : Énergie d'interaction électrostatique

Selon les résultats obtenus, les composés possédant les substituants donneurs d'électrons les plus forts, ont une plus grande capacité de liaison avec l'ADN, contrairement aux autres composés. En outre, certains des composés testés sont des fixateurs de sillons mineurs.

Par ailleurs, les meilleurs composés : (Z)-phytol (L39), eicosane (L42), héneicosane (L40), acide hexadécanoïque (L59), apilotaxène (L58) et (E)-phytol (L60) ont présenté les meilleures interactions. Leurs énergies calculées étaient : - 6,978 ; - 6,858 ; - 6,819 ; - 6,516 ; - 6,406 et - 6,425 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. A l'exception de β-cadinène, γ-eudésmol et β-

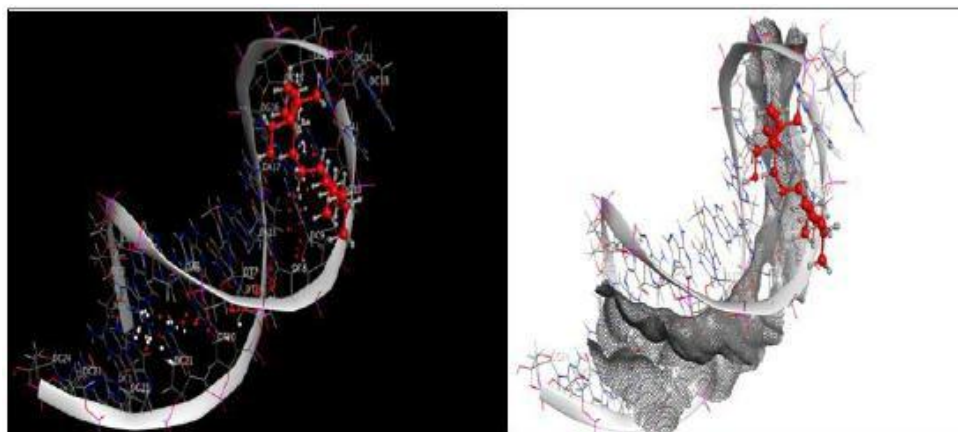
eudésamol qui existaient dans la région du sillon principal, leurs énergies obtenues via l'amarrage moléculaire étaient : - 4,741 ; - 4,824 et - 4,793 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. En revanche, les autres composés sont situés dans le petit sillon de l'ADN. (Tableau 22 + Annexe 5).

Dans cette étude, parmi les ligands testés, les deux composés : (Z)-phytol (Ligand 39) et l'eicosane (Ligand 42) ont exposé la plus faible énergie de liaison pour la séquence d'ADN (-6,978, -6,858 kcal/mol) et l'enzyme catalase (-7,184, -7,158 kcal/mol), comparés aux ligands de référence (NADPH) et ligands de control : le butylhydroxytoluène (BHT) et l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), avec un score d'énergie de (-4,743 et -4,965 kcal/mol) pour la séquence d'ADN, et (-5,052 ; -5,591 kcal/mol) pour l'enzyme, respectivement.

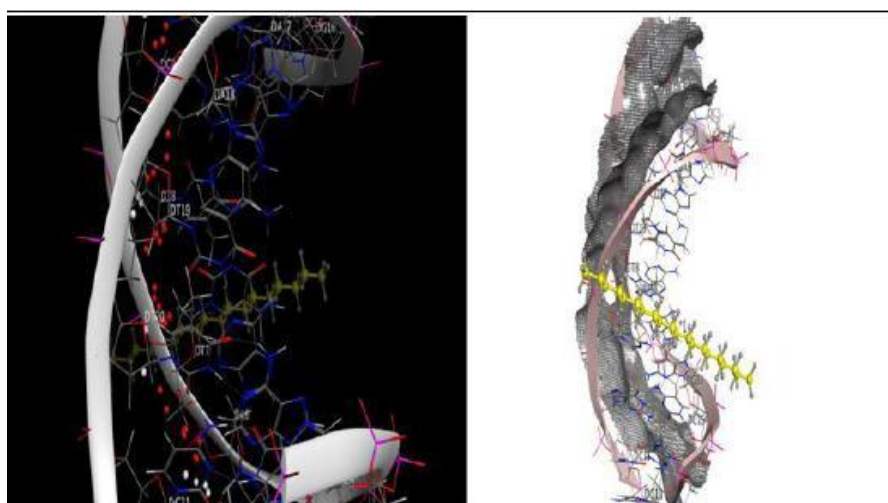
L'énergie de liaison est le paramètre principal générée par l'amarrage moléculaire. Elle nous renseigne sur la force et l'affinité de l'interaction entre le ligand et le récepteur. Ainsi, plus l'énergie de liaison est faible, plus l'interaction est grande. Par conséquent, les ligands (Z)-phytol (L39) et eicosane (L42) ont dévoilé une meilleure affinité et interaction que le ligand de référence (NADPH) et les molécules de contrôle : BHT et EDTA. En effet, les deux complexes présentent une meilleure activité antioxydante que les références synthétiques : BHT et EDTA.

Par ailleurs, les résultats de l'amarrage moléculaire montrent que l'affinité de liaison du complexe-1 [(Z) phytol-catalase] est supérieure à celle du complexe-2 [eicosane-catalase]. Les études de simulation d'amarrage moléculaire et de dynamique moléculaire suggèrent que le composé (Z)-phytol a une forte affinité de liaison avec l'ADN par rapport à l'eicosane.

La plus grande affinité de liaison du complexe-1 est due aux interactions hydrophobes ( $\pi$ - $\pi$ ) avec les bases nucléotides de l'ADN et à l'interaction de la liaison hydrogène. En revanche, le complexe-2 eicosane-catalase a montré seulement quelques interactions ( $\pi$ - $\pi$ ) avec les bases nucléotides de l'ADN. Le groupe aromatique volumineux du complexe-1 a participé aux interactions ( $\pi$ - $\pi$ ) avec les nucléotides. Cependant, le groupe du complexe-2 n'a montré aucune interaction avec les nucléotides. C'est pourquoi, l'absence d'interaction ( $\pi$ - $\pi$ ) avec les nucléotides DC15 et DT14 a diminué l'affinité de liaison du complexe-2.



### Z-Phytol L39



### Eicosane L42

**Figure 27.** Modèle de l'amarrage moléculaire du site de la liaison la plus favorable des composés (a) L39 et (b) L42 avec le duplex d'ADN dodécamère de la séquence (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (PDB ID : 1BNA).

D'après les résultats du docking, il a été constaté que le complexe-1 [(Z)-phytol-catalase] s'insère dans le sillon des fragments d'ADN et que les forces hydrophobes jouent des rôles principaux dans la liaison du complexe à l'ADN. Ainsi, les composés (Z)-phytol et eicosane ont montré une meilleure liaison. (Figure 27). Par conséquent, nous pouvons conclure que le complexe- 1 a montré une plus grande affinité de liaison à l'ADN et une plus forte activité antioxydante que le complexe- 2.

D'après ces résultats, il est à noter que plusieurs facteurs, notamment la variabilité des structures des ligands et la capacité à construire des liaisons covalentes et/ou non covalentes, pourraient affecter l'affinité de liaison à l'ADN. Il existe même d'autres facteurs tels que la distribution des charges électrostatiques avec l'ADN et les paires de bases A : T [179].

➤ **Interaction avec les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes**

Afin de compléter ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions de nos meilleurs inhibiteurs avec d'autres antioxydants enzymatiques endogènes : la SOD et la GPx qui sont important et indispensable dans l'ensemble de la stratégie de défense des antioxydants, en particulier, leur rôle est de : convertir les radicaux libres en substances moins nocives (SOD) et éliminer le peroxyde d'hydrogène de l'organisme (GPx).

Les résultats des énergies des meilleurs inhibiteurs des trois cibles enzymatiques endogènes : la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx), obtenus par l'amarrage moléculaire sont présentés dans le tableau 23. Les résultats des autres composés sont indiqués en annexe 6.

**Tableau 23:** Les énergies d'amarrage des meilleurs inhibiteurs de la CAT/ SOD/ GPx.

N°	Composés	Récepteurs	DE (kcal/mol)	ETOR (kT)	VDW (kcal/mol)	EIE (kcal/mol)
<b>Lref</b>	NADPH	CAT	-8,043	2603,149	8687,066	-22383,8
		SOD	-3,247	637,836	3687,273	-10233,1
		GPX	-6,176	1134,834	4767,672	-12474,1
<u>L39</u>	(Z)-Phytol	CAT	<u>-7,184</u>	2537,734	8664,659	-22264,6
		SOD	-3,993	598,608	4192,510	-10291,6
		GPX	-4,413	1091,834	4753,317	-12384,3
L40	Héneicosane	CAT	-6,809	2522,562	8677,642	-22285,8
		SOD	-4,142	581,009	3691,151	-10289,5
		GPX	-4,340	1054,875	4788,068	-12421,7
<u>L42</u>	Eicosane	CAT	<u>-7,158</u>	2515,807	8661,011	-22263,4
		SOD	<u>-4,163</u>	581,203	3704,941	-10281,9
		GPX	-4,686	1060,625	4773,694	-12419,8
L59	Acide Hexadécanoïque	CAT	-6,266	2527,458	8649,425	-22338,3
		SOD	-3,617	590,860	3763,376	-10415,7
		GPX	-4,748	1077,965	4792,381	-12482,6
L60	(E)-Phytol	CAT	-6,882	2533,186	8651,835	-22244,0
		SOD	-3,798	598,256	3744,463	-10344,5
		GPX	-5,281	1067,257	4775,731	-12435,8

**DE** : Energie du docking ; **ETOR** : Energie de Torsion ; **VDW** : Energie de Van der Waals ;  
**EIE** : Energie d'Interaction Electrostatique.

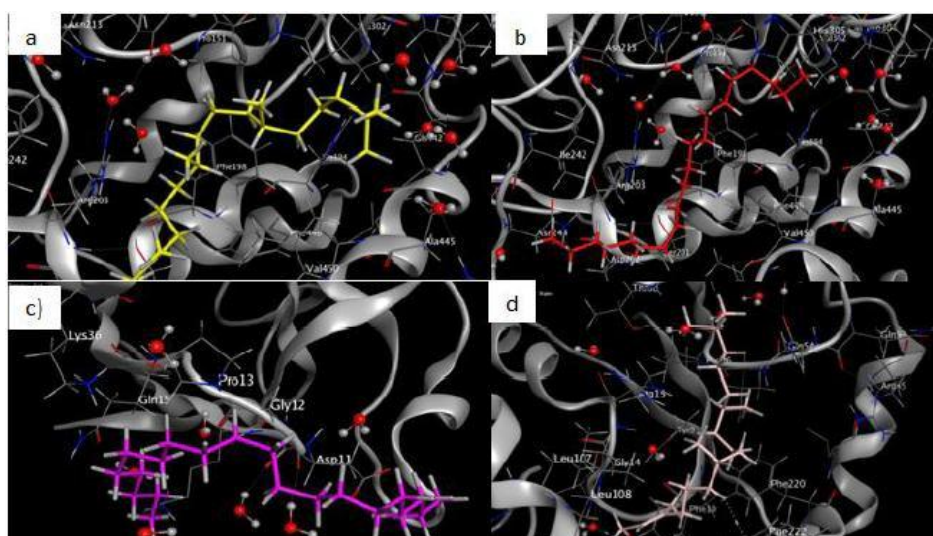
Les résultats de l'amarrage moléculaire ont révélé que le (Z)-phytol (Ligand 39), l'eicosane (Ligand 42), le (E)-phytol (Ligand 60), l'héneicosane (Ligand 40), l'acide hexadécanoïque (Ligand 59) et l'aplotaxène (Ligand 58) étaient les meilleurs composés interagissant avec les liaisons des résidus du site actif de **la catalase**. Leurs énergies d'amarrage calculées étaient de -7,184 ; -7,158 ; -6,882 ; -6,809 ; -6,266 et -6,130 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. En revanche, les composés β-eudésmol (-5,070 kcal.mol<sup>-1</sup>) et γ-eudésmol (-5,286 kcal.mol<sup>-1</sup>) ont présenté la plus faible interaction avec ce récepteur, voir annexe 6.

D'autre part, les meilleurs composés interagissant avec les liaisons des résidus du site actif de la **superoxyde dismutase** étaient : le (Z)-phytol (ligand 39), l'eicosane (ligand 42), l'acétate de (E)-géranyle (ligand 50) et l'hénécicosane (ligand 40). Leurs énergies d'amarrage étaient de - 3,993 ; - 4,163 ; -4,173 et - 4,142 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. Par contre, les composés β-cadinène et γ-eudésmol ont révélé les plus faibles interactions avec ce récepteur, leurs énergies calculées étaient de : -3,422 et -3,182 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. (Tableau 23 + Annexe 6).

Par ailleurs, les meilleurs composés interagissant avec les liaisons des résidus du site actif de la **glutathion peroxydase** étaient : le (E)-phytol (Ligand 60), l'acide hexadécanoïque (Ligand 59), l'eicosane (Ligand 42) et l'aplotaxène (Ligand 58). Leurs énergies calculées étaient de - 5,281 ; - 4,748 ; - 4,686 et -4,664 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivement. (Tableau 23 + Annexe 6). Néanmoins, les composés qui ont présenté les plus faibles interactions avec ce récepteur sont : le β-eudésmol (- 4,000 kcal.mol<sup>-1</sup>) et le δ-cadinène (-4,053 kcal.mol<sup>-1</sup>).

Par conséquent, nous avons observé que les composés (Z)-phytol (L39), eicosane (L42), hénécicosane (L40), acide hexadécanoïque (L59), aplotaxène (L58), et (E)-phytol (L60) ont présenté une affinité de liaison pour interagir avec les récepteurs de l'ADN, la catalase et la glutathion peroxydase. Contrairement aux composés (Z)-phytol (L39), eicosane (L42), (E)-géranyle acétate (L50) et hénécicosane (L40) qui ont montré une affinité de liaison pour interagir avec les récepteurs de la superoxyde dismutase.

Les représentations 3D des meilleures poses des interactions du (Z) phytol (L39) et eicosane (L42) avec les cibles enzymatiques (SOD et GPX) sont illustrées dans la figure ci-dessous :



**Figure 28.** Représentation 3D des meilleures poses des interactions entre les meilleurs ligands et leurs récepteurs

Les protéines sont représentées par le modèle de ruban solide et les ligands sont représentés par le modèle des bâtonnets. A. interaction entre Z-phytol et SOD ; B. interaction entre Eicosane et SOD ; C. interaction entre Eicosane et GPx ; D. interaction entre E-phytol et GPx.

### III.5.3 Évaluation de la dynamique moléculaire

Récemment, de nombreuses études ont démontré que le composé ayant obtenu le score d'énergie le plus faible par l'amarrage moléculaire, ne signifie pas toujours qu'il est meilleur [180]–[182]. De ce fait, il est nécessaire de compléter ce travail par des simulations de dynamique moléculaire afin de valider nos résultats.

Selon nos résultats, le composé Z-phytol possède la meilleure affinité de liaison pour interagir avec les enzymes endogènes. A cet optique, le complexe [Z-phytol-catalase] a été soumis à 100 ns de simulation de dynamique moléculaire.

#### III.5.3.1 Les propriétés thermodynamiques

L'évaluation des propriétés thermodynamiques du meilleur ligand (Z)-phytol (L39) a été étudiée par l'approche des simulations de dynamique moléculaire dans l'ensemble NVT (volume constant) et NPT (pression constante). Nous avons effectué des minimisations d'énergies du meilleur complexe après un amarrage de 600ps. Puis nous avons effectué des simulations jusqu'à (cycles de production DM) 100ns en trois étapes sous contraintes (Tableau 24).

- Etape d'amorçage sp1 (0-20ns) : la thermalisation de 0 à 300 K par exemple.
- Etape d'équilibrage sp2 (20ns -40ns) : simulation normale mais le système n'est pas en équilibre. (40ns-60ns) : relaxation (adaptation) de l'eau à la surface de la protéine.
- Phase de production sp3 (60ns-100ns) : enregistrement des trajectoires.
- Pour finir, l'analyse et la validation des résultats par contribution au score (énergie).

**Tableau 24:** Propriétés thermodynamiques calculées en réelles unités

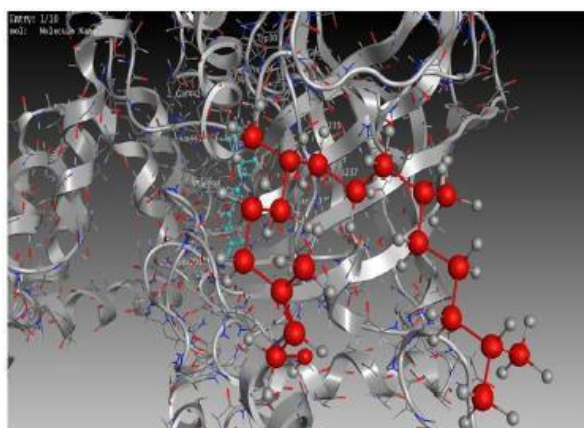
Étapes	Méthodes	H	U	EKT	P	V
SP1	CAT NVT	-548,001	1239,506	7896,099	-60,342	70733,242
	CAT NPT	126,562	-3738,745	3258,956	-166,790	70734,429
	CAT NVT	-3,077	-1794,187	6340,632	-6,647	70733,242
	CAT NPT	0,607	-4177,466	3644,816	-25,583	70129,531
	CAT NVT	1,431	-1872,646	296,267	47,574	70733,242
	CAT NPT	0,856	-4300,242	3777,552	-44,703	68616,622
SP2	CAT NVT	1,794	-1910,387	6454,985	110,509	70733,242
	CAT NPT	1,732	-4370,358	3851,464	-19,527	68023,101
	CAT NVT	7,922	-2034,435	6380,051	-48,245	70733,242
	CAT NPT	15,996	-4431,202	3926,552	-21,916	66554,343
	CAT NVT	6,380	-2223,329	6466,652	-91,712	70733,242
	CAT NPT	24,248	-4429,957	3933,550	-81,352	65744,632



	CAT NVT	-1,253	-2267,157	6466,531	50,258	70733,242
	CAT NPT	4,536	-4482,546	4055,145	108,319	58992,375
SP <sub>3</sub>	CAT NVT	0,874	-2352,489	6388,428	-44,417	70733,242
	CAT NPT	44,459	-4455,767	4068,258	-34,409	55208,097
	CAT NVT	5,273	-2387,140	6402,313	61,308	70733,242
	CAT NPT	87,701	-4490,880	4146,594	153,381	51238,800
<b>Pression P = P* ε/ σ<sup>3</sup> ; Énergie de configuration U = U* Nε ; Energie cinétique de translation EKT = EKT* Nε ;</b>						
<b>Enthalpie H=H* Nε.</b>						

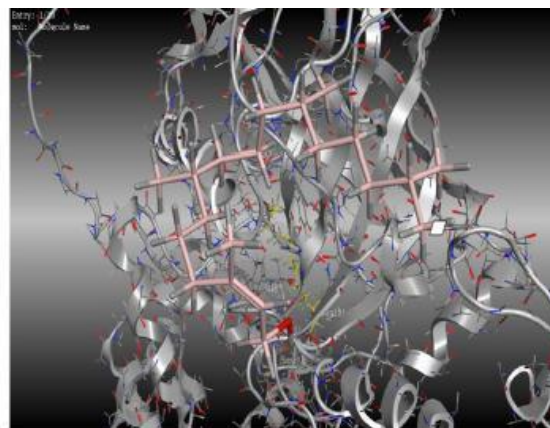
Les résultats obtenus ont révélé que le complexe formé par le ligand L39 a présenté des énergies de configuration et cinétique de translation plus faibles dans l'ensemble NVT comparé à l'ensemble NPT (figures 29- 30). En revanche, les fluctuations de pression dans les ensembles NVT sont plus grandes que les ensembles NPT. Par conséquent, on peut conclure que le ligand 39 (Z)-phytol est prédit comme le système le plus interactif.

Ces résultats sont cohérents avec ceux des prédictions de l'amarrage moléculaire (Tableaux 2-24). Ce qui explique que les complexes de base de schiff pouvaient se combiner spontanément avec la catalase par le biais des interactions de Van der Waals et les liaisons hydrogènes.



**Figure 29.** Docking du composé L39 (jaune) dans le site de liaison de la catalase

La pose finale du ligand après une simulation de dynamique moléculaire (DM) en NVT.

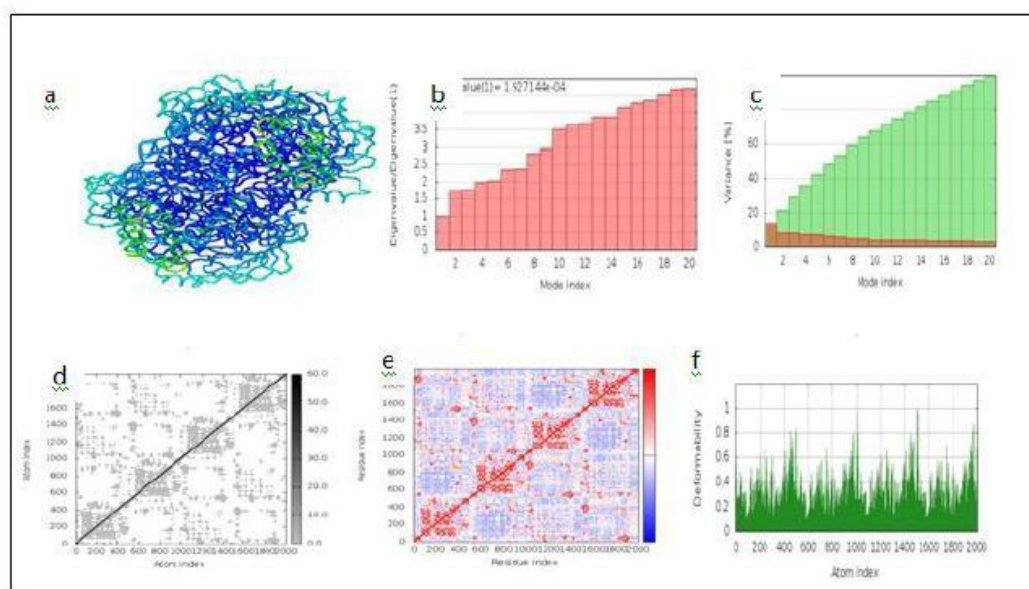


**Figure 30.** Docking du composé L39 (jaune) dans le site de liaison de la catalase

La pose finale du ligand après une simulation de dynamique moléculaire (DM) en NPT

### III.5.3.2 Les propriétés dynamiques structurales

L'étude de simulation de la dynamique moléculaire du meilleur composé (Z)-phytol (Ligand39) (Tableau 20) a été réalisée par le serveur en ligne « iMODS » pour analyser la dynamique structurale. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 31.



**Figure 31.** Résultats de simulation de la dynamique moléculaire du complexe (Z)-Phytol - Catalase (Cat)

(a) mobilité AMN, (b) valeur propre, (c) variance (la couleur rouge indique les variances individuelles et la couleur verte les variances cumulées), (d) réseau élastique (les régions grises foncées indiquent les régions les plus rigides) du complexe, (e) carte de covariance (mouvements corrélés (rouge), non corrélés (blanc) ou anti-corrélés (bleu)) et (f) déformation.

L'analyse en mode normal (AMN) du complexe [(Z)-phytol -catalase] est illustrée dans la figure 31. D'après l'étude de la dynamique moléculaire, le complexe (Z)-phytol (L39) -catalase (Cat) présente une valeur propre assez élevée de  $1,927144 \times 10^{-4}$  ; cette valeur est illustrée dans la figure 31b. En outre, la carte de variance a montré un degré plus élevé en variances cumulatives comparé aux variances individuelles (figure 31c). La carte de covariance et du réseau élastique ont également affiché des résultats satisfaisants (figure 31d, et figure 31e), respectivement. Les graphes de déformation du complexe (Z)-phytol (Ligand 39) - catalase (Cat) montrent que les pics correspondent aux régions de la protéine avec déformation (figure 31f).

Les deux molécules (ligands) sélectionnées peuvent être utilisées comme des agents potentiels pour épuiser les radicaux libres. En revanche, le composé (Z)-phytol (ligand 39) s'est révélé comme l'agent anti-catalase (Cat) le plus puissant. Cependant, d'autres recherches *in vitro* et *in vivo* seraient nécessaires afin de confirmer les résultats de cette étude.

### III.5.4 L'explorateur de propriétés OSIRIS

L'évaluation des propriétés OSIRIS des meilleurs inhibiteurs a été réalisée via une étude computationnelle. La prédiction est évaluée et codée par couleur [183]. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 25. Les résultats des autres composés sont résumés en annexe 7.

**Tableau 25:** Propriétés OSIRIS des meilleurs ligands

Ligands	Mutagène	Tumorigène	Irritant	Reproduction effective
<b>Lref</b>	Vert	Vert	Vert	Vert
<b>BHT</b>	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge
<b>EDTA</b>	Rouge	Vert	Vert	Rouge
<b>L39</b>	Vert	Vert	Vert	Vert
<b>L40</b>	Vert	Vert	Vert	Vert
<b>L42</b>	Vert	Vert	Vert	Vert
<b>L59</b>	Vert	Rouge	Rouge	Vert
<b>L60</b>	Vert	Vert	Vert	Vert

Vert = bon ; Rouge = mauvais

Selon les résultats obtenus, on constate que les composés L40, L42 et L60 sont les meilleurs ligands puisqu'ils affichent aucun risque de toxicité, seulement ces derniers présentent moins d'affinité avec la cible de la catalase. En revanche, le composé L59 s'est avéré un mauvais ligand puisqu'il possède des propriétés tumorigéniques et irritantes.

Cependant, on affirme que le composé L39 est le plus approprié, car il affiche aucun risque de toxicité (classe 5) et présente une bonne affinité de liaison avec le site de la catalase et la séquence d'ADN.

### III.5.5 Evaluation *in silico* des propriétés ADME

Une mauvaise pharmacocinétique (ADME) est la principale raison de l'échec des candidats médicaments dans les essais cliniques. Il est donc important d'analyser les caractéristiques d'absorption, de distribution, d'excrétion et toxicité pour la découverte de nouveaux médicaments [184]. Les résultats des propriétés pharmacocinétiques des meilleurs ligands L39 et L42 évaluées *in silico* par le serveur Swiss ADME sont présentés dans le tableau 26.

**Tableau 26:** Les paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques des meilleurs composés.

		L39	L42
<b>Absorption</b>	Intestinale humain	90.643	89.671
	Perméabilité cutanée	-2.631	-2.774
	Perméabilité Caco-2	1.399	1.371
	Solubilité dans l'eau	-5.51 MS	-7.94 PS
<b>Distribution</b>	VDss (humain)	0.385	0.614
	Perméabilité BBB	0.793	1.014
	Perméabilité SNC	-1.527	-1.199
<b>Excrétion</b>	Clairance totale	1.686	1.998
	Transport rénal de cations organiques	No	No
<b>Toxicité</b>	Toxicité aiguë orale chez le rat (DL50)	1.848	1.586
	Toxicité d'AMES	No	No

Vert = bon, jaune = assez bon, rouge = mauvais.

Les composants actifs : L39- (Z)-phytol, L42- Eicosane.

**ADMET** : Absorption. Distribution. Métabolisme. Excrétion et toxicité.

**BBB** : Barrière hémato-encéphalique (si >0,3 bien distribué, si <-1 mal distribué à la BBB),

**SNC** : système nerveux central (si > -2 pénètre le SNC, si < -3 incapable de pénétrer le SNC),

**VDss** : volume de distribution dans le plasma si < -0,15 faible, si >0,45 élevé ; perméabilité cutanée : (faible si > -2,5).

**Perméabilité Caco-2** : mesure la perméabilité intestinale (bonne si > 0,9).

**Absorption intestinale humaine** : (bonne si > 90 %).

**Ames** : test biologique permettant d'estimer le potentiel toxique d'une substance chimique.

**Solubilité dans l'eau** : MS : solubilité modérée, PS : solubilité faible.

L'étude des paramètres d'absorption montre que les ligands L39 et L42 présentent une biodisponibilité orale prometteuse en raison de la perméabilité cellulaire optimale Caco-2 > 0,9 et intestin humain > 90 %, aussi une bonne perméabilité cutanée inférieure à -2,5 (Tableau 26). D'autre part, le volume de distribution (VDss) de nos deux meilleurs ligands L39 et L42 est de 0,385 et 0,614 respectivement, ce qui suggère que les médicaments seront distribués dans le tissu en tant qu'agents antioxydants puissants. Néanmoins, ils ne sont pas des substrats et inhibiteurs du transporteur de cations organiques. Par ailleurs, le ligand de control (EDTA) et le

ligand de référence (NADPH) co-cristallisé, sont totalement incapables de pénétrer dans le système nerveux central (SNC). Par conséquent, nous proposons le composé L39 comme un médicament thérapeutique potentiel actif par voie orale.

Les présentes simulations de dynamique moléculaire et d'analyse bio-informatique ont été appliquées pour analyser un nouvel inhibiteur des récepteurs enzymatiques antioxydantes (catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPX)) et de l'ADN. Ainsi, parmi tous les composés testés, le composé (Z)-phytol (diterpène oxygéné) a présenté la plus grande affinité de liaison compte tenu des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

De plus, la pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique s'est avérée meilleure pour le (Z)-phytol que pour la molécule témoin et les ligands de références. Par conséquent, nous proposons le composé (Z)-phytol L39 issue de l'huile essentielle de la partie racinaire de *C. sulphurea* comme un nouveau médicament naturel actif par voie orale. En outre, des études biologiques et pharmacologiques supplémentaires sont nécessaires pour le valider.



***CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES***

L'Algérie, de par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse, notamment dans le secteur des plantes aromatiques et médicinales, qui peuvent être exploitées dans divers domaines industriels. L'intérêt porté sur la recherche de ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. D'où, la thématique de cette étude qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles en Algérie.

A cet égard, ce travail doctoral a porté sur l'investigation phytochimique et pharmacologique de trois espèces du genre *Centaurea* : *C. acaulis*, *C. sulphurea* et *C. pullata* appartenant à la plus grande famille botanique, les astéracées. Le choix de ce genre repose sur leurs richesses en métabolites secondaires de types flavonoïdes, stéroïdes et lactones sesquiterpéniques. Ces espèces ont été sélectionnées suivant plusieurs paramètres, y compris : la disponibilité et le fait que leurs huiles essentielles et extraits à l'hexane n'ont pas fait l'objet d'étude scientifique selon l'axe visée. Lors de ce travail, la partie « Phytochimie » a été effectuée au sein du laboratoire LASNABIO de l'Université de Tlemcen, et la partie « Analyse et caractérisation » a été réalisé à l'Université de Corse.

Ce projet de thèse avait quatre objectifs complémentaires :

- La connaissance, la préservation et la valorisation des espèces végétales de l'Ouest Algérien.
- La recherche de nouvelles molécules actives destinées à des applications économiquement durables liées à l'industrie cosmétiques, pharmaceutiques et agroalimentaire à partir de fractions volatiles et extraits de plantes.
- L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles, extraits, et la combinaison entre le constituant majoritaire et les références synthétiques de chaque test afin de chercher les éventuels effets synergiques.
- Préparation galénique d'un hydrogel a base du principe actif isolé des espèces étudiées, à des fins antiinflammatoires.

Le présent travail s'est articulé autour de trois chapitres :

**Le premier chapitre** a été consacré à une généralité sur les huiles essentielles et les techniques d'analyses courantes dans le domaine d'analyse des mélanges volatils des plantes en s'attardant sur l'approche méthodologique développée par le laboratoire chimie des produits naturels pour l'analyse des mélanges complexes des volatils. Également, nous avons présenté une petite revue bibliographique sur les différentes activités biologiques mise en œuvre dans cette étude. Enfin, nous avons terminé par une étude bibliographique sur les descriptions botaniques et ethnobotaniques, chimiques et biologiques des espèces étudiées.

**Le deuxième chapitre**, inclue les résultats de l'étude chimique des huiles essentielles des trois espèces, à savoir, l'étude des compositions chimiques, l'étude de la variabilité chimique et le suivie végétatif. Cette partie a été structurée sous forme de trois partis relatifs à chacune des espèces étudiées. Une analyse comparée des résultats nous permet de tirer les conclusions suivantes.

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires de *C. acaulis* a permis d'identifier 81 et 52 composés représentant (93,7 et 94,8%) de la composition totale, respectivement. L'huile essentielle collective (HE Coll) de la partie aérienne a été caractérisée par l'abondance des composés sesquiterpéniques, dont les principaux composants sont le  $\tau$ -muurolol (8,8%), oxyde de caryophyllène (5,9%) et viridiflorol (3,7%). Suivie par les composés monoterpéniques, le principal constituant de cette classe est le limonène (11,1%). Cependant, les constituants non-terpéniques étaient présents en faible quantités (15,6%). En revanche, la caractérisation chimique de l'huile essentielle collective des parties racinaires a nécessité la mise en œuvre d'analyses complémentaires intégrant la chromatographie sur colonne et la RMN du proton et carbon-13 afin d'isoler, purifier et identifier le composé majoritaire.

En complément, l'étude statistique de la variabilité intra spécifique des huiles essentielles a révélé que les parties racinaires n'ont montré aucune variabilité dans la composition chimique. Contrairement aux parties aériennes qui ont distingué deux groupes d'échantillons se discriminant selon les lieux de récolte. Le premier groupe a été constitué principalement par les teneurs élevées en (E)- $\beta$ -caryophyllène (3,4-8,4%), acide hexadécanoïque (6,3-10,8%),  $\alpha$ -pinène (2,9-4,1%), viridiflorol (5,5-8,6%) et oxyde de caryophyllène (6,2-9,9%), alors que le deuxième groupe a été caractérisé par les teneurs élevées en limonène (15,2-19,2%),  $\tau$ -muurolol (12,6-17,2%), (E)-phytol (4,3-5,6%) et spathulénol (1,2-3,1%).

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires de *C. sulphurea* a permis d'identifier 42 et 18 composés représentant des pourcentages variant de 91 à 96% et de 90 à 95% de la composition totale, respectivement. L'évolution de la composition chimique des huiles essentielles au cours du cycle végétatif a révélé un comportement métabolique différent par rapport aux deux parties de la plante qui se traduit par une production accrue de sesquiterpènes oxygénés pour la partie aérienne, alors que cette dernière voit sa proportion diminuée pour la partie racinaire. En effet, la composition chimique est principalement influencée par le stade de maturité de la plante.



La caractérisation chimique de l'extrait à l'hexane de *C. pullata* a révélé la présence de 08 constituants représentant 94,0% de la composition totale. L'extrait est caractérisé par la famille des composés non-terpéniques, dont le constituant dominant aplotaxène qui représente plus de la moitié de la composition chimique avec un taux de (80,3%).

**Le troisième chapitre** s'intéresse aux résultats des tests biologiques effectués sur les échantillons des parties aériennes et racinaires des huiles essentielles, extraits à l'hexane, le constituant aplotaxène, et la combinaison d'aplotaxène avec les références synthétiques des différents tests.

- L'activité antioxydante a été réalisée par trois méthodes chimiques : la méthode anti-radicalaire DPPH, la chélation des ions ferreux et le blanchissement du  $\beta$ -carotène. Le test anti-inflammatoire a été effectué par la méthode de la dénaturation des protéines. Ces deux tests ont révélé des pouvoirs potentiels très intéressants.
- L'activité antimicrobienne a été évaluée contre des microorganismes pathogènes d'importance clinique. Des résultats modérés ont été obtenus par l'association Aplotaxène- Gentamicine vis-à-vis des bactéries *S. aureus* et *E. coli* pour le test antibactérien. En revanche, cette association a révélé un effet inhibiteur important contre les levures *C. albicans* ATCC10231 et IPP444 pour le test antifongique.
- L'activité neuroprotectrice a été effectuée par les tests d'inhibition enzymatiques des cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les échantillons testés n'ont montré aucune inhibition contre l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), tandis qu'ils ont inhibé la butyrylcholinestérase (BChE) à des niveaux modérés.
- L'étude *in-silico* de l'activité antioxydante évaluée par les deux méthodes chimiques computationnelles : l'approche de l'amarrage moléculaire et la simulation de dynamique moléculaire ont révélé que le composé (Z)-phytol (L39) était le meilleur inhibiteur de l'ADN et les récepteurs des trois enzymes (la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase). De plus, les propriétés ADME affichent que le composé L39 ne présente aucun risque de toxicité et expose un coefficient élevé de perméabilité cutanée dans les intestins avec une biodisponibilité orale prometteuse. Les résultats de cette étude contribuent aux connaissances pharmacologiques et à l'efficacité thérapeutique du constituant (Z)-phytol à réduire le stress oxydatif. Par conséquent, il a été suggéré comme un nouveau médicament potentiel antioxydant.

- Les essais préliminaires de la formulation d'un gel à base du principe actif aplotaxène a des fins d'activité anti-inflammatoires, ont montré que le gel contenant 1% du principe actif avait une efficacité équivalente ou même meilleur à celle du gel commerciale diclofénac de sodium 1%.

Les perspectives de notre travail sont :

- Réaliser les tests de toxicité sur les espèces étudiées (Huile essentielle, extraits à l'hexane)
- Une étude expérimentale in vitro et/ou in vivo du meilleur ligand (Z)-phytol afin d'évaluer davantage son efficacité dans la réduction du stress oxydatif.
- Caractérisation des propriétés physico-chimiques et la transposition d'échelle pour l'hydrogel.



**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## 1. Echantillonnage du matériel végétal

L'étape de l'échantillonnage est indispensable pour toute étude phytochimique, plus particulièrement elle est essentielle pour la détermination des constituants de la fraction volatile d'une plante vue leurs sensibilités aux facteurs environnementaux, car ces derniers peuvent influencer la qualité mais aussi la quantité des métabolites extraits des végétaux [185].

À cet égard, il est indispensable d'être relativement vigilant à la période de récolte, à la phénologie, à la détermination botanique, et aux recueils d'informations correspondantes à l'environnement afin d'appréhender au mieux d'expliquer les éventuelles variations de composition en métabolites volatils.

## 2. Provenance du matériel végétale et identification :

Le matériel végétal des trois espèces sélectionnées : *Centaurea acaulis*, *Centaurea sulphurea* et *Centaurea pullata* a été identifié par le botaniste BABA Ali du laboratoire de botanique, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

Pour chaque espèce étudiée, la matière végétale a été prélevée sur plusieurs localités réparties dans la wilaya de Tlemcen. Les campagnes d'échantillonnages se sont déroulées sur diverses périodes de l'année en fonction de l'état végétatif.

## 3. Situation géographique des zones de récoltes :

### 3.1 *Centaurea acaulis*

Afin de déterminer la composition chimique des huiles essentielles et l'étude de l'influence du lieu de récolte, les échantillons (parties aériennes et racinaires) de *C. acaulis* ont été collectés dans 08 stations de la région de Tlemcen (S1 à S8) réparties en deux zones principales : littorales et montagneuses. Ghazaouet [35°06'48"N; 1°50'04"O] (S1), Nedroma [35°01'38"N; 1°09' 45"O] (S2), Zenata [34°70'03"N; 1°27'30"O] (S3), Henaya [34°58'90"N; 1°27'15"O] (S4), Ain fezza [34°86'70"N; 1°23'30"O] (S5), Zarifet [34°52'20"N; 1°19'08"O] (S6), Beni bahdel [34°43'00"N; 1°31'00"O] (S7), Beni snous [34°39'22"N; 1°33'04"O] (S8).

En outre, pour la préparation des extraits, les échantillons de la partie racinaire de *C. acaulis* ont été étaient recueillis en mois d'Avril 2019, dans la forêt de Ain fezza, Tlemcen [980 m, 34°86'70"N ; 1°23'30"O].

### 3.2 *Centaurea sulphurea*

Afin de déterminer la composition chimique des huiles essentielles et l'étude de l'influence du mois de récolte (suivi végétatif), la station de Ain douze (Commune Beni Mester) située à 11 kilomètres au sud-ouest de Tlemcen, a été choisie comme zone d'étude.

Les échantillons (parties aériennes et racinaires) de *C. sulphurea* ont été récoltés pendant le mois d'Avril (stade végétatif), Mai (stade de floraison) et Juin (stade de pleine floraison).

### 3.3 *Centaurea pullata*

Les échantillons de la partie racinaire de *C. pullata* ont été étaient recueillis en mois de Mai 2019 dans la forêt de Lalla setti, Tlemcen [1030 m, 34° 51' 45''N 1° 18'56''E].

## 4. Préparation d'échantillons

De nombreuses revues décrivent les avantages et les limites des différents procédés et techniques mises en œuvre pour l'extraction des constituants volatils et l'obtention des huiles essentielles. En effet, le choix de la méthode dépend du procédé d'extraction et de l'objectif souhaité, entre autre, la nature, le rendement ainsi les caractéristiques physico-chimiques du matériel végétale à traiter [186]. De notre part, nous avons utilisé l'une des principales techniques appliquées à l'échelle du laboratoire nommée : hydrodistillation (Water Distillation) dans un appareil de type Clevenger [187].

### 4.1 Extraction des huiles essentielles :

La distillation des huiles essentielles des parties aériennes et racinaires des espèces étudiées, a été réalisée par hydrodistillation durant 4h- 5h dans un appareil de type Clevenger dans le respect du procédé validé par la pharmacopée européenne. Cependant, il est impérativement d'être très rigoureux par rapport aux conditions et aux paramètres d'extractions car la qualité et la quantité d'huiles essentielles peuvent être affectées par : la durée de distillation, le ratio masse de plante/volume d'eau, le flux de condensation et la durée entre la récolte et la distillation [188,189]. La conservation des huiles essentielles se fait dans des piluliers en verre stériles et teintés, à l'abri de la lumière, l'air et humidité à une température de 4°C, afin d'éviter toute réaction de dégradation.

#### ➤ Rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendements (\%)} = \frac{MHE}{MMF} \times 100$$

Rdt HE : Rendement en huile essentielle (%)

MHE : Masse d'huile essentielle (g) MMF : Masse de la matière végétale (g)

## 4.2 Extraction à l'hexane

Les échantillons des parties racinaires ont été séchés et broyés, puis, soumis à un épuisement continu à l'hexane par macération à froid. Le macéra obtenue a été filtré et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les rendements des deux extraits obtenus sont de 1,90% pour *C. pullata* et 2,10% pour *C. acaulis* par rapport à 500 g de poudre.

## 5. Fractionnement de l'huile essentielle collective

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange afin de le purifier ou bien identifier de nouveaux constituants absents des bibliothèques de références.

La partie racinaire de l'huile essentielle collective de *C. acaulis* a été fractionnée par une chromatographie sur colonne de gel de silice (FC, gel de silice 200-500  $\mu\text{m}$ ) en utilisant de l'hexane 100% comme éluant afin d'isoler et identifier le constituant majoritaire.

## 6. Analyse des huiles essentielles et des extraits

L'analyse des mélanges complexes des composés volatils est celle appliquée dans le laboratoire de Chimie des Produits Naturels de l'Université de Corse (France), qui s'effectue par le couplage d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la SM [32].

### ➤ Conditions GC-FID :

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, Etats Unis), équipé d'un seul injecteur split/splitless, de deux colonnes capillaires (60 m x 0,22 mm d, i, ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ) respectivement apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane) et polaire (Rtx-WAX, polyéthylène glycol) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60°C à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 35 mn à 230°C.

Les échantillons ont été injectés en mode split (1/60). L'élution est assurée par un gaz vecteur de dihydrogène avec une pression en tête de colonne de 25 psi et un débit de 0,8 mL/mn. Le volume injecté est de 0,2  $\mu\text{L}$  [190].

Pour chacun des composés, les indices de rétention polaire et apolaire sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane. Les teneurs des composés dans le mélange ont été exprimés en pourcentages relatifs (aire du constituant / aire totale du mélange) sur la base du signal FID.

➤ **Conditions CPG-SM :**

L'analyse des échantillons d'huiles essentielles et extraits a été réalisée à l'aide d'un appareil Perkin Elmer Autosystem XL (Walton, MA, Etats Unis) couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer Turbo Mass, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes capillaires (60 m x 0,22 mm d,i, ; épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), La quantité injectée est de 0,2 µL par mode split avec un rapport de division de 1/80.

En mode impact électronique : les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70eV, et la température de la source d'ions est de 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. Les conditions chromatographiques (programmation de température, gaz vecteur, etc..) sont identiques à celles décrites précédemment.

L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des spectres de masse (impact électronique) avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux présents dans les banques informatisées.

➤ **Conditions RMN :**

Des expériences de spectroscopie RMN sur les composés de l'huile essentielle collective de *C. acaulis* ont été réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE à transformée de Fourier fonctionnant à 400,13 MHz pour le proton, équipé d'une sonde d'observation à large bande à détection directe (BBO). Toutes les mesures RMN ont été acquises à 298 K (25°C). Les déplacements chimiques sont exprimés en δ ppm. Les constantes de couplage scalaires (J) sont données en Hertz.

Pour le RMN <sup>13</sup>C : les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker AVANCE 400 fonctionnant à 100,13 MHz équipé d'une sonde de 5 mm, dans du chloroforme deutéré (CDCl<sub>3</sub>), tous les déplacements étant référés au tétraméthyl silane (TMS) interne. Les spectres ont été enregistrés avec les paramètres suivants : largeur d'impulsion (PW), 4µs (angle de basculement 45°) ; temps d'acquisition 2,7s pour une table de données de 128 K, avec une largeur spectrale (SW) de 24 000 Hz (240 ppm) ; découplage en mode CPD ; résolution numérique 0,183 Hz/pt, Le nombre de scans accumulés était de 3 000 (50 mg d'huile essentielle dans 0,5 ml de CDCl<sub>3</sub>) [191].

➤ **Conditions (IR) :**

Le rayonnement infrarouge : est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière visible mais plus courte que celle des micro-ondes. Les spectres infra-rouges ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge a transformé

de Fourier (IR-TF) Perkin Elmer Spectrum two (Walton, MA, Etats Unis). L'obtention des différents spectres infra-rouges s'est faite à partir de 10 $\mu$ L d'échantillons qui est mis entre deux pastilles KBR sous forme de sandwich. Ce dernier est traité informatiquement à l'aide du logiciel SpectrumTM10 fourni avec l'appareil.

## 7. Identification et quantification des composants

L'identification des constituants a été basée : (i) sur la comparaison de leurs indices de rétention (IR) sur les colonnes polaires et apolaires, déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série de n-alcanes à interpolation linéaire, avec ceux des composés standards ou des données de la littérature [192-194] et (ii) aux spectres de masse avec des bibliothèques commerciales [195,196] et enfin aux spectres de masse de la bibliothèque de laboratoire interne de l'université de Corse.

La quantification des constituants a été réalisée à l'aide d'un Détecteur à Ionisation de Flamme par normalisation interne des aires des pics à l'aide des facteurs de réponses calculés par rapport au tridécane utilisé comme étalon interne, selon la méthode décrite par [197] et adaptée au sein du laboratoire CPN [198].

## 8. Méthodologie d'analyse

L'identification des constituants d'une huile essentielle ou de la fraction volatile issue d'une matrice d'origine végétale est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM.

Le mélange complexe des volatils est analysé simultanément par CPG/Ir et CPG/SM-IE. Le calcul des indices de rétention sur colonne polaires et apolaires, ainsi que la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont par la suite comparés à l'aide d'un logiciel à ceux répertoriés dans la bibliothèque « Arômes » propre au laboratoire de Corse. Cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par héli-synthèse et dans tous les cas, identifiées par RMN ou dans d'autres bibliothèques commerciales en éditions traditionnelles ou informatisées [192,193].

Par contre, on ne peut pas se limiter rien qu'à la note de concordance, il faut systématiquement examiner le spectre de masse du composé analysé pour avoir les informations nécessaires tels que l'ion moléculaire, les fragments caractéristiques ou encore la mise en évidence de Co-élutions. Dans ce contexte, trois approches différentes (**a**, **b** et **c**) sont envisagées :



a) L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté, les données spectrales du composé et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé existant dans les bibliothèques afférentes du laboratoire. Cette démarche est systématiquement mise en œuvre quel que soit la nature du mélange complexe (huile essentielle, extrait au solvant ou fraction volatile (cas d'un fractionnement sur colonne)).

b) Le spectre de masse et les indices de rétention du constituant ne correspondent pas à ceux de la bibliothèque du laboratoire mais correspondent à celles des bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas, nous vérifions par l'étude des fragmentations principales, si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la structure de ce dernier. Une hémisynthèse suivie de l'identification du composé synthétisé par RMN du carbone 13 est complémentaire à cette approche.

c) Les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne figurent dans aucune des bibliothèques. Alors deux stratégies sont envisageables :

✓ Le composé est présent dans les bibliothèques RMN du carbone-13.

✓ Le composé est absent des bibliothèques RMN du carbone-13, donc nous n'avons recours à la purification du constituant pour une étude structurale.

Cette méthodologie a été mise en œuvre pour l'analyse des huiles essentielles et des extraits à l'hexane des différentes espèces des *Centaurea*. En effet, elle est plus dédiée au suivi de la qualité des huiles essentielles commerciales.

## 9. Outils statistiques

Les études statistiques ont été menées avec le logiciel R (R Foundation – Institute for Statistics and Mathematics, Autriche). Les Analyses en Composante Principale (ACP) ont été réalisées avec des matrices de type Pearson en utilisant la fonction « PCA ».

## 10. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant *in vitro* des substances actives fait intervenir en générale la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un agent antioxydant.

### 10.1. Test de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'évaluation de l'activité anti radicalaire a été manipulée par l'essai de piégeage du radical libre DPPH. Ce test simple et moins coûteux fut l'un des premiers radicaux libres exploités pour étudier la relation structure-activité antioxydante. Seul le réactif, quelques cuves et un spectrophotomètre UV-vis sont nécessaires, ce qui explique sa popularité et son utilisation étendue [199].

## Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel à piéger le radical libre DPPH• de couleur violette. Après sa réaction un atome d'hydrogène ou électron, il est ensuite réduit sous la forme diphényle picrylhydrazine DPPH-H de couleur jaune. L'intensité de la couleur est proportionnelle au pouvoir des antioxydants à piéger les radicaux libres. La réduction du radical est contrôlée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 517nm, mais après sa réduction par un antioxydant l'absorbance diminue. L'efficacité de cet essai se compare avec celle d'un antioxydant synthétique de référence [200]

## Protocole expérimental

1000 µl des différentes concentrations des échantillons testés (0,2-15mg/mL) ont été dilués dans l'éthanol et ajoutés à 1 mL de la solution éthanoïque de DPPH 0,2mM fraîchement préparée (rapport 1/1). Après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance du DPPH• et les solutions préparées a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm contre le blanc qui contient de l'éthanol pur. Le butyl-hydroxytoluène (BHT) est utilisé comme un antioxydant de référence [201].

## Détermination du pourcentage d'inhibition

L'activité anti radicalaire est estimée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire \%} = \left[ \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillons})}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

Abs contrôle : Absorbance du contrôle.

Abs échantillons : Absorbance du test effectué.

La concentration inhibitrice de 50% est défini comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH (DPPH•). Les CI<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les regréassions linéaires des graphes des taux d'inhibition : pourcentages d'inhibitions en fonction de différentes concentrations des extraits testées.

## 10.2. Test de chélation des ions métalliques

Le fer et le cuivre, sont les principaux métaux de transitions présents aux seins des tissus biologiques connus pour leurs grand rôle pro-oxydant vis-à-vis à l'oxydation des lipides, en raison de leurs fortes réactivités. Cependant, l'excès de ces derniers peut engendrer des dommages cellulaires [202].

### Principe

La ferrozine forme en présence du fer ferreux un chromophore de couleur rouge (Fe<sup>2+</sup>- Ferrozine). La formation de ce complexe est perturbée en présence d'agents chélateurs, ce qui aboutis à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement a une longueur d'onde de 562 nm. A cet effet, plus la coloration de la solution contenant l'échantillon testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important [131].

### Protocole expérimental

Cinq cent microlitres des échantillons ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations (0,2-15mg/mL) sont mélangées à 100 µL de FeCl<sub>2</sub> (0,6mM), et 900 µL de méthanol. Après 5min, 100 µL de Ferrozine (5 mM) sont additionnées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laisser pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduelle et la formation d'un chromophore rouge (Fe (II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester. Les lectures sont effectuées à 562 nm contre un blanc de méthanol [55].

### Détermination du pourcentage d'inhibition

L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice} = \left[ \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance en absence de chélateur (contrôle négatif).

Abs test : absorbance en présence du chélateur (extraits ou EDTA).

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des échantillons, la concentration effectrice (EC<sub>50</sub>) définie comme la concentration nécessaire qui produit 50% d'effet chélateur.

### 10.3. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène (BCB)

Le  $\beta$ -carotène est un composé physiologique important qui possède une forte activité biologique [203]. Pour cela, cette technique est employée couramment afin d'évaluer le pouvoir antioxydant par inhibition de la peroxydation des lipides en suivant les absorbances dans le temps.

#### Principe

La présence de l'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueuse, génère des radicaux libres de peroxydes en raison de l'extraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylènes di-allyliques de l'acide linoléique. Ces derniers vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. La présence des antioxydants permet de prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène tout en neutralisant les radicaux libres [133], [204].

#### Protocole expérimental

La solution de  $\beta$ -carotène a été préparée en dissolvant 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme, ensuite 50  $\mu$ L de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé sous pression réduite à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis 100 mL d'eau oxygénée sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée. À 2,5 mL de l'émulsion précédente, 350  $\mu$ L de chaque échantillon ou de la référence antioxydante (BHT) ont été ajoutés. Le mélange a été placé dans un bain d'eau et incubé à 50 °C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente a été suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation ( $t = 0$  min) jusqu'à la fin de l'expérience ( $t = 120$  min) à 470 nm. Le témoin est préparé de la même manière sauf que l'échantillon est remplacé par le solvant d'extraction [205].

#### Détermination du pourcentage d'inhibition

L'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \left[ \frac{(A_E(120) - A_T(120))}{(A_T(0) - A_T(120))} \right] \times 100$$

$A_E(120)$  : Absorbance de l'échantillon à 120min.

$A_T(120)$  : Absorbance de témoin à 120min.  $A_T(0)$  : Absorbance de témoin à 0min.

La concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition (IC50) a été calculée à partir du graphique du pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration de l'échantillon.

## 11. Activité anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien connues de l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires dont l'arthrite. A cet effet, la capacité de l'extrait végétal à réduire ou empêcher la dénaturation des protéines le rend éventuellement utile pour le développement de nouveaux remèdes anti-inflammatoires [206].

### Principe

La capacité des échantillons d'huiles essentielles et extraits à réduire la dénaturation thermique des protéines est déterminée selon la méthode de [207]. En effet, l'application d'un stress externe tel que la chaleur provoque le changement réversible de la conformation secondaire et tertiaire des protéines qui se traduisent par la diminution de leurs solubilités et la perte de leurs fonctions biologiques. A cette optique, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire [208].

### Protocole expérimental

Le mélange réactionnel (5 mL) est constitué de 0,2 mL d'albumine d'œuf, de 2,8 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 6,4) et de 2mL des différents échantillons a des concentrations variables (0,2 à 2,5 mg/ml) ou de la solution standard (diclofénac de sodium). De l'eau distillée a été utilisée comme témoin négatif. Ensuite, les mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes. La dénaturation est induite en bain marie à 70 ° C durant 5 minutes. Après refroidissement, les absorbances ont est mesurées à 660 nm via le spectrophotomètre UV/visible. Le médicament de référence le diclofénac sodique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

### Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines

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

$$\% \text{ inhibition} = \left[ \frac{A_t}{A_c - 1} \right] \times 100$$

A c : l'absorbance sans échantillon d'essai (contrôle négatif).

A t : l'absorbance de l'échantillon d'essai.

## 12. Formulation du gel a base du principe actif : aplotaxène

### a. Rationnel de formulation

Dans cet essai préliminaire, la formulation proposée est une préparation simple en termes de composition et faisabilité à petite échelle industrielle. Cette démarche consistera, dans un premier temps à proposer une composition qualitative incluant : l'agent gélifiant, le principe actif et le solvant principal. Un Co-solvant tels que la glycérine, l'éthanol ou le propylène glycol, pourra être ajouté en cas de nécessité.

Dans cette étude, nous discuterons de la faisabilité du gel, mais nous n'aborderons pas les aspects concernant les propriétés microbiologiques et la conservation du gel. Nous envisageons d'étudier tous ces aspects dans un travail ultérieur.

### **b. Choix des principales composantes de formulation**

Le choix de l'agent gélifiant s'est porté sur un dérivé de l'acide polyacrylique, le CARBOPOL 980. Ce polymère hydrophile est couramment utilisé dans la fabrication des gels pharmaceutiques, en effet, il est l'agent gélifiant de plusieurs spécialités pharmaceutiques qui revendiquent un effet anti-inflammatoire, comme exemple : NIFLUGEL (acide niflumique), le gel KETUM (kétoprofène) et le gel FLECTOR (diclofénac).

Les Co-solvants hydrophiles participent à l'hydratation du polymère pour permettre sa gélification, mais également, ils doivent permettre une solubilisation améliorée du principe actif dans la préparation. Dans notre cas, nous avons utilisé de l'éthanol du fait qu'il dissout le principe actif et qu'il appartient à la classe III des solvants réputés pour leur bonne tolérance dans les préparations pharmaceutiques.

### **c. Protocole de préparation du gel actif**

1.5 g de Carbopol (agent gélifiant) a été dispersé sous agitation mécanique dans 80 mL d'eau distillée contenant 4 g de glycérine (humectant, émollient) et 0.05 g de benzoate de sodium (conservateur). La préparation a été maintenue au repos pendant une nuit à température ambiante pour atteindre une hydratation complète du Carbopol. Durant cette étape, on obtient une dispersion ayant un pH acide et une faible viscosité.

Par la suite, le principe actif aplotaxène solubilisé dans 10 ml d'éthanol à 96 % (v/v) a été ajouté à la base du gel sous agitation et la dispersion a été ensuite neutralisée avec du diéthylamine. Le poids final du gel a été ajusté à 100 g avec de l'eau distillée, puis soumis à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.

**Tableau 27:** Composition des gels préparés avec différentes concentrations du principe actif

<b>Gel</b>	<b>Extrait</b>	<b>Carbopol (g)</b>	<b>Glycérine (g)</b>	<b>Ethanol 96% (mL)</b>	<b>Sodium benzoate (g)</b>	<b>Diéthylamine (g)</b>	<b>Eau distillée</b>
<b>0.1%</b>	0.1	0.5	4	10	0.05	0.175	qsp 100 g
<b>0.5%</b>	0.5	0.5	4	10	0.05	0.175	qsp 100 g
<b>1%</b>	1	0.5	4	10	0.05	0.175	qsp 100 g
<b>5%</b>	5	0.5	4	10	0.05	0.175	qsp 100 g

### 13. Activité antimicrobienne

L'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques représente un danger majeur pour la santé humaine. Pour cela, il faudrait chercher des solutions alternatives pour faire face aux infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

Pour évaluer le pouvoir anti-infectieux des huiles essentielles, on procède à un aromatoگرامme.

#### 13.1 Microorganismes et conditions de croissance

L'activité antimicrobienne des échantillons d'huiles essentielles et extraits à l'hexane a été testée sur cinq souches microbiennes : deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATTC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, deux bactéries à Gram-positives : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* SAMS ATCC 25923, et deux levures : *Candida albicans* IPP444 et *Candida albicans* ATCC10231. Les souches bactériennes ont été cultivées dans du Muller-Hinton Agar à une température de 37°C pendant 24 h, tandis que les levures ont été cultivées dans du Sabouraud Agar (Merck) à une température de 37°C durant 48h. Après incubation, les suspensions microbiennes ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile (0,85%) et ajustée à une concentration finale correspondant à 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> CFU/mL pour les bactéries et à 1 à 5 × 10<sup>6</sup>CFU/mL pour les levures.

#### 13.2 Technique de diffusion sur gélose

La méthode de diffusion sur gélose permet de déterminer le pouvoir antimicrobien des échantillons testés vis-à-vis des microorganismes en utilisant Mueller-Hinton Agar (MHA, Oxoid) pour les bactéries et Saboureaud Dextrose Agar (SDA, Merck) pour les levures. Cette technique est réalisée selon les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) [209]. Les disques de papier filtre stériles de 05 mm (Whatman, no,2) ont été imprégnés de 10 µl de chaque échantillon ensuite placés sur la surface de la gélose appropriée (MHA ou SDA) préalablement ensemencée par écouvillonnage, les boîtes sont ensuite incubées pendant 37°C durant 24 à 48h. La gentamicine (10µg) et l'amphotéricine B (0,2 mg), un antibiotique et un antifongique commerciaux étaient utilisés comme contrôle positif titre de comparaison pour les bactéries et les levures, respectivement. Les diamètres de la zone d'inhibition (en mm) ont été mesurés avec un compas. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [210] :

(-) souche résistante ( $D < 8$  mm)

(+) souche sensible ( $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$ )

(+ +) souche très sensible ( $15\text{mm} \leq D \leq 19$  mm) (+ + +) extrêmement sensible ( $D > 20$  mm)

La moyenne et l'écart type ont été calculés avec le logiciel PAST VERSION 3,22.

### 13.3 Méthode de micro dilution sur milieu liquide

La force relative d'un antimicrobien est déterminée par des dilutions en séries. Plus le produit est dilué en restant inhibiteur de la croissance du microorganisme, plus il est puissant.

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), des microplaques à 96 puits à fond rond ont été utilisées selon les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute. Dans chaque puits de la microplaque, 100  $\mu$ l du bouillon Mueller Hinton/ Sabouradu Dextrose additionné de Tween-80 (concentration finale de 0,001% v/v afin de faciliter la solubilité de l'huile) ont été introduites. Ensuite, une série de 10 dilutions des échantillons à tester a été préparée en mélangeant : 100  $\mu$ L de chaque huile avec 100  $\mu$ L du milieu de culture afin d'obtenir une dilution  $\frac{1}{2}$  entre chaque puits engendrant des concentrations finales allant de 25 à 0,048% (v/v). Les deux derniers puits représentent les témoins. Le même protocole expérimental et les mêmes concentrations ont été adoptés pour la détermination de la CMI de la molécule aplotaxène mais sans l'addition de Tween-80.

Enfin, 100  $\mu$ l de l'inoculum correspondant à  $5 \times 10^5$  UFC/ml (pour les bactéries) et de 1 à  $5 \times 10^4$  cellules/ml (pour les *Candida*) ont été ajoutés dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et incubées à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 16 à 20h. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la concentration la plus faible capable d'inhiber la croissance microbienne.

### 14. Activité neuroprotectrice

La capacité neuroprotectrice des huiles essentielles a été évaluée par les tests d'inhibition des cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), qui représentent l'option thérapeutique la plus étudiée dans la maladie d'Alzheimer. A ce jour, ce sont les seules molécules qui ont été approuvées pour traiter cette maladie.

#### Principe

Au total, 14 acides aminés aromatiques sont présents dans le site actif de l'AChE, tandis que six d'entre eux sont substitués par des acides aminés aliphatiques pour la BChE. Les processus de liaison et d'hydrolyse des ligands volumineux sont limités pour l'AChE en raison de la présence des résidus phénylalanine dans la poche de liaison des acyles. En revanche, ces résidus sont substitués par deux acides aminés flexibles qui sont sélectifs pour la BChE et permettent alors la liaison de ligands plus volumineux. Les différents mécanismes impliqués dans la réaction du site actif spécifique à chaque enzyme ont été étudiés par modélisation moléculaire et même la cristallographie [74].



## Protocole expérimental

L'activité neuroprotectrice a été évaluée par des tests d'inhibitions enzymatiques de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la Butyrylcholinestérase (BChE), qui sont liées à la maladie d'Alzheimer, selon la méthode de [165]

Le mélange réactionnel est constitué de 150  $\mu\text{L}$  de solution tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 $\mu\text{L}$  des différents échantillons à différentes concentrations (dilués dans de l'éthanol) et 20  $\mu\text{L}$  d'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ou de BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U). Le mélange a été ensuite incubé à 25 °C pendant 15 minutes. Puis, 10  $\mu\text{L}$  de l'ion dithiobis nitrobenzoate DTNB (0,5 Mm) et 10  $\mu\text{L}$  d'acetylthiocholine iodide (0,71 mM) ou 10  $\mu\text{L}$  de butyrylthiocholine chloride (0,2 mM) ont été ajoutés. Après réaction, les absorbances ont été mesurés à 412 nm via un lecteur de microplaques à 96 puits. La galanthamine a été utilisée comme médicament de référence et testée dans le même intervalle de concentration des échantillons d'huiles (3,125- 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Également, la valeur de la  $\text{CI}_{50}$  a été calculée.

### Pourcentage d'inhibition enzymatique de l'AChEetBChE :

Le % d'inhibition a été déterminé selon l'équation suivante :

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

E : est l'absorbance sans échantillon d'essai.

S : l'absorbance de l'échantillon d'essai.



# ***REFERENCES***

- [1] S. Hseini et A. Kahouadji, « Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental) », *Lazaroa*, vol. 28, p. 79-93, 2007.
- [2] M. R. Rao, M. C. Palada, et B. N. Becker, « Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems », in *New vistas in agroforestry*, Springer, p. 107-122, 2004.
- [3] B. FASO, « Rapport National Sur L'état Des Ressources Phytogénétiques Pour L'alimentation Et L'agriculture », 2007.
- [4] N. BACHIR, « Contribution à l'étude des propriétés des huiles essentielles extraites à partir des plantes médicinales utilisées contre l'anémie ».
- [5] D. Roux, « Conseil en aromathérapie. 2ème édition, pro officina (Rueil Malmaison) ». France, 2008.
- [6] J. Laurent, « Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine », PhD Thesis, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2017.
- [7] J. Fouché, A. Marquet, et A. Hambuckers, « Les plantes médicinales, de la plante au médicament : Observation du monde des plantes. 11p », 2000.
- [8] A. Zhiri, « Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré, Nutra News », *Science, Nutrition, Prévention et santé*. Edité par la Fondation pour le libre choix, vol. 12, n° 8, 2006.
- [9] M. Boucekrit, « Etude de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles de deux apiaceae *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. Et *Margotia gummifera* (Desf.) Lange », PhD Thesis, 2018.
- [10] J. Bruneton et P. Pharmacognosie, « Plantes médicinales, 4 e édition », *Éditions Tec & Doc Lavoisier, Paris*, 2009.
- [11] J. Raynaud, Prescription et conseil en aromathérapie. Technique et Documentation, 2006.
- [12] J. Bruneton, « Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales », 1993.
- [13] K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon, « Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes ». *Springer*, 2013.
- [14] V. R. Preedy, « Essential oils in food preservation, flavor and safety ». *Academic Press*, 2015.
- [15] R. Wegrzyn et H. Lamendinh, « Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire », *Journal of dentistry for children*, vol. 1225, p. 62-66, 2005.
- [16] J. D. Thompson, J. C. Chalchat, A. Michet, Y. B. Linhart, et B. Ehlers, « Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes », *Journal of chemical ecology*, vol. 29, n° 4, p. 859-880, 2003.
- [17] M. B. Stefanini, L. C. Ming, M. O. M. Marques, M. A. A. Meireles, L. S. Moura, et J. A. Marchese, « Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year », *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, vol. 8, p. 86-90, 2006.
- [18] A. C. Aprotosoiaie, A. Şpac, M. Hăncianu, A. Miron, V. F. Tănăsescu, V. Dorneanu, U. Stănescu, « The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.) », *Farmacica*, vol. 58, no 1, p. 46-53, 2010.
- [19] C. Besombes, « Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées », PhD Thesis, Université de La Rochelle, 2008.
- [20] J. U. Chowdhury, M. H. Mobarok, M. N. I. Bhuiyan, et N. C. Nandi, « Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. cultivated in Bangladesh », *Bangladesh Journal of Botany*, vol. 38, n° 2, p. 181-183, 2009.
- [21] K. Ložienė et P. R. Venskutonis, « Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides* », *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, n° 5, p. 517-525, 2005.
- [22] F. Mayer, « Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite », PhD Thesis, Université de Lorraine, 2012.
- [23] S. Fellah, P. N. Diouf, M. Petrissans, D. Perrin, M. Romdhane, et M. Abderrabba, « Chemical composition and antioxidant properties of *Salvia Officinalis* L. oil from two culture sites in Tunisia », *Journal of essential oil research*, vol. 18, n° 5, p. 553-556, 2006.
- [24] É. Denes et N. Hidri, « Synergie et antagonisme en antibiothérapie », *Antibiotiques*, vol. 11, n° 2, p. 106-115, 2009.
- [25] K. S. Sonam et S. Guleria, « Synergistic antioxidant activity of natural products », *Journal of Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, vol. 2, n° 16, p. 1086, 2017.
- [26] W. Dhifi, S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, et W. Mnif, « Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review », *Medicines*, vol. 3, n° 4, p. 25, 2016.
- [27] J. Yang et R. H. Liu, « Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-β-D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, n° 18, p. 8581-8586, 2009.
- [28] J. Hwang, H. N. Hodis, et A. Sevanian, « Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 49, n° 1, p. 308-314, 2001

- [29] K. Liao et M. Yin, « Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 48, no 6, p. 2266-2270, 2000.
- [30] A. M. Galal, « Natural product-based phenolic and nonphenolic antimicrobial food preservatives and 1, 2, 3, 4-tetrahydroxybenzene as a highly effective representative: a review of patent literature 2000-2005 », *Recent patents on anti-infective drug discovery*, vol. 1, n° 2, p. 231-239, 2006.
- [31] R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote, et G.J. Nychas, « A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol », *Journal of applied microbiology*, vol. 91, n° 3, p. 453-462, 2001.
- [32] D. Joulain, « Modern analysis methodologies: use and abuse », *Perfumer & flavorist*, vol. 19, n° 2, p. 5-17, 1994.
- [33] P. J. Marriott, R. Shellie, et C. Cornwell, « Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils », *Journal of Chromatography A*, vol. 936, n° 1-2, p. 1-22, 2001.
- [34] J. Tranchant, J. Buzon, N. Guichard, J. Lebbe, A. Prévot, et J. Serpinet, « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse », 1968.
- [35] H. Skoog, « NIEMAN, « Principes d'analyse instrumentale », Ed », *De Boeck, Bruxelles*, 2003.
- [36] N. Samadi, S. Masoum, B. Mehrara, et H. Hosseini, « Application of linear multivariate calibration techniques to identify the peaks responsible for the antioxidant activity of *Satureja hortensis* L. and *Oliveria decumbens* Vent. essential oils by gas chromatography–mass spectrometry », *Journal of Chromatography B*, vol. 1001, p. 75-81, 2015.
- [37] R. C. Dougherty, « Negative chemical ionization mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, vol. 53, n° 4, p. 625-636, 1981.
- [38] H. Hendriks et A. P. Bruins, « A tentative identification of components in the essential oil of *Cannabis sativa* L. by a combination of gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry and retention indices », *Biomedical Mass Spectrometry*, vol. 10, n° 6, p. 377-381, 1983.
- [39] M. Zupanc, M. Prošek, et M. Dušan, « Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils », *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 15, n° 8, p. 510-513, 1992.
- [40] R. P. Adams, « Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry », vol. 456. Allured publishing corporation Carol Stream, 2007.
- [41] P. Delaveau, « Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon, V. Formáček, KH Kuberczka, 13 NMR spectroscopy, John Wiley et Sons (1982), p. 374, pounds 53.50. » *Elsevier*, 1983.
- [42] V. Formáček et K. H. Kubeczka, « <sup>13</sup>C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: Basic and applied aspects ». *Martinus Nijhoff Publishers : La Haye*, 1982.
- [43] K. Liu et F. Tomi, « La RMN du carbone-13, outil d'analyse. Etude phytochimique de *Clinipodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica* », PhD Thesis, Université de Corse, 2008.
- [44] R. G. Brereton, « Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant », *John Wiley & Sons*, 2003.
- [45] E. Cicchetti, P. Merle, et A. Chaintreau, « Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database », *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 23, n° 6, p. 450-459, 2008.
- [46] K. A. Saeedi et R. Omidbaigi, « Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of *Kelussia odoratissima* Mozaff. seed », *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, vol. 25, n° 1, p. 113-119, 2009.
- [47] A. Favier, « Le stress oxydant », *L'actualité chimique*, vol. 108, n° 10, p. 863-832, 2003.
- [48] J. Pincemail, M. Meurisse, R. Limet, et J. O. Defraigne, « Fumée de cigarette : une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées », *Medi Sph*, vol. 78, 1998.
- [49] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, et J. Telser, « Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease », *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, n° 1, p. 44-84, 2007.
- [50] R. F. Ali, « Antioxidative effects of *pomposia* extract, on lipid oxidation and quality of ground beef during refrigerated storage », *American Journal of Food Technology*, vol. 6, n° 1, p. 52-62, 2011.
- [51] A. Tomaino, F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A.D. Pasquale et A. Saija. « Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils », *Food chemistry*, vol. 89, n° 4, p. 549-554, 2005.
- [52] A. Nafis A. Kasrati, C. A. Jamali, N. Mezrioui, W. Setzer, A. Abbad, et L. Hassani, « Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards », *Industrial Crops and Products*, vol. 137, p. 396-400, oct. 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.032.
- [53] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, et M. Idaomar, « Biological effects of essential oils—a review », *Food and chemical toxicology*, vol. 46, n° 2, p. 446-475, 2008.

- [54] I. Pereira, P. Severino, A. C. Santos, A. M. Silva, et E. B. Souto, « Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 171, p. 566-578, 2018.
- [55] P. Thapa, O. Prakash, A. Rawat, R. Kumar, R. M. Srivastava, D. D. Rawat, et A. K. Pant, « Essential Oil Composition, Antioxidant, Anti-inflammatory, Insect Antifeedant and Sprout Suppressant Activity in Essential Oil From Aerial Parts of *Cotinus coggygria Scop.* », *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 23, n<sup>o</sup> 1, p. 65-76, 2020.
- [56] B. R. B. Abire et B. Amina, « Etude phytochimique et évaluation *in vivo* et *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire de certains extraits de la plante médicinale *Inula viscosa* », 2017.
- [57] H. Habouche et S. Mimoune, « Etude *in vitro* de l'activité antioxydant et anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *matricaria pubescens.* », PhD Thesis, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila, 2019.
- [58] E. K. Akkol, R. Arif, F. Ergun, et E. Yesilada, « Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea species* », *Journal of ethnopharmacology*, vol. 122, n<sup>o</sup> 2, p. 210-215, 2009.
- [59] U. Koca, I. P. Süntar, H. Keles, E. Yesilada, et E. K. Akkol, « *In vivo* anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica Trev. ex Spreng* », *Journal of ethnopharmacology*, vol. 126, n<sup>o</sup> 3, p. 551-556, 2009.
- [60] R. Landolfi, R. L. Mower, et M. Steiner, « Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations », *Biochemical pharmacology*, vol. 33, n<sup>o</sup> 9, p. 1525-1530, 1984.
- [61] Y. Foutse, « Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans la région de l'ouest Cameroun : étude phytochimique et pharmacologique d'*Azelia africana* JE Smith ex Pers », PhD Thesis, Aix-Marseille, 2017.
- [62] Y. Osada, J. Ping Gong, et Y. Tanaka, « Polymer gels », *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, vol. 44, n<sup>o</sup> 1, p. 87-112, 2004.
- [63] H. Cormier, « *Mise au point d'un gel pour le traitement des lésions cutanées herpétiques* », National Library of Canada= Bibliothèque nationale du Canada, Ottawa, 1999.
- [64] S. Touzouirt, « Formulation d'un gel anti-inflammatoire et bactéricide a base d'alkylphenol », PhD Thesis, Boumerdès, Université M'hamed bougara. Faculté des Hydrocarbures et de la chimie, 2008.
- [65] F. Amarti B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, L. Aarab, M. E. Ajjouri, et A. Chaouch, « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus Algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth.* du Maroc », *BASE*, 2010.
- [66] J. Sfeir, C. Lefrançois, D. Baudoux, S. Derbré, et P. Licznar, « In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes* », *Evidence-based complementary and alternative medicine*, vol. 2013, 2013.
- [67] S. Andrade-Ochoa, G. V. Nevárez-Moorillón, L. E. Sánchez-Torres, M. Villanueva-García, B. E. Sánchez-Ramírez, L. M. Rodríguez-Valdez, et B. E. Rivera-Chavira, « Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* », *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 15, n<sup>o</sup> 1, p. 1-11, 2015.
- [68] J. C. Lopez-Romero, H. González-Ríos, A. Borges, et M. Simões, « Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* », *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015.
- [69] M. Lis-Balchin, « *Lavender: the genus Lavandula* », *CRC press*, 2002.
- [70] S. D. Cox, C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J. R. Warmington, et S. G. Wyllie, « The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) », *Journal of applied microbiology*, vol. 88, n<sup>o</sup> 1, p. 170-175, 2000.
- [71] S. Karaman, M. Digrak, U. Ravid, et A. Ilcim, « Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus Celak* from Turkey », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, n<sup>o</sup> 2, p. 183-186, 2001.
- [72] M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, et C. Delarmelina, « Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants », *Journal of ethnopharmacology*, vol. 97, n<sup>o</sup> 2, p. 305-311, 2005.
- [73] M. Ayaz, A. Sadiq, M. Junaid, F. Ullah, F. Subhan, et J. Ahmed, « Neuroprotective and anti-aging potentials of essential oils from aromatic and medicinal plants », *Frontiers in aging neuroscience*, vol. 9, p. 168, 2017.
- [74] A. Abd Rashed, A. Z. Abd Rahman, et D. N. G. Rathi, « Essential oils as a potential Neuroprotective remedy for age-related neurodegenerative diseases: A review », *Molecules*, vol. 26, n<sup>o</sup> 4, p. 1107, 2021.
- [75] A. Bansal, M. Kirschner, L. Zu, D. Cai, et L. Zhang, « Coconut oil decreases expression of amyloid precursor protein (APP) and secretion of amyloid peptides through inhibition of ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) », *Brain research*, vol. 1704, p. 78-84, 2019.
- [76] A. S. Tepe et M. Ozaslan, « Anti-Alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* », *Industrial Crops and Products*, vol. 145, p. 112069, 2020.
- [77] M. B. Bahadori, P. Salehi, et A. Sonboli, « Comparative study of the essential oil composition of *Salvia urmiensis* and its enzyme inhibitory activities linked to diabetes mellitus and Alzheimer's disease », *International journal of food properties*, vol. 20, n<sup>o</sup> 12, p. 2974-2981, 2017.
- [78] M. S. Ali-Shtayeh, S. Y. Abu-Zaitoun, N. Dudai, et R. M. Jamous, « Downy lavender oil: a promising source of antimicrobial, antiobesity, and anti-alzheimer's disease agents », *Evidence-Based Complementary and*

*Alternative Medicine*, vol. 2020.

- [79] M. Ansari et H. Eslami, « Preparation and study of the inhibitory effect of nano-niosomes containing essential oil from *artemisia absinthium* on amyloid fibril formation », *Nanomedicine Journal*, vol. 7, n<sup>o</sup> 3, p. 243-250, 2020.
- [80] J. Bekir, M. Mars, J. P. Souchard, et J. Bouajila, « Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 55, p. 470-475, 2013.
- [81] M. S. Ali-Shtayeh R. M. Jamous, S. Y. Abu-Zaitoun, R. J. Akkawi, S. R. Kalbouneh, N. Bernstein, et N. Dudai, « Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze growing in Palestine », *Industrial Crops and Products*, vol. 124, p. 617-625, 2018.
- [82] S. Amokrane et R. Arhab, « Evaluation du potentiel nutritif et antiméthanogénique des plantes médicinales (Asteraceae) par des procédés phytochimiques, biologiques et moléculaires. », PhD Thesis, يروتنم فوخللا ةعماج 2019، فنطنسق.
- [83] M. Bahri, N. Boukalkoul, et A. Zellagui, « *Centaurea melitensis* L », 2020.
- [84] H. Zater et F. Benayache, « Constituants chimiques, propriétés cytotoxiques, antifongiques et antibactériennes de l'extrait chloroforme de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire », PhD Thesis.
- [85] H. Zater, K. Rebbas, S. Bicha, et S. Bensaid, « Découverte de *Centaurea hyalolepis* Boiss. (Asteraceae) dans la région de Djelfa (Algérie) », *Acta Botanica Malacitana*, n<sup>o</sup> 44, p. 67-69, 2019.
- [86] P. Quezel et S. Santa, « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales », 1963.
- [87] F. H. Hellwig, « *Centaureinae* (Asteraceae) in the Mediterranean—history of ecogeographical radiation », *Plant Systematics and Evolution*, vol. 246, n<sup>o</sup> 3, p. 137-162, 2004.
- [88] S. Bicha et al., « A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L », *Der Pharmacia Lettre*, vol. 5, n<sup>o</sup> 6, p. 24-30, 2013.
- [89] T. Mishio, T. Honma, et T. Iwashina, « Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments », *Biochemical systematics and Ecology*, vol. 2, n<sup>o</sup> 34, p. 180-184, 2006.
- [90] A. Bentamène, S. Benayache, J. Crèche, G. Petit, J. Bermejo-Barrera, F. Leon et F. Benayache, « New guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae) », *Biochemical systematics and ecology*, 2005.
- [91] S. Djeddi, « Etude phytochimique, biologique chimiométrique des substances naturelles isolées de : *centaurea pullata* L d'algerie et *centaurea grisebachii* (Nyman) Helder. ssp. *grisebachii* de grèce », PhD Thesis, Université de Annaba-Badji Mokhtar, 2008.
- [92] S. Djeddi, A. Karioti, M. Sokovic, C. Koukoulitsa, et H. Skaltsa, « A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties », *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 16, n<sup>o</sup> 7, p. 3725-3731, 2008.
- [93] D. Montesinos et R. M. Callaway, « Traits correlate with invasive success more than plasticity: A comparison of three *Centaurea* congeners », *Ecology and evolution*, vol. 8, n<sup>o</sup> 15, p. 7378-7385, 2018.
- [94] F. Secilla, J. Rojas, et J. A. Alcaraz, « *Centaurea sulphurea* Willd. (Asteraceae), novedad para la flora de Andalucía Occidental », *Acta Bot. Malacitana*, vol. 37, p. 233 - 234, janv. 2012, doi: 10.24310/abm.v37i0.2673.
- [95] F. João et M. Daniel, « Inter-regional hybrids of native and non-native *Centaurea sulphurea* inherit increased competitive ability from the non-natives », *Plant Ecology & Diversity*, vol. 9, no 4, p. 381-386, 2016.
- [96] M. Merzouk et C. Niboucha, « Contribution à l'étude phytochimique des plantes médicinales Algériennes : le genre *Centaurea*, les flavonoïdes et leurs méthodes d'identification », PhD Thesis, University of Jijel, 2020.
- [97] Dr. S. Djeddi, M. Soković, et H. Skaltsa, « Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species (Asteraceae) Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of their Antimicrobial Activities », *Journal of essential oil-bearing plants JEOP*, vol. 14, nov. 2011, doi: 10.1080/0972060X.2011.10643986.
- [98] A. El-fassi fihri, « La Pharmacopée marocaine traditionnelle, Jamal Bellakhdar », *Horizons Maghrébins-Le droit à la mémoire*, vol. 35, no 1, p. 319-321, 1998.
- [99] T. Berkan, L. Üstünes, F. Lermioglu, et A. Özer, « Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium* », *Planta medica*, vol. 57, n<sup>o</sup> 01, p. 34-37, 1991.
- [100] D. Azzouzi, R. Mekkiou, P. Chalard, J.C. Chalchat, O. Boumaza, R. Seghiri, F. Benayache, S. Benayache, « Essential oil composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria », *International Journal of Phytopharmacy Research*, vol. 8, n<sup>o</sup> 9, p. 1545-8, 2016.
- [101] H. Jaroslav, B. Milos, K. Pavel, « Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of *Rhaponticum carthamoides* root essential oil », *Phytochemistry*, 2009, vol. 70, no 3, p. 414-418.
- [102] J. Y. Choi, E. H. Choi, H. W. Jung, J. S. Oh, W. H. Lee, J. G. Lee, « Melanogenesis inhibitory compounds from *Saussureae Radix* », *Archives of Pharmacal Research*, vol. 31, n<sup>o</sup> 3, p. 294-299, mars 2008, doi: 10.1007/s12272-001-1154-0.
- [103] G. Flamini, M. Tebano, P. L. Cioni, Y. Bagci, H. Dural, K. Ertugrul, T. Uysal et A. Savran, « A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey », *Plant Systematics and Evolution*, vol. 261, n<sup>o</sup> 1, p. 217- 228, 2006.

- [104] K. M. Khleifat, S. A. Matar, M. Jaafreh, H. Qaralleh, M. O. Al-limoun, et K. Y. Alsharafa, « Essential Oil of *Centaurea damascena* Aerial Parts, Antibacterial and Synergistic Effect », *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 22, n<sup>o</sup> 2, p. 356-367, mars 2019, doi: 10.1080/0972060X.2019.1626292.
- [105] L. Riccobono, A. Maggio, M. Bruno, S. Bancheva, O. Santucci, et F. Senatore, « Chemical composition of the essential oil of *Centaurea grinensis* Reuter and *Centaurea apiculata* Ledeb: Growing wild in Croatia and Bulgaria, respectively and PCA analysis of subgenus *Lopholoma* (Cass.) Dobrocz », *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, vol. 151, n<sup>o</sup> 6, p. 1035-1044, 2017.
- [106] A. Ayromlou, S. Masoudi, et A. Mirzaie, « Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and anticancer activities of *scorzonera calyculata* boiss. and *centaurea irritans* wagenitz. Extracts, endemic to iran », *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, n<sup>o</sup> 1, p. 118, janv. 2020, doi: 10.4103/jrptps.JRPTPS\_97\_19.
- [107] I. Telci, I. Demirtas, et A. Sahin, « Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity », *Industrial Crops and Products*, vol. 30, n<sup>o</sup> 1, p. 126-130, 2009.
- [108] H. Lakhal, T. Boudiar, A. Kabouche, Z. Kabouche, R. Touzani, et C. Bruneau, « New Sesquiterpene Lactone and Other Constituents from *Centaurea sulphurea* (Asteraceae) », *Natural Product Communications*, vol. 5, n<sup>o</sup> 6, p. 1934578X1000500, juin 2010, doi: 10.1177/1934578X1000500603.
- [109] A. Kabouche, Z. Kabouche, R. Touzani, et C. Bruneau, « Flavonoids from *Centaurea sulphurea* », *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 46, n<sup>o</sup> 6, p. 966-967, janv. 2011, doi: 10.1007/s10600-011-9798-3.
- [110] J. Mahoney et E. Graf, « Role of Alpha-Tocopherol, Ascorbic Acid, Citric Acid and EDTA as Oxidants in Model Systems », *Journal of Food Science*, vol. 51, p. 1293-1296, août 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.1986.tb13108.x.
- [111] F. P. Luis, B. Pinto, L. C. DA costa, J. S., et al « Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. », *Journal of Ethnopharmacol*, vol. 232, p. 30-38, déc. 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.12.011.
- [112] S.S. Cheng, M.T. Chua, E.H. Chang, C.G. Huang, W.J. Chen, et S.T. Chang, « Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages », *Bioresource Technology*, vol. 100, n<sup>o</sup> 1, p. 465-470, 2009.
- [113] R. G. Binder, M. Benson, W. F. Haddon, et R. C. French, « Aplotaxene derivatives from *Cirsium arvense* », *Phytochemistry*, vol. 31, n<sup>o</sup> 3, p. 1033-1034, 1992.
- [114] A. Aktumsek, G. Zengin, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, et A. Duran, « Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species », *Food and chemical toxicology*, vol. 55, p. 290-296, 2013.
- [115] Y. B. Kose, A. Altintas, B. Demirci, S. Celik, et K. C. Baser, « Composition of the essential oil of endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz from Turkey », *Asian Journal of Chemistry*, vol. 21, n<sup>o</sup> 3, p. 1719, 2009.
- [116] Y. B. Köse, B. Demirci, K. H. C. Başer, et E. Yücel, « Composition of the essential oil of three endemic *Centaurea* species from Turkey », *Journal of Essential Oil Research*, vol. 20, n<sup>o</sup> 4, p. 335-338, 2008.
- [117] S. M. A. Zobayed, F. Afreen, et T. Kozai, « Phytochemical and physiological changes in the leaves of *St. John's wort* plants under a water stress condition », *Environmental and Experimental Botany*, vol. 59, n<sup>o</sup> 2, p. 109-116, 2007.
- [118] S. Dash et N. Mohanty, « Evaluation of assays for the analysis of thermo-tolerance and recovery potentials of seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars », *Journal of Plant Physiology*, vol. 158, n<sup>o</sup> 9, p. 1153-1165, 2001.
- [119] R. S. Verma, R. K. Verma, R. C. Padalia, A. Chauhan, A. Singh, et H. P. Singh, « Chemical diversity in the essential oil of Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones) », *Chemistry & biodiversity*, vol. 8, n<sup>o</sup> 10, p. 1921-1929, 2011.
- [120] F. Amarti et al., « Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc », *Phytothérapie*, vol. 9, n<sup>o</sup> 3, p. 149-157, 2011.
- [121] K. H. Koumaglo, K. Dotse, F. Bettini, et J.-C. Bayle, « Composition chimique de l'huile essentielle de *Chromolaena odorata* (L) King et *Robinson* (Asteraceae) du Togo: Effets de séchage et du site de récolte », *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, vol. 28, p. 11-16, 2009.
- [122] S. Jose et T. D. Thomas, « Comparative phytochemical and anti-bacterial studies of two indigenous medicinal plants *Curcuma caesia* Roxb. and *Curcuma aeruginosa* Roxb », *International Journal*, vol. 65, 2014.
- [123] S. Kordali, R. Kotan, A. Mavi, A. Cakir, A. Ala, et A. Yildirim, « Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, n<sup>o</sup> 24, p. 9452-9458, 2005.

- [124] F. Juteau, V. Masotti, J. M. Bessière, M. Dherbomez, et J. Viano, « Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil », *Fitoterapia*, vol. 73, n<sup>o</sup> 6, p. 532-535, 2002.
- [125] L. Riahi, H. Chograni, M. Elferchichi, Y. Zaouali, N. Zoghalmi, et A. Mliki, « Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities », *Industrial Crops and Products*, vol. 46, p. 290-296, 2013.
- [126] M. Blumenthal, A. Goldberg, et J. Brinckmann, « *Expanded commission E monographs*. Integrative Medicine Communications », *Herbal medicine*, 2000.
- [127] Y. A. Crespo, L. R. B. Sánchez, Y. G. Quintana, A. S. T. Cabrera, A. B. Del Sol, et D. M. G. Mayancha, « Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L. and *Coriandrum sativum* L. using simplex-lattice design », *Heliyon*, vol. 5, n<sup>o</sup> 6, p. e01942, 2019.
- [128] M. N. Alam, N. J. Bristi, et M. Rafiqzaman, « Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity », *Saudi pharmaceutical journal*, vol. 21, n<sup>o</sup> 2, p. 143-152, 2013.
- [129] G. Ruberto et M. T. Baratta, « Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems », *Food chemistry*, vol. 69, n<sup>o</sup> 2, p. 167-174, 2000.
- [130] I. Bouhleb *et al.*, « Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 23, n<sup>o</sup> 1, p. 56-63, 2007.
- [131] K. Le, F. Chiu, et K. Ng, « Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii », *Food Chemistry*, vol. 105, n<sup>o</sup> 1, p. 353-363, 2007.
- [132] M. Cheurfa et R. Allem, « Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro », *Phytothérapie*, vol. 14, n<sup>o</sup> 3, p. 181-187, 2016.
- [133] B. Tepe, M. Sokmen, H. A. Akpulat, et A. Sokmen, « Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey », *Food Chemistry*, vol. 95, n<sup>o</sup> 2, p. 200-204, 2006.
- [134] E. N. Frankel et A. B. S. Meyer, « The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, n<sup>o</sup> 13, p. 1925-1941, 2000.
- [135] L. Jirovetz *et al.*, « Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of the Leaf Essential Oil of *Corymbia citriodora* (Hook) from China », *Natural product communications*, vol. 2, p. 599-606, mai 2007, doi: 10.1177/1934578X0700200518.
- [136] Y. Lu et L. Y. Foo, « Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*) », *Food chemistry*, vol. 75, n<sup>o</sup> 2, p. 197-202, 2001.
- [137] J. Mazumder, R. Kumria, et D. Pathak, « Evaluation of synergistic antimicrobial activity and antioxidant activity of blend of essential oil contains fennel, coriander, ajowan and caraway », *IOSR Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, vol. 9, p. 87-94, 2014.
- [138] F. Benyoucef, M. E. A. Dib, Z. Arrar, J. Costa, et A. Muselli, « Synergistic antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis* », *Journal of Applied Biotechnology Reports*, vol. 5, n<sup>o</sup> 4, p. 151-156, 2018.
- [139] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, et K. Robards, « Methods for testing antioxidant activity », *Analyst*, vol. 127, n<sup>o</sup> 1, p. 183-198, janv. 2002, doi: 10.1039/B009171P.
- [140] R. Gogoi, R. Loring, N. Sarma, S. Munda, S. K. Pandey, et M. Lal, « A comparative study on antioxidant, anti-inflammatory, genotoxicity, anti-microbial activities and chemical composition of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers from North-east India », *Industrial Crops and Products*, vol. 125, p. 131-139, 2018.
- [141] C. Sivaraj, P. Arumugam, et K. Gayathri, « Anti-inflammatory, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Essential Oil Extracted from *Salvia Officinalis* L. », *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 257-263, 2017.
- [142] P. Rondeau, « Stress oxydant et glycation : relation structure et activités biologiques de l'albumine *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de la pathologie diabétique », PhD Thesis, Université de la Réunion, 2009.
- [143] M. C. Souza, A. C. Siani, M. F. S. Ramos, O. Menezes-de-Lima Jr, et M. Henriques, « Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species », *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 58, n<sup>o</sup> 8, p. 582-586, 2003.
- [144] G. F. Passos, E. S. Fernandes, F. M. da Cunha, J. Ferreira, L. F. Pianowski, M. M. Campos, et J. B. Calixto, « Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea* », *Journal of ethnopharmacology*, vol. 110, n<sup>o</sup> 2, p. 323-333, 2007.
- [145] E. S. Fernandes, G. F. Passos, R. Medeiros, F. M. da Cunha, J. Ferreira, M. M. Campos, L. F. Pianowski et J. B. Calixto, « Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans- caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea* », *European journal of pharmacology*, vol. 569, n<sup>o</sup> 3, p. 228-236, 2007.
- [146] P. H. Hart, C. Brand, C. F. Carson, T. V. Riley, R. H. Prager, et J. J. Finlay-Jones, « Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator



- production by activated human monocytes », *Inflammation Research*, vol. 49, n<sup>o</sup> 11, p. 619-626, 2000.
- [147] V. da Silva Bolzani, M. Valli, M. Pivatto, et C. Viegas, « Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, n<sup>o</sup> 9, p. 1837-1846, 2012.
- [148] M. Parvin, N. Das, N. Jahan, M. Akhter, L. Nahar, et M. Islam, « Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark », *BMC Research Notes*, vol. 8, n<sup>o</sup> 1, p. 1-7, 2015.
- [149] R. S. Talhouk, W. El-Jouni, R. Baalbaki, H. Gali-Muhtasib, J. Kogan, et S. N. Talhouk, « Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis* », *Journal of medicinal plants research*, vol. 2, n<sup>o</sup> 2, p. 024-033, 2007.
- [150] A. C. Siani, M. C. Souza, M. G. Henriques, et M. F. Ramos, « Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava* », *Pharmaceutical biology*, vol. 51, n<sup>o</sup> 7, p. 881-887, 2013.
- [151] S. B. Erel *et al.*, « Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa* », *Pharmaceutical biology*, vol. 52, n<sup>o</sup> 6, p. 775-781, 2014.
- [152] S. B. Erel *et al.*, « Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities », *Pharmaceutical biology*, vol. 49, no 8, p. 840-849, 2011.
- [153] A. L. Hale, L. Reddivari, M. N. Nzaramba, J. B. Bamberg, et J. C. Miller, « Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among *Solanum* species », *American journal of potato research*, vol. 85, n<sup>o</sup> 5, p. 332-341, 2008.
- [154] K. Bush, « Courvalin P Dantas G, et al. Tackling antibiotic resistance », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, n<sup>o</sup> 12, p. 894-6, 2011.
- [155] S. Chouhan, K. Sharma, et S. Guleria, « Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives », *Medicines*, vol. 4, n<sup>o</sup> 3, p. 58, 2017.
- [156] C. F. Duffy et R. F. Power, « Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts », *International journal of antimicrobial agents*, vol. 17, n<sup>o</sup> 6, p. 527-529, 2001.
- [157] T. Köhler, J.-C. Pechère, et P. Plesiat, « Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance », *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, vol. 56, n<sup>o</sup> 9, p. 771-778, 1999.
- [158] S. Uribe, J. Ramirez, et A. Peña, « Effects of beta-pinene on yeast membrane functions », *Journal of bacteriology*, vol. 161, n<sup>o</sup> 3, p. 1195-1200, 1985.
- [159] R. Randrianarivelo S. Sarter, E. Odoux, P. Brat, M. Lebrun, B. Romestand, C. Menut, H. S. Andrianoelisoa, M. Raherimandimby, P. Danthu, « Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans* », *Food Chemistry*, vol. 114, n<sup>o</sup> 2, p. 680-684, 2009.
- [160] F. A. Al-Bayati, « Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts », *Journal of ethnopharmacology*, vol. 116, n<sup>o</sup> 3, p. 403-406, 2008.
- [161] G. O. Onawunmi, W.-A. Yisak, et E. O. Ogunlana, « Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 12, n<sup>o</sup> 3, p. 279-286, 1984.
- [162] W. T. Langeveld, E. J. Veldhuizen, et S. A. Burt, « Synergy between essential oil components and antibiotics: a review », *Critical reviews in microbiology*, vol. 40, n<sup>o</sup> 1, p. 76-94, 2014.
- [163] Y. Mouas, F. Z. Benrebaha, et C. Chaouia, « évaluation de l'activité antibacterienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *rosmarinus officinalis l.* », *Revue Agrobiologia*, vol. 7, n<sup>o</sup> 1, p. 363-370, 2017.
- [164] C. O. Nwonuma, T. A. Adelani-Akande, O. O. Osemwegie, A. F. Olaniran, et T. A. Adeyemo, « Preliminary in vitro antimicrobial potential and phytochemicals study of some medical plants », *F1000 Research*, vol. 8, n<sup>o</sup> 81, p. 81, 2020.
- [165] M. S. Bensaad, S. Dassamiour, L. Hambaba, C. Bensouici, et H. Haba, « In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. », *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 9, n<sup>o</sup> 6, p. 790-802, 2021.
- [166] H. T. Phan, K. Samarat, Y. Takamura, A. F. Azo-Oussou, Y. Nakazono, et M. C. Vestergaard, « Polyphenols modulate alzheimer's amyloid beta aggregation in a structure-dependent manner », *Nutrients*, vol. 11, n<sup>o</sup> 4, p. 756, 2019.
- [167] L. Thorgrimsen, A. Spector, A. Wiles, et M. Orrell, « Aroma therapy for dementia. », *The Cochrane database of systematic reviews*, n<sup>o</sup> 3, p. CD003150-CD003150, 2003.
- [168] A. Abd Rashed, A. Z. Abd Rahman, et D. N. G. Rathi, « Essential oils as a potential Neuroprotective remedy for age-related neurodegenerative diseases: A review », *Molecules*, vol. 26, n<sup>o</sup> 4, p. 1107, 2021.
- [169] M. J. Kohoude, F. Gbaguidi, P. Agbani, M.-A. Ayedoun, S. Cazaux, et J. Bouajila, « Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves », *Pharmaceutical biology*, vol. 55, n<sup>o</sup> 1, p. 33-42, 2017.
- [170] M. Miyazawa et C. Yamafuji, « Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, n<sup>o</sup> 5, p. 1765-1768, 2005.

- [171] M. A. N. Lagarde, « Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. », PhD Thesis, Paris, CNAM, 2014.
- [172] M. A. Lill, « In silico drug discovery and design », *Future Medicine*, 2013.
- [173] M. Fouzia et B. Salim, « Virtual screening of natural and synthetic inhibitors of cyclooxygenase COX-2 enzyme using docking-scoring functions », *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 9, n° 01, p. 020-027, 2019.
- [174] M. G. Sarwar, D. Ajami, G. Theodorakopoulos, I. D. Petsalakis, et J. Rebek Jr, « Amplified halogen bonding in a small space », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, n° 37, p. 13672-13675, 2013.
- [175] M. G. Sarwar, B. Dragisic, L. J. Salsberg, C. Gouliaras, et M. S. Taylor, « Thermodynamics of halogen bonding in solution: substituent, structural, and solvent effects », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 5, p. 1646-1653, 2010.
- [176] C. Bissantz, B. Kuhn, et M. Stahl, « A medicinal chemist's guide to molecular interactions », *Journal of medicinal chemistry*, vol. 53, n° 14, p. 5061-5084, 2010.
- [177] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, et O. Kalayci, « Oxidative stress and antioxidant defense », *World allergy organization journal*, vol. 5, n° 1, p. 9-19, 2012.
- [178] S. M. Al-Dalaen et A. I. Al-Qtaitat, « American Journal of Bioscience and Bioengineering », *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 2, n° 5, p. 60-71, 2014.
- [179] S. Neidle, « DNA minor-groove recognition by small molecules », *Natural product reports*, vol. 18, n° 3, p. 291-309, 2001.
- [180] K.C. Chen, H.-Y. Chen, et C. Y.C. Chen, « Potential protein phosphatase 2A agents from traditional Chinese medicine against cancer », *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, 2014.
- [181] Y.C. Chen, « Beware of docking! », *Trends in pharmacological sciences*, vol. 36, n° 2, p. 78-95, 2015.
- [182] T.C. Hung, W.Y. Lee, K.B. Chen, Y.C. Chan, C.C. Lee, et C. Y.C. Chen, « In silico investigation of traditional Chinese medicine compounds to inhibit human histone deacetylase 2 for patients with Alzheimer's disease », *BioMed research international*, vol. 2014, 2014.
- [183] C. N. Nalini, S. R. Deepthi, N. Ramalakshmi, et G. Uma, « Toxicity risk assesment of isatins », *Rasayan J. Chem*, vol. 4, n° 4, p. 829-833, 2011.
- [184] A. Daina, O. Michielin, et V. Zoete, « SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules », *Scientific reports*, vol. 7, n° 1, p. 1-13, 2017.
- [185] J. H. G. Lago, O. A. Fávero, et P. Romoff, « Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. leaves », *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 17, n° 7, p. 1334-1338, 2006.
- [186] D. Samate Abdoul, « Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso: Valorisation », PhD Thesis, thèse de doctorat, Univ. De Ouagadougou, Burkina Faso. 2012.
- [187] O. E. Council, « Paraffin, Liquid, Monograph : 0239 », *Ph. Eur. (3rd ed). Council of Europe, Strasbourg*, p. vol. 1290, 1997.
- [188] M. Romdhane et C. Tizaoui, « The kinetic modelling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil », *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, vol. 80, n° 7, p. 759-766, 2005.
- [189] H. K. Kim et R. Verpoorte, « Sample preparation for plant metabolomics », *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, vol. 21, n° 1, p. 4-13, 2010.
- [190] A. Medbouhi et al., « Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria », *Chemistry & Biodiversity*, vol. 15, n° 1, p. e1700343, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700343>.
- [191] A. Bouzabata, F. Boussaha, J. Casanova, et F. Tomi, « Composition and Chemical Variability of Leaf Oil of *Myrtus Communis* from North-Eastern Algeria », *Natural product communications*, vol. 5, p. 1659-62, oct. 2010, doi: 10.1177/1934578X1000501029.
- [192] « Jennings W, Shibamoto T. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, In: Jovanovich, H.B (Ed.). First ed. Academic Press: New-York 1980. »
- [193] « König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and Related Constituents of Essential oils, first ed. Library of Mass Finder 2.1, Institute of Organic Chemistry, Hamburg 2001. »
- [194] « National Institute of Standards and Technology, NIST/EPA/ NIH Mass Spectral Library, PC Version 1.7, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA, 1999 ».
- [195] « Mc Lafferty FW, Stauffer DB. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench- Top/PBM version 3.10d. Palisade: Newfield 1994».
- [196] « F. W. Mc Lafferty, D. B. Stauffer, 'The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data', 1st edn., Wiley-Interscience, New York, 1988. »

- [197] C. Bicchi E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. A. Zellner, R. Costa et Patrizia Rubiolo « Quantitative analysis of essential oils: a complex task », *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 23, n<sup>o</sup> 6, p. 382-391, 2008.
- [198] N. Djabou, J. Paolini, J. M. Desjobert, H. Allali, N. Baldovini, J. Costa et A. Muselli, « Qualitative and quantitative analysis of volatile components of *Teucrium massiliense L.*—identification of 6-methyl-3-heptyl acetate as a new natural product », *Flavour and fragrance journal*, vol. 25, n<sup>o</sup> 6, p. 475-487, 2010.
- [199] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, et K. Güçlü, « Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 85, n<sup>o</sup> 5, p. 957-998, 2013.
- [200] C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, et F. Saura-Calixto, « A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 76, n<sup>o</sup> 2, p. 270-276, 1998.
- [201] M. S. Blois, « Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical », *Nature*, vol. 181, n<sup>o</sup> 4617, Art. n<sup>o</sup> 4617, avr. 1958, doi: 10.1038/1811199a0.
- [202] İ. Gulcin, M. E. Buyukokuroglu, et O. I. Kufrevioglu, « Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin », *Journal of pineal research*, vol. 34, n<sup>o</sup> 4, p. 278-281, 2003.
- [203] N. Ghedadba, L. Hambaba, A. Ayachi, M. C. Aberkane, H. Bousselsela, et S. M. Oueld-Mokhtar, « Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé », *Phytothérapie*, vol. 13, n<sup>o</sup> 2, p. 118-129, 2015.
- [204] P. L. Ronald, W. Xianli, et S. Karen, « Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* », 2005, vol. 53, no 10, p. 4290-4302.
- [205] T. Hatami, S. A. Emami, S. S. Miraghaee, et M. Mojarrab, « Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis Willd* », *Iran J Pharm Res*, vol. 13, n<sup>o</sup> 2, p. 551-559, 2014.
- [206] H. Rahman, M. C. Eswaraiah, et A. M. Dutta, « In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa Var. joha* rice (an aromatic indigenous rice of Assam) », *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, vol. 15, n<sup>o</sup> 1, p. 115-121, 2015.
- [207] S. Chandra, P. Chatterjee, P. Dey, et S. Bhattacharya, « Evaluation of anti-inflammatory effect of ashwagandha: a preliminary study *in vitro* », *Pharmacognosy Journal*, vol. 4, n<sup>o</sup> 29, p. 47-49, 2012.
- [208] N. I. Osman, N. J. Sidik, A. Awal, N. A. M. Adam, et N. I. Rezali, « In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa L.* and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis », *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 5, n<sup>o</sup> 4, p. 343, 2016.
- [209] J. L. Watts *et al.*, « Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Third Edition », vol. 28, p. 11.
- [210] A. G. Ponce, R. Fritz, C. Del Valle, et S. I. Roura, « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », *LWT-Food Science and Technology*, vol. 36, n<sup>o</sup> 7, p. 679-684, 2003.



# *ANNEXES*

**Annexe 1: Propriétés des ligands de l'huile essentielle de la partie aérienne de *C. sulphurea***

Molécule	Noms	Nom IUPAC	Pub Chem CID	Masse moléculaire	Formule
L1	$\alpha$ -Pinène	2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	6654	136.23	C10H16
L2	Sabinéne	4-methylidene-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexane	18818	136.23	C10H16
L3	$\beta$ -pinène	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	14896	136.23	C10H16
L4	Mycènes	7-methyl-3-methylidenocta-1,6-diene	31253	136.23	C10H16
L5	p-Cymène	1-methyl-4-propan-2-ylbenzene	7463	134.22	C10H14
L6	Limonène	1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	22311	136.23	C10H16
L7	(Z)- $\beta$ -ociméne	(3Z)-3,7-dimethylocta-1,3,6-triene	5320250	136.23	C10H16
L8	(E)- $\beta$ -ociméne	(3E)-3,7-dimethylocta-1,3,6-triene	5281553	136.23	C10H16
L9	Nonanal	nonanal	31289	142.24	C9H18O
L10	Linalool	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	6549	154.25	C10H18O
L11	Terpinéne-4-ol	4-methyl-1-propan-2-ylcyclohex-3-en-1-ol	11230	154.25	C10H18O
L12	Méthyl-Salicylate	méthyl 2-hydroxybenzoate	4133	152.15	C8H8O3
L13	Decanol	decan-1-ol	8174	158.28	C10H22O
L14	$\alpha$ -Copaéne	1,3-dimethyl-8-propan-2-yltricyclo[4.4.0.0 <sup>2,7</sup> ]dec-3-ene	19725	204.35	C15H24
L15	(E)- $\beta$ -Caryophylléne	(1R,4E,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	5281515	204.35	C15H24
L16	$\alpha$ -Humuléne	(1E,4E,8E)-2,6,6,9-tetramethylcycloundeca-1,4,8-triene	5281520	204.35	C15H24
L17	Germacréne-D	(1Z,6Z,8S)-1-methyl-5-methylidene-8-propan-2-ylcyclodeca-1,6-diene	91723653	204.35	C15H24
L18	$\beta$ -Selinéne	(3R,4aS,8aR)-8a-methyl-5-methylidene-3-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,4a,6,7,8-octahydronaphthalene	442393	204.35	C15H24
L19	4-epi-Cubebol	(1S,4S,5S,6S,7R,10S)-4,10-dimethyl-7-propan-2-yltricyclo[4.4.0.0 <sup>1,5</sup> ]decan-4-ol	12304217	222.37	C15H26O
L20	Bicyclogermacréne	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	13894537	204.35	C15H24
L21	$\alpha$ -Muurooléne	(1S,4aS,8aR)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalene	12306047	204.35	C15H24
L25	Germacréne-D-4-ol	(2E,7E)-1,7-dimethyl-4-propan-2-ylcyclodeca-2,7-dien-1-ol	5352847	222.37	C15H26O

<b>L26</b>	Oxide de caryophyllène	4,12,12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo[8.2.0.04,6]dodecane	14350	220.35	C15H24O
<b>L27</b>	Salvial-4(14)-en-1-one	(1S,3aR,8aS)-3a-methyl-7-methylidene-1-propan-2-yl-2,3,5,6,8,8a-hexahydro-1H-azulen-4-one	42608172	220.35	C15H24O
<b>L28</b>	Viridiflorol	(1aR,4S,4aS,7R,7aS,7bS)-1,1,4,7-tetramethyl-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1aH-cyclopropa[e]azulen-4-ol	11996452	222.37	C15H26O
<b>L29</b>	Epoxide humulène II	(3Z,7E)-1,5,5,8-tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	5463721	220.35	C15H24O
<b>L31</b>	epi-Cubénol	(1S,4R,4aS,8aR)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-4a-ol	12046149	222.37	C15H26O
<b>L32</b>	$\tau$ -Muurolol	(1S,4S,4aR,8aS)-1,6-dimethyl-4-propan-2-yl-3,4,4a,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-1-ol	3084331	222.37	C15H26O
<b>L34</b>	$\alpha$ -Cadinol	(1R,4S,4aR,8aR)-1,6-dimethyl-4-propan-2-yl-3,4,4a,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-1-ol	10398656	222.37	C15H26O
<b>L35</b>	$\alpha$ -Eudésmol	2-[(2R,4aR,8aR)-4a,8-dimethyl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl]propan-2-ol	92762	222.37	C15H26O
<b>L37</b>	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	(1R,8aR)-8a-methyl-4-methylidene-6-propan-2-yl-1,2,3,4a,5,8-hexahydronaphthalen-1-ol	6429131	220.35	C15H24O
<b>L38</b>	Tétradécanol	tétradécan-1-ol	8209	214.39	C14H30O

## Annexe 2: Propriétés des ligands de l'huile essentielle de la partie racinaire de *C. sulphurea*

Molécule	Noms	Nom IUPAC	Pub Chem	Masse moléculaire (g/mol)	Formule
<b>L43</b>	Hex-3-en-1-ol (E)	(E)-hex-3-en-1-ol	5284503	100.16	C6H12O
<b>L44</b>	Hex-3-en-1-ol (Z)	(Z)-hex-3-en-1-ol	5281167	100.16	C6H12O
<b>L45</b>	$\alpha$ -Thujéne	2-methyl-5-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene	17868	136.23	C10H16
<b>L46</b>	$\beta$ -pinéne	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	14896	136.23	C10H16
<b>L47</b>	Méthyl-Salicylate	méthyl 2-hydroxy benzoate	4133	152.15	C8H8O3
<b>L48</b>	Décanol	decan-1-ol	8174	158.28	C10H22O
<b>L49</b>	Dec-3-en-2-one	(E)-dec-3-en-2-one	5363233	154.25	C10H18O
<b>L51</b>	$\alpha$ -Copaéne	1,3-dimethyl-8-propan-2-yltricyclo[4.4.0.02,7]dec-3-ene	19725	204.35	C15H24
<b>L52</b>	Dodécanal	dodécanal	8194	184.32	C12H24O

<b>L53</b>	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	(1R,4E,9S)-4,11,11-triméthyl-8-méthylidènebicyclo[7.2.0]undéc-4-ène	5281515	204.35	C15H24
<b>L54</b>	$\alpha$ -Humulène	(1E,4E,8E)-2,6,6,9-tétraméthylcycloundéc-1,4,8-triène	5281520	204.35	C15H24
<b>L55</b>	Germacrène-D	(1Z,6Z,8S)-1-méthyl-5-méthylidène-8-propan-2-ylcyclodéc-1,6-diène	91723653	204.35	C15H24
<b>L56</b>	Oxide de caryophyllène	4,12,12-triméthyl-9-méthylidène-5-oxatricyclo[8.2.0.0.4,6]dodécane	14350	220.35	C15H24O
<b>L57</b>	Époxyde humulène II	(3Z,7E)-1,5,5,8-tétraméthyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodéc-3,7-diène	5463721	220.35	C15H24O

**Annexe 3:** Les énergies (Kcal/mol) (affinité de liaison) des complexes formés par les ligands de l'huile essentielle avec la cible de la catalase.

Mol	Score	RMSD-refine	E-Conf	E-PLACE	E-REFINE	Rmsd
Lref (Native)	-7,97096014	4,68782759	-722,341064	-56,5938377	-29,9442215	1,287
L2	-3,88704371	1,21237528	30,6284142	-34,1589203	-8,03204155	0,231
L3	-3,94628	1,11452448	19,6354332	-36,5459633	-10,104681	0,151
L4	-4,55995321	1,26810312	3,4000299	-41,6391563	-12,9062834	0,405
L5	-4,31294489	1,6795876	23,7007504	-36,9787025	-12,7957802	0,240
L6	-4,24678135	2,32827258	24,4138355	-38,4764977	-10,3571377	0,105
L7	-4,63459826	0,80311048	22,1834126	-37,6015015	-11,5327673	0,071
L8	-4,40625525	3,86050892	19,7765789	-37,639225	-12,3703632	0,186
L9	-4,66843081	1,29199898	-2,58940005	-42,1385002	-12,2455978	0,118
L10	-4,67725086	1,95574021	14,1400661	-41,0474396	-13,0402174	0,097
L11	-4,19324493	1,56141019	26,1478539	-41,6175385	-13,2336178	0,234
L12	-4,2321372	1,94384146	22,0518665	-63,2284546	-11,6995354	0,141
L13	-4,87165976	0,716219127	-3,67760944	-59,6669884	-12,0080776	0,261
L14	-4,6683259	2,09637737	49,688221	-41,6238899	-14,2940207	0,272
L15	-4,36114502	3,20033979	60,4819107	-47,2253075	-12,8066206	0,151
L16	-4,55383825	1,90766406	63,6945992	-42,1987381	-12,5069418	1,071
L17	-4,57506704	3,35696459	40,505024	-35,3185463	-13,3276224	0,532
L18	-4,0977416	2,71517467	47,431881	-47,5162964	-12,8394489	0,356
L19	-4,99567032	2,46123052	41,7866516	-48,5986137	-13,7355928	0,427
L20	-4,69868898	1,20911908	62,9069977	-41,3514328	-11,1247225	0,316
L21	-4,75638676	0,661210179	40,244648	-55,6263962	-7,03142071	0,236
L25	-4,62917185	2,53696036	34,9913177	-41,2908936	-11,6854525	0,258
L26	-4,49333096	2,48852944	53,9551048	-33,3199577	-16,0133057	0,238
L27	-4,52912569	3,28587341	48,2331848	-48,6194572	-15,9582672	0,319
L28	-4,52298212	3,256078	63,402832	-48,4812775	-12,752758	0,212
L29	-4,81293726	2,08405995	69,3171005	-39,6858788	-15,3131933	0,246
L31	-4,73594141	0,731017649	47,0833549	-36,8992348	-15,1315441	0,192
L32	-4,63027239	3,51910138	40,4549713	-54,8345413	-16,2687168	0,207
L34	-4,82514524	1,82431555	37,2686043	-55,1147346	-12,8953199	0,306
L35	-4,64924383	2,06205535	45,2310524	-52,5151253	-12,6898384	0,262
L37	-4,93070602	1,24613357	14,4794188	-67,3982162	-14,2452564	0,222
L38	-4,256355	1,325658	15,236535	-563256354	-123,525653	0,2356
L43	-3,59877467	1,30459833	2,60804319	-35,2643356	-6,84670687	0,128

L44	-3,81998968	1,21585739	11,0346546	-35,2956848	-8,45313549	0,070
L45	-4,48522472	1,10241115	29,9271927	-30,5219498	-9,03198051	0,083
L46	-3,82427931	0,824638844	25,8639469	-23,777956	0,603183985	0,088
L47	-4,5938282	0,934319556	33,1085548	-54,815239	-11,1250544	0,117
L48	-4,82161379	1,38320065	-3,77851653	-43,7966957	-11,3690357	0,160
L49	-4,7997489	1,44501567	-5,9522171	-46,6148033	-14,142457	0,174
L51	-4,21852636	2,02631927	50,182251	-57,0978699	-11,8984489	0,189
L52	-4,74782705	0,737626314	-5,68534279	-46,3250999	-15,2927198	0,189
L53	-4,836936	1,95184958	60,3355751	-26,3364162	-15,0616941	0,143
L54	-4,40791798	1,40854919	64,750618	-30,32617	-8,24160576	0,238
L55	-4,38038158	2,29839063	40,2982025	-43,6075706	-12,984643	0,347
L56	-4,96466064	1,42215419	53,9763756	-49,9227905	-16,1066895	0,425
L57	-3,82165098	2,89302421	66,7069244	-39,9659081	-8,7645216	0,234

**Annexe 4 : S-score (énergie) et interactions entre les ligands et les résidus du site actif de la cible catalase**

No	Composés	S-score (kcal/mol)	Liaisons entre atomes des composés et résidus du cite actif					
			Les atomes du composé	Les atomes récepteurs	Les résidus récepteurs	Types D'interactions	Distances (Å)	Energies (kcal/mol)
Catalase (Cal)								
L24	3-(Z)-Hexenyl-	-5,478	6-ring	NZ	LYS 237	pi-cation	3,83	-1,3
L33	$\beta$ -Eudésmol	-5,070	O1 1	6-ring	PHE 198	H-pi	4,49	-0,7
L5	p-Cyméne	-4,312	6-ring	6-ring	PHE 198	pi-pi	3,89	-0,0
L10	Linalool	-4,677	O1 1	O	HOH1444	H-donor	2,39	8,0
L12	Méthyl-Salicylate	-4,232	O3 3	O	HOH 1533	H-acceptor	2,44	2,9
			6-ring	CD	ARG 203	pi-H	4,33	-0,7
L13	Décanol	-4,871	O1 1	O	HOH 1414	H-donor	2,64	-0,4
			O1 1	O	HOH 1484	H-acceptor	2,34	13,3
L14	$\alpha$ -Copaéne	-4,668	C11 11	6-ring	PHE 198	H-pi	3,77	-0,6
L22	$\beta$ -Cadinéne	-5,528	C3 3	6-ring	PHE 198	H-pi	4,00	-0,6
L27	Salvial-4(14)-en-1- one	-4,529	C6 6	5-ring	HIS 305	H-pi	3,80	-1,0
L29	Humulène époxyde 2	-4,812	C8 8	5-ring	HIS 305	H-pi	3,75	-1,0
L32	$\tau$ -Muurolol	-4,630	O1 1	O	HOH 1444	H-acceptor	2,60	-1,1
L33	$\beta$ -Eudésmol	-5,002	O1 1	O	HOH1533	H-donor	2,72	-1,2
L36	(Z,Z)-Farnésol	-5,130	O1 1	O	HOH 1465	H-donor	2,59	-0,6
L45	$\alpha$ -Thujéne	-4,485	C4 4	6-	PHE198	H-pi	4,21	-0,6
L47	Méthyl-Salicylate	-4,593	O2 2	O	ASN 149	H-donor	2,47	-0,4
L48	Décanol	-4,821	O1 1	O	HOH 1465	H-donor	2,54	0,8
L49	Dec-3-en-2-one	-4,799	O1 1	O	HOH 1465	H-acceptor	2,63	-1,7
			O1 1	O	HOH 1533	H-acceptor	2,52	0,5
L50	Acétate de géranyle	-5,432	O2 2	N	HIS 305	H-acceptor	2,74	-3,6
L52	Dodécanal	-4,747	O1 1	O	HOH 1608	H-acceptor	2,55	-0,7
L56	Oxide de caryophylléne	-4,964	O1 1	N	HIS 305	H-acceptor	2,61	-2,7
			C15 15	5-ring	HIS 305	H-pi	4,60	-0,6



### Annexe 5: Les énergies de l'amarrage moléculaire des autres inhibiteurs d'ADN

Ligand	Compound	DE*(kcal/mol)	DE*(kcal/mol)	ETOR (kT)	VDW (kT)	EIE (kT)
		<i>ctDNA</i>	<i>Catalase</i>			
	<b>BHT</b>	-4,743	-5,052	330,721	413,487	-1942,09
	<b>EDTA</b>	-4,965	-5,591	330,722	413,486	-1942,09
	Lref	-5,900	-8,043	330,722	413,486	-1942,09
L22	$\beta$ -Cadinène	-4,741	-5,528	330,704	413,378	-1942,04
L23	$\delta$ -Cadinène	-5,507	-5,351	330,722	413,682	-1942,18
L24	3-(Z)-Hexenyl-benzoate	-5,757	-5,478	330,723	413,680	-1942,19
L30	$\gamma$ -Eudésmol	-4,824	-5,286	330,723	413,681	-1942,19
L33	$\beta$ -Eudésmol	-4,793	-5,070	330,724	413,680	-1942,19
L36	(Z,Z)-Farnésol	-5,482	-5,717	330,723	413,317	-1942,01
L50	Acétate de géranyle	-5,029	-5,268	330,724	413,316	-1942,01
L58	Aplotaxène	-6,406	-6,130	330,725	413,315	-1942,01
		<i>DE: Energy ETOR: Energy Tortion</i>		<i>VDW: Van Der Walls</i>		<i>EIE: Electostatic</i>

### Annexe 6: Profils d'interaction des autres ligands avec les antioxydants enzymatiques endogènes

No	Compound	Targets	Energy (kcal/mol)	Energy Tortion (kT)	Van Der Walls (kcal/mol)	Electrostatic (kcal/mol)
L22	$\beta$ -Cadinène	CAT	-5,528	2516,749	8577,675	-22121,4
		SOD	-3,422	621,834	3664,946	-10248,4
		GPX	-4,462	1072,848	4669,599	-12257,0
L23	$\delta$ -Cadinène	CAT	-5,351	2514,223	8580,197	-22145,5
		SOD	-3,532	625,892	3646,372	-10224,6
		GPX	-4,053	1072,109	4693,851	-12282,4
L24	3-(Z)-Hexenyl-benzoate	CAT	-5,470	2526,529	8570,499	-22161,7
		SOD	-3,693	624,144	3701,304	-10248,5
		GPX	-4,380	1080,134	4729,110	-12320,9
L30	$\gamma$ -Eudésmol	CAT	-5,286	2550,548	9178,920	-22166,9
		SOD	-3,182	628,255	3698,876	-10299,3
		GPX	-4,227	1085,522	4744,378	-12365,9
L33	$\beta$ -Eudésmol	CAT	-5,070	2545,981	8611,407	-22208,9
		SOD	-3,494	634,114	3849,729	-10525,8
		GPX	-4,000	1089,727	4790,189	-12429,4
L36	(Z,Z)-Farnésol	CAT	-5,717	2538,600	8615,747	-22258,9
		SOD	-3,782	622,721	3627,715	-10134,0
		GPX	-4,356	1071,766	4784,062	-12419,4
L50	Acétate de géranyle	CAT	-5,268	2532,317	9171,650	-22260,7
		SOD	-4,173	600,814	3709,599	-10307,0
		GPX	-4,337	1081,093	4770,511	-12436,6
L58	Aplotaxène	CAT	-6,130	2523,155	9149,877	-22190,6
		SOD	-3,714	592,475	3706,447	-10286,5
		GPX	-4,664	1073,626	4769,966	-12422,9

**Annexe 7: Propriétés OSIRIS des autres ligands**

Ligands	Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive effective
Lref	green	green	green	green
BHT	red	red	red	red
EDTA	red	green	green	red
L22	green	green	green	green
L23	green	green	green	green
L24	green	green	red	green
L30	green	green	green	green
L33	green	green	green	green
L36	red	green	green	green
L50	red	red	red	yellow
L58	green	green	red	green
green = good, yellow = tolerable, red = bad,				

***PRODUCTIONS  
SCIENTIFIQUE***





## Chemical Composition and Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticholinesterase Properties of the Aerial and Root Parts of *Centaurea acaulis* Essential Oils: Study of the Combinatorial Activities of Aplotaxene with Reference Standards

Lyna Benhamidat, Mohammed El Amine Dib, Okkacha Bensaid, Amina Tabet Zatla, Assia Keniche, Ibtisem El Ouar, Djabou Nassim & Alain Muselli

To cite this article: Lyna Benhamidat, Mohammed El Amine Dib, Okkacha Bensaid, Amina Tabet Zatl, Assia Keniche, Ibtisem El Ouar, Djabou Nassim & Alain Muselli (2022) Chemical Composition and Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticholinesterase Properties of the Aerial and Root Parts of *Centaurea acaulis* Essential Oils: Study of the Combinatorial Activities of Aplotaxene with Reference Standards, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 25:1, 126-146, DOI: [10.1080/0972060X.2022.2046177](https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2046177)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2046177>



Published online: 16 Mar 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Article

**Chemical Composition and Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticholinesterase Properties of the Aerial and Root Parts of *Centaurea acaulis* Essential Oils: Study of the Combinatorial Activities of Aplotaxene with Reference Standards****Lyna Benhamidat<sup>1</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>1\*</sup>, Okkacha Bensaid<sup>2</sup>, Amina Tabet Zatla<sup>2</sup>, Assia Keniche<sup>2</sup>, Ibtisem El Ouar<sup>3</sup>, Djabou Nassim<sup>3</sup> and Alain Muselli<sup>4</sup>**<sup>1</sup> Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou BekrBelkaid, BP 119, Tlemcen 13000, Algeria<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Faculté des Sciences, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Algeria<sup>3</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Faculty of Life and Natural Sciences, University Frères Mentouri Constantine 1, Algeria<sup>4</sup> Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, BP 52, FR-20250 Corté, France*\* Corresponding Authors: a\_dibdz@yahoo.fr (Mohammed El Amine Dib)*

Received 06 January 2022; Received in revised form 17 February 2022; Accepted 17 February 2022

**Abstract:** In recent years, growing attention has been given to essential oils. Essential oils obtained from medicinal plants show high therapeutic potential against various types of pathologies, including Alzheimer's, cancer and inflammatory diseases. The purpose of this work was to study the chemical composition of the aerial and root parts of *Centaurea acaulis* essential oils by GC/FID and GC/MS, to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective properties, and *in-vitro* combinatory effect of aplotaxene isolated from the roots with reference standards, in order to find new and more effective agents for the treatment of degenerative and inflammatory diseases. The statistical analysis clustered the essential oil aerial parts into two distinct groups. The specimens characterized by a humid climate and low altitude was mainly discriminated by the high contents of (E)- $\beta$ -caryophyllene (3.4-8.4%), hexadecanoic acid (6.3-10.8%) and caryophyllene oxide (6.2-9.9%). While the second group characterized by a humid climate and higher altitudes was characterized by high levels of limonene (15.2-19.2%) and  $\tau$ -muurolol (12.6-17.2%). In contrast, essential oils of roots were dominated by aplotaxene whatever the climate type. All samples showed very good antioxidant and anti-inflammatory activities. The combination of aplotaxene with references gave synergistic effects with excellent activities about 2 times higher than the synthetic references. The neuroprotective activity of essential oils and aplotaxene did not show inhibition against AChE, whereas they inhibited BChE with IC<sub>50</sub> values comparable to Galantamine.

**Keywords:** Aplotaxene, Biological activities, *Centaurea acaulis*, Chemical variability, Essential oils.

## Introduction

Alzheimer's disease is considered the most common neuro-degenerative disorder because of the neurodegeneration that occurs during the course of this disease<sup>1</sup>. Although it is not possible to treat it completely, there are nowadays some drugs to slow down the clinical progression of the disease, in particular, cholinesterase inhibitors: acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) in the brain<sup>2</sup> that represents the predominant cholinesterase in the brain in the late Alzheimer's disease stage<sup>3</sup>. The excessive production of free radicals, including reactive oxygen species (ROS) once formed lead to oxidative damage to integral enzymes, proteins and even DNA which leads to degenerative or pathological processes such as ageing, cancer, inflammation, diabetes and neurodegenerative disorders<sup>4</sup>. A study conducted by Ben Kheder *et al.* has shown that people who have an imbalance between oxidants and antioxidants in the blood have a much higher risk of developing Alzheimer's disease. The research team showed that oxidative markers, known to be involved in Alzheimer's disease, increase up to five years before the onset of the disease<sup>5</sup>. On the other hand, inflammation is one of the most important protective mechanisms of the body against the damages caused by injury, irritation, infections, or internal dysfunctions due to autoimmune pathologies. In addition, excessive inflammation can result in severe chronic illnesses like Crohn's disease<sup>6</sup> and may be partly responsible for some of the brain changes seen in dementia<sup>7</sup>. The commonly used drugs to reduce inflammation are NSAIDs, thus, prolonged use of these agents carries the risk of cardiovascular, gastrointestinal toxicity, and other toxicity<sup>4</sup>. Essential oils are the aromatic and volatile products biosynthesized by plants as secondary metabolites<sup>8</sup>. However, the molecular diversity of the metabolites they contain gives them biological roles and properties. Some essential oils can act as anti-inflammatory and antioxidant agents by inhibiting the release of pro-inflammatory mediators, scavenging free radicals and increasing antioxidant defenses to improve health or cure diseases in humans<sup>6</sup>. For this reason, in recent years, the use of extracts

and volatile components obtained from plants as natural alternative treatments to synthetic drugs "has attracted" the attention of scientists for industrial applications, especially in the field of cosmetics and pharmaceuticals<sup>9</sup>. The genus *Centaurea* is one of the largest genera of the subtribe *Centaureinae*, and belongs to the biggest and important botanical family: Asteraceae. It contains more than 700 species distributed all over the world. In Algeria, it is represented by 45 species with 7 localized in the Sahara<sup>10</sup>. Among them, *Centaurea acaulis*, an endemic species of Algeria and Tunisia, is widely used by the Algerian population in the treatment of colds, dizziness, and headache<sup>11</sup>. As reported by many phytochemical and pharmacological studies, various essential oils and isolated compounds from Algerian *Centaurea* species have shown important biological activities. According to the literature, the *in-vitro* anti-inflammatory effects of the chloroform extracts of *C. hierapolitana*, *C. calolepis* and *C. cadmea* showed strong activities<sup>10</sup>. On the other hand, *C. cadmea* and *C. ensiformis* showed strong antioxidant activity<sup>12</sup>. Additionally, methanol extracts of *C. polypodiifolia* var. *pseudobehen* and *C. antalyense* showed good inhibition against AChE and BChE, which suggests this species might be a potential source of anti-cholinesterase substances<sup>13</sup>. The study conducted on the n-butanol extract of *C. tougourensis* showed significant antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities as well as neuroprotective effects<sup>14</sup>. Also, antiulcerogenic and immunologic effects of *Centaurea L.* has been discussed<sup>15</sup>. To our knowledge, until now, no pharmacological study has been made of *C. acaulis* essential oils from the aerial and root parts. For that purpose, the current paper reports original results about the (i) intraspecies variations of essential oils of *C. acaulis* native to western Algeria, (ii) evaluate the *in-vitro* antioxidant, anti-inflammatory and anti-cholinesterase activities of essential oils and its major component, aplotaxene and (iii) evaluate the biological activities of the combination of aplotaxene and essential oil with reference molecules in the hope of finding new drugs that are more effective and less harmful.

## Materials and methods

### Chemicals used in the study

Solvents and reagents used were: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH),  $\beta$ -carotene, iron (III) chloride, linoleic acid, Tween 40 and 80, ferrozine, butylated hydroxytoluene (BHT), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phosphate-buffered saline, diclofenac sodium acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and galantamine. All chemicals used in the present study were of analytical grade purchased from Sigma (Sigma-Aldrich).

### Plant materials and essential oil extraction

The root (500 g) and aerial parts (500 g) of *C. acaulis* were harvested from eight locations (P1-P8) near Tlemcen city (Algeria) during the flowering stage (March-July). The plant was identified by the botanist Dr. BABA Ali from the Department of Ecology and Environment of the University of Tlemcen (Algeria), where reference specimens of the plant have been placed in the herbarium (N° voucher: C.a. 0118 to C.a. 0818). Some information of sample locations (geographical origin, yields and altitudes), are presented in Table 1. The root and aerial parts

were air-dried at room temperature. The total plant material from each population was submitted to hydrodistillation for 4-5 hours using a Clevenger apparatus according to the procedure described in the European Pharmacopeia that allows the recycling of the aqueous phase of the distillate by cohobage<sup>16</sup>. The procedure was repeated three times. The isolated essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and then the essential oil mass was determined.

### Isolation of Aplotaxene

The collective essential oil (1 g) of roots was obtained by the mixture of all essential oil samples, which was then subsequently submitted to column chromatography for separation, using silica gel column chromatography (FC, silica gel 200-500  $\mu$ m) and eluted with 100% Hexane.

### Identification of the oil components

#### Gas chromatography

The gas chromatography (GC) analysis was carried out using Clarus 500 Perkin-Elmer Auto system apparatus equipped with two flame ionization detectors (FID), with a fused capillary column (50 m x 0.22 mm I.D; film thickness

**Table 1. Geographical distribution of *C. acaulis* from western Algeria**

Codes	Locations	N° Voucher	GPS coordinates	Climate	Alt (m)	Yields
AP1, RP1	GHAZAOUET	C.a.0118	35°06'48"N; 1°50'04"O		036	AP 0.6 RP 0.7
AP2, RP2	NEDROMA	C.a.0218	35°01'38"N; 1°09'45"O	Humid	185	AP 0.3 RP 0.6
AP3, RP3	ZENATA	C.a.0318	34°70'03"N; 1°27'30" O		280	AP 0.6 RP 0.5
AP4, RP4	HENAYA	C.a.0418	34°58'90"N; 1°27'15"O		428	AP 0.5 RP 0.5
AP5, RP5	AIN FEZZA	C.a.0518	34°86'70"N; 1°23'30"O		900	AP 0.4 RP 0.5
AP6, RP6	ZARIFET	C.a.0618	34°52'20"N; 1°19'08"O	Humid	980	AP 0.2 RP 0.2
AP7, RP7	BENI BAHDEL	C.a.0718	34°43'00"N; 1°31'00"O	and cooler	600	AP 0.3 RP 0.4
AP8, RP8	BENI SNOUS	C.a.0818	34°39'22"N; 1°33'04"O		850	AP 0.2 RP 0.3

RP: Root parts; AP: Aerial parts



0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polymethyl- siloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was fixed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min). Injector and detector temperature were maintained at 280°C. Essential oils were injected as neat samples in the split mode (1/60), using helium as the carrier gas (0.8 ml/min); the injection volume was 0.2  $\mu\text{l}$ . RIS was determined using the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data<sup>17,18</sup>.

#### **Gas chromatography/Mass spectrometry**

Essential oils were analyzed with a PerkinElmer Turbo-Mass quadrupole analyzer, coupled to a PerkinElmer Autosystem XL, equipped with two fused-silica capillary columns and operated with the same GC conditions described above, except for a split of 1/80. EI mass spectra were acquired under the following conditions: Ion source temp. 150°C, energy ionization 70 eV, mass range 35-350 Da (scan time: 1 s)<sup>19</sup>.

#### **Component identification and quantification**

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC RIs on non-polar and polar columns and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries<sup>20,21</sup> and comparison of the spectra with those of the inhouse laboratory library. The quantification of constituents was carried out using a flame ionization detector by internal standard method using the response factor calculated with respect to the tridecane (0.7 g.100 g<sup>-1</sup>) used as internal standard.

#### **Nuclear magnetic resonance (NMR)**

The NMR spectrometer used was Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at the basic frequency of 400.13 MHz for <sup>1</sup>H. The spectrometer is equipped with direct detection broadband observe (BBO) probe. All NMR measurements were acquired at 298 K (25°C). Chemical shifts are expressed in  $\delta$  ppm. Scalar coupling constants (J) are given in Hertz. <sup>13</sup>C NMR: The NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform

spectrometer operating at 100.13 MHz for <sup>13</sup>C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4  $\mu\text{s}$  (flip angle 45°); acquisition time 2.7 s for 128 K data table, with a spectral width (SW) of 24,000 Hz (240 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3,000 (50 mg of essential oil in 0.5 mL of CDCl<sub>3</sub>)<sup>22</sup>.

#### **Evaluation of antioxidant activity**

In order to evaluate the antioxidant potential of aerial parts and roots of *C. acaulis* essential oils as well as the apotaxene, three different methods were used, namely DPPH radical scavenging, metal ion chelating and  $\beta$ -carotene bleaching activity.

#### **Free radical scavenging activity (DPPH)**

Free radical scavenging activities of samples were determined spectrophotometrically. The changes in color (from deep blue to light-yellow) were measured at 517 nm with a UV-VIS spectrophotometer. The radical scavenging activity of essential oils was measured by the standard method<sup>23</sup>. 1000  $\mu\text{l}$  Of various concentrations of samples ranging from (0.2-15 g/L) were prepared in ethanol and added 1 mL of 0.2 mM DPPH solution freshly prepared. After 30 min incubation at 37°C in the dark, the anti-DPPH activity was measured at 517 nm against blank and standard (BHT). The percentage inhibition activity was calculated by the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \left[ \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Where,  $A_{\text{control}}$  is absorbance of DPPH radical (without the test sample) and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of DPPH radical with the essential oil samples of various concentrations. IC<sub>50</sub> values (g/L) were calculated graphically by the linear regression of plotted graphs, inhibition percentages as a function of different concentrations extracts tested<sup>24</sup>. Analyses were achieved in triplicates and BHT was used as a reference.

**Metal chelating activity**

The metal chelating ability of Fe<sup>2+</sup> by samples was studied as per the developed protocol and practiced by many researchers<sup>25</sup>. In a test tube 100 µl of (0.6 mM) FeCl<sub>2</sub>, 100 µl of 5 mM ferrozine and 900 µl of methanol were mixed together with various amounts of samples (0.2-15 g/L). The reaction mixture was mixed thoroughly and incubated for 10 min. The absorbance was measured at 562 nm using a spectrophotometer. Here, EDTA (0.01 mM) was taken as standard. Using the given equation, the inhibition percentage of metal chelating activity of all samples were calculated:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Sample})}{\text{Abs Control}} \right] \times 100$$

Where, Abs control is Absorbance of control sample (without the test sample) and Abs sample is the absorbance of test sample. The amount of inhibition by the test samples was expressed as the percentage of concentration required to do 50% inhibition (IC<sub>50</sub>). Analyses were achieved in triplicates and BHT was used as a reference.

**β-Carotene bleaching activity**

Oxidation scavenging activity of samples was performed using the β-carotene bleaching method<sup>26</sup>. Briefly, a stock solution of the β-carotene-linoleic acid mixture was prepared: 5 mg of β-carotene was dissolved in 10 mL of chloroform. 1000 µl of this solution, 50 µl of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were mixed. The solvent was evaporated entirely by using a rotary evaporator. 100 mL of distilled water saturated with oxygen was added and shaken vigorously until an emulsion was formed. A volume of 2.5 mL of previous emulsion was transferred into test tubes containing 350 µl of essential oil dissolved in ethanol at different concentrations. The emulsion system was incubated at 50°C for 120 min. The same procedure was repeated for (BHT) the synthetic antioxidant used as positive controls. After the incubation, the absorbance was measured at 470 nm using a spectrophotometer against a blank containing only 350 µl of ethanol. The antioxidant activity was calculated according to the following formula:

$$\beta\text{-Carotene activity (\%)} = \left[ \frac{A_s(120) - A_c(120)}{A_c(0) - A_c(120)} \right] \times 100$$

Where, A<sub>s</sub> (120) is the absorbance of the sample at t = 120 min, A<sub>c</sub> (120) is the absorbance of the control at t = 120 min, and A<sub>c</sub> (0) is the absorbance of the control at t = 0 min. Analyses were achieved in triplicates and BHT was used as a reference.

**Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity**

*In-vitro* anti-inflammatory activity of essential oils was determined by protein denaturation assay. For this experiment, the reaction mixture (5 mL) consisting of 0.2 mL of egg albumin (from fresh hen's egg), 2.8 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.4) and 2 mL essential oil of varying concentrations (0.2 to 2.5 g/L). The mixtures were incubated at 37 °C in a BOD incubator for 15 min and then heated at 70°C for 5 min in a hot water bath. After cooling, their absorbance was measured at 660 nm. A similar volume of double-distilled water served as the control. Diclofenac sodium in the same concentrations was used as the reference drug<sup>27</sup>. The percentage inhibition of protein denaturation was calculated by using the following formula.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{V_t}{V_c} - 1 \right] \times 100$$

Where, V<sub>t</sub> is the absorbance of the test sample and V<sub>c</sub> is the absorbance of control. Each experiment was done in triplicate and the result was determined from the average values.

**Evaluation of neuroprotective activity**

The evaluation of the acetylcholin-esterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities was conducted as previously described by Bensaad *et al.*<sup>28</sup>. Briefly, A volume of 150 µL of sodium phosphate buffer (100 mM; pH 8.0) was added to 10 µL of sample dissolved in ethanol at different concentrations (3.12, 6.25, 12.50, 25.0, 50.0 and 100 µg/mL). Then, 20 µL of AChE (5.32 × 10<sup>-3</sup> U) or BChE (6.85 × 10<sup>-3</sup> U) or solution was added to the mixture. After 15 min of incubation at 25°C, a volume of 10 µL of DTNB (0.5 mM) and 10 µL of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) or 10 µL of butyrylthiocholine

chloride (0.2 mM) were added to the previous mixture. The absorbance was measured at 412 nm by a 96-well microplate reader, and galantamine was used as a reference drug and tested at the same concentration. The percentage of inhibition was determined through the formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(E - S)}{E} \right] \times 100$$

Where, E and S were the enzyme activities without and with the test sample, respectively. The concentration of the samples that caused 50% inhibition of the AChE and BChE activities ( $IC_{50}$ ) was calculated via nonlinear regression analysis.

#### **Determination of the synergistic activity**

In order to evaluate the synergistic effects, a combination of 1 mL of aplotaxene with 1 mL of the synthetic references was studied with the same concentrations for each activity described.

#### **Statistical analysis**

Data treatment was done using XLSTAT 2014.5.03 to examine the discrimination between samples and its chemical constituents. Data analyses were performed using PCA, this method aims to reduce the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results. Indeed, PCA provides the data in which both objects (oil samples) and variables (oil major components) are plotted. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The statistical comparisons used Student's t-test. The differences were considered significant at  $P < 0.05$ . The correlation coefficients ( $r^2$ ) for the test parameters were established via regression analysis. Analysis of each test was performed in triplicate.

## **Results**

### **Yields and chemical compositions of *C. acaulis* essential oils**

The essential oils from the aerial part of *C. acaulis* collected from Western Algeria, afforded a light-yellow color essential oil with an average yield varying from  $0.2 \pm 0.04$  to  $0.6 \pm 0.02\%$  (w/w), either  $0.2 \pm 0.02$ g/100g to  $0.6 \pm 0.01$ g/100g, based

on the dry mass of the plant. While the essential oils from the root part showed slightly higher yields (0.2-0.7%) either (0.2g/100g-0.7g/100g) (Table 1). The highest yields (0.6-0.7%) were observed of the AP1 station with an altitude of 36 m and a humid climate, while the lowest yields (0.2%) were observed of the AP6 station (altitude 980 m with humid and cooler climate) for both organs of the plant, respectively (Table 1). All the individual essential oil samples were pooled to produce a "collective essential oil" for the roots (Coll<sup>r</sup> EO) and "collective essential oil" for aerial parts (Coll<sup>ap</sup> EO), separately, which was used for detailed analysis. *C. acaulis* Coll EO was characterized by eighty-one compounds accounting 93.7% of total collective essential oil (Table 2). The Coll EO of aerial parts of *C. acaulis* was characterized by the abundance of sesquiterpene compounds, in which oxygenated compounds (31.4%) were higher than hydrocarbons (22.7%). The main compounds identified in the Coll EO were:  $\tau$ -muurolol (8.8%), caryophyllene oxide (5.9%),  $\beta$ -elemene (3.4%), germacrene D (3.5%) and viridiflorol (3.7%). The second dominant class of the collective essential oil was monoterpene compounds, whose hydrocarbons (13.7%) were higher than the oxygenated (7.1%). The principal component of this class was limonene (11.1%). However, non-terpenic compounds were present in low quantities (15.6%) such as hexadecanoic acid (4.6%) (Table 2). Routine GC and GC/MS analysis of essential oil of roots led to the identification of fifty-two components. However, our spectral libraries were found to be nonoperative in identifying the major component of the essential oil (N<sup>o</sup>46 of Table 3). One predominant compound was obtained by separation by column chromatography with an average yield of (0.5g). Column chromatography allowed us to separate the major component. The identification of aplotaxene was done by other complementary analyzes such as <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.

#### **<sup>13</sup>C-NMR**

(CDCl<sub>3</sub>, 101,13 MHz):  $\delta = 139.0$  ppm (C-16),  $132.0$  ppm (C-3),  $130.2$  ppm (C-10),  $128.8$  ppm

Table 2. Percentage of compounds identified in the essential oils from aerials parts of *C. acaulis* isolated from various localities

No. <sup>a</sup>	Compounds	RT	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Coll <sup>ap</sup>	EO	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	Identificatio <sup>d</sup>
1	$\alpha$ -Pinene	14.1	930	931	1.6		2.9	3.9	4.1	3.2	0.2	0.1	0.2	0.1	R.I.M.S
2	Sabinene	15.8	964	964	0.4		0.3	0.7	2.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	R.I.M.S
3	B-Pinene	16.1	970	972	0.9		1.4	0.5	1.2	0.4	0.4	0.2	1.3	2.1	R.I.M.S
4	Myrcene	17.1	981	976	1.9		3.3	4.5	3.2	1.6	0.1	0.2	0.6	0.5	R.I.M.S
5	2-Pentyl furan	17.3	982	983	1.9		2.0	2.6	2.2	1.1	2.6	2.3	1.4	1.0	R.I.M.S
6	<i>p</i> -Cymene	18.9	1014	1011	0.2		0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5	0.2	R.I.M.S
7	Limonene	19.5	1025	1020	11.1		5.3	1.9	5.1	3.1	19.2	22.1	17.5	15.2	R.I.M.S
8	<i>Z</i> - $\beta$ -Ocimene	19.7	1026	1024	0.3		0.2	0.5	1.1	0.1	tr	tr	0.1	0.2	R.I.M.S
9	<i>E</i> - $\beta$ -Ocimene	19.8	1037	1034	0.4		0.1	0.5	1.9	0.1	0.1	tr	0.1	0.2	R.I.M.S
10	$\beta$ -Terpinene	20.53	1045	1047	0.4		0.2	1.0	1.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	R.I.M.S
11	<i>cis</i> -6-Nonenal	22.5	1080	1083	1.3		1.3	1.5	0.8	0.9	1.0	1.6	1.8	1.2	R.I.M.S
12	Nonanal	22.9	1083	1082	1.3		0.5	1.7	0.4	2.5	0.6	3.2	1.2	0.5	R.I.M.S
13	Linalool	23.1	1088	1087	0.7		0.3	0.3	2.0	0.1	0.1	0.2	2.1	0.6	R.I.M.S
14	$\alpha$ -Pinene-oxide	23.4	1098	1096	0.3		0.2	0.1	0.5	1.1	0.3	0.1	0.3	tr	R.I.M.S
15	$\alpha$ -Campholen aldehyde	24.9	1107	1103	0.1		0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	R.I.M.S
16	<i>trans</i> -Pinocarveol	25.5	1126	1125	0.2		0.3	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	R.I.M.S
17	<i>cis</i> -Verbeneol	25.8	1132	1127	2.6		2.9	1.2	3.2	2.5	2.6	3.6	2.5	2.1	R.I.M.S
18	Pinocarvone	26.1	1136	1136	0.1		tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	R.I.M.S
19	$\alpha$ -Pinocamphone	26.8	1141	1151	0.5		0.3	0.5	tr	0.1	0.2	0.4	0.3	2.0	R.I.M.S
20	<i>cis</i> -6-Nonen-1-ol	27.2	1152	1156	0.2		0.2	0.3	tr	0.5	0.3	tr	0.1	tr	R.I.M.S
21	<i>cis</i> -2-Nonen-1-ol	27.6	1158	1158	0.2		0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	1.0	0.2	0.2	R.I.M.S
22	Terpinen-4-ol	28.1	1164	1161	0.2		0.5	0.4	tr	0.3	0.3	tr	0.1	tr	R.I.M.S
23	Methyl salicylate	28.5	1170	1173	0.1		0.1	tr	tr	0.3	0.1	tr	0.2	0.1	R.I.M.S
24	Myrtenal	28.7	1172	1173	0.5		0.2	0.5	0.1	1.1	0.1	0.6	0.5	1.2	R.I.M.S
25	$\alpha$ -Terpineol	28.9	1175	1179	0.1		0.1	0.3	tr	0.1	0.1	tr	0.2	0.3	R.I.M.S
26	Safranal	29.1	1177	1177	0.1		0.2	0.2	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.2	R.I.M.S
27	Myrtenol	29.3	1182	1183	0.2		0.3	0.5	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	0.1	R.I.M.S
28	Verbenone	29.4	1183	1184	0.1		tr	0.1	0.1	0.2	0.2	tr	0.2	0.1	R.I.M.S
29	Decanal	29.5	1185	1186	0.8		0.1	0.8	1.3	1.3	1.1	0.6	0.1	1.2	R.I.M.S

table 2. (continued).

No. <sup>a</sup>	Compounds	RT	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Coll <sup>sp</sup> EO	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	Identificatio <sup>d</sup>
30	$\alpha$ -Campholenol	29.7	1186	1187	0.3	tr	0.2	0.3	0.8	0.1	0.6	0.2	tr	RI,MS
31	trans-Carveol	30.1	1201	1196	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	tr	0.2	RI,MS
32	Carvone	31.5	1222	1222	0.3	0.1	0.2	0.1	tr	0.6	0.5	0.4	0.3	RI,MS
33	Carvacrol methyl ether	31.9	1229	1231	0.0	tr	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.2	tr	RI,MS
34	Piperitone	32.4	1230	1232	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	RI,MS
35	Tridecane	35.8	1300	1300	0.8	tr	0.5	1.6	0.3	0.2	1.2	1.6	1.5	RI,MS
36	Neryl acetate	39.8	1341	1342	0.2	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	RI,MS
37	Geranyl acetate	40.9	1367	1361	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	tr	tr	RI,MS
38	$\alpha$ -Copaene	41.2	1373	1379	0.6	0.6	1.1	0.6	0.4	1.7	0.6	tr	tr	RI,MS
39	$\beta$ -Elemene	41.8	1385	1388	3.4	0.6	0.1	3.0	0.1	0.1	7.5	8.0	7.7	RI,MS
40	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	43.8	1418	1424	1.7	8.4	3.5	3.4	3.9	0.6	0.1	0.2	tr	RI,MS
41	$\alpha$ -Humulene	45.7	1449	1456	0.7	2.0	0.8	0.7	1.2	1.3	tr	tr	tr	RI,MS
42	$\beta$ -Ionone	46.6	1464	1466	0.1	0.1	0.2	0.4	0.2	0.1	tr	tr	tr	RI,MS
43	$\beta$ -Muurolene	47.2	1471	1471	3.4	0.3	0.5	1.3	1.2	5.4	4.3	6.5	8.5	RI,MS
44	Dodecanol	47.6	1472	1475	0.3	tr	0.4	0.8	0.6	0.9	tr	tr	tr	RI,MS
45	Germacrene D	47.9	1477	1480	3.5	8.7	1.5	2.1	1.2	1.3	5.1	1.6	6.5	RI,MS
46	$\beta$ -Selinene	47.8	1481	1483	0.7	tr	1.2	2.6	0.7	0.8	tr	tr	tr	RI,MS
47	4-epi-Cubebol	47.9	1487	1486	0.3	tr	0.4	0.8	0.8	0.9	tr	tr	tr	RI,MS
48	Bicyclogermacrene	48.2	1490	1494	0.6	tr	1.0	0.7	0.6	2.5	tr	tr	tr	RI,MS
49	$\alpha$ -Muurolene	48.3	1491	1496	0.1	0.4	0.2	0.1	0.6	0.2	tr	tr	tr	RI,MS
50	$\alpha$ -Selinene	48.5	1493	1495	0.3	tr	1.3	0.3	0.9	0.1	tr	tr	tr	RI,MS
51	E,E- $\alpha$ -Farnesene	48.9	1506	1498	0.3	tr	0.3	0.4	0.8	0.6	tr	tr	tr	RI,MS
52	$\beta$ -Cadinene	50.2	1509	1507	0.1	tr	0.1	0.2	0.9	0.5	tr	tr	tr	RI,MS
53	trans-Calamenene	51.3	1511	1512	1.2	tr	0.1	0.5	0.2	1.9	0.2	3.5	0.1	RI,MS
54	$\delta$ -Cadinene	51.5	1513	1516	0.8	1.7	1.1	0.5	0.3	0.2	1.3	1.1	0.5	RI,MS
55	$\alpha$ -Cadinene	51.6	1539	1535	0.4	tr	1.3	0.7	0.1	0.8	tr	tr	tr	RI,MS
56	$\beta$ -Calacorene	51.7	1541	1548	0.1	tr	0.4	0.2	0.2	tr	tr	0.2	tr	RI,MS
57	E-Verolidol	51.8	1550	1564	0.6	tr	1.1	0.1	tr	tr	1.2	1.5	0.9	RI,MS
58	1,5-Epoxyvalial-4(14)-ene	51.9	1552	1560	0.4	0.6	0.5	0.2	0.5	1.2	0.1	0.2	tr	RI,MS
59	3(Z)-Hexanyl benzoate	52.1	1554	1552	0.0	tr	tr	0.3	tr	tr	tr	tr	tr	RI,MS

table 2. (continued).

No. <sup>a</sup>	Compounds	RT	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Coll <sup>ap</sup> EO	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	Identificatio <sup>d</sup>
60	Germairene D-4-ol	52.4	1567	1573	0.7	0.1	0.2	1.6	1.2	0.2	0.8	0.7	0.5	RI,MS
61	Spathulenol	52.7	1568	1557	1.9	0.5	0.2	0.8	0.6	1.2	2.3	2.6	3.1	RI,MS
62	Caryophyllene oxide	52.9	1571	1576	5.9	6.8	9.9	6.2	8.4	1.8	2.2	2.5	2.6	RI,MS
63	Globulol	53.2	1578	1580	0.9	0.5	0.2	0.6	0.8	1.3	1.3	1.2	1.0	RI,MS
64	Salvial-4(14)-en-1-one	53.5	1579	1578	1.3	0.1	1.9	0.8	2	4.3	0.5	0.4	0.2	RI,MS
65	Tridecanol	53.6	1580	1856	0.1	0.1	tr	0.2	tr	0.2	tr	tr	tr	RI,MS
66	Viridiflorol	53.7	1585	1591	3.7	5.5	8.6	6.5	8.1	0.4	0.2	0.1	0.3	RI,MS
67	$\beta$ -Aplophenone	54.1	1591	1593	1.3	tr	0.6	0.8	3.5	1.8	2.1	0.9	0.8	RI,MS
68	Humulene epoxide 2	54.3	1594	1601	2.0	1.5	2.1	1.7	2.9	2.8	1.6	2.2	1.5	RI,MS
69	epi-Cubebol	55.8	1623	1624	1.9	1.0	2.5	2.3	2.1	1.9	2.2	2.0	1.0	RI,MS
70	$\tau$ -Cadinol	55.9	1628	1632	0.8	1.5	1.8	1.1	0.8	0.6	0.2	0.1	0.2	RI,MS
71	$\tau$ -Muurolol	56.4	1636	1634	8.8	3.1	3.9	2.5	4.5	12.6	13.6	17.2	14.2	RI,MS
72	$\beta$ -Eudesmol	56.6	1639	1644	2.2	2.8	1.6	2.2	2.0	2.8	1.9	1.5	2.1	RI,MS
73	$\alpha$ -Cadinol	57.1	1642	1645	1.5	5.4	4.5	3.8	4.5	0.7	0.3	0.6	0.2	RI,MS
74	$\alpha$ -Eudesmol	57.3	1654	1653	1.2	1.3	2.0	1.7	1.4	1.1	0.9	0.6	0.4	RI,MS
75	14-Hydroxy-9-epi-E-caryophyllene	57.5	1657	1656	0.2	0.6	tr	0.1	0.4	0.2	tr	0.1	0.1	RI,MS
76	Eudesma-4(15)-7-diene-1- $\beta$ -ol	58.2	1673	1672	0.9	tr	tr	3.0	0.2	1.1	0.8	0.5	2.5	RI,MS
77	cis-Farnesol	58.9	1682	1682	0.1	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	0.1	tr	0.1	RI,MS
78	Hexahydro harnesyl acetone	66.3	1829	1831	0.4	0.5	0.6	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.1	RI,MS
79	Hexadecenoic acid	72.2	1958	1954	4.6	10.8	7.6	7.3	6.3	1.2	1.3	1.6	1.2	RI,MS
80	Z-Phytol	77.1	2069	2080	0.9	0.1	3.2	0.2	tr	1.5	tr	0.1	1.8	RI,MS
81	E-Phytol	78.7	2100	2107	2.2	1.1	1.2	1.3	1.8	4.3	5.6	4.8	5.6	RI,MS
	Identification %				93.7	91.1	97.1	98.8	91.1	96.1	98.7	97.9	95.9	
	Oxygenated monoterpenes (N <sup>o</sup> : 13-19, 22-28, 30-34, 36,37)				6.9	6.5	6.6	8.2	8.5	6.4	7.4	8.6	8.1	
	Hydrocarbon monoterpenes (N <sup>o</sup> : 1-4,6-10)				17.2	13.4	13.3	19.6	8.7	20.1	22.9	20.1	18.5	
	Hydrocarbon sesquiterpenes (N <sup>o</sup> : 38-41, 43, 45,46, 48-56)				17.9	23.0	14.6	17.1	14.1	18.4	19.1	21.1	23.3	

table 2. (continued).

No. <sup>a</sup> Compounds	Coll <sup>ap</sup> EO	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP5	AP6	AP7
Oxygenated sesquiterpenes (N°: 42, 47, 57,58, 60-64, 66-78)	37.1	31.4	41.7	36.3	44.1	35.9	32.3	34.9	31.7
Non-terpene compounds (N°: 5,11,12, 20,21,29,35,44,59,65,79)	11.5	15.6	16.1	15.3	13.9	8.6	11.4	8.3	6.9
Oxygenated diterpenes (N°: 80,81)	3.1	1.2	4.8	2.3	2.6	6.7	5.6	4.9	7.4
Unidentified compounds	6.3	8.9	2.9	1.2	8.9	3.9	1.3	2.1	4.1

<sup>a</sup> Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup> Retention indices of literature on the apolar column (IRLa) reported from the literature. <sup>c</sup> Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). <sup>d</sup> RI. retention indices; MS. mass spectrometry in electronic impact mode. Coll EO: collective essential oil. AP: Aerial parts

Table 3. Percentage of compounds identified of essential oils from roots parts of *C. acaulis* isolated from various localities

No. <sup>a</sup> Compounds	RT	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Coll <sup>e</sup> EO	RI	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Identification <sup>d</sup>
1 Hexanal	8.3	768	770	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.3	RI,MS
2 $\alpha$ -Pinene	9.9	930	931	0.4	0.1	0.1	0.3	0.4	0.3	0.5	0.6	0.8	RI,MS
3 cis-3-Hepten-1-ol	11.4	935	939	3.7	2.6	5.5	3.7	2.9	2.7	3.0	5.6	4.3	RI,MS
4 $\beta$ -Pinene	16.7	970	972	1.8	0.1	0.3	tr	3.1	tr	3.1	4.0	4.1	RI,MS
5 2-Pentyl furan	16.9	982	983	0.3	0.2	0.2	0.6	0.2	0.6	0.2	0.2	0.3	RI,MS
6 Limonene	18.6	1025	1020	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.3	0.5	0.8	1.2	RI,MS
7 trans-Pinocarveol	18.9	1126	1125	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	RI,MS
8 Cis-Verbenol	25.4	1132	1127	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	0.2	0.2	0.1	tr	RI,MS
9 $\alpha$ -pino-Camphone	26.6	1141	1151	0.3	0.8	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.1	0.4	RI,MS
10 cis-6-Nonen-1-ol	27.8	1152	1156	0.5	0.2	1.3	0.1	tr	0.1	0.1	1.5	1.1	RI,MS
11 Terpinen-4-ol	28.3	1164	1161	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	0.2	0	0.2	0.1	RI,MS
12 Methyl salicylate	28.9	1170	1173	0.8	0.1	1.6	0.3	0.3	0.3	0.3	1.5	1.8	RI,MS
13 $\alpha$ -Campholenol	29.5	1186	1187	0.1	0.2	0.1	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	RI,MS
14 trans-Carveol	30.7	1201	1196	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	RI,MS
15 Dec-3-en-2-one	31.7	1221	1219	0.4	0.6	0.5	0.4	0.1	0.4	0.1	0.8	0.5	RI,MS
16 Piperitone	32.1	1230	1232	0.7	0.9	0.8	0.6	0.9	0.6	0.9	0.5	0.5	RI,MS
17 Tridecane	35.6	1300	1300	0.3	0.2	0.6	0.1	0.2	0.1	0.2	0.7	0.7	RI,MS

table 3. (continued).

No. <sup>a</sup>	Compounds	RT	/RI <sup>b</sup>	RI <sup>a</sup>	Colr <sup>EO</sup>	RI	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Identification <sup>d</sup>
18	Nerylacetate	39.6	1341	1342	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	RI:MS
19	$\beta$ -Elemene	41.6	1385	1388	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	RI:MS
20	Trans Caryophyllene	43.7	1418	1424	3.4	2.5	3.6	4.8	3.0	5.4	1.8	2.8	3.0	RI:MS
21	$\alpha$ -Humulene	45.6	1449	1456	0.2	0.2	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	RI:MS
22	$\beta$ -Ionone	46.4	1464	1466	1.0	0.4	0.1	1.4	2.3	1.2	2.1	0.1	0.2	RI:MS
23	$\gamma$ -Muuroleone	47.3	1471	1471	0.2	0.3	0.2	0.1	0.4	0.2	0.3	0.2	0.1	RI:MS
24	Germacrene D	47.8	1477	1480	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.2	RI:MS
25	$\beta$ -Selinene	47.9	1481	1483	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3	0.5	0.4	0.2	RI:MS
26	4-epi-Cubebol	48.2	1487	1486	2.6	1.9	2.8	2.6	3.2	3.1	2.8	1.8	2.9	RI:MS
27	$\alpha$ -Selinene	48.6	1493	1495	0.4	0.2	0.8	0.1	0.2	0.2	0.3	0.6	0.5	RI:MS
28	E.E- $\alpha$ -Farnesene	49.2	1506	1498	0.4	0.6	0.3	0.5	0.6	0.4	0.5	0.2	0.1	RI:MS
29	$\gamma$ -Cadinene	50.3	1509	1507	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	RI:MS
30	$\alpha$ -Calacorene	50.6	1528	1531	0.4	0.1	0.9	0.3	0.3	0.2	0.1	0.7	0.5	RI:MS
31	$\alpha$ -Cadinene	50.9	1539	1535	0.2	tr	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	RI:MS
32	$\beta$ -Calacorene	51.1	1541	1548	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	RI:MS
33	3-(Z)-Hexanyl benzoate	51.8	1554	1552	0.3	0.6	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.4	RI:MS
34	Germacrene D-4-ol	52.2	1567	1573	0.7	0.7	0.9	0.4	0.7	0.4	0.9	0.7	1.0	RI:MS
35	Caryophyllene oxide	52.8	1571	1576	10.9	14.6	13.8	8.0	6.9	7.9	7.2	14.0	14.7	RI:MS
36	Salvial-4(14)-en-1-one	53.1	1579	1578	0.8	1.9	0.1	0.2	0.1	0.1	0.4	1.8	1.5	RI:MS
37	Tridecanol	53.4	1580	1586	0.9	0.2	0.5	1.2	1.3	1.6	1.4	0.5	0.7	RI:MS
38	Viridiflorol	53.6	1585	1591	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.6	0.2	RI:MS
39	$\beta$ -Aplophenone	53.9	1591	1593	1.1	2.6	0.1	0.4	0.3	0.4	0.3	2.5	1.8	RI:MS
40	Humulene epoxide 2	54.1	1594	1601	0.3	0.2	0.7	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	RI:MS
41	$\gamma$ -Eudesmol	55.2	1617	1619	0.3	0.4	0.2	0.1	tr	0.2	0.1	0.6	0.8	RI:MS
42	Aromadendren epoxide 2	55.7	1619	1618	0.7	0.7	0.9	0.6	0.5	0.5	0.4	0.9	0.9	RI:MS
43	$\tau$ -Muurolool	56.2	1636	1634	0.6	0.4	1.6	0.4	0.2	0.5	0.1	0.5	0.9	RI:MS
44	$\beta$ -Eudesmol	56.8	1639	1644	1.2	1.1	1.1	1.3	1.2	0.9	1.6	1.0	1.3	RI:MS
45	$\alpha$ -Cadinol	57.2	1642	1645	0.5	0.5	0.1	0.1	0.6	tr	0.5	0.8	1.2	RI:MS
46	Aplotaxene	57.6	/	1663	51.6	46.3	43.3	61.6	60.6	59.2	58.3	42.5	40.6	RI: MS, NMR
47	Eudesma-4(15)-7-dien-1-beta-ol	57.9	1669	1672	0.3	0.1	0.2	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.6	RI:MS



table 3. (continued).

No. <sup>a</sup>	Compounds	RT	/RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Coll <sup>e</sup> EO	RI	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Identification <sup>d</sup>
48	Pentadecane	59.2	1700	1700	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	RI:MS
49	Tetradecanoic acid	62.1	1748	1754	1.8	1.6	1.5	2.1	2.0	3.4	1.8	1.1	0.9	RI:MS
50	Hexadecanoic acid	72.2	1958	1954	1.1	1.4	1.2	1.4	1.2	0.6	0.5	1.2	1.3	RI:MS
51	Z-Phytol	76.3	2069	2080	1.7	1.8	1.8	1.6	1.2	1.5	1.8	1.8	2.0	RI:MS
52	E-Phytol	82.3	2100	2107	0.5	0.2	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	2.0	1.1	RI:MS
	Identification %				94.8	89.2	90.8	97.3	96.1	95.5	93.7	99.2	97.0	
	Oxygenated monoterpenes (N°: 7-9, 11-14,16,18)				2.7	1.8	1.8	1.5	1.4	1.5	1.6	1.6	1.0	
	Hydrocarbon monoterpenes (N°: 2,4,6)				2.7	0.3	0.6	0.6	3.9	0.6	4.1	5.4	6.1	
	Hydrocarbon sesquiterpenes (N°: 19-21, 23-25, 27-32)				6.4	5.4	7.1	7.0	5.6	7.9	4.8	6.2	5.4	
	Oxygenated sesquiterpenes (N°: 22, 26,34-36,38-45,47)				19.5	25.2	22.6	14.3	14.5	14.4	14.8	25.6	28.2	
	Non-terpene compounds (N°: 1,3,10,15,17,33,37,46,48-50)				61.3	54.5	56.8	71.9	69.2	69.5	66.5	56.6	53.2	
	Oxygenated diterpenes (N°: 51,52)				2.2	2.0	1.9	2.0	1.5	1.6	1.9	3.8	3.1	
	Unidentified compounds				5.2	10.8	9.2	2.7	3.7	4.5	6.3	0.8	3.0	

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from the literature. <sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). <sup>d</sup>RI, retention indices; MS, mass spectrometry in electronic impact mode; Coll EO: collective essential oil. RP: Root parts

(C-6,7), 128.2 ppm (C-4), 127.1 ppm (C-9), 115.2 ppm (C-17), 35.0 ppm (C-5,8), 33.8 ppm (C-11), 33.9 ppm (C-15), 30.0 ppm (C-12,14), 28.0 ppm (C-13), 20.5 ppm (C-2), 14.2 ppm (C-1).

The <sup>13</sup>C NMR spectrum showed the presence of 17 carbon atoms, including eight olefinic carbons (two carbons come from a terminal vinyl;  $\delta$  115.2-139.0). The proton-coupled <sup>13</sup>C-NMR spectrum confirmed the presence of seven olefinic CH groups, one methyldene group, eight alkyl CH<sub>2</sub> groups and one methyl group ( $\delta$  14.2-35.0). The values of olefinic chemical shifts suggest the absence of conjugated double bonds and oxygenated organic function <sup>29,30</sup>.

### <sup>1</sup>H NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz)  $\delta$  0.98-1.02 (3H, t,  $J$  = 7.5 Hz), 1.23-1.27 (1H, s), 1.23-1.46 (8H, m), 2.0-2.14 (6H, m), 2.74-2.87 (4H, m), 4.89-4.97 (1H, ddt,  $J$  = 1.2, 2.3, 10.2 Hz), 4.94-5.04 (1H, ddt,  $J$  = 1.5, 2.2, 17.1 Hz), 5.26-5.46 (4H, m), 5.74-5.88 (1H, ddt,  $J$  = 6.7, 10.2, 16.9 Hz).

The <sup>1</sup>H NMR spectrum displays three 1,2-disubstituted alkene units and one terminal double bond (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-) corresponding to signals 5.26-5.46 (6H) and 5.74-5.88 (3H) ppm which appeared as a doublet of triplets with  $J$ (H, H) = 16.9; 10.2; 6.7 Hz. Two doubly allylic CH<sub>2</sub> groups and three monoallylic CH<sub>2</sub> groups corresponding to 2 multiplets to signals  $\delta$ H=2.0-2.14 ppm (6H) and  $\delta$ H = 1.23-1.27 ppm (6H). The triplet at  $\delta$ H = 0.98-1.02 ppm (3H,  $J$ =7.5 Hz) was consistent with a CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>- group attached to an olefinic center. The comparison of the data with described in the literature <sup>29,30</sup> led to the identification of aplotaxene (Fig. 1).

### Chemical variability of *C. acaulis* essential oils

A principal component analysis (PCA) was applied to identify possible relationships between the major components and the environmental indices. According to the results of Table 3, the essential oils of the root parts showed no variability in the chemical compositions. The principal components of this essential oil were aplotaxene that varied 40.6-61.6% and caryophyllene oxide of 6.9-14.7% (Table 3).

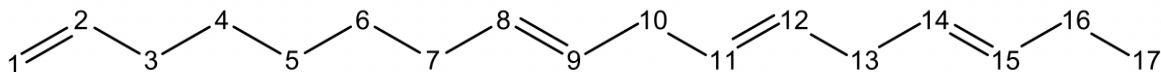


Figure 1. Structure of aplotaxene

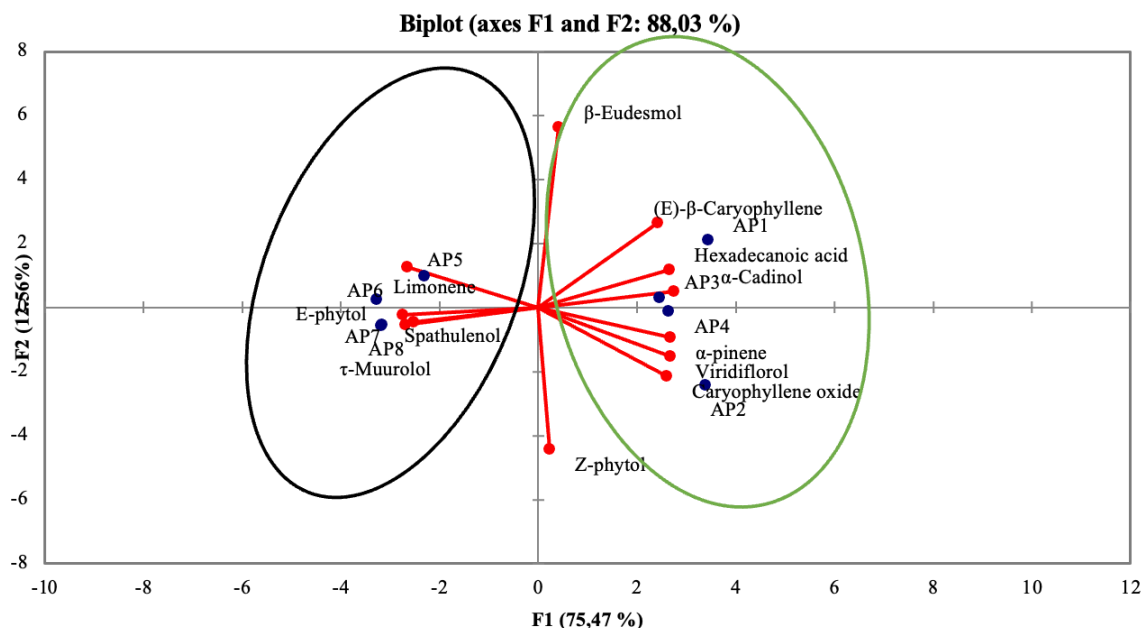


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of chemical compositions of *C. acaulis*

On the other hand, the results of PCA (Fig. 2) suggested that there are two main clusters of essential oils of aerial parts of *C. acaulis*. The first two axes accounted for 75.45% and 12.56% of the total variance, respectively. The general structure of the PCA clustering confirmed the existence of two main groups. Group 1 included all samples of essential oils from Ghazaouet, Nedroma, Zenata and Henaya (AP1 to AP4), and Group 2 included all samples of essential oils from Ain Fezza, Zarifet, Benibahdel and Beni snous (AP5 to AP8). Group 1 characterized by a humid climate and low altitude was mainly discriminated by the high contents of (E)- $\beta$ -caryophyllene (3.4-8.4%), hexadecanoic acid (6.3-10.8%),  $\alpha$ -pinene (2.9-4.1%), viridiflorol (5.5-8.6%) and caryophyllene oxide (6.2-9.9%). While, the second group II characterized by a humid climate and higher altitudes was characterized by high levels of limonene (15.2-19.2%),  $\tau$ -muurolol (12.6-17.2%), E-phytol (4.3-5.6%) and spathulenol (1.2-3.1%) (Fig 2).

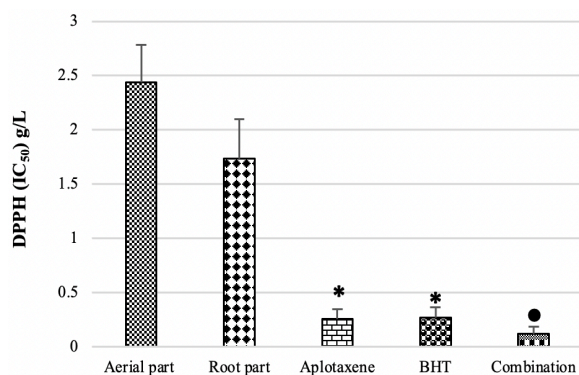
### Antioxidant activities

#### DPPH free radical scavenging assay

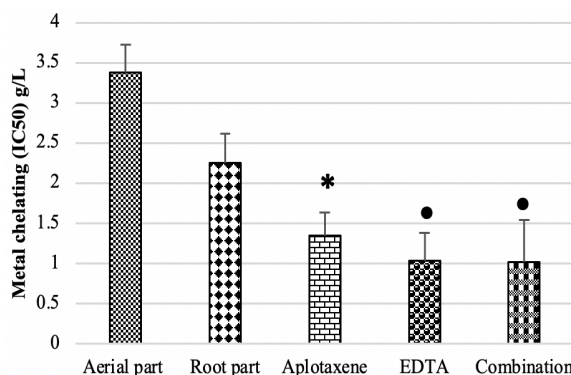
The free radical scavenging activity of *C. acaulis* essential oils, aplotaxene and the combination between aplotaxene and BHT were analyzed using DPPH assay. The results are shown in Fig. 3. The scavenging ability of all samples has shown antioxidant activity. Comparison of the DPPH scavenging activity of the investigated essential oils and aplotaxene with those expressed by BHT showed that aplotaxene exhibited the strongest activity ( $IC_{50}=0.24$  g/L) better than reference BHT (0.26 g/L). While, the essential oils of aerial and root parts showed low antioxidant activity with  $IC_{50}$ s of 2.4 g/L and 1.7 g/L, respectively (Fig. 3). On the other hand, aplotaxene-BHT combination had given a very interesting synergistic effect with excellent antioxidant activity in quenching of DPPH radical, with an  $IC_{50}$  of 0.12 g/L, more interesting than the control BHT alone (Fig. 3).

#### Metal chelating assay

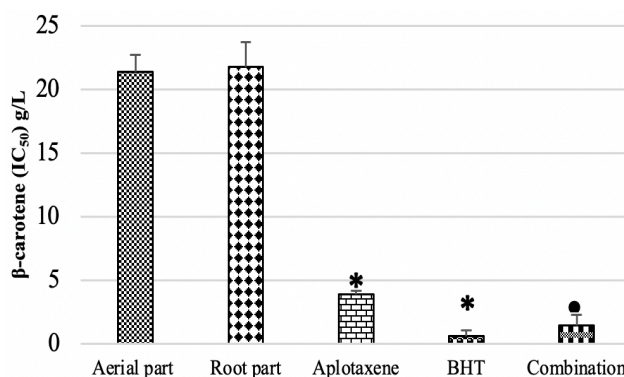
The formation of a complex with free ferrous



**Figure 3.** Antioxidant activity (IC<sub>50</sub> g/L) of essential oil of *C. acaulis* by DPPH method (\*significant  $p \leq 0.01$  compared to aerial and root parts; ●significant  $p \leq 0.01$  compared to aplotaxene and BHT)



**Figure 4.** Antioxidant activity (IC<sub>50</sub> g/L) of essential oil of *C. acaulis* by Metal Chelating Method (\*significant  $p \leq 0.01$  compared to aerial and root parts; ●significant  $p \leq 0.01$  compared to aplotaxene and EDTA).



**Figure 5.** Antioxidant activity (IC<sub>50</sub> g/L) of essential oil of *C. acaulis* by  $\beta$ -carotene method (\* significant  $p \leq 0.01$  compared to aerial and root parts ●significant  $p \leq 0.01$  compared to aplotaxene and EDTA)

(Fe<sup>2+</sup>) ions that leads to a change in the color of the test samples with increasing the amount of oil (0.2 to 15 g/L) showed very good antioxidant activity. The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) providing 50% inhibition of metal chelating assay in the test solution was calculated (see Fig. 4). The comparison of the metal chelating assay of *C. acaulis* essential oils, aplotaxene and the combination of aplotaxene with EDTA showed that the combination between aplotaxene (IC<sub>50</sub> = 1.34 g/L) and EDTA (IC<sub>50</sub> = 1.03 g/L) had given a synergistic effect with a better chelating effect (IC<sub>50</sub> = 1.01 g/L) almost equal to the synthetic antioxidant used as a reference, followed to roots (IC<sub>50</sub> = 2.25 g/L) and aerial parts (IC<sub>50</sub> = 3.37 g/L) of essential oils. (Fig. 4).

#### ***$\beta$ -Carotene bleaching assay***

$\beta$ -carotene-linoleic acid bleaching assay is based on the loss of the yellow color of  $\beta$ -carotene when it is attacked by the radicals produced by linoleic acid oxidation in an emulsion<sup>31</sup>. The IC<sub>50</sub> value of aerial and root parts essential oils were 21.3 g/L and 21.7 g/L, whereas the IC<sub>50</sub> of BHT was 0.59 g/L. However, the combination between aplotaxene (IC<sub>50</sub> = 3.85 g/L) and BHT had given a synergistic effect with important antioxidant activity in lipid peroxidation (IC<sub>50</sub> = 1.40 g/L) but which less than the reference antioxidant BHT (Fig. 5).

#### ***In-vitro anti-inflammatory activity***

The *in-vitro* anti-inflammatory activity of essential oils, aplotaxene, diclofenac sodium

and combination was done using the protein denaturation method. Protein denaturation is a process of loss of biological properties of protein molecules by application of external stress or compound such as an organic solvent or heat<sup>32</sup>. The essential oils of *C. acaulis* protected the albumin against heat-induced denaturation. The results showed a concentration-dependent inhibition of protein (albumin) denaturation by samples (0.2 to 2.5 g/L). Sodium diclofenac was used as the reference drug at the same concentration (Table 4). The results showed that the essential oil of roots and aplotaxene have a very good inhibitory effect, with percentages of 82.7% and 77.3%, at a concentration of 2.5 g/L comparatively to diclofenac (80.3%) respectively. However, the combination between aplotaxene and diclofenac showed high

inhibition (90.3%) at the same concentration (2.5 g/L) (Table 4).

The samples/drug concentration for 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) was determined by plotting percentage inhibition with respect to control against treatment concentration. The best anti-inflammatory activity was observed with the combination of aplotaxene and diclofenac with  $IC_{50}$  of 0.84 g/L compared to diclofenac ( $IC_{50}$ = 1.01 g/L) (Fig. 6).

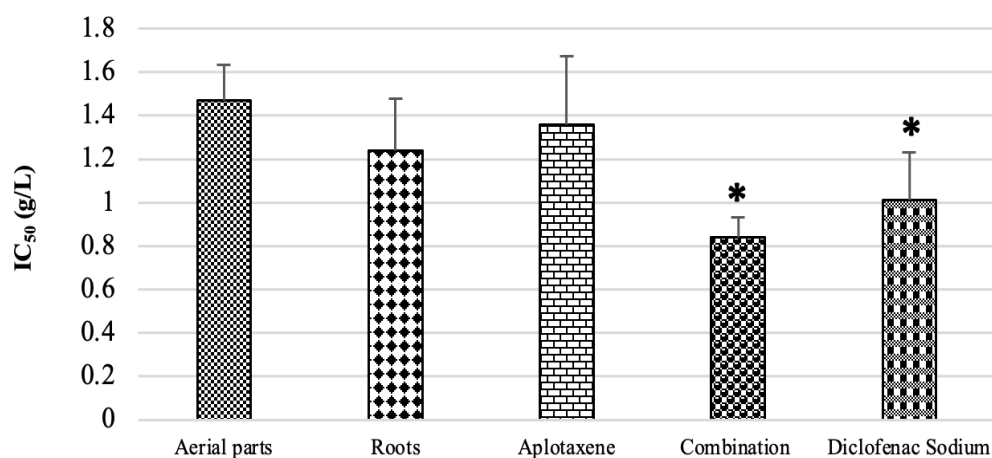
#### Neuroprotective Activity

Given the research interest of our group for this medicinal plant, we tested the essential oil of *C. acaulis* as an inhibitor of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) two enzymes responsible for Alzheimer's disease. The results of the AChE and BChE inhibitory

**Table 4. Percentages of inhibition of protein denaturation of *C. acaulis* essential oils, Aplotaxene, Sodium diclofenac and their combination at different concentrations**

Concentrations (g/L)	Diclofenac Sodium (%)	Percentage of Inhibition			
		Aerial parts	Root parts	Aplotaxene	Combination
0.2	20.0±0.1	20.4±0.0	17.2±0.2	11.7±0.0	20.0±0.0
0.4	37.9±0.1	33.5±0.0	26.8±0.7	25.5±0.0	39.3±0.1
0.6	43.4±0.2	41.6±0.2	37.2±0.1	33.1±0.0	48.9±0.1
1.0	56.5±0.8	45.2±0.4	48.2±0.1	47.5±0.3	65.5±0.1
2.0	75.5±0.1	55.4±0.6	68.2±0.7	65.2±0.4	78.6±0.2
2.5	80.3±0.1	67.8±0.1	82.7±0.2	77.3±0.5	90.3±0.1

Samples and positive control were done in triplicates (n=3), SD=standard deviation, Combination: Aplotaxene+diclofenac



**Figure 6.  $IC_{50}$  values of *C. acaulis* essential oils, aplotaxene, sodium diclofenac and their combination**

activities of the samples are summarized in Table 5. The essential oil and aplotaxene did not show inhibition against AChE, while they selectively inhibited BChE at moderate levels (greater, than 55%) at the concentration of 100 mg/L (Table 5).

In addition, the essential oil of *C. acaulis* and aplotaxene showed good inhibitory activity of BChE with an  $IC_{50}$  values of 58.3 and 81.5 mg/L, but lower than galantamine ( $36.40 \pm 1.99$  mg/L) in the anti-BChE assay (Fig. 7). Therefore, no activity was shown for the combination of the essential oil with galantamine.

### Discussion

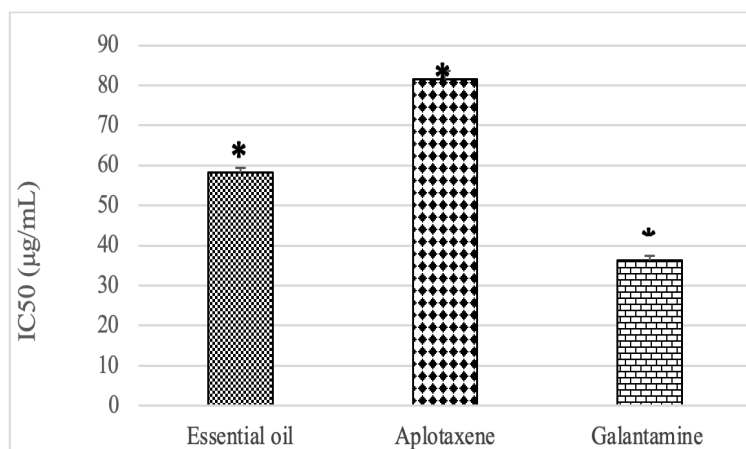
Natural products known for their medicinal properties are an inexhaustible source of

phytochemicals with pharmacological effects<sup>33</sup>. To the best of our knowledge, the results obtained in this study are the first published data concerning the antioxidant, anti-inflammatory and enzyme inhibitory properties of essential oils of *C. acaulis* species. The results showed that the essential oils of aerial parts were rich in hydrocarbon and oxygenated sesquiterpenes, while the root parts were predominated by a good source of alkatetraenes derivatives (Aplotaxene). The previous work on other *Centaurea* species has shown that germacrene D was the main component in *C. hadimensis*, *C. drabifolia* subsp. *detonsa* and *C. rupestris*. While *C. iconiensis* contained a higher concentration of Undecene<sup>34-37</sup>. The results of the present investigation showed

**Table 5. Enzyme inhibitory activity of the essential oil of *C. acaulis***

Essential oils mg/L	3.12	6.25	12.50	25.00	50.00	100.0
<b>AChE inhibitory activity</b>						
EO	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Aplotaxene	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Galantamine	35.9±2.3	43.7±0.0	68.5±0.3	80.7±0.4	85.8±1.6	91.8±0.2
Combination	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<b>BChE inhibitory activity</b>						
EO	13.3±0.1	18.3±0.2	26.3±1.2	35.1±2.1	47.5±1.1	69.6±1.9
Aplotaxene	Na	Na	10.3±0.3	28.4±0.6	43.2±2.6	58.6±1.6
Galantamine	3.3±0.6	6.93±0.6	24.3±2.9	45.1±2.6	63.9±2.8	73.6±0.8
Combination	Na	Na	Na	Na	Na	Na

Values expressed are means ±S.D of three parallel measurements. Na: no absorbance. EO; Essential oils. Combination: Essential oil+ Galantamine



**Figure 7.**  $IC_{50}$  values of *C. acaulis* roots, aplotaxene and galantamine in the anti-BChE assay

that the combination between aploxene and the synthetic antioxidant exhibited remarkable antioxidant properties in quenching of DPPH radical which was about 2 times higher than the synthetic antioxidant used as a reference. The antioxidant activity evaluated by the method of metal chelating showed that the combination of aploxene with EDTA was better than aploxene, 3 times more active than the essential oil of the aerial part and 2 more active than that of the roots. While in  $\beta$ -carotene bleaching assay, the combination between aploxene and BHT had given a synergistic effect but which less than the reference antioxidant BHT. The combination of essential oils, extracts or natural bioactive compounds with synthetic antioxidants may lead to new natural preservatives. Indeed, a synergistic antioxidant effect between methanol extract of rosemary and BHT was demonstrated, allowing a decrease from 4.4 to 17 folds in the amounts of the synthetic compound used<sup>38</sup>. Potential synergistic activity was found in combinations of natural antioxidants isolated from *spinach* leaves and synthetic antioxidants. On the other hand, the combination of ferulic acid, caffeic acid, and epigallocatechin-3-gallate with commercial antioxidants showed synergistic antioxidant activity<sup>39</sup>. However, if we review the results of antioxidant activities, we can notice that aploxene showed very interesting activities. Indeed, it has been suggested that apolar components have antioxidant properties because they are concentrated within the lipid-water interface, allowing the oxidation of  $\beta$ -carotene and the prevention of lipid radical formation<sup>40</sup>. The *in-vitro* anti-inflammatory activity showed that aerial and root parts essential oils have significant anti-inflammatory activity towards the denaturation of fresh hen's egg albumin protein, but the combination of aploxene and the standard drug showed better activity compared to the activity of diclofenac sodium alone. The anti-inflammatory molecules of medicinal plants, belonging to the most diverse chemical classes, have already demonstrated proven anti-inflammatory activity<sup>41</sup>. Among them, alkaloids, terpenes<sup>42,43</sup> and phenolic compounds such as tannins and flavonoids<sup>44-46</sup>. According to

the literature, methyl eugenol rich lemongrass essential oil showed good activity in *in-vitro* anti-inflammatory test<sup>47</sup>. The *in-vitro* anti-inflammatory effects of *Centaurea hierapolitana*, *Centaurea calolepis* and *Centaurea cadmea* exhibited strong anti-inflammatory activities<sup>48</sup>. The essential oil had better BChE inhibitory activity. Neuroprotective effect against the key enzyme involved in alzheimer disease and more precisely against BChE was observed. Thus, the best anti-BChE activity of the essential oil could be attributed on one hand to aploxene, and other hand, to the synergistic effect of mixture of some terpene compounds that are identified as major or minor constituents. Indeed,  $\alpha$ -pinene was potent inhibitor of AChE. While the trans-caryophyllene inhibited BChE with IC<sub>50</sub> values of 78.6 mg/L. The caryophyllene oxide as a major compound of essential oil of *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* showed significant anticholinesterase capacity as well<sup>49</sup>. Recently, the activity of butyrylcholinesterase (BChE) has been a focus of many researches because in the late stages of alzheimer disease, the concentrations of acetylcholinesterase (AChE), the key enzyme in the breakdown of acetylcholine, declines dramatically by up to (85%) while the BChE level remains the same or is even up-regulated where it represents the predominant cholinesterase in the alzheimer disease patient brain<sup>50</sup>. For this purpose, such researches have targeted BChE as a new approach to intervening in the management of alzheimer disease<sup>51-53</sup>.

These properties make *C. acaulis* specie a potential alternative natural to use in the food and pharmaceutical industries for the treatment of diseases that involve oxidative stress and in the treatment of inflammations. Consequently, these results can be considered as preliminary in order to show the importance of this species. In any case, further studies need to be conducted to evaluate the efficacy of essential oil and aploxene on industrial scale.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to professor Houssine Ziani Cherif from the University of Tlemcen,

Macromolecules Laboratory, Department of Chemistry, for his support and precious help and to Baba Ali from the University of Tlemcen, Ecology and Environment Department for botanical identification of plants.

## References

1. **Han, Z., Tian, R., Ren, P., Zhou, W., Wang, P., Luo, M., Jin, S. and Jiang, Q. (2018).** Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease: A Mendelian Randomization Study. *BMC Med. Genet.* 19(1): 1-9.
2. **Tepe, A.S. and Ozaslan, M. (2020).** Anti-Alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *Ind. Crops Prod.* 145: 112069.
3. **Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F. and Menichini, F. (2008).** Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Curr. Med. Chem.* 15(12): 1209-1228.
4. **Gogoi, R., Loying, R., Sarma, N., Munda, S., Pandey, S.K. and Lal, M. (2018).** A comparative study on antioxidant, anti-inflammatory, genotoxicity, anti-microbial activities and chemical composition of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba Pers* from North-east India. *Ind. Crops Prod.* 125: 131-139.
5. **Ben Khedher, M.R., Haddad, M., Laurin, D. and Ramassamy, C. (2021).** Effect of APOE  $\epsilon$ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.: Diagn. Assess. Dis. Monit.* 13(1): 12231.
6. **Chou, S.T., Lai, C.C., Lai, C.P. and Chao, W.W. (2018).** Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea (Lamiaceae)* Essential Oil. *Ind. Crops Prod.* 122: 675-685.
7. **Rivers-Auty, J., Mather, A.E., Peters, R., Lawrence, C.B. and Brough, D. (2020).** Anti-inflammatories in Alzheimer's disease-potential therapy or spurious correlate. *Brain communications.* 2(2): fcaa109.
8. **Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L. and Yang, C. (2018).** Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* 4: 126-136.
9. **Sharma, A., Sharma, L. and Goyal, R. (2020).** GC/MS Characterization, *in-vitro* Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Pinus* Plant Species from Himachal Pradesh, India. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 23(3): 522-531.
10. **Djeddi, S., Soković, M. and Skaltsa, H. (2011).** Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species (*Asteraceae*) Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of their Antimicrobial Activities. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 14(6): 658-666.
11. **Rita De Cássia da Silveira e Sá, D.P., Andrade, L.N. and De Sousa, D.P. (2015).** Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Nat. Prod. Commun.* 10(10): 1767-1774.
12. **Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S. and Khan, I.A. (2007).** Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF- $\kappa$ B of eight *Centaurea* L. species. *Phytother Res.* 21: 488-491.
13. **Ozsoy, N., Kultur, S., Yilmaz-Ozden, T., Ozbek Celik, B., Can, A. and Melikoglu, G. (2015).** Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acetylcholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Activities of Turkish Endemic *Centaurea Antiochia Var. Praealta*. *J. Food Biochem.* 39(6): 771-776.
14. **Sabri, M.B., Dassamiour, S., Hambaba, L., Bensnoui, C., Haba, H. and Garrido, G. (2021).** *In vitro* assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 9(6): 790-802.
15. **Reyhan, A., Küpeli, E. and Ergun, F. (2004).** The biological activity of *Centaurea* L. species. *Gazi University. J. Sci.* 17: 149-

- 164.
16. European Pharmacopoeia, 5<sup>th</sup> edn, pp. 217-218, Council of Europe, Strasbourg (2004).
  17. **Jennings, W. and Shibamoto, T. (1980).** Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. Ed. H. B. Jovanovich, 1st edn., Academic Press, New York.
  18. **Konig, W.A., Hochmuth, D.H. and Joulain, D. (2001).** Terpenoids and Related Constituents of Essential oils. Library of Mass Finder 2.1., 1st edn., Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
  19. **Tabet Zatla, A., Dib, M.A., Djabou, N., Tabti, B., Meliani, N., Costa, J. and Muselli, A. (2017).** Chemical variability of Essential oil of *Daucus carota subsp. sativus* from Algeria. J. Herbs, Spices Med. Plants. 23(3): 216-230.
  20. **Mc Lafferty, F.W. and Stauffer, D.B. (1988).** The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data. 1st edn., Wiley-Interscience, New York.
  21. National Institute of Standards and Technology, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, PC Version 1.7, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA. 1999.
  22. **Bouzabata, A., Boussaha, F., Casanova, J. and Tomi, F. (2010).** Composition and Chemical Variability of Leaf Oil of *Myrtus Communis* from North-Eastern Algeria. Nat. Prod. Commun. 5(10): 1659-62.
  23. **Blois, M.S. (1958).** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature. 181: 1199-1200.
  24. **Belabbes, R., Dib, M.A., Djabou, N., Ilias, F., Tabti, B., Costa, J. and Muselli, A. (2017).** Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula Arvensis L.* from Western Algeria. Chem. Biodivers. 14(5): e1600482.
  25. **Thapa, P., Prakash, O., Rawat, A., Kumar, R., Srivastava, R.M., Rawat, D.S. and Pant, A.K. (2020).** Essential Oil Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Insect Anti-feedant and Sprout Suppressant Activity in Essential Oil from Aerial Parts of *Cotinus Cogglyria Scop.* J. Essent. Oil-Bear. Plants. 23(1): 65-76.
  26. **Hatami, T., Emami, S.A., Miraghaee, S.S. and Mojarreb, M. (2014).** Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis Willd.* Iran. J. Pharm. Res. 13: 551-559.
  27. **Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P. and Bhattacharya, S. (2012).** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific. J. Trop. Biomed. 2(1): 178-180.
  28. **Bensaad, M.S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Bensouici, C., Haba, H. (2021).** *In Vitro* Assessment of Antioxidant, Anti-Inflammatory, Neuroprotective and Antimicrobial Activities of *Centaurea Tougourensis Boiss. & Reut.* J. Pharm. Pharmacogn. Res. 9(6): 790-802.
  29. **Havlik, J., Budesinsky, M., Kloucek, P., Kokoska, L., Valterova, I., Vasickova, S. and Zeleny, V. (2009).** Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of *Rhaponticum carthamoides* root essential oil. Phytochemistry. 70(3): 414-418.
  30. **Choi, J.Y., Choi, E.H., Jung, H.W., Oh, J.S., Lee, W.H., Lee, J.G., Son, J.K., Kim, Y. and Lee, S.H. (2008).** Melanogenesis Inhibitory Compounds from *Saussureae Radix.* Arch. Pharm. Res. 31(3): 294-299.
  31. **Jianu, C., Golet, I., Stoin, D., Cocan, I. and Lukinich-Gruia, A.T. (2020).** Antioxidant Activity of *Pastinaca Sativa L. Ssp. Sylvestris* [Mill.] Rouy and *Camus* Essential Oil. Molecule. 25(4): 869.
  32. **Kumar, R., Prakash, O., Pant, A.K., Isidorov, V.A. and Mathela, C.S. (2012).** Chemical composition, antioxidant and myorelaxant activity of essential oils of *Globba sessiliflora Sims.* J. Essent. Oil Res. 24(4): 385-391.
  33. **Kohoude, M.J., Gbaguidi, F., Agbani, P., Ayedoun, M.A., Cazaux, S. and Bouajila, J. (2017).** Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves. J. Pharm.



- Biol. 55(1): 33-42.
34. **Baser, K.H.C., Özek, G., Özek, T. and Duran, A. (2006).** Composition of the essential oil of *Centaurea huber-morathii* Wagenitz isolated from seeds by microdistillation. *Flavour Fragr. J.* 21: 568-570.
  35. **Jemia, M.B., Senatore, F., Bruno, M. and Bancheva, S. (2015).** Components from the essential oil of *Centaurea aeolica* Guss. and *C. diluta* Aiton from Sicily, Italy. *Rec. Nat. Prod.* 9: 580-585.
  36. **Firouznia, A., Akbari, M.T., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Bigdeli, M. and Anaraki, M.T. (2007).** Composition of the essential oils of *Artemisia turanica* Krasch., *Helichrysum ocephalum* Boiss. and *Centaurea ispananica* Boiss. Three Asteraceae herbs growing wild in Iran. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 10: 88-93.
  37. **Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Akbari, M.T., Moazami, N., Masoudi, S. and Amiri, H. (2006).** Composition of the essential oils of *Xanthium strumarium* L. and *Centaurea solstitialis* L. from Iran. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 18: 427-429.
  38. **Bellik, Y. and Selles, S.M.A. (2017).** *In Vitro* Synergistic Antioxidant Activity of *Honey Mentha Spicata* Combination. *J. Food Meas. Charact.* 11(1): 111-118.
  39. **Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A. and Moreno, S. (2009).** Synergistic Antioxidant and Antibacterial Activity of *Rosemary* plus Butylated Derivatives. *Food Chem.* 115: 456-461.
  40. **Frankel, E.N. and Meyer, A.S. (2000).** The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80(13): 1925-1941.
  41. **Fialho, L., Cunha-E-Silva, J.A., Santa-Maria, A.F., Madureira, F.A. and Iglesias, A.C. (2018).** Comparative study of systemic early postoperative inflammatory response among elderly and non-elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Rev. Col. Bras Cir.* 45(1): e1586.
  42. **Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A.G. and Bishayee, A. (2019).** Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur. J. Pharmacol.* 858: 172472.
  43. **Bi, W., Bi, Y., Gao, X., Yan, X., Zhang, Y., Xue, P., Bammert, C.E., LeGalley, T.D., Gibson, K.M., Bi, L. and Wang, J.X. (2016).** Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of novel kyotorphin-nitroxide hybrid molecules. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26(8): 2005-2013.
  44. **Mitra, I., Saha, A. and Roy, K. (2010).** Exploring quantitative structure-activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. *Mol. Simul.* 36: 1067-1079.
  45. **Rex, J.R.S., Muthukumar, N.M.S.A. and Selvakumar, P.M. (2018).** Phytochemicals as a potential source for anti-microbial, antioxidant and wound healing-A review. *MOJ Bioorg. Org. Chem.* 2(2): 61-70.
  46. **Raj Kapoor, B., Burkan, Z.E. and Senthilkumar, R. (2010).** Oxidants and human diseases: Role of antioxidant medicinal plants-A review. *Pharmacologyonline.* 1: 1117-1131.
  47. **Alminderej, F., Bakari, S., Almundarij, T.I., Snoussi, M., Aouadi, K. and Kadri, A. (2020).** Antioxidant activities of a new chemotype of *Piper cubeba* L. fruit essential oil (methyleugenol/eugenol): *In Silico* molecular docking and ADMET studies. *Plants.* 9(11): 1534.
  48. **Erel, S.B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S. and Krenn, L. (2014).** Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharm. Biol.* 52(6): 775-781.
  49. **Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Abu-Zaitoun, S.Y., Akkawi, R.J., Kalbouneh, S.R., Bernstein, N. and Dudai, N. (2018).** Chemical Profile and Bioactive Properties of the Essential Oil Isolated from *Clinopodium Serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze Growing in Palestine. *Ind. Crops Prod.* 124: 617-625.
  50. **Miyazawa, M. and Yamafuji, C. (2005).**

- Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* 53(5): 1765-1768.
51. **Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A.M., Statti, G.A., de Cindio, B., Houghton, P.J. and Menichini, F. (2005).** Chemical Analysis, Antioxidant, Antiinflammatory and Anti-cholinesterase Activities of *Origanum Ehrenbergii* Boiss and *Origanum Syriacum* L. Essential Oils. *Food Chem.* 117(1): 174-180.
52. **Ballard, C.G., Greig, N.H., Guillozet-Bongaarts, A.L., Enz, A. and Darvesh, S. (2005).** Cholinesterases: Roles in the Brain during Health and Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2(3): 307-318.
53. **Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M.R., Conforti, F., Passalacqua, N.G., Statti, G.A., Giancarlo, A. and Menichini, F. (2010).** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25(5): 622-628.

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>

## A combined *in vitro*–*in silico* approach for the discovery of novel endogenous enzymatic and ctDNA sequence of bioactive molecules from aerial and root parts of *Centaurea sulphurea* as antioxidant's agents

Benhamidat Lyna, Mesli Fouzia, Bensaid Okkacha, Mohammed El Amine Dib & Alain Muselli

To cite this article: Benhamidat Lyna, Mesli Fouzia, Bensaid Okkacha, Mohammed El Amine Dib & Alain Muselli (2022): A combined *in vitro*–*in silico* approach for the discovery of novel endogenous enzymatic and ctDNA sequence of bioactive molecules from aerial and root parts of *Centaurea sulphurea* as antioxidant's agents, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: [10.1080/07391102.2022.2090438](https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2090438)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2090438>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 29 Jun 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## A combined *in vitro*–*in silico* approach for the discovery of novel endogenous enzymatic and ctDNA sequence of bioactive molecules from aerial and root parts of *Centaurea sulphurea* as antioxidant's agents

Benhamidat Lyna<sup>a</sup>, Mesli Fouzia<sup>a</sup>, Bensaid Okkacha<sup>a</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>a</sup> and Alain Muselli<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Algeria; <sup>b</sup>Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Corté, France

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

### ABSTRACT

The excess free radicals not neutralized by the antioxidant defenses damage the essential macromolecules of our cells, causing abnormalities in the expression of genes and membrane receptors, cell proliferation or death, immune disorders, mutagenesis, deposits of proteins or lipofuscin in tissues. The first objective of this study was to elucidate the composition of the essential oil of the aerial and root part of *Centaurea sulphurea* during beginning of the vegetative cycle (March), beginning of the flowering stage (April) and full bloom (May/June) using GC/FID and GC/MS. The second aim was to describe the antioxidant activity using three methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric-reducing antioxidant power (FRAP),  $\beta$ -carotene bleaching assay) and bioinformatical study of ctDNA sequence and three endogenous enzymes inhibition. The essential oils obtained from the root during the full bloom period consisted mainly of caryophyllene oxide, apotaxene and (Z)-phytol. While, the aerial parts were dominated by caryophyllene oxide, verridiflorol and humulene epoxide II. The results showed that essential oil presented an excellent antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values of 2.06 g/L and 1.29 g/L, for aerial and root parts, compared to butylated hydroxytoluene (BHT) and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) controls and the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) co-crystallized inhibitor. The results of the molecular docking revealed that (Z)-phytol (Ligand 39) has an affinity to interact with ctDNA sequence, and three targets *Endogenous enzymes*. The molecular dynamics study was conducted for the best inhibitors (Z)-phytol. A few key residues were identified at the binding site of receptors. The *in-silico* assessment of the ADME properties and BOILED-Egg plot reveals that compound (Z)-phytol (L39) is permeable to the blood brain barrier and have high lipophilicity and high coefficient of skin permeability in the intestines with good bioavailability. The ADMET analysis also showed that this oxygenated diterpene is safer to replace the synthetic drugs with side effects. Further testing is needed to assess its effectiveness in reducing oxidative stress for use in the pharmaceutical industry.

### ARTICLE HISTORY

Received 8 September 2021  
Accepted 11 June 2022

### KEYWORDS

*C. sulphurea*; antioxidant; *in silico*; ctDNA binding; MOE (Molecular Operating Environment)

## 1. Introduction

Antioxidants have been widely used as additives to help maintain quality and increase the shelf life of the product. Also, antioxidants have an important role in the prevention of various diseases because they suppress active oxygen and lipid peroxidation (Noguchi & Niki, 1999). The antioxidant capacity of essential oils can be evaluated either *in vivo*, on living organisms or *in-vitro*, by using methods that involve the mixture of oxidant species with a sample that contains antioxidants capable of inhibiting the generation of free radicals (Alam et al., 2013). The latter can act under different mechanisms such as free radical decomposition, free radical scavenging and to chelate ferrous ions (Çam et al., 2009). Synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), have been widely used, but due to their undesirable effect, the naturally

occurring antioxidants are highly desirable (Rodil et al., 2012). The *Centaurea* genus presents a great therapeutic interest. This genus belonging to the largest and important genera of Asteraceae family, it accounts for about more than five hundred species distributed all over the world (Trease et al., 1983). Forty-five species are cultivated in Algeria according to Quezel and Santa (Francisco et al., 1995). Among them, *C. sulphurea* which is an annual herbaceous species. Indeed, several phytochemical and pharmacological studies have shown its richness in natural bioactive substances. Many *Centaurea* species were used in traditional medicine to treat various diseases, such as diabetes, malaria, hemorrhoids, abscesses and colds (Kargıoğlu et al., 2010). Similarly, it has been beneficial in the treatment of cancer and microbial infections (Kumarasamy et al., 2003; Panagouleas et al., 2003). The flowering tops of *C. sulphurea*

are used in decoction against palpitations (Secilla et al., 2012). Previous phytochemical work of this species has shown that chloroform extracts of the aerial part were rich in sesquiterpene lactones such as sulfureidine (Lakhal et al., 2010) and flavonoid aglycones such as cirsilineol, jaceosidin, 3-O-methyl-eupatorin, eptin and eupatilin (Kabouche et al., 2011). The endogenous enzymatic antioxidant defense system such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPxs), play an important role in homeostatic redox balance (Eddaikra et al., 2021). These defense systems are important and indispensable in the entire defense strategy of antioxidants, especially in reference to super oxide anion radical ( $^{\bullet}\text{O}_2^-$ ) (Ighodaro et al., 2018).

The computational technique known as “docking” can predict the binding of drug–target complex, as well as the conformation of the ligand upon binding to a protein target. It makes it possible to represent, interpret and predict biomolecular structures and functions (Mesli et al., 2013).

To the best of our knowledge, no studies have investigated the chemical composition and the biological activities of *C. sulphurea* essential oil. The main interest of this study was to study first the chemical composition of essential oil of *C. sulphurea* during the three developmental stages and the investigation of their antioxidant properties. The second study was to try to elucidate how the molecules of this oil interact with three powerful endogenous enzyme (catalase (CAT), superoxide dismutase (SODs), glutathione peroxidase (GPx)) and *ctDNA* sequence. Knowing that these endogens are active in endothelial cells, cytoplasm and mitochondrial intermembrane matrix (Oury et al., 1996).

The previous studies have shown that the catalase activation with a natural antioxidant component, which doesn't have toxicity, can provide useful results in the health field (Najjar et al., 2017). Also, other researchers have reported that catalase inhibition by wogonin led to  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation and cytotoxicity in cancer cells through  $\text{H}_2\text{O}_2$ -mediated NF- $\kappa$ B suppression and apoptosis activation (Pal et al., 2014; Yang et al., 2011). In this research, the plat form package MOE (Molecular Operating Environment) was used to study the modeling applications between all compounds of *C. sulphurea* essential oil and the catalase enzyme. After that, the compounds that achieved both good score in docking with catalase were docked with two endogenous enzymes: Superoxide Dismutase (Manjula et al., 2018), Glutathione Peroxidase (Tars et al., 2010) enzymes and *Ct-DNA* sequence (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> dodecamer (Drew et al., 1980), in order to validate the best interactions with the nucleotides and their affinities.

The main interest was to develop unique potential inhibitors of endogenous enzymatic (catalase (CAT), superoxide dismutase (SODs), glutathione peroxidase (GPx) and *ctDNA* sequence, to combat free radicals and protect the body from the damage caused by them. The docking studies predicted that the constituent molecules of the aerial and root parts of essential oil of *C. sulphurea* possess more capability as inhibitors as compared to established drugs in the pharmaceutical industry. Further, five designed compounds were filtered

through Lipinski's rule of five, along with ADMET risk parameters assessments. Finally, the top hit compound Z-phytol was analyzed by system pharmacology approaches.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental procedures

#### 2.1.1. Chemicals used in the study

Solvents and reagents used were 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), ethanol, methanol, potassium persulfate, iron chloride, ferrozine, BHT, EDTA, Quercetin and anhydrous sodium sulphate were purchased from Sigma (Sigma–Aldrich). In this study, we used analytical grade chemicals.

#### 2.1.2. Plant material and extraction of essential oil

The plant materials of *C. sulphurea* were collected in the Zarifet forestwit latitude: 1°19'08''O; longitude: 34°52'20''N; altitude: 990m) about 10 km from Tlemcen (Algeria). The essential oils of the aerial and root parts used for the study were collected at the beginning of April (Vegetative stage), at mid-May (Floral budding stage) and at the end of June (Flowering stage). The plant was identified by the botanist BABA Ali from the Department of Agronomy of the University of Tlemcen (Algeria), where a voucher specimen of the plant has been deposited in the Herbarium. Plant materials were air-dried at room temperature and submitted to hydro-distillation for 4 hours using a Clevenger apparatus according to the procedure described in the European Pharmacopeia (Conseil de l'Europe, 1996). The essential oils were treated with anhydrous sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and stored in a sealed tube at  $-4^\circ\text{C}$  until further used for chemical analysis and antioxidant activity.

#### 2.1.3. Identification of the oil components

**2.1.3.1. Gas chromatography.** The gas chromatography (GC) analysis was carried out using Clarus 500-Perkin-Elmer Auto system apparatus (Waltham, Massachusetts, USA) equipped by two flame ionization detectors (FID), with fused capillary columns (film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ; 50 m  $\times$  0.22 mm I. D), BP-1 (polymethyl-siloxane) and BP-20 (polyethylene glycol); carrier gas, helium; linear velocity, 0.8 mL/min (Bekhechi et al., 2010). The oven temperature was fixed from 60  $^\circ\text{C}$  to 220  $^\circ\text{C}$  at 2  $^\circ\text{C}/\text{min}$  and then held isotherm (20 min) (Bereksi et al., 2018), injector temperature was 250  $^\circ\text{C}$  (injection mode: split 1/60); detector temperature 250  $^\circ\text{C}$ . The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, without using correction factors, as described previously (Medbouhi et al., 2018).

#### 2.1.3.2. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Essential oils were analyzed with a Perkin ElmerTurbo-Mass quadrupole analyzer, coupled to a Perkin Elmer Auto system XL (France), equipped with two fused-silica capillary columns and operated with the same gas chromatography conditions

described above, except for a split of 1/80. Under the following conditions, EI mass spectra were acquired: Ion source temp. 150 °C, energy ionization 70 eV, mass range 35–350 Da (scan time: 1 s) (Zatla et al., 2017).

#### 2.1.4. Component identification and quantification

Quantification and identification of the components were made (i) through the comparison of their GC retention indices (RI) on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data (Bouyanzer et al., 2006; Jennings et al., 1980; König et al., 2004) and (ii) also through computer matching with commercial mass spectral libraries (National Institute of Standards and Technology, 1999) and comparison of spectra with those of in-library of laboratory of chemistry of natural products, University of Corsica (France). Component quantification was carried out using peak normalization % abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard.

#### 2.1.5. Antioxidant assays

**2.1.5.1. DPPH free radical scavenging assay.** The essential oil from the **flowering stage (June)** was used for the evaluation of antioxidant activity. Radical scavenging activity of essential oil was measured by the standard method and determined by using spectrophotometer. A volume of 1000  $\mu$ l of various concentrations of oil ranging from (0.2–15 g/L) were prepared in ethanol and added 1 mL of 0.2 mM DPPH solution freshly prepared. After 30 min of incubation at 37 °C in the dark, the anti DPPH activity was measured by recording the absorbance at 517 nm against blank and standard (BHT). The percentage inhibition activity was calculated by the following equation (Dhami et al., 2018).

$$\text{DPPH scavenging effect\%} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

where  $A_{\text{control}}$  is absorbance of DPPH radical (without the test sample), and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of DPPH radical with the oil samples of various concentrations. The  $IC_{50}$  (Half-maximal inhibitory concentration) was calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concentrations of the sample tested (Belabbes et al., 2017).

**2.1.5.2. Metal chelating activity.** The metal chelating assay by oils was examined by spectrophotometry method based on ability of essential oil to chelate transition metal ions  $Fe^{2+}$  by measuring the absorbance of iron-ferrozine complex formed at 562 nm (Kumar et al., 2012; Parki et al., 2017). In brief 100  $\mu$ l of (0.6 mM)  $FeCl_2$ , 100  $\mu$ l of 5 mM ferrozine and 900  $\mu$ l mL of methanol were added to various concentrations of tested sample (0.2–15 mg/mL). The solutions were mixed thoroughly and incubated for 10 min (Dhami et al., 2018). The absorbance of test sample was measured in a UV spectrophotometer at 562 nm. All the readings were recorded in duplicate; EDTA

(0.01 mM) was used as the standard. The metal-chelating activity of tested samples, expressed as percentage was calculated by using the following formula (Dhami et al., 2018).

$$\text{Chelating activity \%} = \frac{(\text{control} - \text{sample})}{\text{control}} \times 100 \quad (2)$$

The  $IC_{50}$  was calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concentrations of the sample tested.

**2.1.5.3.  $\beta$ -carotene bleaching assay.** The ability of *C. sulphurea* essential oils to protect lipid peroxidation was assessed by using the  $\beta$ -carotene bleaching test (Sangwan et al., 2001) this method is commonly used because  $\beta$ -carotene is an important physiological compound however it shows a strong biological activity (Kim et al., 2004). BHT was the positive control. Briefly, a mixture of  $\beta$ -carotene, Linoleic acid, and Tween 40 was prepared. The solvent was evaporated entirely by using a rotary evaporator. 100 mL of distilled water saturated with oxygen was added and shaken vigorously to form an emulsion. Then, 2.5 mL of the obtained emulsion was transferred into test tubes with 3.5 mL sample at different concentrations. The reaction mixture was maintained at 50 °C for 120 min, and the absorbance was measured at 470 nm using spectrophotometer against a blank consisting of an emulsion without  $\beta$ -carotene (Stankovic et al., 2020). The  $\beta$ -carotene bleaching assay was calculated as follows (Stankovic et al., 2020):

$$\beta - \text{carotene activity \%} = \frac{(A_s(120) - A_C(120))}{(A_C(0) - A_C(120))} \times 100 \quad (3)$$

where  $A_{s(120)}$  is the absorbance of the sample at  $t = 120$  min,  $A_{C(120)}$  is the absorbance of the control at  $t = 120$  min, and  $A_{C(0)}$  is the absorbance of the control at  $t = 0$  min. The  $IC_{50}$  was calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concentrations of the sample tested.

## 2.2. Theoretical background and computational details

### 2.2.1. Preparation and optimization of both enzyme and inhibitors

In this study, the structures of all compounds were downloaded from PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). The 3D structures of all compounds were pre-optimized by means of the Molecular Mechanics using Force Field MM+. After that, the resulted minimized structures were further refined using the semi-empirical method (AM1) (Stewart et al., 2007). All methods are implemented in HyperChem 8.0.8 software (HyperChem v8, 2009). At the end, the database was created in which all the compounds were converted into their 3D structures and this database was used as an input file in MOE-docking. Both crystallographic structures of the human catalase (PDB ID: 1dgb Resolution = 2.20 Å) as can be seen from Figure 1, R-Value Free 0.227 (Putnam et al., 2000) and Ct-DNA sequenced (CGCGAATTCGCG)2 dodecamer (PDB ID: 1BNA; Resolution = 1.90 Å), R-Value Free 0.178 (Drew et al.,

1980) (were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). In general, the protein structure with a resolution between 1.5 and 2.5 Å have an excellent quality for further studies (Clément & Slenzka, 2006; Didierjean & Tête-Favier, 2016), whereas, the resolution value of catalase and B-DNA belongs to this interval. Receptor (DNA) and ligand (the complex) files were prepared using platform package MOE (Molecular Operating Environment). The complex was enclosed in a box with the number of grid points in  $x \times y \times z$  directions ( $122 \times 72 \times 6$ ), and a grid spacing of 0.375 Å. All other parameters were default settings. For each of the docking cases, the lowest energy docked conformation, according to the package MOE (Molecular Operating Environment (MOE), 2013) scoring function, was selected as the binding mode.

### 2.2.2. Molecular docking

In this research, the platform package MOE (Molecular Operating Environment) was used to study the modeling applications between all compounds and the catalase enzyme. After that, the compounds that achieved good score in docking with catalase were docked to two Endogenous enzymes: Superoxide Dismutase (PDB ID: **5ytu**) (Manjula et al., 2018), Glutathione Peroxidase (PDB ID: **2vcv**) (Tars et al., 2010) enzymes and *Ct-DNA* sequence (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> dodecamer (PDB ID: **1BNA**) (Drew et al., 1980), in order to validate the best interactions with the nucleotides and their affinities. During the docking process the ligand was considered structurally rigid while the target was set as completely flexible. The wash setting was applied at pH6.0 and 300K, hydrogen atoms were added, and protonation 3D were assigned. The minimum energy configuration was performed using the MMFF94x force field. OPLS-AA force field was used with conjugant gradient method (Jorgensen et al., 1996). To assign atom type and partial charges in receptor structure. The number of interactions varies between (0, n) where n is 10, the cut-off for coulomb interaction and Van der Waals interactions was 30 Å with the ability to study the hydrogen-electrostatic in the total active site of catalase was optimized and the results were discussed. Also, we followed the same protocol of Molecular docking simulation which is used in our previous studies (Chenafa et al., 2021; Daoud et al., 2018). The following default parameters were used: Placement: Triangle Matcher; Rescoring 1: London dG. The London dG scoring function was employed to estimate the lowest score energy of the complex for the best pose of the compounds tested. All simulations were run by using all explicit solvation models using TIP3P water. After that, the RMSD value was used to compare the differences between the atomic distances of the docked poses and the ligand molecule of reference pose (NADPH), where a threshold of 2.0 Å corresponding to the better solution (Cross et al., 2009). In the end, the binding energy between ligands and target catalase was calculated using molecular mechanics (MOE, 2013) and based on molecular mechanics (Halgren, 1996, 1999). The results of the top scoring complexes in the active site were selected for the further molecular dynamics simulation study.

**Table 1.** Plant material, vegetative cycle and oil yields of *C. sulphurea*.

Month	Stage	Essential oilyield (%)		Temperature (°C)
		Aerial part	Root part	
April	Vegetative stage	0.05	0.15	13
May	Floral budding stage	0.16	0.29	25
June	Flowering stage	0.25	0.38	36

### 2.2.3. Molecular dynamics simulation, ADMET, cytochromes P450 and pharmacophore mapping

The potent compound which has best binding affinity (Score) and one almost a stable interaction with the catalase target was subjected to Molecular dynamics simulations. Molecular dynamics simulations (MD) were run by Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) for 100 ns for the complex (1dgb-compound). The Langevin equation (Toda et al., 1991) is used in NAMD to generate the Boltzmann distribution (canonical NVT, isobar-isotherm NPT) for units and simulations. The Brunger-Brooks-Karplus (BBK) method is used to integrate the Langevin equation (Brünger et al., 1984). The equations of motion (position and velocity) are described by Fokker-Planck (Wang & Skeel, 2003). The detailed analysis of (MD) simulation results of complex-L39 with target catalase is summarized in Figures 7 and 8. Moreover, the stable conformation obtained in the MD simulation of the best complex was conducted by Internal coordinates normal mode analysis server (IMODS). Internal coordinate's normal mode analysis server (IMODS) is a web-based software system. It can be used to investigate the values of deformability, eigenvalues, variance, co-variance map and elastic network. The software package MOE (Molecular Operating Environment) has proven its performance in several recent studies and has been invoked, for example: Stitou et al. (2021), Daoud et al. (2018), Chenafa et al. (2021), Mesli et al. (2019), and Mesli et al. (2021). Among the 60 (according to Table 2) selected compounds the molecular structures of the best compounds were analyzed using a SWISS ADME) server (<http://www.swissadme.ch/>). The results of absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) for selected compounds are listed in Table 12. These results prescribe that the ADMET-score would be a comprehensive index to estimate chemical drug-likeness. The drug score associate drug likeness, cLogP, LogS, molecular weight and toxicity risks in one handy value than may be attuned to judge the compound's overall potential to quality for a drug (Geronikaki et al., 1999; Lipinski et al., 1997). In this study, prediction and descriptors of druglikeness such as mutagenic, toxicological dosage level were predicted using a PreADMET server (<http://preadmet.bmdrc.org/>) and admetSAR server (<http://lmm.d.ecust.edu.cn:8000/>). All results of toxicological pathways, including organ toxicity, toxicity and stress response pathways are given in Table 13. To identify the toxicity of the selected best ligands Z-phytol, Eicosane, BHT, EDTA and analogues compounds of L39 and L42, we used Protox II (Banerjee et al., 2018). Cytochromes P450 are key enzymes involved in the metabolism of various endogenous or exogenous molecules. The results of The P450 sites of metabolism (SOM) of the best compound L39 were determined by online tool, RS-WebPredictor 1.0 (Release, 2018) and listed in supplementary Table S11. The

**Table 2.** Chemical compositions of *C. sulphurea* essential oils during three developmental stages.

Aerial part of <i>C. sulphurea</i> essential oils								
No. <sup>a</sup>	Components	IRI <sup>a,b</sup>	RId <sup>a,c</sup>	RIp <sup>d</sup>	April	May	June	Identification
1	$\alpha$ -Pinene	936	931	1022	3.1	1.7	13.2	RI, MS
2	Sabinene	973	966	1120	–	0.5	5.6	RI, MS
3	$\beta$ -pinene	978	970	1110	–	0.1	0.9	RI, MS
4	Myrcene	987	981	1159	1.7	0.9	0.2	RI, MS
5	p-Cymene	1015	1011	1265	2.7	0.4	0.3	RI, MS
6	Limonene	1023	1022	1197	4.8	2.7	0.7	RI, MS
7	(Z)- $\beta$ -ocimene	1024	1026	1230	–	0.1	0.3	RI, MS
8	(E)- $\beta$ -ocimene	1041	1037	1247	–	0.4	0.2	RI, MS
9	Nonanal	1083	1083	1394	0.7	0.7	0.5	RI, MS
10	Linalool	1081	1088	1544	1.2	tr	tr	RI, MS
11	Terpinen-4-ol	1164	1162	1590	–	0.2	0.1	RI, MS
12	Methyl-Salicylate	1173	1170	1731	–	0.1	0.2	RI, MS
13	Decanol	1185	1185	1498	–	0.2	0.3	RI, MS
14	$\alpha$ -Copaene	1379	1375	1488	–	0.6	3.5	RI, MS
15	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1424	1418	1591	2.9	1.9	3.4	RI, MS
16	$\alpha$ -Humulene	1456	1450	1665	–	0.4	0.6	RI, MS
17	Germacrene-D	1480	1478	1704	–	0.8	1.1	RI, MS
18	$\beta$ -Selinene	1483	1482	1712	–	0.6	0.8	RI, MS
19	4-epi-Cubebol	1487	1487	1870	–	0.2	0.6	RI, MS
20	Bicyclgermacrene	1494	1491	1727	–	0.1	0.3	RI, MS
21	$\alpha$ -Murolene	1496	1493	1719	–	0.1	0.5	RI, MS
22	$\beta$ -Cadinene	1507	1506	1752	–	0.1	0.2	RI, MS
23	$\delta$ -Cadinene	1516	1515	1752	–	0.2	0.5	RI, MS
24	3-(Z)-Hexenyl-benzoate	1554	1550	2088	0.4	0.2	tr	RI, MS
25	Germacrene-D-4-ol	1573	1567	2025	1.3	1.2	0.5	RI, MS
26	Caryophyllene oxide	1576	1571	1980	29.6	27.6	10.5	RI, MS
27	Salvial-4(14)-en-1-one	1584	1580	1996	2.2	2.1	0.2	RI, MS
28	Veridiflorol	1591	1584	2089	12.8	11.5	4.9	RI, MS
29	Humuleneepoxide II	1601	1599	2044	3.9	3.7	6.5	RI, MS
30	$\gamma$ -Eudesmol	1619	1617	2197	2.3	0.9	0.1	RI, MS
31	epi-Cubenol	1624	1623	2059	–	1.9	0.1	RI, MS
32	$\tau$ -Muurolool	1634	1630	2103	–	2.1	3.2	RI, MS
33	$\beta$ -Eudesmol	1644	1640	2232	0.7	7.2	8.5	RI, MS
34	$\alpha$ -Cadinol	1645	1641	2232	0.6	1.1	3.5	RI, MS
35	$\alpha$ -Eudesmol	1653	1649	2220	1.4	2.6	4.5	RI, MS
36	(Z,Z)-Farnesol	1653	1653	2163	0.6	3.1	6.5	RI, MS
37	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	1672	1670	2347	0.2	3.2	3.2	RI, MS
38	Tetradecanol	1676	1696	2105	–	0.9	0.5	RI, MS
39	(Z)-Phytol	2080	2081	2572	0.1	0.1	0.5	RI, MS
40	Heneicosane	2100	2099	2101	7.3	2.1	0.2	RI, MS
41	(E)-Phytol	2114	2113	2591	5.2	6.3	8.5	RI, MS
42	Eicosane	2200	2201	2200	6.5	1.1	0.2	RI, MS
	<b>Total %</b>				<b>92.2</b>	<b>91.9</b>	<b>96.1</b>	
	Oxygenatedmonoterpenes				3.9	1.2	1.1	
	Hydrocarbonmonoterpenes				9.6	5.9	20.6	
	Hydrocarbonsesquiterpenes				2.9	4.8	10.9	
	Oxygenatedsesquiterpenes				55.6	68.4	50.1	
	Non-terpeniccompounds				14.9	5.2	4.4	
	Oxygenatedditerpenes				5.3	6.4	9.0	
<b>Root parts of <i>C. sulphurea</i> essential oils</b>								
43	Hex-3-en-1-ol (E)	812	791	1966	0.4	tr	0.3	RI, MS
44	Hex-3-en-1-ol (Z)	831	825	1380	0.2	tr	0.1	RI, MS
45	$\alpha$ -Thujene	922	923	1023	0.6	1.7	0.3	RI, MS
56	$\beta$ -pinene	978	970	1110	3.9	2.5	8.1	RI, MS
47	methyl-Salicylate	1173	1170	1731	0.7	0.9	0.5	RI, MS
48	Decanol	1185	1185	1498	2.4	tr	0.8	RI, MS
49	Dec-3-en-2-one	1219	1221	1601	1.3	0.5	0.4	RI, MS
50	Geranylacetate	1361	1367	1752	tr	0.1	0.3	RI, MS
51	$\alpha$ -Copaene	1379	1375	1488	0.1	0.1	0.2	RI, MS
52	Dodecanol	1389	1390	1695	3.4	tr	0.2	RI, MS
53	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1424	1418	1591	6.5	8.8	16.6	RI, MS
54	$\alpha$ -Humulene	1456	1450	1665	0.5	0.1	tr	RI, MS
55	Germacrene-D	1480	1478	1704	3.5	3.3	1.1	RI, MS
56	Caryophyllene oxide	1576	1571	1980	32.1	19.1	14.6	RI, MS
57	Humuleneepoxide II	1601	1599	2044	1.1	10.6	3.5	RI, MS
58	Aplotaxene	1663	1661	–	27.9	15.5	10.5	RI, MS
59	Hexadecanoicacid	1958	1954	–	0.2	12.3	5.6	RI, MS
60	(E)-Phytol	2114	2113	2591	10.3	15.4	28.6	RI, MS
	<b>Identification %</b>				<b>95.1</b>	<b>90.9</b>	<b>91.7</b>	
	Hydrocarbonmonoterpenes				4.5	4.2	8.4	
	Oxygenatedmonoterpenes				0.7	0.9	0.5	
	Hydrocarbonsesquiterpenes				10.6	12.3	17.9	
	Oxygenatedsesquiterpenes				33.2	29.8	18.4	

(continued)



Table 2. Continued.

Aerial part of <i>C. sulphurea</i> essential oils								
No. <sup>a</sup>	Components	IRI <sup>a,b</sup>	RId <sup>a,c</sup>	RIp <sup>d</sup>	April	May	June	Identification
	Oxygenatedditerpenes				10.3	15.4	28.6	
	Aliphaticcompounds				35.8	28.3	17.9	

RI: retention indices, MS: mass spectra in electronic impact mode.

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1).

<sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (IRIA).

<sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIA).

<sup>d</sup>Retention indices on the polar Rtx-Wax column.

Table 3. Antioxidant activity (IC<sub>50</sub>) of essential oils of *C. sulphurea*.

Sample name	Mean values (in g/L) with SD		
	DPPH radical scavenging (IC <sub>50</sub> )	Metal chelating activity (IC <sub>50</sub> )	$\beta$ -Carotene/linoleic acid assay (IC <sub>50</sub> )
Aerial part	2.06 $\pm$ 0.1	2.02 $\pm$ 0.3	38.4 $\pm$ 0.5
Root part	1.29 $\pm$ 0.5	2.96 $\pm$ 0.5	36.6 $\pm$ 0.2
BHT (DPPH)	0.26 $\pm$ 0.5	–	–
BHT ( $\beta$ -Carotene)	–	–	0.59 $\pm$ 0.1
EDTA	–	1.03 $\pm$ 0.2	–

SD = standard deviation.

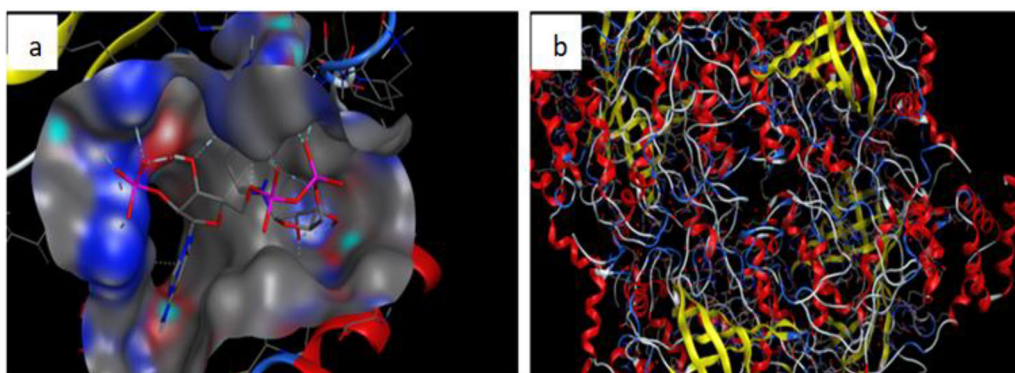


Figure 1. (a) The active site of isolated catalase. (b) Simplified model of catalase.

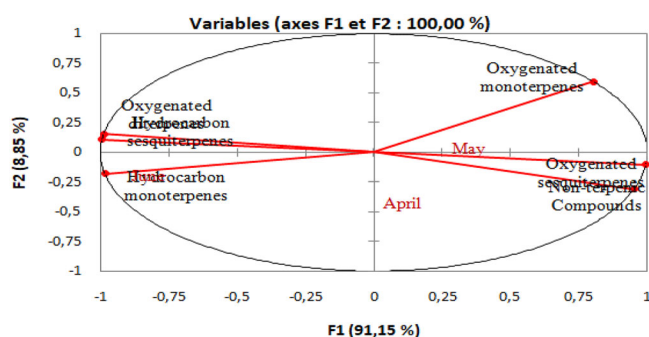


Figure 2. Distribution of variables of chemical composition of *Centaurea sulphurea* roots during the vegetative cycle.

pharmacophore mapping study of the best ligand was carried out by online server Pharm Mapper (Parr et al., 1989). It consists of identifying common binding elements that is responsible for the biological activity and determining the 3D relationship between pharmacophore elements in each conformation generated (Vyas et al., 2008). The pharmacophore modelling was done for the best ligand molecule among the 60 (according to Table 2) a selected molecule is summarized in Figure 9. However, in this study the P450 sites of metabolism (SOM), toxicological pathways, ligand-based pharmacophore modeling, drug likeness prediction and ADMET-calculations

were carried out to determine and compare the biological activities of the two best ligands.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Experimental approach

#### 3.1.1. Essential oil yields

The essential oil yield of the aerial and root parts of *C. sulphurea* varied remarkably during the three stages of development of the plant. The essential oils yield of aerial and root parts was the lowest (0.05% and 0.15, respectively) during the first vegetative stage. Then it increased appreciably as the floral budding stage outset (0.16% and 0.29%) and reached 0.25% and 0.38% at the flowering stage, respectively (Table 1). This increase in yield can be explained by the length of the vegetative cycle, summer heat and the effect of water stress (Kim et al., 2004; Sangwan et al., 2001).

#### 3.1.2. Chemical composition of *C. sulphurea* essential oil

The analysis of essential oils of the aerial and root parts of *C. sulphurea* during three stages of development of the plant was analyzed by GC and GC/MS and identified by comparison of their retention indices and mass spectra with those of

**Table 4.** Energy minimization of the best compounds for antioxidant drug.

Ligand compound	Toxic	LogP	Energies (kcal/mol)	LogS	Hdon + Hacc	Flexibility
L22 $\beta$ -Cadinene	No	4.58	2.60161e + 001	-4.67	don:0; acc:0	1 out 1
L23 $\delta$ -Cadinene	No	4.58	2.95608e + 001	-5.17	don:0; acc:0	1 out 1
L24 3-(Z)-Hexenyl-benzoate	No	3.20	3.01393e + 001	-3.30	don:0; acc:1	6 out 6
L30 $\gamma$ -Eudesmol	No	4.06	3.84759e + 001	-3.67	don:1; acc:1	1 out 1
L33 $\beta$ -Eudesmol	No	3.92	4.47669e + 001	-4.36	don:1; acc:1	1 out 1
L36 (Z,Z)-Farnesol	No	4.40	1.60145e + 001	-4.25	don:1; acc:1	7 out 7
L39 (Z)-Phytol	No	6.36	1.72039e + 001	-8.27	don:1; acc:1	13 out 13
L40 Heneicosane	No	8.44	-8.49952e + 000	-10.66	don:0; acc:0	18 out 18
L42 Eicosane	No	8.05	-8.29676e + 000	-10.15	don:0; acc:0	17 out 17
L50 Geranyl acetate	No	3.24	9.02954e + 000	-3.02	don:0; acc:1	6 out 6
L58 Aplotaxene	No	5.98	1.22114e + 001	-7.27	don:0; acc:0	11 out 11
L59 Hexadecanoic acid	No	5.55	-1.46061e + 001	-6.49	don:2; acc:1	14 out 14
L60 (E)-Phytol	No	8.27	1.77210e + 001	6.36	don:1; acc:1	13 out 13

**Table 5.** S-score (Energy) and interactions between best compounds and the active site residues of catalase target.

No.	Compounds	S-score (kcal/mol)	Bonds between atoms of compounds and residues of the active site					Distances (Å)	Energy (kcal/mol)
			Atom of compound	Involved receptor atoms	Involved receptor residues	Type of interaction bond			
L59	Catalase (Cal) Hexadecanoic acid	-6.266	6-ring	OH	TYR 215	H-acceptor	2.26	63.6	
				O	HOH 1533	H-acceptor	3.51	-0.6	
L60	(E)-Phytol	-6.882	O1 1	O	HOH 1558	H-acceptor	2.88	-0.3	
			O1 1						
L39	(Z)-Phytol	-7.184		NZ	LYS237	H-acceptor	3.11	-1.80	
L40	Heneicosane	-6.900	C 12	5-ring	HIS 305	H-pi	3.62	-0.7	
L42	Eicosane	-7.158	C-11	6-ring	PHE198	H-Pi	4.45	-0.60	

H = Conventional hydrogen bond, C = Carbon hydrogen bond, Aa = Alkyl-alkyl, Ap = Alkyl-Pi, Aps = Amide-Pi stacked, Ppt = Pi-pi T-shaped, X = Halogen.

the "Aromas" library specific to the laboratory of the University of Corsica. The chemical compositions are presented in Tables 2 and 3. Eight monoterpene hydrocarbons, nine sesquiterpene hydrocarbons, three oxygenated monoterpenes, sixteen oxygenated sesquiterpenes, four oxygenated diterpenes and two non-terpenic compounds were identified in the aerial parts. Throughout the vegetative cycle (May–June), the essential oil of aerial parts has been characterized by a high percentage of oxygenated sesquiterpenes characterized by caryophyllene oxide (10.5–29.6%), verridiflorol (4.9–12.8%) and humulene epoxide II (3.7–6.5%). At the vegetative stage and the floral budding stage, the hydrocarbon monoterpenes and the hydrocarbon sesquiterpenes were present in low amounts with percentages varying from 1.2–3.9% and 5.9–9.6%. Then at the flowering stage, they increased at 20.6% and 10.9%, respectively (Table 2). At the vegetative stage (May), the aliphatic compounds were more predominant (14.9%) followed by heneicosane (7.3%) and eicosane (6.5%) (Table 2).

The chemical compositions of root parts are presented in Table 3. Eighteen components were detected, accounting for 95.1% at the vegetative stage, 90.9% at the floral budding and 91.7% at the flowering stage. The essential oil of root parts of vegetative stage contains aliphatic compounds (35.8%), oxygenated sesquiterpenes (33.2%), hydrocarbon sesquiterpenes (10.6%) and oxygenated diterpenes (10.3%) (Table 2, Figure 1). The oil contains caryophyllene oxide (32.1%), aplotaxene (27.9%) and (E)-phytol (10.3%) as main components. At the floral budding, the essential oil of *C. sulphurea* was dominated by oxygenated sesquiterpenes (29.8%) and aliphatic compounds (28.3%), followed by oxygenated diterpenes (15.4%) and hydrocarbon sesquiterpenes

(12.3%) (Figure 1). The main components were caryophyllene oxide (19.1%), aplotaxene (15.5%), (E)-phytol (15.4%) and hexadecanoic acid (12.3%). On the other hand, at the flowering stage, the oil of roots was dominated by oxygenated diterpenes (28.6%), oxygenated sesquiterpenes (18.4%), aliphatic compounds (17.9%), hydrocarbon sesquiterpenes (17.9%) and small amount of hydrocarbon monoterpenes (8.4%) (Table 2 and Figure 2). The main components were (E)-phytol (28.6%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (16.6%), caryophyllene oxide (14.6%), aplotaxene (10.5%) and  $\beta$ -pinene (8.1%). It is noteworthy that the normalized percent abundances of major oil components varied greatly according to physiological stage.

A significant increase in hydrocarbons sesquiterpenes were observed with a percentage for 10% at the vegetative stage to 18% at the floral stage compared to oxygenate which decreased (33% to 18%). However, caryophyllene oxide and aplotaxene, showed a significant decrease of their percentage during vegetative monitoring (32 to 14%) and (27 to 10%), respectively. However, the content of oxygenated diterpenes increased significantly at the budding and flowering stages, with a percentage of 15.4% and 28.6% respectively. While the content of aliphatic compounds was at 35.8% decreased to 17.9% at the flowering stage (Table 2).

From our results cited in Table 2, we were able to trace the variation in the contents of the different chemical classes of essential oils from roots *C. sulphurea* see Figure 2. The distribution (Figure 2) showed that the essential oil was rich in oxygenated sesquiterpenes (18.4–33.2%) and aliphatic components (17.9–35.8%) during the month of April. However, the percentage of hydrocarbon sesquiterpenes was relatively

**Table 6.** The docking energies of best DNA inhibitors.

Ligand	Compound	DE* (kcal/mol) <i>ctDNA</i>	DE* (kcal/mol) <i>Catalase</i>	ETOR (kT)	VDW (kT)	EIE (kT)
BHT31404		-4.743	-5.052	330.721	413.487	-1942.09
EDTA6049		-4.965	-5.591	330.722	413.486	-1942.09
Lref		-5.900	-8.043	330.722	413.486	-1942.09
L39	(Z)-Phytol	-6.978	-7.184	330.723	413.317	-1942.01
L40	Heneicosane	-6.819	-6.809	330.724	413.316	-1942.01
L42	Eicosane	-6.858	-7.158	330.724	413.316	-1942.01
L59	Hexadecanoic acid	-6.516	-6.266	330.725	413.315	-1942.01
L60	(E)-Phytol	-6.425	-6.908	330.720	413.488	-1942.09

DE: Energy, ETOR: Energy Torsion, VDW: Van Der Walls, EIE: Electrostatic.

**Table 7.** Interaction profiles of the potential compounds for three *Endogenous Enzymatic* inhibitors.

No.	Compound	Targets	Energy (kcal/mol)	Energy torsion (kT)	Van Der Walls (kcal/mol)	Electrostatic (kcal/mol)
Lref	NADPH	CAT	-8.043	2603.149	8687.066	-22,383.8
		SOD	-3.247	637.836	3687.273	-10,233.1
		GPX	-6.176	1134.834	4767.672	-12,474.1
L39	(Z)-Phytol	CAT	-7.184	2537.734	8664.659	-22,264.6
		SOD	-3.993	598.608	4192.510	-10,291.6
		GPX	-4.413	1091.834	4753.317	-12,384.3
L40	Heneicosane	CAT	-6.809	2522.562	8677.642	-22,285.8
		SOD	-4.142	581.009	3691.151	-10,289.5
		GPX	-4.340	1054.875	4788.068	-12,421.7
L42	Eicosane	CAT	-7.158	2515.807	8661.011	-22,263.4
		SOD	-4.163	581.203	3704.941	-10,281.9
		GPX	-4.686	1060.625	4773.694	-12,419.8
L59	Hexadecanoic acid	CAT	-6.266	2527.458	8649.425	-22,338.3
		SOD	-3.617	590.860	3763.376	-10,415.7
		GPX	-4.748	1077.965	4792.381	-12,482.6
L60	(E)-Phytol	CAT	-6.882	2533.186	8651.835	-22,244.0
		SOD	-3.798	598.256	3744.463	-10,344.5
		GPX	-5.281	1067.257	4775.731	-12,435.8

DE: docking energy; ETOR: Torsion energy; VDW: Van der Waals; EIE: Electrostatic Interaction Energy.

lower (4.2–8.4%) compared to oxygenated sesquiterpenes during the month of June. The, oxygenated monoterpenes (0.–.09%) constitute the lowest percentage classes during the month of May. Previous work has shown that the main components of essential oils of *C. dimorpha* Viv. and *C. apiculata* Lebed collected in Algeria and Bulgaria, respectively were rich in caryophyllene oxide with a percentage of (9.9% and 15.8%) (Belkassam et al., 2019; Riccobono et al., 2017). However, hexadecanoic acid was detected as main constituent in essential oils of *C. pterocaula* Trautv (Sen et al., 2021), *C. aggregata* subsp. *aggregata*, *C. balsamita* and *C. Behen* (Erdogan et al., 2017) from Turkey with a percentage ranging from 23.0% to 35.8%, similarly for essential oil from Lebanon (33.2%) (Senatore et al., 2005). On the other hand, the main component obtained from the essential oils of *C. pumilio* from Egypt was pentadecane (17.8%) (Naeim et al., 2020), *C. damascena* from Jordan was fokienol (11.4%) (Khleifat et al., 2019), *C. polymorpha* from Spain was Heptacosane (11.5%) (Formisano et al., 2006) and *C. grinensis* from Croatia was p-vinyl guaiacol (21.5%) (Riccobono et al., 2017). Benzyl benzoate (26.5%) and geranial (38.6%) were detected as the main constituents of essential oils of *C. isphahanica* Boiss and *C. irritans* from Iran, respectively (Formisano et al., 2006; Khleifat et al., 2019). The essential oils of *C. grisebachii* subsp. *Grisebachii* and *C. affinis* Friv. from Greece were dominated by 6,10,14-trimethyl-pentadecan-2-one (12.9%) and tetracosane (7.8%) (Djeddi et al., 2011). Essential oils of *C. paniculata* Subsp. *Carueliana* and *C. rupestris* from Italy were constituted by (Z)-3-hexenol (16.5%) and germacrene D (42.3%) (Tava et al., 2010).

### 3.1.3. Evaluation of the antioxidant activities of essential oils

The antioxidant activities were performed using the free radical scavenging activity (DPPH), metal chelating tests and  $\beta$ -carotene bleaching assay, using BHT and EDTA as a positive control (Table 3).

The free radical scavenging activity of *C. sulphurea* essential oil was analyzed using DPPH assay. Varying concentrations of the samples were used from 0.2 to 15 g/L. It has been observed that the free radical scavenging activity increases with the increase in concentration oils (Table 3). It is also observed that the aerial and root parts of essential oils had good antioxidant activity, with IC<sub>50</sub> values of 2.06 g/L and 1.29 g/L, respectively, but this activity remains lower compared to the BHT control (IC<sub>50</sub> = 0.26 g/L).

Chelating activity on Fe<sup>+2</sup> of essential oils of *C. sulphurea* was estimated using various amounts of oil from 0.2 to 15 mg/mL. From the IC<sub>50</sub> values obtained, it was observed that the oil of the aerial part (IC<sub>50</sub> = 2.02 g/L) exhibited a greater inhibitory activity than the essential oil of the root part (IC<sub>50</sub> = 2.96 g/L), while that of the EDTA control, the IC<sub>50</sub> was 1.03 g/L (Table 3). These oils either chelated metal ions or suppressed reactivity by occupying all coordination sites of metal ions (Mohany et al., 1985).

$\beta$ -carotene-linoleic acid activity of essential oils of *C. sulphurea* was estimated using various concentrations from 5.0 to 38 g/L for essential oils and 0.1 to 8.0 g/L for BHT. From the IC<sub>50</sub> values obtained, it has been observed that the oil from the root part showed a greater inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> of 36.6 g/L contrary to the aerial part (IC<sub>50</sub> = 38.4 g/L).

L). The standard has the highest activity with an  $IC_{50}$  of 0.59 g/L. The rate of  $\beta$ -carotene bleaching can be slowed down in the presence of antioxidants (Oke et al., 2009). Indeed, this last one is a free radical mediated phenomenon resulting from the hydroperoxides formed from linoleic acid, which attack the highly unsaturated  $\beta$ -carotene molecules (Wang et al., 2008).

It can be concluded that the essential oils of *C. sulphurea* showed significant antioxidant potential, presumably due to qualitative and quantitative difference of their components. This antioxidant effectiveness of aerial and root parts essential oils may be attributed primarily to the presence of (E)- $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide in high concentrations. Indeed, it has been previously shown that species rich in these compounds possessed appreciable antioxidant activity (Figueiredo et al., 2019; Sarikurkcu et al., 2018; Nafis et al., 2019). Also, the activity of the root part could be explained by the presence of the dominating compound aploxene, but to our knowledge there are no studies on evaluation of the antioxidant capacity of hydrocarbons compounds.

### 3.2. Theoretical and computational methods

#### 3.2.1. Evaluation of molecular docking

**3.2.1.1. Properties of compounds.** The information of best compounds after docking was obtained from MOE software (Molecular Operating Environment (MOE), 2019) and Molegro Virtual Docker (MVD) software (Thomsen et al., 2006) given for ligands in Table 4 and properties of other compounds of aerial and root part of *C. sulphurea* are listed in Tables S1 and S2 (Supplementary Materials), respectively.

According to the table above, we note also that the five molecules (Z)-phytol, heneicosane, eicosane, hexadecanoic acid and (E)-phytol have a high value of flexibility compared to other molecules and also the results obtained show that these five ligands have a high value of torsion angle relative to other compounds. This shows that these compounds L39, L60, L59, L40 and L42 are more flexible. In addition, it is noted that the growth of the torsion angle depends on the binding number of the compound.

**3.2.1.2. Identification of the best poses based on affinity of compounds with catalase target.** The results obtained after the docking calculations and the **five best poses** received for the best compounds with the pocket of the **catalase** target have been listed in Table 5 and the results of energy (binding affinity) for other compounds are listed in Tables S3–S5 (Supplementary Materials).

#### 3.2.1.3. Interaction with catalase, CtDNA sequence and endogenous enzymatic antioxidant systems

**3.2.1.3.1. Interaction with catalase.** The results obtained show that the scores of binding free energies of all complexes (1dgb-compound) were between  $-3.819$  and  $-7.184$  kcal/mol and the complexes formed by compounds: L39 and L42 have the lowest score of binding energy compared to the other complexes (see Table 5; Tables S3–S5, Supplementary Materials). They give the best docking scores,

**Table 8.** Thermodynamic properties calculated in reels units.

Stage	Method	H	U	EKT	P	V
SP <sub>1</sub>	CATNVT	-548.001	1239.506	7896.099	-60.342	70,733.242
	CATNPT	126.562	-3738.745	3258.956	-166.790	70,734.429
	CATNVT	-3.077	-1794.187	6340.632	-6.647	70,733.242
	CATNPT	0.607	-4177.466	3644.816	-25.583	70,129.531
	CATNVT	1.431	-1872.646	296.267	47.574	70,733.242
	CATNPT	0.856	-4300.242	3777.552	-44.703	68,616.622
SP <sub>2</sub>	CATNVT	1.794	-1910.387	6454.985	110.509	70,733.242
	CATNPT	1.732	-4370.358	3851.464	-19.527	68,023.101
	CATNVT	7.922	-2034.435	6380.051	-48.245	70,733.242
	CATNPT	15.996	-4431.202	3926.552	-21.916	66,554.343
	CATNVT	6.380	-2223.329	6466.652	-91.712	70,733.242
	CATNPT	24.248	-4429.957	3933.550	-81.352	65,744.632
SP <sub>3</sub>	CATNVT	-1.253	-2267.157	6466.531	50.258	70,733.242
	CATNPT	4.536	-4482.546	4055.145	108.319	58,992.375
	CATNVT	0.874	-2352.489	6388.428	-44.417	70,733.242
	CATNPT	44.459	-4455.767	4068.258	-34.409	55,208.097
	CATNVT	5.273	-2387.140	6402.313	61.308	70,733.242
	CATNPT	87.701	-4490.880	4146.594	153.381	51,238.800

Pressure  $P = P^* \epsilon / \sigma^{-3}$ . Energy of configuration  $U = U^* N \epsilon$ . Translation Kinetic Energy  $EKT = EKT^* N \epsilon$  and Enthalpy  $H = H^* N \epsilon$ .

based on the binding free energy (Table 5). This shows that these complexes are more stable. As can be seen from Figure 3 and Figure 4.

We note that the complex formed by the compound L39 (1dgb-L39) has the lowest energy score compared to the other complexes formed by control test butyld hydroxytoluene (BHT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Moreover, this compound forms one interaction with active site residue of the catalase target.

The complex formed by compound L42 gave a score value very close (slightly higher) to the value of the both best of control test butyld hydroxytoluene (BHT) and ethylenediaminetetraacetic (EDTA) (Table 5). Their binding free energies were  $-5.052$  and  $-5.591$  kcal/mol respectively. In addition, this compound establishes one interaction with active site residues of the catalase target.

In addition, other compounds that formed interactions with active site residues of the catalase target which are less stable than L39 and L42 are given in Tables S3–S5 (Supplementary Materials). These ligands are 3-(Z)-hexenylbenzoate,  $\beta$ -eudesmol and (E)-phytolligands L24, L33, L60, interacts with LYS 237 (pi-cation), PHE 198 and HOH 1558 at a distance of 3.83, 4.49 and 2.08 Å strong with energy of  $-1.3$ ,  $-0.7$  and  $-0.3$  kcal/mol respectively and p-cymene ligand L5 interacts with one amino acid PHE 198 pi-pi at a distance of 3.89 Å strong and energy binding of  $-0.04$ , similarly, the  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -cadinene, salvia-4(14)-en-1-one ligand (L14, L22 and L27) interacts with H-pi at a distance of 3.77, 4.00 and 3.80 Å (strong, low) respectively. Humuleneepoxyde II,  $\tau$ -muurolool and  $\beta$ -eudesmol ligands (L29, L32 and L33) interacts with HIS 305, H-pi, HOH 1444 and HOH 1533 at a distance of 3.75, 2060 and 2.72 Å (weak) respectively with energy binding of  $-1.0$ ;  $-1.1$  and  $-1.2$  kcal/mol respectively while (Z,Z)-farnesol ligand (L36) interacts with HOH 1465 H-donor at a distance of 2.59 Å (strong) and energy binding of  $-0.6$  kcal/mol. Hexadecanoic acid, linalool, methyl-salicylate and decanol interacts with one amino acid TYR 215, ARG203 and HOH 1414, HOH 1484 H-acceptor at a distance of 2.26, 2.63, 4.33 and 2.64, 2.34 Å average, strong interaction and energy binding of  $-6.6$ ,  $-1.5$ ,  $-0.7$  and  $-0.4$  kcal/mol, and

**Table 9.** Predicted toxicity risks of best test compounds.

Ligands	Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive effective
Lref				
BHT	Red	Red	Red	Red
EDTA				
L39	Green	Green	Green	Green
L40				
L42		Red	Red	
L59		Red	Red	
L60				
1-Analog structure L39			Yellow	Yellow
2-Analog structure L39				
3-Analog structure L39				
4-Analog structure L39				Red

Green = good, yellow = tolerable, red = bad.

interaction with heneicosane,  $\alpha$ -thujene, methyl-salicylate, decanolanddec-3-en-2-one with HIS 305, PHE198, ASN 149 and HOH 1465, respectively, H-donor and H-pi at a distance of 3.62, 4.21, 2.47 and 2.54 Å (strong, low, average interaction) and energy binding of  $-0.7$ ,  $-0.6$ ,  $0.4$  and  $-0.8$  kcal/mol respectively. Dec-3-en-2-one, geranylacetate, dodecanal and caryophyllene oxide interact with HOH 1465–1533, HIS305, HOH1068 and HIS305 with energy binding of  $-1.7$ ,  $-3.6$ ,  $-2.7$  and  $-0.6$  kcal/mol.

In our research, all the compounds tested show stable hydrogen bonds. On the other hand, previous research (Sarwar et al., 2010, 2013) proved that, halogen bonding similar to hydrogen bonding plays a crucial role for biological and chemical systems.

The binding affinity of L39, L42, L40, L60, and L59 ((Z)-phytol, eicosane, heneicosane, (E)-phytol and hexadecanoic acid) have considerably increased to  $-7.184$ ,  $-7.158$ ,  $-6.900$ ,  $-6.882$ , and  $-6.266$  kcal/mol respectively. Improved hydrogen bond was observed in L39 and L42. This bond not only contribute in increasing binding affinity, but also enhance the binding specificity (Bissantz et al., 2010; Sarwar et al., 2013). This observation helped to confirm that compounds (L39 and L42) (oxygenated diterpene) are bound at the desired binding site of receptor protein after molecular docking.

**3.2.1.3.2. Interaction mechanism of the complex with Ct-DNA sequence.** According to the research of (Birben et al., 2012) reactive oxygen species (ROS) can lead to DNA modifications in several ways, which involves degradation of bases, single- or double-stranded DNA breaks, purine, pyrimidine, or sugar. Most of these DNA modifications are highly relevant to carcinogenesis, aging, and neurodegenerative, cardiovascular, and autoimmune diseases (Al-Dalaen et al., 2014). So, this study was to elucidate the interaction of the best ligands obtained by molecular docking with the CtDNA sequence, in order to validate the interactions with the nucleotides and their affinities. The results obtained after the docking calculations for the **five** best compounds with the pocket of the Ct-DNA sequence (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> dodecamer (PDBID:1BNA) have been listed in Table 6. Energy (binding affinity) and interactions for other compounds are listed in Table S6 (Supplementary Materials).

The obtained results show that compounds with stronger electron-donating substituents have higher DNA-binding

ability than the others; On the other hand, results show that some of the tested compounds are minor groove binders. Our results demonstrated that the five compounds: (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), heneicosane (Ligand 40), hexadecanoic acid (Ligand 59), aploxene (Ligand 58), and (E)-phytol (Ligand 60), were the best interacting compounds (see Table 6; Supplementary Materials Table S6).

The calculated docking energies for these compounds were respectively  $-6.978$ ,  $-6.858$ ,  $-6.819$ ,  $-6.516$ ,  $-6.425$ , and  $-6.46$  kcal mol<sup>-1</sup>. With the exception of  $\beta$ -cadinene,  $\gamma$ -eudesmol and  $\beta$ -eudesmol, other compounds are located in the small cDNA groove. The results of molecular docking showed that  $\beta$ -cadinene,  $\gamma$ -eudesmol and  $\beta$ -eudesmol, existed in the main groove region. The calculated docking energy of this compound was  $-4.741$ ,  $-4.824$  and  $-4.793$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively (See Supplementary Materials Table S6). Among, the test candidates in this study, (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), displayed the lowest binding energy of  $-6.978$ ,  $-6.858$  kcal/mol for Ct-DNA sequence and  $-7.184$ ,  $-7.158$  kcal/mol for the enzyme. These energies are lower compared to those of the Lref (NADPH) and two control ligands butylated hydroxytoluene (BHT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Their binding energies obtained are  $-4.743$ ,  $-4.965$  kcal/mol, respectively for DNA sequence and  $-5.052$ ,  $-5.591$  kcal/mol, respectively, for the enzyme were much higher than (Z)-phytol, as found in our study; thus (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42) displayed much better binding than the Lref (NADPH) and control molecule; butylated hydroxytoluene (BHT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The two complexes are showing greater antioxidant activity than butyted hydroxytoluene (BHT) and ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA).

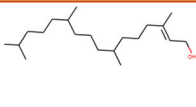
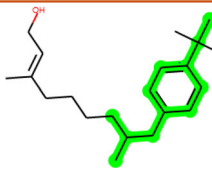
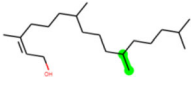
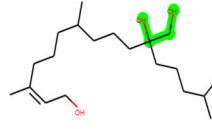
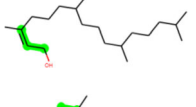
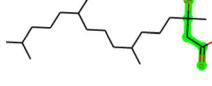
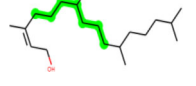
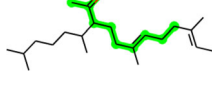
The docking results reveal that the binding strength of complex-1 [(Z)-phytol-catalase] is higher than complex-2 [eicosane-catalase]. Molecular dynamics simulation studies suggest that compound (Z)-phytol has a strong DNA-binding affinity than compound eicosane. The more bonding strength of complex-1 is due to the presence of hydrophobic pi-pi interactions with nucleotide bases of DNA, along with hydrogen bonding interaction. On the other hand, complex-2 eicosane-catalase showed only a few pi-pi interactions with nucleotide bases of DNA. The bulkier aromatic group in complex-1 participated in pi-pi interactions with nucleotides. However, the group in eicosane-catalase showed no interactions with nucleotides. Thus, the absence of pi-pi interactions with DC15 and DT14 nucleotides lowers the binding affinity of complex-2.

From the docking results with the optimal energy, it was found that the complex [complex-1 (Z)-phytol-catalase] inserted into the groove of DNA fragments and hydrophobic forces play main roles in the binding of complex to ct-DNA.

The docking results reveal (Z)-phytol and eicosane displayed much better binding (See Figure 5). From our results, we can conclude that complex-1 showed greater DNA binding and antioxidant activity than complex-2.

**3.2.1.3.3. Interaction with endogenous enzymes antioxidant systems.** In order to complete this research, we deemed it

**Table 10.** In silico Bioisosteric Replacement based on similarity comparison method using MolOpt.

Molecule	Replaceable group	Transformation in previous studies	Analogue structure	Smiles
L39		Eur. J. Biochem., 1989, 185, 605–614	1-Analog L39 	<chem>CC(=CCO)CCCC(C)Cc1ccc(C(C)(C)C)cc1</chem>
		Drug Metab. Dispos., 2012, 40, 928–942 J. Med. Chem., 2008, 51, 3720–3730	2-Analog L39 	<chem>CC(=CCO)CCCC(C)CCCC(O)(CO)CCCC(C)C</chem>
		J. Nat. Prod., 2004, 67, 1783–1788	3-Analog L39 	<chem>CC(C)CCCC(C)CCCC(C)CCCC(C)(O)CC(=O)O</chem>
		J. Nat. Prod., 2004, 67, 1783–1788	4-Analog L39 	<chem>CC(=O)C(CCC(C)=CCCC(C)=CCO)C(C)CCCC(C)C</chem>

useful to study the interaction of our best molecules with other defense systems antioxidant targets such as SOD and GPX.

The results of docking energies of three endogenous enzymes and five best inhibitors are shown in (Table 7). And results of other compounds are shown in Table S7 (Supplementary Materials).

Molecular docking results revealed that (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), (E)-phytol (Ligand 60), heneicosane (Ligand 40), hexadecanoic acid (Ligand 59), and aploxene (Ligand 58) were the best compounds interacting with the suspected binding residues at the active site catalase (Figure 6; Supplementary Materials). The calculated docking energies for these molecules were respectively  $-7.184$ ,  $-7.158$ ,  $-6.882$ ,  $-6.809$ ,  $-6.266$ , and  $-6.130$  kcal mol<sup>-1</sup>.  $\beta$ -eudesmol and  $\gamma$ -eudesmol were the weakest interacting compounds with this receptor (Table S7 Supplementary Materials). The calculated docking energy, calculated for this compound was  $-5.070$  and  $-5.286$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. The best compounds, interacting with the suspected binding residues at the active site superoxide dismutases (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), (E)-geranyl acetate (Ligand 50), heneicosane (Ligand 40) (Table 7; Supplementary Materials Table S7). The calculated docking energies for these molecules were respectively  $-3.993$ ,  $-4.163$  and  $-4.173$ ,  $-4.142$  kcal mol<sup>-1</sup>.  $\beta$ -cadinene and  $\gamma$ -eudesmol (Table S7, Supplementary Materials) was the weakest interacting compound with this receptor. The calculated docking energy calculated for this compound is  $-3.422$  and  $-3.182$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. Additionally, the best compounds interacting with the suspected binding residues at the active site glutathione peroxidase were (E)-phytol (Ligand 60), hexadecanoic acid (Ligand 59), eicosane (Ligand 42), aploxene (Ligand 58) (Supplementary Materials Table S7). The calculated docking energies for these molecules were respectively  $-5.281$ ,  $-4.748$ ,  $-4.686$ , and  $-4.664$  kcal mol<sup>-1</sup>.  $\beta$ -eudesmol and  $\delta$ -cadinene were the weakest interacting compound with the receptor

glutathione peroxidase. The calculated docking energy calculated for this compound are  $-4.000$  and  $-4.053$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. We observed that (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), heneicosane (Ligand 40), hexadecanoic acid (Ligand 59), aploxene (Ligand 58), and (E)-phytol (Ligand 60) showed a binding affinity for interacting with receptors for ctDNA and the same compounds showed a binding affinity for catalase and site of glutathione peroxidase but these compounds (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), (E)-geranyl acetate (Ligand 50), heneicosane (Ligand 40) showed a binding affinity for interacting with receptors for superoxide dismutase. Representations of the best pose interactions (Z)-phytol (Ligand 39), eicosane (Ligand 42), with three targets (CAT, SOD and GPX) are shown in Figure S1 (Supplementary Materials).

### 3.2.2. Evaluation of molecular dynamics

Many previous studies (Chen et al., 2014, 2015; Hung et al., 2014) confirmed that the highest dock score obtained by molecular docking does not mean that the compound is a potent lead. Therefore, to validate this result it is necessary to carry out molecular dynamics simulations. From the docking results, Z-phytol was found to possess the best binding affinity towards the Endogenous enzyme. Hence, the complex of Z-phytol with catalase was subjected to 100 ns of MD simulation.

**3.2.2.1. Thermodynamic properties.** We have studied the evolution thermodynamic properties of best ligand (Z)-phytol (Ligand39) in the NVT and NPT ensemble. We performed energy minimizations of the best complex after docking of 600 ps. Then carried out simulations up to (MD production cycles) 100 ns in three stages under constraints (see Table 8).

An important point is also obtained from Table 8. The translation and rotation energies of the complex formed by the ligand L39 in NPT are very important. Unlike the complex formed by the same ligand in NVT ensemble, these energies and its enthalpy are low. Pressure fluctuations in NVT units are greater than NPT units. Therefore, (Z)-phytol (Ligand 39) is predicted

**Table 11.** Drug-likeness prediction and Physicochemical Properties (PC) through OSIRIS property explorer and the Swiss ADME online server of the best inhibitors.

S. no.	Ligand	Drug likeliness						Physicochemical properties (PC)			
		c log P	Solubility log S	Molecular weight	TPSA Å <sup>2</sup>	Drug likeness	Drug score	Refra.	Lipophi.	Solub.	Skin perm.
	<b>BHT</b>	4.82	-3.98	220.35	20.23	-9.12	0.05	71.97	3.33	-5.27	-4.02
	<b>EDTA</b>	-6.14	1.67	292.24	155.6	-7.63	0.17	63.06	-0.05	2.78	-12.26
	<b>Lref</b>	-11.59	0.95	745.2	393.5	-36.39	0.26	156.1	-0.21	0.57	-15.70
01	L39	<b>7.42</b>	-4.63	296.54	<b>20.23</b>	-3.77	<b>0.27</b>	<b>98.94</b>	<b>4.78</b>	<b>-5.98</b>	<b>-2.29</b>
02	L40	<b>9.61</b>	-6.11	296.56	00.00	-20.40	0.24	103.0	5.58	-7.41	-0.31
03	L42	<b>9.16</b>	-5.84	282.55	00.00	-20.40	0.24	98.25	5.64	-7.05	-0.60
04	L59	<b>6.06</b>	-4.24	256.43	37.30	-25.22	0.11	80.80	3.85	-5.02	-2.77
05	L60	<b>7.42</b>	-4.63	296.54	20.23	-3.77	0.27	98.94	4.77	-5.98	-2.29
	1-Analog L39	<b>6.83</b>	-4.72	302.50	20.23	-8.02	0.17	99.44	4.48	-5.72	-3.19
	2-Analog L39	5.63	-3.68	328.53	60.69	-5.99	0.32	101.3	4.29	-4.21	-4.63
	3-Analog L39	6.08	-4.43	328.53	57.53	-2.67	0.32	101.2	4.27	-7.72	-3.54
	4-Analog L39	7.18	-4.45	336.56	37.30	-3.09	0.16	108.2	4.58	-5.22	-3.67

MW: molecular weight, MLogP: logarithm of partition coefficient of the compound between water and n-octanol: log: solubility; TPSA or Topological Polar Surface Area: the surface belonging to polar atoms in the compound.

Refra: Molar Refractivity, Lipophi: Lipophilicity, Solub: Water solubility, Skin perm: skin permeation.

**Table 12.** Pharmacokinetic and toxicity evaluated parameters of best compounds.

		39	1-Analog structure L39	2-Analog structure L39	3-Analog structure L39	4-Analog structure L39	42
Absorption	Human intestinal	90.643	92.051	90.594	90.706	93.967	89.671
	Skin permeability	-2.631	-2.564	-2.663	-2.735	-2.586	-2.774
	Caco-2 permeability	1.399	1.44	1.666	-2.735	1.497	1.371
	Water solubility <sup>a</sup>	-5.51	-6.36	-4.37	-4.83	-5.11	-7.94
		MS	PS	MS	MS	MS	PS
Distribution	VD <sub>ss</sub> (human)	0.385	0.703	-0.377	-0.782	0.036	0.614
	BBB permeability	0.793	0.729	-0.374	-0.225	-0.299	1.014
	CNS permeability	-1.527	-0.728	-2.767	-2.604	-1.796	-1.199
Excretion	Total clearance	1.686	1.444	1.759	1.49	1.854	1.998
	Renal organic cation transporter	No	No	No	No	No	No
Toxicity	Oral rat acute toxicity (LD50)	1.848	2.566	3.272	1.653	1.973	1.586
	AMES toxicity	No	No	No	No	No	No
	Minnow toxicity	-1.137	-0.543	0.178	-1.121	-1.025	-2.372

Green = good, yellow = tolerable, red = bad.

MS: Moderately soluble, PS: Poorly soluble.

Active components: 39—(Z)-Phytol, 42—Eicosane. BBB: Blood-brain barrier.

ADMET: Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity.

VD<sub>ss</sub>: < -0.15 low, >0.45 high, BBB: >0.3 cross BBB, < -1 poorly distributed to the BBB, CNS: > -2 penetrate CNS, < -3 unable to penetrate CNS, Low skin permeability: > -2.5, Caco-2 permeability: > 0.9, Human intestinal absorption: > 90.

<sup>a</sup>Results from SwissADME tools.

**Table 13.** Organ Toxicity, toxicity and Stress response pathways report of the best two molecules analogues and two ligands of control.

Ligands		L 39	Analog 01	Analog 02	Analog 03	Analog 04	L 42 (BHT)	(EDTA)	
Predicted LD50 mg/kg		5000	6750	5000	4820	5000	750	650	
Predicted Toxicity Class		5	6	5	5	5	3	4	
Target		Prediction / Probability							
Classification	Organ toxicity	I 0.79	I 0.79	I 0.85	I 0.68	I 0.73	I 0.74	I	
	Toxicity	Hepatotoxicity	I 0.79	I 0.79	I 0.85	I 0.68	I 0.73	I 0.74	I
		Carcinogenicity	I 0.76	I 0.76	I 0.61	I 0.67	I 0.77	I 0.58	I A
		Immunotoxicity	I 0.99	I 0.98	I 0.98	I 0.99	I 0.99	I 0.98	I
		Mutagenicity	I 0.97	I 0.71	I 0.75	I 0.85	I 0.94	I 1.0	I
Cytotoxicity	I 0.85	I 0.82	I 0.86	I 0.85	I 0.87	I 0.78	I		
Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	I 0.98	I 0.71	I 0.92	I 0.97	I 0.96	I 1.0	I	
	Heat shock factor response element (HSE)	I 0.98	I 0.71	I 0.92	I 0.97	I 0.96	I 1.0	I	
	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	I 0.99	I 0.58	I 0.85	I 0.97	I 0.98	I 1.0	I A	
	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	I 1.0	I 0.99	I 0.98	I 0.98	I 0.99	I 1.0	I	
	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	I 1.0	I 0.99	I 0.98	I 0.98	I 0.99	I 1.0	I	

A: Active, I: Inactive.

to be the most interactive system. These results are in total agreement with the docking prediction results (see Tables 7 and 8). Thermodynamic parameters in agreement with

molecular docking results demonstrated that schiff base complexes could combine with catalase spontaneously through hydrogen bonds and Van der Waals interactions.

**Table 14.** Energy balance of complexes formed with Catalase (*Cat*) under potent clinical antioxidant, some species of *Centaurea* and our results for essential oils of the *Sulphurea*.

Some species of <i>Centaurea</i> .				
Other experiments				
Country	Score	Species	Major components	Reference
Algeria	-4.745	<i>C. dimorpha</i> Viv.	caryophyllene oxide (9.88%)	(Belkassam et al., 2019).
Turkey (Patnos)	-6.222	<i>C. pterocaula</i> Trautv	Hexadecanoic acid (13.9%)	(Sen et al., 2021).
Turkey (Elazığ)		<i>C. aggregata</i> subsp. <i>Aggregata</i>	Hexadecanoic acid (35.8%)	(Erdogan et al., 2017).
		<i>C. balsamita</i>	Hexadecanoic acid (23.0%)	
		<i>C. behen</i>	Hexadecanoic acid (32.7%)	
Egypt	-5.635	<i>C. pumilio</i> L	Pentadecane (17.8%)	(Naeim et al., 2020)
Iran (Sofeh-Isfahan)	-5.282	<i>C. ispanica</i> Boiss	Benzyl benzoate (26.5%)	(Firouznia et al., 2007). (Ayromlou et al., 2020)
Iran (Mehran)	-4.809	<i>C. irritans</i>	Geranial (38.6%)	
Italy	-4.517	<i>C. paniculata</i> Subsp. <i>Carueliana</i>	(Z)-3-hexenol (16.5%)	Tava et al., 2010)
	-5.012	<i>C. rupestris</i> s.l.	germacrene D (42.3%)	
Jordan	-6.279	<i>C. damascena</i>	Fokienol (11.4%)	(Khleifat et al., 2019)
Spain	-6.253	<i>C. polymorpha</i> Lag	Heptacosane (11.5%)	(Formisano et al., 2006).
Croatia	-4.413	<i>C. grinensis</i> Reuter	p-Vinyl guaiacol (21.5%)	(Riccobono et al., 2017).
Bulgaria	-4.745	<i>C. apiculata</i> Lebed	Caryophyllene oxide (15.8%)	
Lebanon	-6.222	<i>C. eryngioides</i> Lam	Hexadecanoic acid (33.2%)	(Senatore et al., 2005).
	-6.125	<i>C. iberica</i> Trev	4-Vinyl guaiacol (8.5%)	
Greece	-6.523	<i>C. grisebachii</i> subsp. <i>Grisebachii</i>	6,10,14-Trimethyl-pentadecan-2-one (12.9%)	(Djeddi et al., 2011).
	-6.025	<i>C. affinis</i> Friv.	Tetracosane (7.8%)	
<b>Ligands of Control</b>				
BHT	-5.052			
EDTA	-5.591			
<b>Ours Results</b>				
L39	-7.184			
Analogue-1	-6.472			
Analogue-2	-6.564			
Analogue-3	-7.270			
Analogue-4	-7.697			
L42	-7.158			

**3.2.2.2. Structural dynamics properties.** We have studied the evolution structural dynamics of the best test compound, (Z)-phytol (Ligand 39) (See Table 5) by IMODS. Results of structural molecular dynamics simulation are listed in Figure S2 (Supplementary Materials).

The normal mode analysis (NMA) of the prepared, (Z)-phytol (Ligand 39)-*catalase* (*Cat*) complex was illustrated in (Figure S2a) From the molecular dynamics study of the prepared (Z)-phytol (Ligand 39)—*catalase* (*Cat*) complex, it was clear that the prepared enzyme-ligand complex had quite high eigenvalue of  $1.927144e-04$  the eigenvalue is illustrated in Figure S2(b). However, the variance map showed a higher degree of cumulative variances than individual variances (Figure S2c). The elastic network map and co-variance also produced quite satisfactory results (Figure S2d and S2e respectively). The deformability graphs of the complex (Z)-phytol (Ligand 39)—*catalase* (*Cat*) illustrate the peaks in the graphs correspond to the regions in the protein with deformability (Figure S2f). The two selected ligand molecules can be used as potential agents to deplete DPPH and free radicals. Overall, in our study, (Z)-phytol (Ligand 39) emerged as the most potent anti-*catalase* (*Cat*) agent. However, more *in vitro* and *in vivo* researches should be performed on the (Z)-phytol (Ligand 39) the best ligands to confirm the findings of this study.

### 3.2.3. The OSIRIS property explorer and Bioisosteric replacement

A computational study was carried out for the best compounds to assess their OSIRIS properties. The obtained value is depicted in Table 9 and the results of predicted toxicity

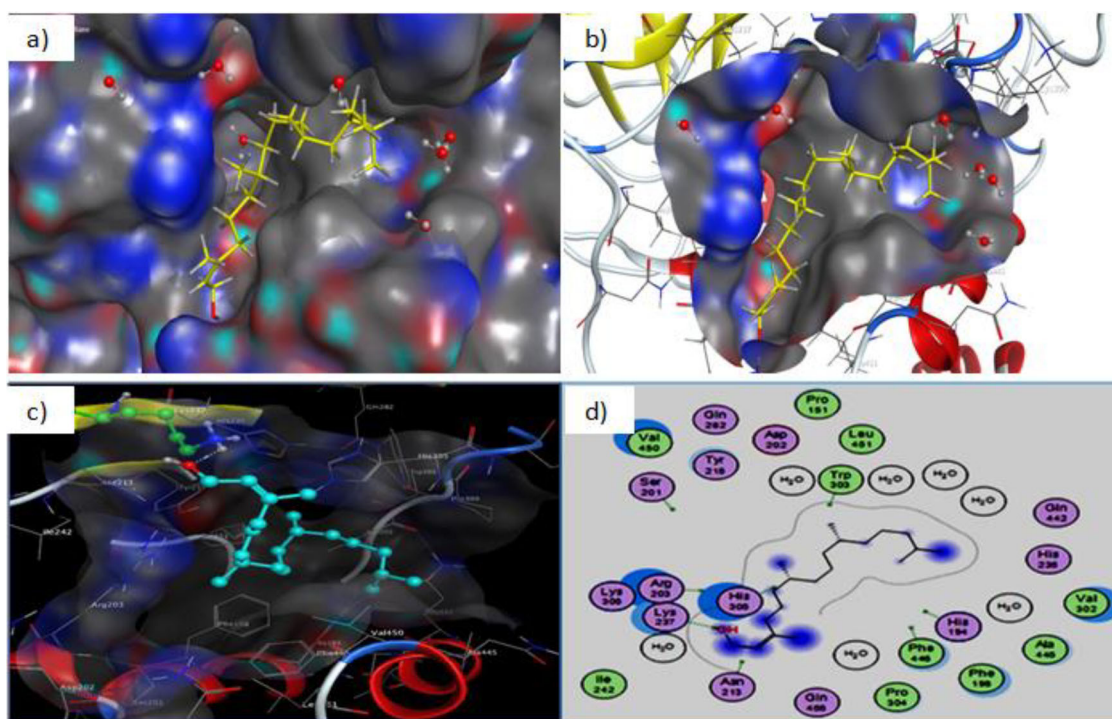
risks of other compounds are summarized in Table S8 (Supplementary Materials). Prediction results are valued and color coded (Nalini et al., 2011). The predicted results of Bioisosteric replacement are presented in Table 10.

The results summarized in Table 9 (Supplementary Materials Table S8) revealed that compounds L22, L23, L30, L33 and L39, L40, L42, L60 are the best ligands while L24, L36 have less affinity via the catalase target and L58 was predicted to cause irritation. Ligand L50 does not to possess druglikeness properties since it is predicted to be tumorigenic, mutagenic, irritant and moderately reproductive. Therefore, we are interested in the two compounds L39 and L42 with a remarkable interest in L39, because the former has good complementarity with the site of catalase and DNA sequence. Therefore, we thought to propose another molecule by using fragments of the compound-39. For this, we used, Molopt (A web server for drug design using bioisosteric transformation) which automatically generates analogs lists by replacing molecular substructures with chemical groups with similar biological properties. The resulting set of transforming analogs can be evaluated for future synthesis.

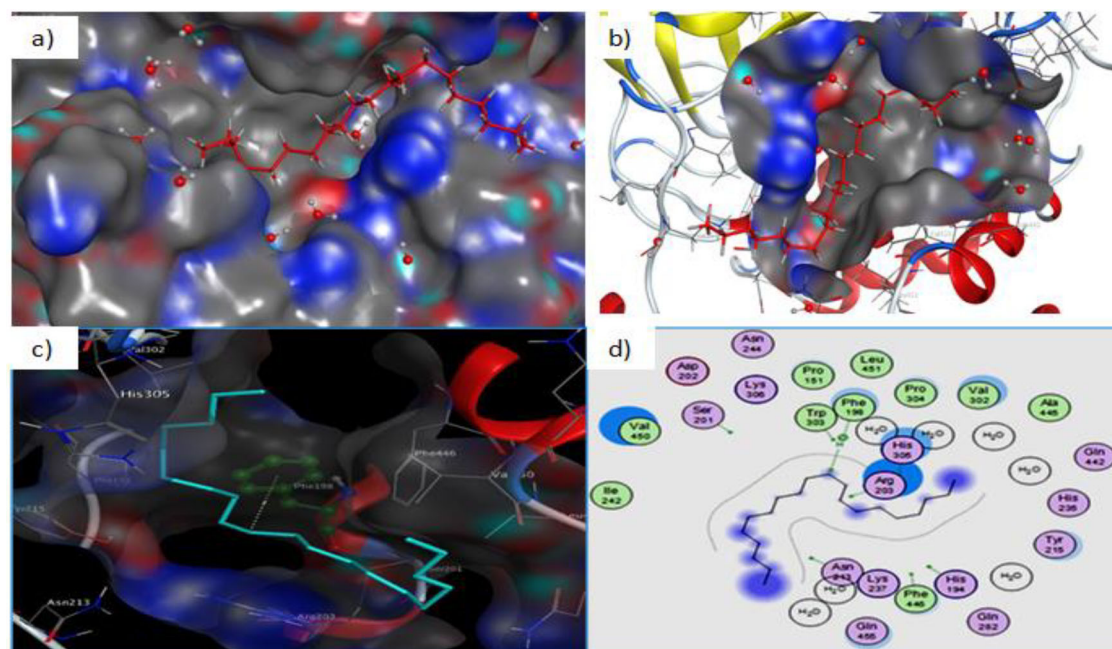
### 3.2.4. In silico assessment of the ADMET properties and drug-likeness

Poor pharmacokinetics Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADMET) is the major concern for the failure of drug candidates in clinical trials. So, knowing ADME features for the compound in advance is more important for drug discovery. The predicted results of drug-likeness,





**Figure 3.** Displaying the Catalase binding site cavity 3D interaction diagram of (Z)-Phytol with pocket (b) and without pocket (c); Binding mode of (Z)-Phytol as 2D diagram (d). The binding patterns (Z)-Phytol in the active site of Catalase, in which (Z)-Phytol is appeared in stick model with pink while the surface of *Cat* is shown in blue red green (a).



**Figure 4.** Displaying the Catalase binding site cavity 3D interaction diagram of Eicosane with pocket (b) and without pocket (c); Binding mode of Eicosane as 2D diagram (d). The binding patterns (Z)-Phytol in the active site of Catalase, in which Eicosane is appeared in stick model with pink while the surface of *Cat* is shown in blue red green (a).

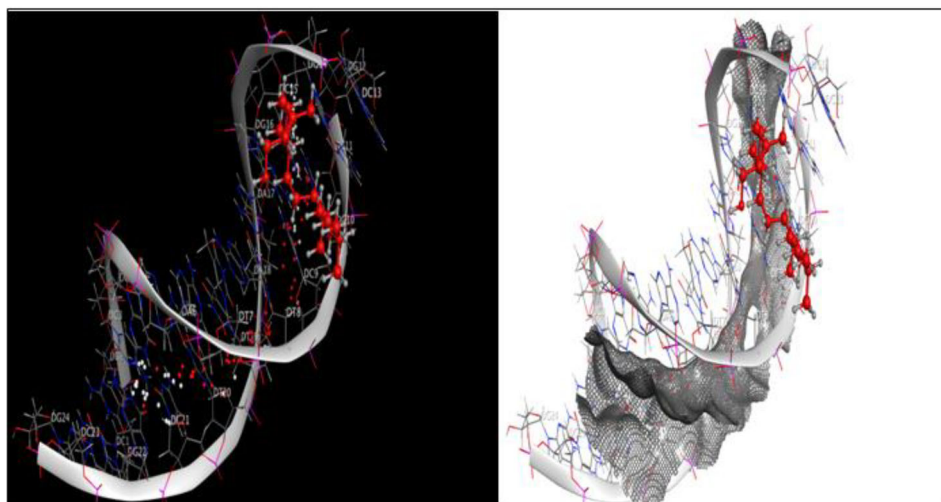
pharmacokinetics and organ toxicity are presented in Tables 11, 12, and 13, respectively.

**3.2.4.1. Drug-likeness evaluation.** A good drug candidate is absorbed in required time and well distributed throughout the system for its effective metabolism and action. Table 11 depicts the drug-likeness properties of test compounds

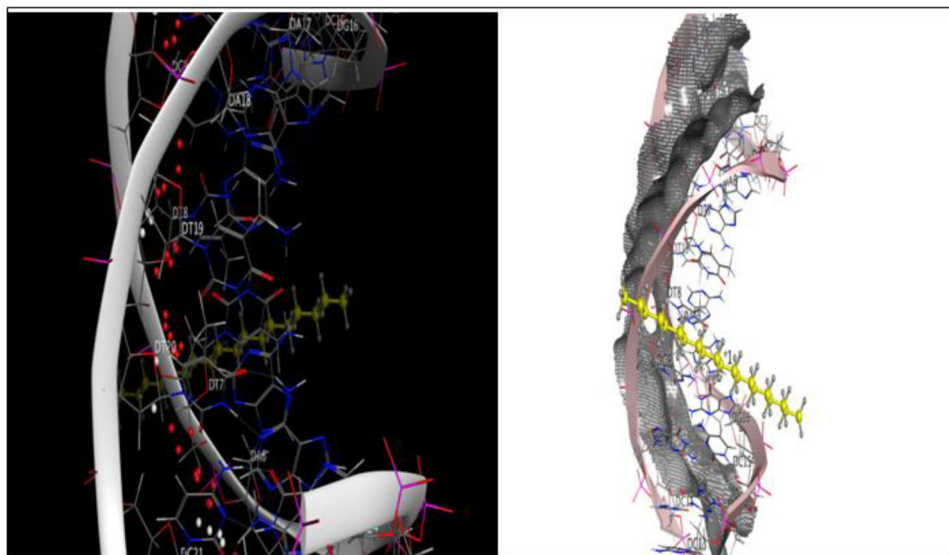
with least binding energies predicted using OSIRIS Property Explorer.

Result of Drug-likeness prediction and Physicochemical Properties (PC) for other compounds is listed in Tables S9 and S10 (Supplementary Materials) respectively.

The results listed in Table 11 revealed that ligand (Z)-phytol (Ligand 39), (E)-phytol (Ligand 60), eicosane (Ligand 42),



(a) Z-Phytol L39



(b) Eicosane L42

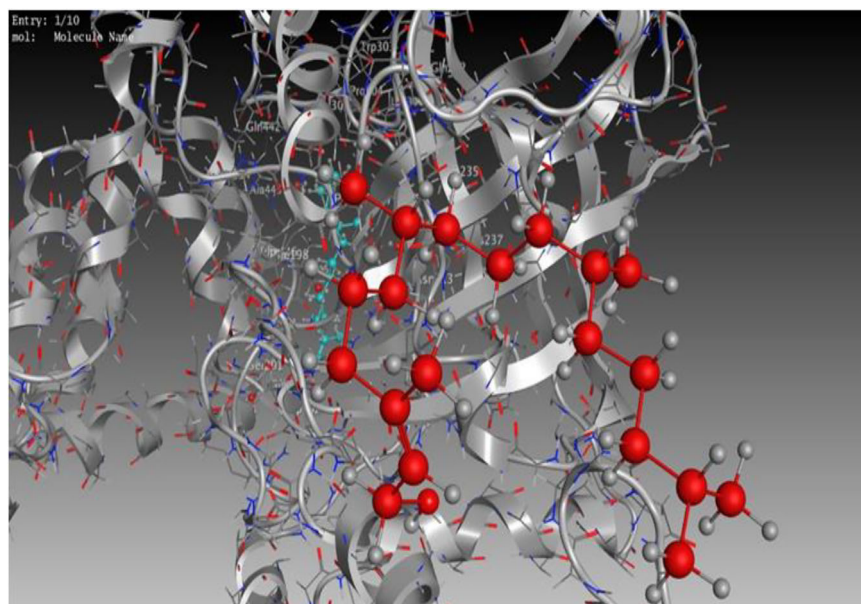
**Figure 5.** Molecular docked model of the most favorable binding site of compounds (a) L39 and (b) L42 with DNA dodecamer duplex of sequence d (CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (PDB ID: 1BNA).

heneicosane (Ligand 40), have high absorption with a low molecular weight of order 296.54. Also, we can note that these compounds comply with Lipinski's rule of 5, Veber's rules and Egan's rule. MW range 264.41 (<500), A log *S* value indicates solubility; the lesser the log *S* value, the higher the solubility, which would enhance the absorption log for (Z)-phytol (Ligand 39) and eicosane (Ligand 42) were  $-4.63$  and  $-5.84$ , respectively. A lower molecular weight would again enhance the absorption rate and thus most of the drugs were tried to be kept at the lowest possible molecular weight, suggesting that these compounds would not be expected to cause problems with oral bioavailability.

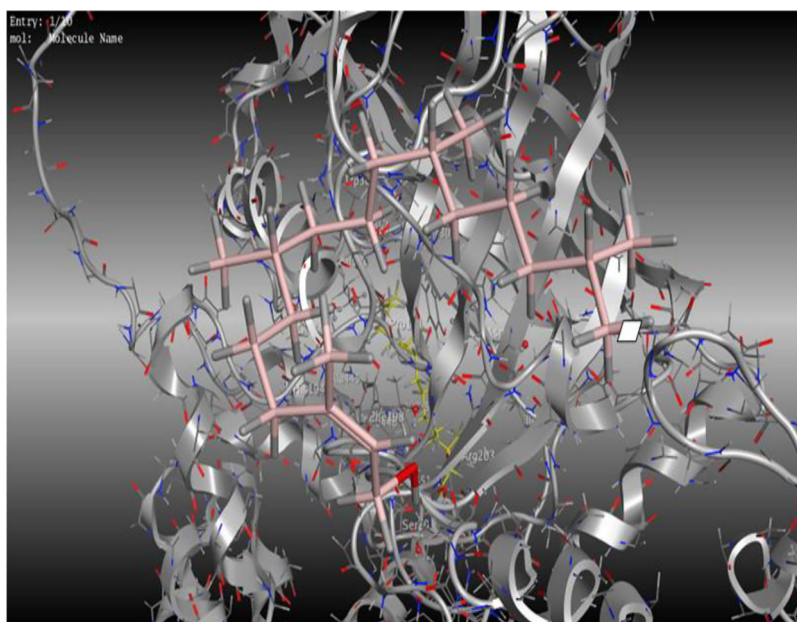
The ADME parameters were calculated for compounds under study, i.e. L22, L23, L30, L33, L39, L40, L42, and L60 by calculating the different Physico-chemical and bio-pharmaceutical highlights (Table 11; Supplementary Table S10).

The results indicated that the molecular refractivity was 69.04, 69.04, 70.46, 70.46, 80.48, 103.06, 98.25 and 98.94 for lead compounds, namely, L22, L23, L30, L33, L39, L40, L42, and

L60, respectively. Water solubility properties were calculated through Log *S* ESOL Class ( $-3.56$ ,  $-3.76$ ,  $-3.29$ ,  $-3.51$ ,  $-5.98$ ,  $-7.41$ ,  $-7.05$  and  $-5.98$ ), log *S* AliClass ( $-3.70$ ,  $-4.02$ ,  $-3.49$ ,  $-3.86$ ,  $-8.47$ ,  $-10.96$ ,  $-10.40$  and  $-8.47$ ), SILICOS-ITClass ( $-3.07$ ,  $-3.32$ ,  $-3.41$ ,  $-3.21$ ,  $-5.51$ ,  $-8.34$ ,  $-7.94$  and  $-5.51$ ) class. Lipophilicity is a key physicochemical property that plays a crucial role in determining ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties and the overall suitability of drug candidates. The results were assessed for ILOGP and SILICOS-IT which revealed that all compounds except (Z)-phytol (Ligand 39), (E)-phytol (Ligand 60), eicosane (Ligand 42), heneicosane (Ligand 40) (ILOGP4.78, 4.77, 5.64, 5.85 and SILICOS-IT 6.57, 6.57, 7.98, 8.43), respectively showed a most favorable range, which describes a good balance between permeability and solubility and is expected to show good bioavailability upon oral drug administration. GI absorption predicted was low for each selected molecule. Drugs diffuse across a cell membrane in a concentration



**Figure 6.** The compound—39; docked (blue) into the binding site of Cat the final ligand pose and the docking pose after a molecular dynamics (MD) in NVT simulation.

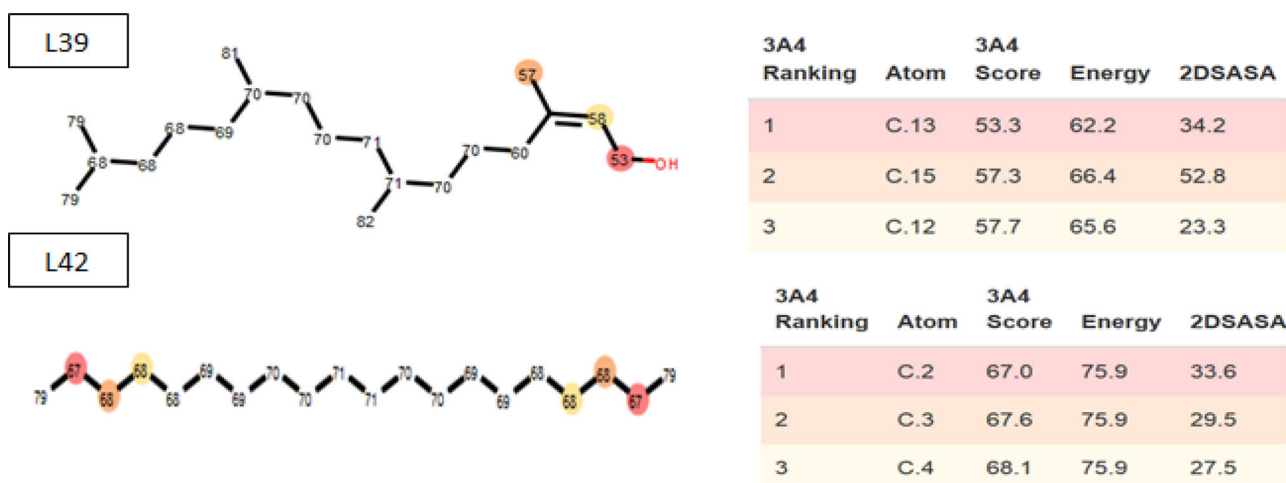


**Figure 7.** The compound—39; docked (yellow) into the binding site of Cat the final ligand pose and the docking pose after a molecular dynamics (MD) in NPT simulation.

gradient, a region of high concentration (e.g. gastrointestinal fluids) to a region of low concentration (e.g. blood). This permeability foresight helps to understand the outcomes of ADMET and the cell-based bioassays. The results showed that the permeability over human skin was found to be  $-4.71$ ,  $-4.49$ ,  $-5.25$ ,  $-5.00$ ,  $-2.29$ ,  $-0.31$ ,  $-0.60$  and  $-2.29$  cm/s for compounds viz., L22, L23, L30, L33, L39, L40, L42, and L60, respectively. These compounds showed almost no possibility to cross the BBB except L30 and L33. All medicines intended to work on the body pass into the blood stream. In this way, the fate of the drug—or rather its active ingredient—is commonly divided into four main stages: ADME (absorption, distribution in the body, metabolism and elimination) (See Table 12).

Apropos, the absorption parameters compound L39; and L42 presents a promising oral availability, due to the optimal Caco-2 cell permeability and HIA ( $>0.9$  and Human intestinal  $>90\%$ , respectively) (See Table 12).

**3.2.4.2. ADME-T properties.** Here, we evaluated the ADME properties of the selected L39–L42 and analogues compounds by using in silico SwissADME server to see the pharmacokinetic properties (Daina et al., 2017). The Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity properties of the selected and analogues compounds have shown in Table 12.



**Figure 8.** SMARTCyp results illustrating the metabolic sites for L39 and L42 which were predicted correctly with top-ranking atoms and ranked depending on the major metabolite.

All compounds passed the AMES tests. The volume of distribution (VDs) for our two best ligands (0.385 and 0.614 for L39 and L42, respectively) suggests that the drug will be distributed in the tissue as potent antioxidative agents. The control ligands, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the Lref (NADPH) co-crystallized inhibitor are entirely unable to penetrate the central nervous system (CNS). The distribution and absorption parameters, respectively, have been graphically represented by the extended and renewed version of the Edan-Egg (Egg) model named Brain Or Intestinal EstimatedD (BOILED) permeation predictive model (BOILED-Egg) (Figure S3, Supplementary Materials).

The graph (Figure S3, Supplementary Materials) showed that the ligands butyl hydroxyl toluene (BHT),  $\beta$ -eudesmol and  $\gamma$ -eudesmol, analogue-1 and analogue-2 are absorbed by the brain. The ligands Z-phytol E-phytol, analogue-3 and analogue-4 showed gastrointestinal absorption within acceptable limits, except for ligands ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the Lref (NADPH) (TPSA 155.68 and 393.56 Å<sup>2</sup>, respectively).

**3.2.4.3. Prediction toxicity risk.** Studying the toxicity profile was necessary in order to access the safety profile of the desired compounds. All results of toxicological pathways, including organ toxicity, toxicity and stress response pathways are given in Table 13. To identify the toxicity of the selected L39–L42, BHT, EDTA and analogues compounds, we used ProtoxII (Banerjee et al., 2018).

Organ Toxicity, Toxicity and Stress response pathways were also carried out for 10 biological activities. We note that butylated hydroxyltoluene (BHT) Predicted LD50 is 650 mg/kg and falls to Class 4 while 5000 mg/kg was Predicted for ethylene diaminetetraacetic and falls in class 2 of Toxicity Class. BHT falls to class 4 with range of 300 to 2000 mg/kg, these would be harmful in case of oral delivery. In addition, the compounds (Z)-phytol L39 was inactive for all toxic effects but eicosane L42 was active for androgen receptor (AR). (Z)-phytol L39 was in the toxicity class 5 and nontoxic, hence the best compound for our study. The toxicity class profile is in the order; (Z)-phytol L39

Predicted (Class: 5) >butyl hydroxyl toluene (BHT) (Class: 4 >eicosane) L42 (Class: 4>) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Class: 2).

### 3.2.5. Pharmacophore mapping

Metabolism presents an essential function in the drug-drug interaction and bioavailability of drugs. Only the free form of the drug can bind with drug-metabolizing enzymes. To study the metabolic behavior of lead compounds, it is very important to study the cytochrome P450 enzymes (CYPs) as they are the most notable class of enzymes.

The possible sites of a chemical compound are illustrated by the circles on the chemical structure of the compound (Zaretski et al., 2013). Figure 8 showed the possible interaction of L39 and L42 with CYP450 (3A4). So, the Site of Metabolism (SOM) at C1, C2, and C3 sites was predicted, and the ability of the two ligands to activate/inhibit the cytochrome system was determined.

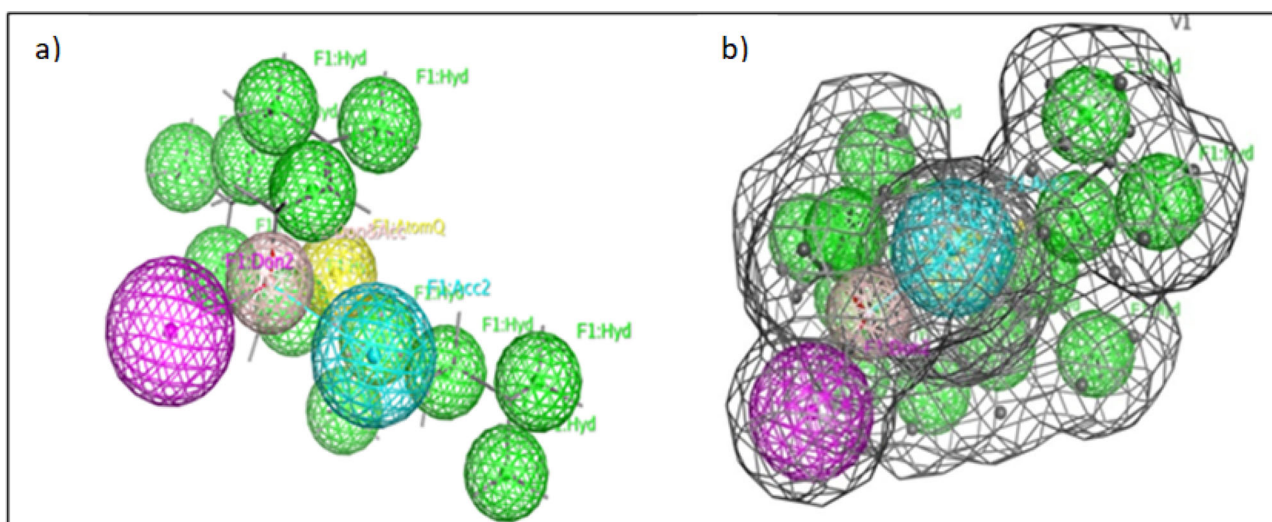
The P450 SOM predictions showed that Z-phytol L39 had 4 sites of metabolism (SOMs) for the CYP450 1A2, 450 2A6 enzyme, CYP450 2B6, CYP450 2C8, CYP450 2C19, CYP450 2D6, CYP450 2E1 and CYP450 3A4 and 5 sites for CYP450 2C9. Are given in Table S11 (Supplementary Materials).

The Pharmacophore Mapping was carried out for the (Z)-phytol best ligand of the oxygenated diterpene. (Z)-phytol showed 1 Hydrogen acceptor bonds, 12 Hydrophobic groups, one Aromatic rings and 2 Hydrogen donor bonds. It also generated a good number of good contacts with the Pharmacophore of catalase, Figure 9.

The Pharmacophore of Z-phytol generates a hypothesis which can be applied successfully in biological screening for further experiments (Dixon et al., 2006).

Validation of our results, for essential oils of *C. sulphurea*, the synthetic antioxidant butylated hydroxyl toluene (BHT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and some species of *Inula* genuses are given in Table 14.

According to the table above, we note also that the compound L39 and their analogues have a high value of energy score compared to other compounds.



**Figure 9.** (a) Pharmacophore Mapping of Z-phytol L39. (b) Asteric constriction (dark gray) was added to the pharmacophore model.

The Oxygenated diterpene compounds were the most dominant. The complex formed by the compound L39 (Z)-phytol gives a low energy value of the score  $-7.148 \text{ kcal mol}^{-1}$  that it is very close to the value of the clinical drugs (see Table 14), this compound establishes one interaction LYS 237 with the residues of active sites of the catalase (Figure 3).

The results presented in Table 11 revealed that compound L39 has high lipophilicity and high coefficient of skin permeability. Therefore, we propose (Z)-phytol was the best ligand which allows the inhibition of three targets and *ctDNA* sequence. So, we suggest (Z)-phytol present in (oxygenated diterpene) with its validated activity score ( $-7.184$ ,  $-3.993$ ,  $-4.413$ ,  $-6.978$ ); respectively for three targets and *ctDNA* sequence as a *new oral ligand*. According to its pharmacophore properties the compound 39 generated a hypothesis which can be applied successfully in biological screening for further experiments (Figure 9). *In vivo*, many studies were focused on the inhibitory effect of the sulphurea compounds, on key enzymes linked to investigate antioxidant activity; catalase and superoxide dismutase. The results of Souza et al. (2019) have proved that **extracts of *C. sulphurea*** showed  $IC_{50}$  values of 103.9 at 24 and 48 h. Our results showed that essential oil of *C. sulphurea* showed  $IC_{50}$  values of 2.06 g/L and 1.29 g/L. Through these results, we can conclude that, our oil presented an excellent antioxidant activity.

In our research the software platform that integrates visualization and modeling detect the hydrophobic interactions between (Z)-phytol (constituent molecules of the aerial and root parts of essential oil of *C. sulphurea*) and the three *endogenous enzymes*. The orientations of the docked ligands are consistent with a mechanism whereby these hydrophobic compounds dock into a hydrophobic pocket near the active site, there by blocking binding of the receptor. The results revealed inhibitory activities against novel three targets. Furthermore, compound-39 Z-phytol showed a high level of gastrointestinal adsorption, which contributes to good oral bioavailability. Consequently, the study carried out in this research reveals many secrets conveyed by the use of magic plants. At the end of our study, we propose that all

biological activity depends on the presence of certain metabolites inside the tissues of the plant. The results obtained in this study reveal that (Z)-phytol and eicosane have potential antioxidant ability in three receptors via Reactive oxygen species (ROS) generation. Thus, (Z)-phytol and eicosane may be used for more analyses in order to further evaluate their efficiency in the reduction of oxidative stress and a possible antioxidant to be used in the pharmaceutical industry.

#### 4. Conclusion

The present research aimed at the chemical and biological investigation of the essential oil of the aerial and root parts of the *C. sulphurea* species in hopes to find new natural products. The results showed that essential oil of *C. sulphurea* is a good source of caryophyllene oxide, apilotaxene and (Z)-phytol. The essential oils demonstrated greater antioxidant activity. However, no information was found in the available literature about the biological *in vivo* and *in vitro* activities of *C. sulphurea*. It would be interesting to study the antioxidant activity of these essential oils to check whether they possess antioxidant activities. The inhibition of Catalase receptor was theoretically investigated by two methods of computational chemistry: molecular docking analyses, MD simulations, ADME properties and pharmacological knowledge. The results reveal that ligand natural inhibitor (Z)-phytol L39 and eicosane L42 of essential oils from aerial and root parts of *C. sulphurea* during its vegetative cycle has an affinity to interact with *ctDNA* sequence and three receptors. Compound (Z)-phytol L39 and their analogues showed better antioxidant, scavenging activity than other compounds. The results were also analysed computationally using the molecular dynamic and a molecular docking approach. From two analyses, it was also found that among all the tested compounds, compound 39 exhibited the best antioxidant activity. Moreover, the penetration through the Blood-Brain Barrier came out to be best for (Z)-phytol and their analogues than the control molecule and Lref. (Z)-phytol and their analogues were the best inhibitors for 1dgb, considering the pharmacokinetic

and pharmacodynamic properties. (Z)-phytol (Oxygenated diterpene) has the highest binding affinity among all the inhibitors, it is proposed as a *natural orally active drug*, and it may also be a good candidate for further biological and pharmacological investigations. The results reveal that (Z)-phytol L39 and their analogues have potential antioxidant ability in at least three *endogenous* receptors (*catalase (CAT)*, *superoxide dismutase (SODs)* and *glutathione peroxidase (GPX)* and DNA sequence) via ROS generation. Thus, (Z)-phytol can be used as templates for further development of antioxidant therapeutic agents.

## Acknowledgements

Authors thanks the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for the support under the PRFU project (approval no. B00L01UN130120190009) and (approval no. B00L01UN130120180004).

## Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

## References

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Alam, S., & Khan, F. (2018). Virtual screening, docking, ADMET and system pharmacology studies on garcinia caged xanthone derivatives for anticancer activity. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23768-7>
- AL-DALAEN, Said M. et AL-QTAITAT, Aiman I. (2014). Oxidative stress versus antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, *2*(5), 60. <https://doi.org/10.11648/j.bio.20140205.11>
- Agbadah, E. E., Nwachukwu, K. C., & Okoh, M. P. (2016). Biochemical effects of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) on cadmium treated maize (*Zea mays* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *African Journal of Biotechnology*, *15*(15), 593–600.
- Ayromlou, A., Masoudi, S., & Mirzaie, A. (2020). Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and anticancer activities of *Scorzonera calyculataboiss.* and *Centaurea irritanswagenitz.* Extracts, endemic to iran. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, *9*(1), 118.
- Atika Eddaikra and Naouel Eddaikra (2021). *Endogenous Enzymatic Antioxidant Defense and Pathologies*. In Antioxidants. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95504>
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W257–W263.
- Bekhechi, C., Boti, J. B., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Casanova, J., & Tomi, F. (2010). Isothymol in Ajowan essential oil. *Natural Product Communications*, *5*(7), 1934578X1000500. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500726>
- Belabbes, R., Dib, M. E. A., Djabou, N., Ilias, F., Tabti, B., Costa, J., & Muselli, A. (2017). Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from western Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, *14*(5), e1600482. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600482>
- Belkassam, A., Zellagui, A., Gherraf, N., Flamini, G., Cioni, P. L., Rebbas, K., & Smaili, T. (2019). Assessment of Antioxidant effect of the essential oil and methanol extract of *Centaurea dimorpha* Viv.aerial parts from Algeria. *Acta Scientifica Naturalis*, *6*(1), 54–62. <https://doi.org/10.2478/asn-2019-0008>
- Bereksi, M. S., Hassaine, H., Bekhechi, C., & Abdelouahid, D. E. (2018). Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants extracts commonly used in Algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria. *Pharmacognosy Journal*, *10*(3), 507–512. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.3.83>
- Bissantz, C., Kuhn, B., & Stahl, M. (2010). A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, *53*(14), 5061–5084. <https://doi.org/10.1021/jm100112j>.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bouyanzer, A., Majidi, L., & Hammouti, B. (2006). Effect of eucalyptus oil on the corrosion of steel in 1M HCl. *Bulletin of Electrochemistry*, *22*(7), 321–324.
- Branen, A. L., Richardson, T., Goel, M. C., & Allen, J. R. (1973). Lipid and enzyme changes in the blood and liver of monkeys given butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. *Food and Cosmetics Toxicology*, *11*(5), 797–806.
- Brünger, A., Brooks, C. L., III, & Karplus, M. (1984). Stochastic boundary conditions for molecular dynamics simulations of ST2 water. *Chemical Physics Letters*, *105*(5), 495–500. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(84\)80098-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(84)80098-6)
- Chen, K. C., Chen, H. Y., & Chen, C. Y. C. (2014). Potential protein phosphatase 2A agents from traditional Chinese medicine against cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, *2014*, 436863–436863. <https://doi.org/10.1155/2014/436863>
- Chen, Y. C. (2015). Beware of docking!. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(2), 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001>
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., & Tang, Y. (2012). admetsAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, *52*(11), 3099–3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
- Chenafa, H., Mesli, F., Daoud, I., Achiri, R., Ghalem, S., & Neghra, A. (2021). In silico design of enzyme  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors using molecular docking, molecular dynamic, conceptual DFT investigation and pharmacophore modelling. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1882340>
- Clément, G., & Slenzka, K. (Eds.). (2006). *Fundamentals of space biology: Research on cells, animals, and plants in space* (Vol. 18). Springer Science & Business Media.
- Conseil de l'Europe. (1996). Pharmacopée européenne.
- Cross, J. B., Thompson, D. C., Rai, B. K., Baber, J. C., Fan, K. Y., Hu, Y., & Humblet, C. (2009). Comparison of several molecular docking programs: Pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *49*(6), 1455–1474. <https://doi.org/10.1021/ci900056c>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*(1), 42717–42713. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daoud, I., Melkemi, N., Salah, T., & Ghalem, S. (2018). Combined QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on new Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*, *74*, 304–326. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.03.021>
- Didierjean, C., & Tête-Favier, F. (2016). Introduction to protein science. Architecture, function and genomics. By Arthur M. Lesk 2016. Pp. 466 Paperback. Price GBP 39.99. ISBN 9780198716846. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, *72*(12), 1308–1309.
- Dixon, S. L., Smondryev, A. M., Knoll, E. H., Rao, S. N., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2006). PHASE: A new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1.

- Methodology and preliminary results. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(10–11), 647–671.
- Djeddi, S., Sokovic, M., & Skaltsa, H. (2011). Analysis of the essential oils of some *Centaurea* species (Asteraceae) growing wild in Algeria and Greece and investigation of their antimicrobial activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(6), 658–666. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643986>
- DREW, Horace R., WING, Richard M., TAKANO, Tsunehiro, et al. (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2179–2183. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179>
- Eddaikra, A., & Eddaikra, N. (2021). Endogenous enzymatic antioxidant defense and pathologies. In *Antioxidants*. IntechOpen.
- Erdogan, T., Sumer, B., Ozcu nar, O., Cakilcioglu, U., Demirci, B., Baser, K. H. C., & Kivcak, B. (2017). Essential oil composition of three *Centaurea* Species from Turkey: *Centaurea aggregata* Fisch. & Mey.ex DC. subsp. *aggregata*, *C. balsamita* Lam. and *C. behen* L. *Records of Natural Products*, 11(1), 69.
- Figueiredo, P. L. B., Pinto, L. C., da Costa, J. S., da Silva, A. R. C., Mourão, R. H. V., Montenegro, R. C., da Silva, J. K. R., & Maia, J. G. S. (2019). Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 232, 30–38.
- Firouznia, A., Akbari, M. T., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Bigdeli, M., & Anaraki, M. T. (2007). Composition of the essential oils of *Artemisia turanica* Krashch., *Helichrysum ocephalum* Boiss. and *Centaurea ispanica* Boiss. three asteraceae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(2), 88–93. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643524>
- Formisano, C., Senatore, F., Bellone, G., Bruno, M., Grassia, A., Raio, A., & Rigano, D. (2006). Chemical composition and biological activity of essential oil from flowerheads of *Centaurea polymorpha* Lag. (Asteraceae) growing wild in Spain. *Polish Journal of Chemistry*, 80(4), 617–622.
- Francisco, A. (1995). JB HARBORNE (ED.) *The flavonoids—Advances in research since 1986* Chapman & Hall, London, 676 pp. ISBN 0-412-48070-0. <https://doi.org/10.1002/pca.2800060109>
- Çam, M., Hı sıl, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3), 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.009>
- Geronikaki, A., Poroikov, V., Hadjipavlou-Litina, D., Filimonov, D., Lagunin, A., & Mgonzo, R. (1999). Computer aided predicting the biological activity spectra and experimental testing of new thiazole derivatives. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 18(1), 16–25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3838\(199901\)18:1<16::AID-QSAR16>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3838(199901)18:1<16::AID-QSAR16>3.0.CO;2-O)
- Greenstein, J. P., & Andervont, H. B. (1943). Note on the liver catalase activity of pregnant mice and of mice bearing growing embryonic implants. *Journal of the National Cancer Institute*, 4(3), 283–284.
- Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5–6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
- Halgren, T. A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of Computational Chemistry*, 20(7), 730–748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<730::AID-JCC8>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<730::AID-JCC8>3.0.CO;2-T)
- Hung, T. C., Lee, W. Y., Chen, K. B., Chan, Y. C., Lee, C. C., & Chen, C. Y. C. (2014). In silico investigation of traditional Chinese medicine compounds to inhibit human histone deacetylase 2 for patients with Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014, 769867–769867. <https://doi.org/10.1155/2014/769867>
- HyperChem v8. (2009). *Molecular modelling system*. Hypercube Inc.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jennings, W., & Shibamoto, T. (1980). *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. 465 Seiten. Academic Press, New York, London, Sydney, Toronto, San Francisco 1980. <https://doi.org/10.1002/food.19820260943>
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45), 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., & Bruneau, C. (2011). Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 966–967. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9798-3>
- Kargı ođlu, M., Cenkci, S., Serteser, A., Konuk, M., & Vural, G. (2010). Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Human Ecology*, 38(3), 429–450. <https://doi.org/10.1007/s10745-010-9318-2>
- Khleifat, K. M., Matar, S. A., Jaafreh, M., Qaralleh, H., Al-limoun, M. O., & Alsharafa, K. Y. (2019). Essential oil of *Centaurea damascena* aerial parts, antibacterial and synergistic effect. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(2), 356–367. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1626292>
- KIM, Nam-Sun et LEE, Dong-Sun. (2004). Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 27(1-2), 96–100. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301603>
- König, W. A., Joulain, D., & Hochmuth, D. H. (2001). Terpenoids and related constituents of essential oils. *Library of MassFinder*, 2.1. Hamburg: Institute of Organic Chemistry. .
- Kumar, R., Prakash, O., Pant, A. K., Isidorov, V. A., & Mathela, C. S. (2012). Chemical composition, antioxidant and myorelaxant activity of essential oils of *Globba sessiliflora* Sims. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 385–391. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.692915>
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Dinan, L. N., Ferguson, C. A., Finnie, D. A., Jaspars, M., & Sarker, S. D. (2003). Biological activity of lignans from the seeds of *Centaurea scabiosa*. *Pharmaceutical Biology*, 41(3), 203–206. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.3.203.15099>
- Lakhal, H., Boudiar, T., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., & Bruneau, C. (2010). New sesquiterpene lactone and other constituents from *Centaurea sulphurea* (Asteraceae). *Natural Product Communications*, 5(6), 1934578X10005000. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500603>
- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT(1). *International Journal of Toxicology*, 21(Suppl 2), 19–94.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1–3), 3–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Madkour, L. H. (2020). *Reactive oxygen species (ROS), nanoparticles, and endoplasmic reticulum (er) stress-induced cell death mechanisms*. Academic Press.
- Mahoney, J. R., & Graf, E. (1986). Citric acid and EDTA as oxidant in a model system. *Journal of Food Science*, 51(5), 1293–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13108.x>
- Manjula, R., Wright, G. S., Strange, R. W., & Padmanabhan, B. (2018). Assessment of ligand binding at a site relevant to SOD 1 oxidation and aggregation. *FEBS Letters*, 592(10), 1725–1737. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13055>
- McLafferty, F. W., & Stauffer, D. B. (1994). Bench-top/PBM Mass spectrometry library search system, version 3.10 d. In *Wiley registry of mass spectral data*. Newfield: Palisade.
- Medbouhi, A., Merad, N., Khadir, A., Bendahou, M., Djabou, N., Costa, J., & Muselli, A. (2018). Chemical composition and biological investigations of *Eryngium triquetrum* essential oil from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, 15(1), e1700343. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700343>
- Mesli, F., Daoud, I., & Ghalem, S. (2019). Antidiabetic activity of *Nigella sativa* (BLACK SEED)-by molecular modeling elucidation, molecular dynamic, and conceptual DFT investigation. *Pharmacophore*, 17868(136.2380), C10H16.

- Mesli, F., Ghalem, M., Daoud, I., & Ghalem, S. (2021). Potential inhibitors of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Corchorus olitorius* Linn using docking, molecular dynamics, conceptual DFT investigation and pharmacophore mapping. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39, 1–13. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896389>
- Mesli, F., Medjahed, K., & Ghalem, S. (2013). Prediction of structural and thermodynamic properties of three products: 1-bromobenzene, tetrachlorethylene and 4-hydroxy-chromen-2-one using numerical methods. *Research on Chemical Intermediates*, 39(4), 1877–1895. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-0722-7>
- Molecular Operating Environment (MOE). (2019). 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7.
- Naeim, H., El-Hawiet, A., Rahman, R. A. A., Hussein, A., El Demellawy, M. A., & Embaby, A. M. (2020). Antibacterial activity of *Centaurea pumilio* L. root and aerial part extracts against some multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2876-y>
- Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Mezrioui, N., Setzer, W., Abbad, A., & Hassani, L. (2019). Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. *Industrial Crops and Products*, 137, 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.032>
- Najjar, F. M., Ghadari, R., Yousefi, R., Safari, N., Sheikhasani, V., Sheibani, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Studies to reveal the nature of interactions between catalase and curcumin using computational methods and optical techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 550–556.
- Nalini, C. N., Deepthi, S. R., Ramalakshmi, N., & Uma, G. (2011). Toxicity risk assessment of isatins. *Rasayan Journal of Chemistry*, 4(4), 829–833.
- National Institute of Standards and Technology. (1999). PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass spectral library.
- Noguchi, N., & Niki, E. (1999). Chemistry of active oxygen species and antioxidants. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health.*, p. 20. <https://doi.org/10.1201/9780367811099-1>
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874–879. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.061>
- Oury, T. D., Day, B. J., & Crapo, J. D. (1996). Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 75(5), 617–636.
- Pal, S., Dey, S. K., & Saha, C. (2014). Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: A biophysical approach. *PLoS One*, 9(7), e102460.
- Panagouleas, C., Skaltsa, H., Lazari, D., Skaltsounis, A. L., & Sokovic, M. (2003). Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. *mixta*, growing wild in Greece. *Pharmaceutical Biology*, 41(4), 266–270. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.4.266.15664>
- Parki, A., Chaubey, P., Prakash, O., Kumar, R., & Pant, A. K. (2017). Seasonal variation in essential oil compositions and antioxidant properties of *Acorus Calamus* L. accessions. *Medicines*, 4(4), 81.
- Parr, R. G., & Yang, W. (1989). *Density functional theory of atoms and molecules* (Vol. 1). Oxford University Press.
- Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295–309.
- Release, S. (2018). 2: *Maestro*, version 11.8. Schrödinger, LLC.
- Riccobono, L., Maggio, A., Bruno, M., Bancheva, S., Santucci, O., & Senatore, F. (2017). Chemical composition of the essential oil of *Centaurea grinensis* Reuter and *Centaurea apiculata* Ledeb: Growing wild in Croatia and Bulgaria, respectively and PCA analysis of sub-genus *Lopholoma* (Cass.) Dobroc. *Plant Biosystems*, 151(6), 1035–1044. <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1219419>
- Robert G. Parr and Yang Weitao. (1989). Density functional theory of atoms and molecules. *Oxford University Press*, 1. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195092769.001.0001>
- Rodil, R., Quintana, J. B., & Cela, R. (2012). Oxidation of synthetic phenolic antioxidants during water chlorination. *Journal of Hazardous Materials*, 199–200, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.058>
- Ruiz-Carmona, S., Alvarez-Garcia, D., Follope, N., Garmendia-Doval, A. B., Juho, S., Schmidtke, P., Barril, X., Hubbard, R. E., & Morley, S. D. (2014). rDock: A fast, versatile and open-source program for docking ligands to proteins and nucleic acids. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003571.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3–21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>
- Sarikurku, C., Ozer, M. S., Calli, N., & Popović-Djordjević, J. (2018). Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Marrubium parviflorum* subsp. *oligodon*. *Industrial Crops and Products*, 119, 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.023>
- Sarwar, M. G., Dragisic, B., Salsberg, L. J., Gouliaras, C., & Taylor, M. S. (2010). Thermodynamics of halogen bonding in solution: Substituent, structural, and solvent effects. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), 1646–1653. <https://doi.org/10.1021/ja9086352>
- Sarwar, M. G., Ajami, D., Theodorakopoulos, G., Petsalakis, I. D., & Rebek, J. (2013). Amplified halogen bonding in a small space. *Journal of the American Chemical Society*, 135(37), 13672–13675. <https://doi.org/10.1021/ja407815t>
- Secilla, F. M., Rojas, J. A. G., & Devesa, J. A. (2012). *Centaurea sulphurea* Willd. (Asteraceae), novedad para la flora de Andalucía occidental. *Centaurea sulphurea* Willd. (Asteraceae), a novelty for the Western Andalusian flora. *Acta Botanica Malacitana*, 37, 233–234.
- Sen, A., Kurkuoğlu, M., Yildirim, A., Senkardes, I., Bitis, L., & Baser, K. H. C. (2021). Chemical composition, antiradical, and enzyme inhibitory potential of essential oil obtained from aerial part of *Centaurea pterocaula* Trautv. *Journal of Essential Oil Research*, 33(1), 44–52. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1839585>
- Senatore, F., Arnold, N. A., & Bruno, M. (2005). Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon. *Natural Product Research*, 19(8), 749–754. <https://doi.org/10.1080/14786410412331302136>
- Souza, J. M., Candido, A. C. B. B., & Pagotti, M. C. (2019). In vitro evaluation of the leishmanicidal potential of selected plant-derived extracts against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 12(1), 36–41.
- STANKOVIC, Milan. (2020). *Medicinal Plants and Natural Product Research*. MDPI-Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Pages: 231. <https://doi.org/10.3390/books978-3-03928-119-0>
- Stewart, James. J. P. (2007). Optimization of parameters for semi-empirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, 13(12), 1173–1213. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>
- Stitou, M., Toufik, H., Bouachrine, M., & Lamchouri, F. (2021). Quantitative structure–activity relationships analysis, homology modeling, docking and molecular dynamics studies of triterpenoid saponins as Kirsten rat sarcoma inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(1), 119–152. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1707122>
- Tars, K., Olin, B., & Mannervik, B. (2010). Structural basis for featuring of steroid isomerase activity in alpha class glutathione transferases. *Journal of Molecular Biology*, 397(1), 332–340.
- Tava, A., Esposti, S., Boracchia, M., & Viegi, L. (2010). Volatile constituents of *Centaurea paniculata* subsp. *carueliana* and *C. rupestris* (Asteraceae) from Mt. Ferrato (Tuscany, Italy). *Journal of Essential Oil Research*, 22(3), 223–227. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700308>
- Toda, M., Kubo, R., Saitō, N., & Hashitsume, N. (1991). *Statistical physics II: Nonequilibrium statistical mechanics* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- THOMSEN, René et CHRISTENSEN, Mikael H. (2006). MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>
- Trease, G.E. and Evans, W.C. (1983) *Textbook of pharmacognosy*. 12th Edition, Tindall and Co., London, 343–383.
- Vyas, V., Jain, A., Jain, A., & Gupta, A. (2008). Virtual screening: A fast tool for drug design. *Scientia Pharmaceutica*, 76(3), 333–360. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0803-03>



- Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondiasaxillaris* fruit. *Food Chemistry*, 106(3), 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.068>
- Wang, W., & Skeel, R. D. (2003). Analysis of a few numerical integration methods for the Langevin equation. *Molecular Physics*, 101(14), 2149–2156. <https://doi.org/10.1080/0026897031000135825>
- Yang, L., Zheng, X. L., Sun, H., Zhong, Y. J., Wang, Q., He, H. N., Shi, X. W., Zhou, B., Li, J. K., Lin, Y., Zhang, L., & Wang, X. (2011). Catalase suppression-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF- $\kappa$ B activation and sensitizes apoptosis. *Cancer Science*, 102(4), 870–876. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01874.x>
- Zaretski, J., Bergeron, C., Huang, T. W., Rydberg, P., Swamidass, S. J., & Breneman, C. M. (2013). RS-WebPredictor: A server for predicting CYP-mediated sites of metabolism on drug-like molecules. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(4), 497–498. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts705>
- Zatla, A. T., Dib, M. E. A., Djabou, N., Tabti, B., Meliani, N., Costa, J., & Muselli, A. (2017). Chemical variability of essential oil of *Daucus carota* subsp. *sativus* from algeria. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 23(3), 216–230. <https://doi.org/10.1080/10496475.2017.1296053>



## Chemical Composition and Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities of the Essential Oil and its Major Component (Carlina oxide) of *Carlina hispanica* Roots from Western Algeria

Radja Achiri, Lyna Benhamidat, Imane Rihab Mami, Mohammed El Amine Dib, Nadia Aissaoui, Chewki Ziani Cherif, Hocine Ziani Cherif & Alain Muselli

To cite this article: Radja Achiri, Lyna Benhamidat, Imane Rihab Mami, Mohammed El Amine Dib, Nadia Aissaoui, Chewki Ziani Cherif, Hocine Ziani Cherif & Alain Muselli (2021) Chemical Composition and Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities of the Essential Oil and its Major Component (Carlina oxide) of *Carlina hispanica* Roots from Western Algeria, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 24:5, 1113-1124, DOI: [10.1080/0972060X.2021.2005692](https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.2005692)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.2005692>



Published online: 07 Dec 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

**Journal of Essential  
Oil-Bearing Plants**

ISSN: 0972-060X (Print); ISSN: 0976-5026 (Online)

<https://www.tandfonline.com/loi/teop>

## Article

### **Chemical Composition and Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities of the Essential Oil and its Major Component (Carlina oxide) of *Carlina hispanica* Roots from Western Algeria**

**Radja Achiri<sup>1</sup>, Lyna Benhamidat<sup>1</sup>, Imane Rihab Mami<sup>2</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>1\*</sup>, Nadia Aissaoui<sup>3</sup>, Chewki Ziani Cherif<sup>4</sup>, Hocine Ziani Cherif<sup>5</sup> and Alain Muselli<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO), département de chimie, faculté des sciences, université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie

<sup>3</sup> Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agro-alimentaire au biomédicale et à l'environnement (LAMAABE), université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie

<sup>4</sup> Department of Chemistry, University Abou-Bekr Belkaid of Tlemcen/Laboratory of Catalysis and Synthesis in Organic Chemistry LCSCO, Tlemcen, Algeria

<sup>5</sup> Macromolécules Research Laboratory, Department of Chemistry, Tlemcen University, Imama B.P.119, Tlemcen, DZ 13000, Algeria

<sup>6</sup> Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

\* Corresponding Author: [a\\_dibdz@yahoo.fr](mailto:a_dibdz@yahoo.fr) (Mohammed El Amine Dib)

Received 12 August 2021; Received in revised form 25 October 2021; Accepted 30 October 2021

**Abstract:** The purpose of this work was to study the chemical composition and *in vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of essential oil and carlina oxide isolated to *Carlina hispanica* roots. The *in vitro* combinatory effect of carlina oxide with BHT, EDTA and diclofenac to reduce their minimum effective dose and minimize their side effects was also tested. The essential oil obtained from the roots has been studied using GC and GC/MS. Antioxidant activity was assessed using radical scavenging activity (DPPH), the  $\beta$ -carotene bleaching test using the BHT as a positive control, and the ferrous Iron chelating using EDTA as a positive control. The activity of anti-inflammatory was assessed by the protein denaturation method using the diclofenac as a positive control. The antimicrobial activity was evaluated against six microbial strains using the Disc Diffusion Assay and the microplate method to determine the MIC. The essential oil of *C. hispanica* was represented mainly by an acetylenic compound carlina oxide (81.1 %) which was isolated and identified by spectroscopic <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and IR methods. The results of the biological activities showed that both essential oil and carlina oxide had an interesting antioxidant and anti-inflammatory power. Likewise, the combinations of positive controls with carlina oxide showed better activities with a substantial reduction in inhibitory concentrations and dose of the antioxidants and anti-inflammatories synthetics. Further studies are needed to provide these positive control combinations with carlina oxide in the pharmaceutical industry.

**Keywords:** *Carlina hispanica*, essential oil, carlina oxide, biological activities.

## Introduction

Since prehistoric times, mankind has always used plants, which are a huge reservoir of compounds from secondary metabolites for healing<sup>1</sup>. Plants are the main source of discovery of new active ingredients, indeed around 170000 bioactive molecules have been identified such as: artemisinin, morphine, colchicine and quinine<sup>2</sup>. In recent years, the use of synthetic antioxidants in the fields of pharmacy, agro-food and cosmetics has been thought to provide solutions to the various pathological mechanisms in which oxidative stress is involved, but their uses are suspected of having a long-lasting carcinogenic effect, tetragens and mutagens<sup>3</sup>. On the other hand, the problem of resistance of microorganisms to antibiotics continues to challenge the health sector<sup>4</sup>. The use of antimicrobial agents which are chemicals has led to the emergence of serious infectious diseases<sup>5</sup>. Moreover, the majority of anti-inflammatory drugs on the market are based on chemicals, although these are quite powerful, their long-term administration causes side effects such as gastric intolerance<sup>6</sup>. In this way, the substitution of these chemical treatments by natural remedies from plants such as essential oils with effects identical to the drugs synthesized seems interesting. The essential oils are natural substances biosynthesized by aromatic plants<sup>7</sup> rich in bioactive compounds with powerful biological and therapeutic effects, particularly as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, pain reliever and insecticides<sup>8-13</sup>. Essential oils are used to extend the shelf life of food products and as an antioxidant<sup>14</sup>. Their antioxidant and immunostimulatory actions will reduce bacterial attacks. On the other hand, these natural essences are widely applied in various fields such as pharmacy, aromatherapy, food processing and perfumery<sup>7</sup>. The family of Asteraceae, also called compound or more rarely compositaceous, is an important, large family and one of the most evolved. It is present all over the world with a predominance in temperate regions. It includes nearly 23000 species<sup>15</sup> divided into 1500 described genus, of which 750 are endemic<sup>16</sup>. Among the plants of this economically important family some provide insecticides as

species of the genus *Pyrethrum*, and some have medicinal properties such as *Inula montana*<sup>17</sup>. The genus *Carlina* is among those belonging to the Asteraceae family. Traditional medicine has granted multiple therapeutic properties to species of this genus, yet in many countries, they have been used to treat many skin disorders such as cancer<sup>18</sup>. The species that is the subject of our study was *C. hispanica* commonly known as Djrinza. The exhaustive bibliographical research carried out of this species has shown us that until now it has not been the subject of study before and in order to identify possible sources and potentials of this plant. Our study was based to (i) isolate the essential oil of *C. hispanica* and major components, (ii) evaluating the in-vitro antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil and its major component and (iii) evaluating the combinatory activities of the major component of the essential oil with reference molecules.

## Material and methods

### *Plant material and essential oil isolation*

The roots of *C. hispanica* were harvested at the flowering stage in May 2019 from Ain Fezza Forest in Tlemcen (Algeria). The authentication (C.H.05.19) of the collected plant was made by the Pr Hassani A of the laboratory of ecology and ecosystem management of the University of Tlemcen. To obtain essential oil, the fresh root parts (500 g) were subjected to hydrodistillation for 4-5 h using a Clevenger-type apparatus advocated by the European Pharmacopoeia that allows the recycling of the aqueous phase of the distillate by cohobage. The extractions were performed in triplicate.

### *Isolation of components*

Collective essential oil (1 g) was obtained by the mixture of all oil samples, which was then subsequently submitted to Column chromatography for separation, using silica gel column chromatography (FC, silica gel 200-500 µm) and eluted with 100 % Hexane.

### *Gas chromatography (GC)*

The analyzes by gas chromatography were carried

out via a Perkin Elmer Clarus Autosystem XL GC apparatus equipped with double flame ionization, and two capillary columns made of silica (60 mx 0.22 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  stationary phase film thickness), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed for an increase from 60°C to 230°C at 2°C/min and then kept isothermal for 35 min at 230°C. For the injector and detector, the temperatures were maintained at 280°C. The pressure at the top of the column is 25 psi with a flow rate of 1 ml/min. the sample was injected with a volume of 0.1  $\mu\text{L}$ . using hydrogen as carrier gas (0.7 ml/min). Retention indices (RI) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n-alkanes ( $\text{C}_5$  to  $\text{C}_{30}$ ) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz (2003) equation and software from Perkin-Elmer <sup>21</sup>.

#### Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The essential oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry using a Perkin Elmer Turbo Mass detector (quadrupole) coupled to a Perkin Elmer Auto system XL equipped with an automatic injector and two columns (60 mx 0.22 mm D.I., film thickness of stationary phase 0.25  $\mu\text{m}$ ), polar (Rtx-Wax) and non-polar (Rtx-1). The ionization energy was 70 eV, the temperature of the ion source was 150°C, and the mass range with which mass spectra were acquired was 35-350 Da. The injection of the sample was done by a divided mode with a division ratio of 1/80 with a volume of pure essential oil of 0.2  $\mu\text{L}$ <sup>22</sup>.

#### Component identification and quantification

The components were identified via (i) comparison of the retention indices (RI) calculated respectively on polar and apolar columns with those of standard compounds (laboratory library "Aroma") or those reported in the literature. (ii) Computer correspondence of mass spectra (electronic impact) with those of the laboratory's internal library <sup>23,24</sup>. The quantification of the constituents was carried out using a flame ionization detector by internal standardization using the response factor calculated with respect to the tridecane (0.7 g.100 g<sup>-1</sup>) used as internal standard <sup>9</sup>.

#### DPPH Free Radical Scavenging Assay

The antioxidant power of the essential oil and carlina oxide has been tested by the method that uses DPPH (2,2-Diphenyl Picryl-Hydrazyl)<sup>9</sup>. 20 g/L of essential oil and carlina oxide stock solution was prepared in a series of different concentrations included between [0.5-15 g/L]. 1000  $\mu\text{l}$  of each concentration was then mixed with 1000  $\mu\text{l}$  of the ethanolic solution of DPPH (0.5 mM). followed by incubation for 30 minutes in the dark and at room temperature. The absorbances were tested using a spectro-photometer at 517 nm. The same concentrations were prepared for BHT to serve as a positive control. The antioxidant activity was calculated in the following way:

$$AA\% = \frac{[(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{test}})]}{Abs_{\text{control}}} \times 100$$

Where: AA: antioxidant activity, Abs: absorbance. The  $\text{IC}_{50}$ s were calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concentrations of the sample tested.

#### Ferrous iron chelating

The ferrous ion-chelating effect of the essential oil and Carlina oxide by  $\text{Fe}^{2+}$  ferrozine test system was estimated by the method of Chua *et al.* <sup>25</sup>. The solutions of the samples and the reference antioxidant EDTA (500  $\mu\text{l}$ ) were initially mixed with 100  $\mu\text{l}$  of  $\text{FeCl}_2$  (0.6 mM in distilled water) and 900  $\mu\text{l}$  of ethanol. After 5 min, 100  $\mu\text{l}$  of Ferrozine (5 mM in ethanol) were added to the reaction medium. The mixture was stirred well and then left to react for 10 min at room temperature. The negative control contains all the reagents except the test sample which is replaced by an equal volume of Ethanol. The absorbance of the reaction was measured at 562 nm and the ratio of inhibition of ferrozine  $\text{Fe}^{2+}$  complex formation was calculated as follows:

$$\%I = [(Ac-As) / Ac] \times 100$$

Where: Ac: Absorbance at 562 nm of control, As: Absorbance at 562 nm of samples.

The  $\text{IC}_{50}$ s was calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concen-

trations of the sample tested.

### **$\beta$ -Carotene bleaching test**

The antioxidant capacity of the essential oil and carlina oxide was determined by measuring the inhibition of oxidative degradation of  $\beta$ -carotene (discoloration) by the oxidation products of acid linoleic according to the method described by Bougateg *et al.*<sup>26</sup>. The  $\beta$ -carotene / linoleic acid emulsion was prepared by dissolving 2 mg of  $\beta$ -carotene in 10 ml of chloroform, 25  $\mu$ l of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were mixed, the chloroform was completely evaporated at 40°C with the rotavapor, then 100 ml of water distilled saturated with oxygen were added, the resulting emulsion was stirred vigorously. A volume of 2.5 ml of the previous emulsion was transformed into test tubes containing 1ml of extracts in Ethanol at different concentrations. Heated thereafter at 50°C in a double boiler. The absorbance was measured for all samples at 470 nm, immediately (t = 0) and after the time of 120 min, using a spectrophotometer against blanc consisting of an emulsion without  $\beta$ -carotene. The percentage inhibition was calculated according to the following formula:

$$A\% = [1 - (A_{E(0)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$$

Where:  $A_{E120}$ : Absorbance at 470 nm of the samples at t = 120 min.

$A_{C0}$ : Absorbance at 470 nm of the control at t = 0 min.

$A_{C120}$ : Absorbance at 470 nm of the control at t = 120 min.

The  $IC_{50}$ s was calculated graphically by the linear regression formula of the inhibition percentages as a function of different concentrations of the sample tested.

### **Anti-inflammatory activity**

The activity of anti-inflammatory *in vitro* of essential oil and carlina oxide was assessed by the protein denaturation method. Diclofenac, a powerful anti-inflammatory drug is used as a reference. The reaction mixture consists of 2 ml of the different dilutions of the essential oil, Carlina oxide or of the control (distilled water) and 2.8 ml of the phosphate-buffered saline (PBS,

pH 6.4) mixed with 0.2 ml of egg albumin (fresh), then the mixture is incubated at 37°C for 15 minutes. The denaturation of albumin is induced in a water bath at 70°C for 5 min. After cooling, the absorbance was measured at 660 nm<sup>27,28</sup>. The percentage inhibition of denaturation was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Where: Ac: Absorbance at 660 nm of control, At: Absorbance at 660 nm of samples

### **Antimicrobial activity**

#### **Microbial strains**

The antimicrobial activity of the essential oil and carlina oxide was evaluated against six microbial strains: two Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), two Gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* SAMS (ATCC 25923), and two yeasts: *C. albicans* IPP444 and *C. albicans* (ATCC 10231).

The bacterial strains were cultured in Muller-Hinton Agar at a temperature of 37°C for 24 h, on the other hand, the yeast was cultivated in Sabouraud Agar (Merck) at a temperature of 37°C for 48 h. After incubation, the microbial suspensions were made in sterile physiological water (0.85 %) and adjusted to a final concentration corresponding to 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU / mL for bacteria and 1 to 5 × 10<sup>6</sup>CFU / mL for yeast.

#### **Disc diffusion assay**

The disk method makes it possible to determine the antimicrobial power of these compounds with respect to the test microorganisms using Muller-Hinton Agar (MHA, Oxoid) medium for bacteria and Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Merck) medium for yeasts. This technique was performed according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>26</sup>. The sterile filter paper discs of 05 mm (Whatman, no.2) were impregnated with 10  $\mu$ l of each then placed on the surface of the appropriate agar (MHA or SDA) previously inoculated by swabbing, the dishes are then incubated for 37°C for 24 to 48 hours. Gentamicin (10  $\mu$ g) and amphotericin B (0.2 mg),

a commercial antibiotic and antifungal were used as positive controls for bacteria and yeasts respectively. The diameters of the zone of inhibition (mm) were measured. This test was done in duplicate, the mean and the standard deviation were calculated with the PAST VERSION 3.22 software.

#### Micro-well dilution assay

The Minimum inhibitory concentrations (MICs) of essential oil and carlina oxide which is the lowest concentration of the antimicrobial agent that inhibits the growth of microorganisms according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Were performed using the method of the microplate (96 wells)<sup>29</sup>. In each line of the microplate, 100 µl of Mueller Hinton broth or 100 µl of Sabouraud Dextrose broth was deposited. Then, 100 µl of each compound was introduced into the 1st well. After having thoroughly mixed the contents of the 1st well, 100 µl were taken, then placed in the 2nd well, until reaching the 10th well; the remaining 100 µl were then eliminated. Therefore, a dilution of ½ between each well will be obtained. The last two wells represent negative controls: well n°11 contains the culture medium

and inoculum and well n°12 contains only the culture medium.

Finally, 100 µl of the bacterial ( $5 \times 10^5$  CFU / ml) or yeast ( $1$  to  $5 \times 10^4$  cells / ml) inoculum were added to each well. The microplates were sealed and incubated at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined to be the lowest concentration at which no growth occurred in the well.

#### Results and discussion

##### Chemical composition of the essential oil

The hydrodistillation of the essential oil of *C. hispanica* roots for 5 hours has resulted an essential oil of yellow-orange color with a yield of 0.14 % (0.7 g). The essential oil components were identified by comparing their mass spectra (EI-MS) and retention indices (RI) with those of the mass spectra library (Table 1). Routine GC-RI and GC-MS analysis of root essential oil led to the identification of 6 components. However, our spectral libraries were found to be non-operative in identifying the major component of the essential oil (N°6 of Table 1). Column chromatography allowed us (see material and method section) to separate the major compound (Carlina oxide) with a mass of 0.80 g. The

**Table 1. Chemical composition of essential oil of the roots of *C. hispanica***

No <sup>a</sup>	Components	Retention time	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Concentration %	Identification <sup>d</sup>
1	<i>trans</i> -Caryophyllene	43.92	1424	1431	0.1	RI. MS
2	$\alpha$ -Curcumene	48.24	1471	1470	2.3	RI. MS
3	<i>trans</i> - $\beta$ -Bergamotene	48.37	1480	1477	4.4	RI. MS
4	Zingibrene	49.42	1489	1496	4.5	RI. MS
5	$\beta$ -Sesquiphellandrene	52.32	1516	1514	1.8	RI. MS
6	Carlina oxide	57.64	1563	1572	81.1	RI. MS
7	<i>Z,Z</i> -Farnesal	58.74	1653	1661	4.5	RI. MS
	Total identification %				98.7	
	% Sesquiterpene hydrocarbons (1,2,3,4,5)				13.1	
	% Oxygenated sesquiterpenes (7)				4.5	
	% Acetylenic compound (6)				81.1	

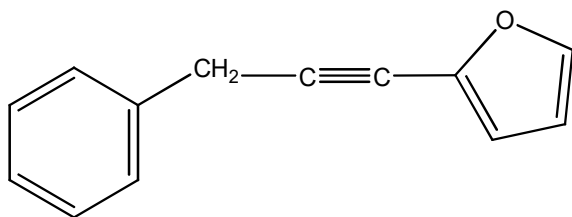
a: Order of elution is given on apolar column (Rtx-1)

b: Retention indices of literature (RI<sup>b</sup>)

c: Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI<sup>c</sup>)

d: RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode

identification of carlina oxide was done by other complementary analyzes such as  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  and the IR spectra. The comparison of the compound obtained with the data described in the literature<sup>20</sup> led to the identification of carlina oxide also known as benzyl-2-furylacetylene (Fig. 1).



**Figure 1.** Carlina oxide

The identification of carlina oxide was done by other complementary analyzes such as  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  and the IR spectra.

IR Spectrum (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): (C=C) 2216; (C-H Ar) 3086; (C=C Ar) 1453, 1487, 1494, 1573; (C=C furano) 1603; (C-H, furano) 984; (C-H Ar) 740.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 3.93 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 6.44 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 3.24, J<sub>2</sub> = 1.8, CH furano); 6.62 (1H, d, J = 3.62, Furane C-H); 7.3-7.5 (6H, m, CH phenyl + CH furano).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 143.05, 137.4, 135.9, 128.7, 128.1, 126.9, 114.3, 110.8, 92.1, 73.1, 25.8.

The comparison of the compound obtained with the data described in the literature<sup>20</sup> led to the identification of carlina oxide also known as benzyl-2-furylacetylene.

$^1\text{H}$  NMR spectrum (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 3.82 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.34 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 3.4, J<sub>2</sub> = 1.8, CH furano), 6.51 (1H, d, J = 3.4, CH furano), 7.2-7.4 (6H, m, CH phenyl + CH furano).

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 142.9, 137.3, 135.9, 128.6, 127.9, 126.7, 114.2, 110.7, 91.9, 72.9, 25.7.

*C. hispanica* essential oil demonstrated the predominance of acetylenic compounds (81.1%) from the identified content. Sesquiterpenes were the most dominant class after acetylenic compounds with a percentage of (17.6 %). The main component were carlina oxide (81.1 %) zingibrene (4.4 %), *Z,Z*-farnesal (4.5 %) and *trans*- $\beta$ -bergamotene (4.4%).

The essential oil of the roots of *C. hispanica* has never been the subject of study before, therefore we had gathered the results of identification of the chemotypes of essential oils of the roots of a few species of *Carlina* genus (Table 2). The essential oils of *C. vulgaris* and *C. gummefera* harvested in the region of Tlemcen (Algeria) are mainly represented by Carlina oxide (33.7 % and 63.2 %, respectively). The essential oil of *C. acaulis* from Italy was dominated by Carlina's oxide with a percentage of 94.6 %. On the other hand, in the essential oil of *C. radix* it was detected with a percentage of 98.9 %. Carlina oxide still constitutes the majority molecule in the essential oil of *C. acanthifolia*, in fact, it was detected with a percentage of 91.5 % (Table 2).

**Table 2.** The main component of essential oil of some species of *Carlina* genus

Country	Species	Major components
Italy (Bagnacavallo) <sup>30</sup>	<i>C. acaulis</i>	Carlina oxide 94.6 %, aromatic benzaldehyde 3.1 % and ar-curcumene 0.4 %
Algeria (Tlemcen-Sidi Djilali) <sup>31</sup>	<i>C. vulgaris</i>	Carlina oxide 33.7 %, Hexadecanoic acid 15.0 % and Neophytadiene 13.4 %
Serbia <sup>32</sup>	<i>C. radix</i>	Carlina oxide 98.9 % and ar-Curcumene 0.2 %.
Serbia (Suva Planina) <sup>32</sup>	<i>C. acanthifolia</i>	Carlina oxide 91.5 % and $\beta$ -Sesquiphellandrene 2.8 %
Algeria (Tlemcen- Ouchebeba) <sup>33</sup>	<i>C. gummefera</i>	Carlina oxide 63.2 %, (E)- $\beta$ -Caryophyllene 8.5 % and $\alpha$ -Bisabolol 5.5 %



### Evaluation of the antioxidant activities

#### DPPH free radical scavenging assay

The antioxidant power was performed according to the DPPH free radical scavenging method, the  $\text{FeCl}_2$  iron chelation method and the  $\beta$ -carotene bleaching method using BHT and EDTA as a positive control (Fig. 2-4).

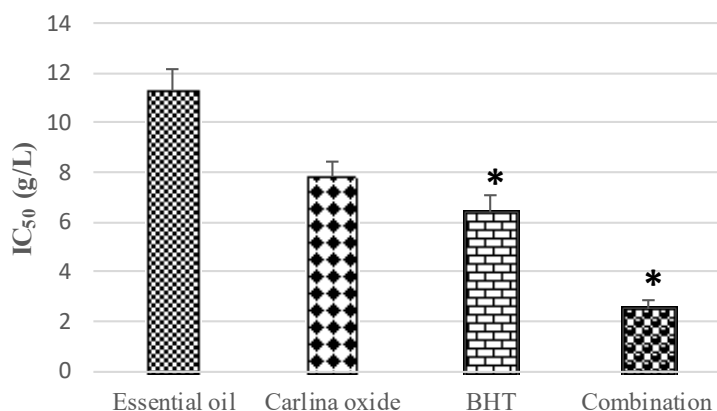
The half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) providing 50 % inhibition of DPPH in the test solution was calculated. The scavenging ability of all samples has shown antioxidant activity. The Carlina oxide-BHT combination indicated the strongest activity in the quenching of the DPPH $\cdot$  radical with an  $\text{IC}_{50}$  of 2.5 g/L, i.e., approximately 4.5 times higher than the synthetic antioxidant used as a reference, BHT ( $\text{IC}_{50}$  = 6.9 g/L; Fig 2), followed by BHT ( $\text{IC}_{50}$  = 6.9 g/L), carlina oxide ( $\text{IC}_{50}$  = 7.8 g/L) and essential oil ( $\text{IC}_{50}$  = 11.3 g/L) (Fig. 2).

#### Metal chelating assay

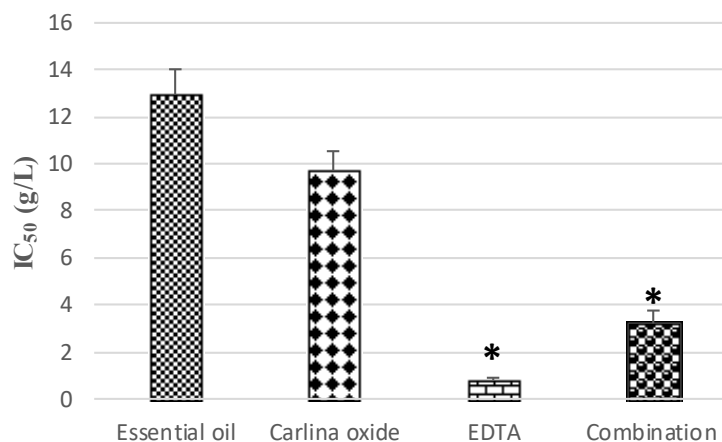
The antioxidant activity ( $\text{IC}_{50}$ s) evaluated by the ferrous iron chelation method of the essential oil, carlina oxide and the combination of carlina oxide-EDTA is shown in Figure 3. The combination of carlina oxide with the reference EDTA showed greater antioxidant activity ( $\text{IC}_{50}$  = 3.2 g/L) than that of carlina oxide ( $\text{IC}_{50}$  = 9.7 g/L) and essential oil ( $\text{IC}_{50}$  = 12.9 g/L) but which remains lower than the antioxidant synthetic EDTA ( $\text{IC}_{50}$  = 0.8 g/L) (Fig. 3).

#### $\beta$ -Carotene Bleaching assay

The results obtained demonstrated that the essential oil and carlina oxide have very good activity against peroxide radicals generated by the oxidation of linoleic acid (Fig. 4). Carlina oxide showed more interesting free radical scavenging activity than essential oil with  $\text{IC}_{50}$  values of 5.1



**Figure 2.**  $\text{IC}_{50}$  of essential oil, Carlina oxide and the combination Carlina oxide-BHT at different concentrations by the DPPH $\cdot$  test



**Figure 3.** Antioxidant activity of the essential oil, carlina oxide and the combination Carlina oxide-EDTA by the ferrous iron chelation test

g/L and 12.6 g/L respectively. For the synthetic antioxidant the  $IC_{50}$  was about 4.9 g/L. However, the combination of carlina oxide-BHT has been shown to have a synergistic effect with  $IC_{50}$  of 2.4 g/L, which is about 2 times stronger than that of the BHT alone (Fig. 4).

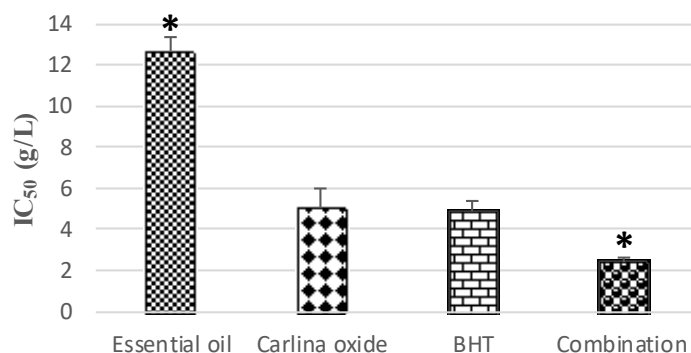
#### Evaluation of the anti-inflammatory activity

The *in-vitro* anti-inflammatory activity of essential oils, carlina oxide, diclofenac sodium and combination (carlina oxide-diclofenac) were done using the protein denaturation method (Table 3). From the results of Table 3, concentration-dependent inhibition of protein denaturation (albumin) was observed by the samples. Diclofenac sodium was used as the reference drug at the same concentration. The results showed that the oil and carlina oxide has a very good inhibitory

effect, with percentages of 75.1 % and 77.9 %, at a concentration of 15 g/L compared to Diclofenac (60.7 %) respectively. However, the combination between carlina oxide and Diclofenac showed high inhibition (83.9 %) at the same concentration (15 g/L) (Table 3).

#### Evaluation of the antimicrobial activity

The antimicrobial power of the essential oil of *C. hispanica* was evaluated against six microorganisms: 4 bacteria [two Gram-positive and two Gram negatives] and two yeasts. The activity was performed qualitatively (disk method) and quantitatively (MIC method). The results are shown in Tables 4 and 5 respectively. The results obtained by the disk diffusion method showed that for *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, both essential oil and carlina oxide



**Figure 4.** Antioxidant activity of the essential oil, Carlina oxide and the combination Carlina oxide-BHT for the bleaching assay method of  $\beta$ -carotene/linoleic acid at different concentration

**Table 3.** Percentages of inhibition of protein denaturation of *C. hispanica* essential oil, carlina oxide, sodium diclofenac and their combination at different concentrations

Concentrations (g/L)	% Inhibition (%)			
	Diclofenac sodium (%)	Essential oil	Carlina oxide	Combination
1	8.5±0.1	4.9±0.1	10.7±0.1	11.2±0.2
2	17.6±0.1	10.2±0.3	12.1±0.1	18.1±0.1
3.5	22.2±0.2	20.5±0.2	27.7±0.3	37.1±0.1
5	34.2±0.8	37.6±0.6	56.3±1.3	58.3±0.2
10	44.5±0.6	70.3±1.6	73.4±0.8	75.6±0.9
15	60.7±1.1	75.1±0.8	77.9±0.5	83.9±1.1

Samples and positive control were done in triplicates (n=3)

SD= standard deviation

Combination: Carlina oxide+Diclofenac

**Table 4. Inhibition Zones of *C. hispanica* essential oil and carlina oxide**

<b>A. Gram-positive bacterial strains</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452		
<b>Zones of inhibition (mm)</b>					
EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	Gent (10 µg)	EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	Gent (10 µg)
11.5±1.5	9±1	33	7.5±0.5	7.5±0	13
<b>B. Gram-negative bacterial strains</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	Gent (10 µg)	EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	Gent (10 µg)
10.5±0.5	-	23	-	-	25
<b>Yeast</b>					
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			<i>Candida albicans</i> IPP444		
EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	AmphB 0.2 µg/mL	EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	AmphB 0.2 µg/mL
19.5±0.5	13.5±0.5	30±0.0	16.66±1.2	11.66±1.20	30±0.0

**Table 5. Minimum inhibitory concentration of essential oil of *C. hispanica* and carlina oxide**

<b>A. Gram-Positive Bacterial Strains</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
<b>Minimum inhibitory concentration</b>					
EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µLdisc)	Gent MIC µg/mL			
1.562±0.00	-	0.5±0.000			
<b>Yeast</b>					
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			<i>Candida albicans</i> IPP444		
EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	AmphB MIC µg/ mL	EO (10 µL/disc)	Carlina oxide (10 µL/disc)	AmphB MIC µg/mL
0.39±0.00	3.125 0.00	8	0.39±0.00	1.562± 0.00	4

demonstrated the same efficacy with an inhibition zone of 7.5 mm. For *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 the diameters were 11.5 mm and 9 mm for the essential oil and carlina oxide respectively. For *Escherichia coli* ATCC 25922, the activity was displayed only by the essential oil with an inhibition zone of 10.5 mm. However, for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no activity was obtained. While for yeasts the essential oil was more effective than carlina oxide with zones of inhibition of 19.5 µg/ml against *Candida albicans* ATCC 10231 and 16.66 µg/ml against *Candida albicans* IPP 444. For carlina oxide, the zones of inhibition were 13.5 µg/ml

and 11.66 µg/ml respectively (Table 4). This means that it is the synergy of molecules of the essential oil that is responsible for the antifungal activity and not only carlina.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained using the microplate method (96 wells). The MIC value of the essential oil was 1.562 µg/ml for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, while for *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 and gram-negative bacteria didn't demonstrate any efficiency. However, carlina oxide has not been active for all bacteria which is in agreement with the disk test. For yeasts, the MIC values of the essential oil were 0.39 µg/ml

for both yeasts. For carlina oxide, the MIC was 3.125 µg/ml for *Candida albicans* ATCC 10231 and 1.562 µg/ml for *Candida albicans* IPP 444 (Table 5).

### Conclusions

This is the first report on the chemical composition and biological activities of the essential oil from the root part of *C. hispanica*. The Chemical characterization has shown that essential oil was rich in acetylenic compound. The *in vitro* combination of carlina oxide with BHT and EDTA showed better activity which led to a substantial

reduction of inhibitory concentration. Essential oil and carlina oxide had good activity anti-inflammatory, but the combination of carlina oxide with diclofenac was better. From the results, we observe that the combination of carlina oxide with the positive controls can reduce the minimum effective dose, which in turn can help to minimize side effects and deliver them with similar potency. Therefore, other evaluations of the therapeutic efficacy of the essential oil, carlina oxide as well as the combinations with *in vivo* tests in the context of further research should be carried out.

### References

1. **Lee, K.H. (2004).** Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead. *J. Nat. Prod.* 67: 273-283.
2. **Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. and Mnif, W. (2016).** Essential Oils, Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines.* 3(25): 1-16.
3. **Lewis, K. (2012).** Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature.* 485(7399): 439-440.
4. **Wright, G.D. and Sutherland, A.D. (2007).** New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *TRENDS Mol. Med.* 13(6): 260-267.
5. **Davis, J. (1994).** Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 264: 375-382.
6. **Ndoye Foe, F.M.C., Kemejni Tchinnang, T.F., Nyegue, A.M., Abdou, J-P., Gbaweng Yaya, A.J., Tchinda, A.T., Oyono Essame, J-L. and Etoa F-X. (2016).** Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complement. Altern. Med.* 16:117.
7. **Dordevic, S., Petrovic, S., Dobric, S., Milenkovic, M., Vucicevic, D., Zizic, S. and Kukic J. (2007).** Antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109: 458-463.
8. **Bardeau, F. (2009).** Les Huiles Essentielles : Découvrir les Bienfaits et les Vertus d'une Médecine Ancestrale. Fernand Lanore.
9. **El-Massry, K.F., Farouk, A. and Abou-Zeid, M. (2008).** Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) volatile oil. *J. Essent. Oil Bear. Plant.* 11: 536-543.
10. **Medjdoub, K., Benomari, F. Z., Djabou, N., Dib, M. A., Gaouar Benyelles, N., Costa, J. and Muselli, A. (2019).** Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four *Mentha* species. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* e64165.
11. **Tefiani, C., Riazi, A., Youcefi, F., Aazza, S., Gago, C., Faleiro, M.L., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J. and Miguel, M.G. (2015).** *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J. Essent. Oil Res.* 27(2): 1-9.
12. **Willem, J.P. (2015).** Huiles Essentielles Antivirales. Guy Trédaniel, Paris.
13. **Mouhi, L., Moghrani, H., Nasrallah, N., Amrane, A., Maachi, R. (2017).** Anti inflammatory activity of essential oil of an endemic *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. with chemotype carvacrol,

- and its healing capacity on gastric lesions. *J. Food Biochem.* 41(3): e12359.
14. **Merad Boussalah, N. (2020).** Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Hydrosol Extract from Aerial Parts of *Cynoglossum cheirifolium* L. from Algeria. *J. Essent. Oil Bear. Plant.* 23(1): 97-104.
  15. **Barreda., Luis P., Maria, CT., Eduardo, B.O., Ian, R., Félix, F. and Viviana, D. (2015).** Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the *Cretaceous of Antarctica*. 112(35) : 10989-10994.
  16. **Harkati, B. (2011).** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae: *Scorzonera undulata*. Thèse doctorat: Chimie organique: Constantine: Université de Mentouri Constantine, 4-5.
  17. **Gaussen, H. and Leroy, F. (1982).** Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2<sup>ème</sup> édition, 424-426.
  18. **Strzemski, M., Wojnicki, K., Sowa, I., Wojas-Krawczyk, K., Paweł Krawczyk, P., Kocjan, R., Justyna Such, J., Latałski, M., Wnorowski, A. and Wójciak-Kosio, M. (2017).** *In Vitro* Antiproliferative Activity of Extracts of *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* and *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka*. *Front. Pharmacol.* 8: 371.
  19. **Conseil de l'Europe. (1996).** Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A. Sainte Ruffine.
  20. **Djordjevic, S., Petrovic, S., Ristic, M. and Djokovic, D. (2005).** Composition of *Carlina acanthifolia* Root Essential Oil. *Chem. Nat. Comp.* 44(4): 410-412.
  21. **Dib, M.A., Paolini, J., Bendahou, M., Varesi, L., Allali, H., Desjobert, J.M., Tabti, B. and Costa, J. (2010).** Chemical Composition of Fatty Acid and Unsaponifiable Fractions of Leaves, Stems and Roots of *Arbutus unedo* and *in vitro* Antimicrobial Activity of Unsaponifiable Extracts. *Nat. Prod. Commun.* 5(7): 1085-1090.
  22. **National Institute of Standards and Technology. (2005).** NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database (<http://webbook.nist.gov/chemistry>). Gaithersburg, MD.
  23. **National Institute of Standards and Technology. (1999).** NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT.
  24. **Chua, M.T., Tung, Y.T. and Chang, S.T. (2008).** Antioxidant activities of ethanolic extracts from twigs of *Cinnamomum osmophleum*. *Bioresour. Technol.* 1918-1925.
  25. **Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. (2009).** Antioxidant and free radical scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 114:1198–1205.
  26. **Chandra S., Chatterjee P., Dey P. and Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of anti-inflammatory effect of ashwagandha: a preliminary study *in vitro*. *Pharmacogn. J.* 4: 47-49.
  27. **Mizushima Y. and Kobayashi M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20: 169-173.
  28. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standards .M7-A.
  29. **Wikler, M.A. (2012).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS). 26:M27-A2.
  30. **Benelli, G., Pavoni, L., Zeni, V., Ricciardi, R., Cosci, F., Cacopardo, G., Gendusa, S., Spinozzi, E., Petrelli, R., Cappellacci, L., Maggi, F., Pavela, R., Bonacucina, G. and Lucchi, A. (2020).** Developing a Highly Stable *Carlina acaulis* Essential Oil Nanoemulsion for Managing *Lobesia botrana*. *Nanomaterials.* 10(9): 1867.
  31. **Belabbes, R., Mami, I. R., Dib, M.E.A., Mejdoub, Kenza., Tabti, B., Costa, J. and Muselli, A. (2019).** Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* Rich in Polyacetylene Compounds. *Curr. Nutr. Food Sci.* 16(4): 563-570.
  32. **Stojanovic-Radic, Z., Èomic, L., Radulovic, N., Blagojevic, P., Tatjana Mihajilov-Krstev,**

- 
- T. and Rajkovic, J. (2012).** Commercial *Carlinae radix* herbal drug: Botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. *Pharm. Biol.* 50(8): 933-940.
33. **Mejdouba, K., Rihab Mami, I.R., Rania Belabbes, R., Dib, M.E.A., DJabou, N., Tabti, B., Gaouar-Benyellesa, N., Costa, J. and Muselli, A. (2019).** Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities. *Curr. Bioact. Compd*, 16(4): 489-497.

## RESUME

De nos jours, les plantes aromatiques et médicinales restent encore le premier réservoir de composés biologiquement actifs, une source inépuisable de matières premières, de ce fait, la préservation de ces organismes végétaux constitue un enjeu crucial à l'échelle du pays.

Ce travail de thèse a porté sur la connaissance et la valorisation des ressources naturelles en Algérie, et plus précisément, une étude phytochimique et biologique sur les fractions volatiles des trois espèces du genre *Centaurea* (*Centaurea acaulis*, *Centaurea pullata* et *Centaurea sulphurea*) qui sont une source potentielle de métabolites secondaires bioactifs.

Pour cela, deux grands volets ont été développés : le volet chimique a révélé que la caractérisation chimique des parties aériennes des deux espèces du même genre *C. acaulis* et *C. sulphurea* est différente, en effet, les constituants majoritaires sont le limonène et  $\tau$ -muurolol pour *C. acaulis*, l'oxyde de caryophyllène et viridiflorol pour *C. sulphurea*, en revanche, la caractérisation chimique des parties racinaires a affiché le même composant dominant : un hydrocarbure aliphatique, le (Z,Z,Z)-heptadéca-1,8,11,14- tétraène, trivialement dénommé aplotaxène. Par ailleurs, la composition chimique des extraits à l'hexane est différente des huiles essentielles, toutefois, elles ne font pas exception puisqu'elles montrent la prédominance du constituant aplotaxène. D'autre part, le volet biologique a affiché des résultats très prometteurs pour les deux activités antioxydantes et anti-inflammatoire, en outre, des résultats modérés vis-à-vis les activités antimicrobiennes et neuroprotectrice. Par ailleurs un travail initiative sur l'inhibition des récepteurs des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPx) par deux méthodes de chimie computationnelle a démontré que le composé (Z)-phytol était le meilleur inhibiteur et pourrait être suggéré comme un nouveau médicament potentiel antioxydant. Ce travail de recherche a été achevé par une application thérapeutique : le développement d'un gel à visée anti-inflammatoire pour application par voie locale, suite aux résultats intéressants obtenue par la molécule.

**Mots clés :** *Centaurees*, Huiles essentielles, Extraits à l'hexane, Caractérisation chimique, Activités biologiques, Application thérapeutique.

## ABSTRACT

Nowadays, aromatic and medicinal plants are still the first reservoir of biologically active compounds, an inexhaustible source of raw materials, so the preservation of these plant organisms is a crucial issue across the country.

This thesis work focused on the knowledge and enhancement of natural resources in Algeria, and more specifically, a phytochemical and biological study on the volatile fractions of the three species of the genus *Centaurea* (*Centaurea acaulis*, *Centaurea pullata* and *Centaurea sulphurea*) which are a potential source of bioactive secondary metabolites.

For this, two major components were developed: the chemical component revealed that the chemical characterization of the aerial parts of the two species of the same genus *C. acaulis* and *C. sulphurea* is different, in fact, the majority constituents are limonene and  $\tau$ -muurolol for *C. acaulis*, caryophyllene oxide and viridiflorol for *C. sulphurea*, on the other hand, the chemical characterization of the root parts showed the same dominant component: an aliphatic hydrocarbon, (Z,Z,Z)-heptadeca-1,8,11,14-tetraene, commonly referred to as aplotaxene. Moreover, the chemical composition of hexane extracts is different from essential oils, however, they are no exception since they show the predominance of the constituent aplotaxene. On the other hand, the biological component showed very promising results for both antioxidant and anti-inflammatory activities, in addition, moderate results vis-à-vis the antimicrobial and neuroprotective activities. In addition, an initiative work on the inhibition of antioxidant enzyme receptors (CAT, SOD, GPx) by two computational chemistry methods demonstrated that the compound (Z)-phytol was the best inhibitor and could be suggested as a potential new drug. Antioxidant. This research work was completed by a therapeutic application : the development of an anti-inflammatory gel for local application, following the interesting results obtained by the molecule.

**Keywords :** *Centaury*, Essential oils, Hexane extracts, Chemical characterization, Biological activities, Therapeutic application.

## ملخص

في الوقت الحاضر، لا تزال النباتات العطرية والطبية هي المستودع الأول للمركبات النشطة بيولوجيًا، وهي مصدر لا ينضب للمواد الخام، لذا فإن الحفاظ على هذه الكائنات النباتية يمثل قضية حاسمة في جميع أنحاء البلاد.

الهدف الأساسي لهذه الأطروحة هو معرفة وتعزيز الموارد الطبيعية في الجزائر، وبشكل أكثر تحديدًا، دراسة كيميائية وبيولوجية نباتية على الكسور المتطايرة للأنواع الثلاثة من جنس *Centaurea* (*Centaurea acaulis* و *Centaurea pullata* و *Centaurea sulphurea*) التي تعتبر محتملة مصدر المستقبلات الثانوية النشطة بيولوجيًا.

لهذا، تم تطوير مكونين رئيسيين: أظهر المكون الكيميائي أن التوصيف الكيميائي للأجزاء الهوائية من النوعين من نفس الجنس *C. acaulis* و *C. sulphurea* مختلف، في الواقع، معظم المكونات هي Limonène و  $\tau$ -muurolol و caryophyllene oxide و viridiflorol من ناحية أخرى، أظهر التوصيف الكيميائي لأجزاء الجذر نفس المكون السائد: (Z,Z,Z)-heptadéca-1,8,11,14- tétraène aliphatique، يشار إليه عادة باسم aplotaxène. علاوة على ذلك، يختلف التركيب الكيميائي لمستخلصات الهكسان عن الزيوت الأساسية، ومع ذلك، فهي ليست استثناء لأنها تظهر غلبة مكون aplotaxène. من ناحية أخرى، أظهر المكون البيولوجي نتائج واعدة للغاية لكل من الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات، بالإضافة إلى نتائج معتدلة مقابل الأنشطة المضادة للميكروبات والوقاية العصبية. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت مبادرة العمل على تثبيط مستقبلات إنزيم مضادات الأكسدة (CAT، SOD، GPx) بطريقتين كيميائيتين حساسيتين أن المركب (Z)-phytol هو أفضل مثبط ويمكن اقتراحه كعقار جديد محتمل مضاد للأكسدة، تم الانتهاء من هذا البحث من خلال تطبيق علاجي: تطوير مادة هلامية مضادة للالتهابات للتطبيق الموضعي، بعد النتائج المثيرة التي حصل عليها الجزئي.

**الكلمات المفتاحية:** *Centaurea*، الزيوت الأساسية، خلاصات الهكسان، التوصيف الكيميائي، الأنشطة البيولوجية، التطبيق العلاجي.