



HAL
open science

**Etude des molécules bioactives et de leurs activités chez
deux espèces d'astragales utilisées dans la médecine
traditionnelle: Astragalus emarginatus Labill. et
Astragalus coluteoides Will.**

Abir Chamandy

► **To cite this version:**

Abir Chamandy. Etude des molécules bioactives et de leurs activités chez deux espèces d'astragales utilisées dans la médecine traditionnelle: Astragalus emarginatus Labill. et Astragalus coluteoides Will.. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT: 2021STRAF022 . tel-03688409

HAL Id: tel-03688409

<https://theses.hal.science/tel-03688409>

Submitted on 4 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES
CHIMIQUES**

**UMR 7178 – Équipe de Chimie Analytique des
Molécules BioActives et Pharmacognosie
(CAMBAP)**

THÈSE présentée par :

Abir CHAMANDY

soutenue le : 23 Septembre 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Etude des molécules bioactives et de
leurs activités chez deux espèces
d'astragales utilisées dans la médecine
traditionnelle : *Astragalus emarginatus*
Labill. et *Astragalus coluteoides* Will.**

THÈSE dirigée par :

**M. ENNAHAR Saïd
M. RAMMAL Hassan**

Maître de Conférences, Université de Strasbourg
Professeur, Université Libanaise

RAPPORTEURS :

**M. GOOSSENS Jean-francois
Mme. PERRIN Cathérine**

Professeur, Université de Lille
Professeur, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Mme. JULIEN-DAVID Diane
Mme. URBAIN Aurélie**

Maître de Conférences, Université de Strasbourg
Maître de Conférences, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Mes travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre d'une co-direction entre l'Université Libanaise et l'Université de Strasbourg. Les travaux expérimentaux ont été effectués entre le laboratoire de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie (CAMBAP) et le Plateforme de Recherche et d'Analyses en Sciences de l'Environnement (PRASE). Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et au succès de ce travail.

Merci tout d'abord aux membres de jury et qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie Madame Catherine Perrin, Professeur à l'Université de Montpellier et Monsieur Jean-Francois GOOSSENS, Professeur à l'Université de Lille pour avoir bien voulu être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi Madame Diane JULIEN-DAVID et Madame Aurélie URBAIN, Maîtres de conférence à l'Université de Strasbourg d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Mes plus sincères remerciements et ma plus profonde reconnaissance vont tout particulièrement à Monsieur Saïd ENNAHAR, mon directeur de thèse ainsi qu'à Monsieur Hassan RAMMAL, mon co-directeur de thèse qui m'ont donné l'occasion de mener ma thèse jusqu'à son terme en faisant disparaître toutes les embuches qui se sont manifestées.

Mes remerciements les plus chaleureux à Minjie ZHAO, "*mon ange de la thèse*". Je lui suis très reconnaissante pour le temps qu'elle m'a consacré pendant ces deux dernières années à la fois pour les analyses LC/MS et RMN, pour les discussions riches d'informations, pour son aide précieuse dans la rédaction et la correction de la publication et du manuscrit et finalement pour son enthousiasme, ses orientations et ses conseils à chaque étape.

Je tiens à remercier vivement tous les actuels et les anciens membres de l'équipe CAMBAP pour l'accueil, la sympathie, les conseils et les encouragements. Mes remerciements vont également à tous mes collègues du laboratoire.

Je souhaiterais remercier Monsieur Christian D. MULLER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je remercie également Fathi, merci pour les aides précieuses à réaliser les expérimentations en biologie.

J'aimerais remercier Monsieur Thierry VANDAMME, et tous ces étudiants pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Fouad Haj Hassan, au Professeur Akram HIJAZI et au Dr. Mounir Kassir pour leur soutien surtout aux moments difficiles de la thèse. Merci également au Professeur Salem HAYAR.

Je voudrais remercier deux personnes très particulières et très sympathiques, le Professeur George TOHME et sa femme le Professeur Henriette TOHME pour m'avoir accueillie dans leur maison pour les identifications botaniques des plantes.

Je tiens à exprimer ma pleine gratitude au Dr. Michel AFRAM pour m'avoir donné l'occasion de continuer mes études et pour m'avoir encouragée. Merci également à tous mes collègues à l'IRAL, surtout ceux de la station de Baakline qui m'ont soutenue pendant mes années d'études.

Un grand et spécial merci pour tous mes amis au Liban et à Strasbourg pour leur soutien et pour m'avoir donné la force et le courage de persévérer.

Je tiens enfin à exprimer ma sincère gratitude et ma plus grande reconnaissance à mes parents, pour leurs prières, pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à mes frères et à ma sœur. C'est grâce à l'aide de toutes ces personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. J'ai forcément oublié d'en citer certaines, je m'en excuse par avance auprès d'elles !

Je dédie ma thèse de doctorat au Dr. Michel Antoine Afram, Directeur Général de l'Institut de Recherches Agronomiques Libanais (IRAL), à tous mes collègues à l'IRAL, à mes Parents.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ANNEXES	14
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
PARTIE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA FAMILLE DES FABACEES ET LE GENRE <i>ASTRAGALUS</i>	20
I.1. La famille des fabacées	20
I.1.1. Généralités.....	20
I.1.2. Classification des fabacées	20
I.1.3. Sous-famille des papilionacées	21
I.1.4. Importance des fabacées.....	22
I.1.4.a. Importances alimentaire, agronomique et industrielle.....	22
I.1.4.b. Importance thérapeutique	22
I.2. Le genre <i>Astragalus</i>	23
I.2.1. Généralités.....	23
I.2.2. Répartition géographique	23
I.2.3. Classification et botanique du genre <i>Astragalus</i>	23
I.2.3.a. Classification du genre.....	23
I.2.3.b. Description botanique.....	25
I.2.3.c. Cas d' <i>A. emarginatus</i> Labill. (AEL) et d' <i>A. coluteoides</i> Will.....	25
I.2.4. Importance du genre <i>Astragalus</i>	27
I.2.4.a. Importance économique.....	27
I.2.4.b. Importances pharmaceutique et médicinale.	27
I.3. Métabolites secondaires du genre	28
I.3.1. Les saponines	28
I.3.2. Les flavonoïdes	29
I.3.3. Les polysaccharides.....	31
I.3.4. Les acides phénoliques.....	31

I.4. Toxicité du genre <i>Astragalus</i>	32
PARTIE II - ACTIVITES BIOLOGIQUES	33
II.1. Spectre d'activités chez <i>Astragalus</i>	33
II.2. Activité antioxydante.....	34
II.2.1. Radicaux libres.....	34
II.2.2. Stress oxydant	36
II.2.3. Antioxydants	37
II.2.3.a. Antioxydants endogènes.....	37
II.2.3.b. Antioxydants exogènes	39
II.3. Activité anticancéreuse.....	41
II.3.1. Généralités sur le cancer	41
II.3.2. Cancer du pancréas	42
II.3.3 Relation entre stress oxydant et le cancer	42
II.3.4. Traitement du cancer.....	44
II.3.4.a. Traitement préventif	44
II.3.4.b. Traitement curatif.....	44
II.3.5. Médicaments anticancéreux à base de plantes	44
II.4. Activité anti-inflammatoire	45
II.4.1. Généralités	45
II.4.2. Types d'inflammation.....	45
II.4.2.1. Inflammation aiguë	46
II.4.2.2. Inflammation chronique	47
II.4.3. Anti-inflammatoires	48
II.4.4. Pouvoir anti-inflammatoire des plantes	48
II.5. Activité antimicrobienne	48
II.5.1. Généralités	48
II.5.2. Pouvoir antimicrobien des plantes	49
I. REFERENCES	50
CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES	62
PARTIE A - ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES EXTRAITS	62
II.A.1. Solvants, réactifs et autres produits chimiques.....	62
II.A.1.1. Analyses chimiques.....	62
II.A.1.2. Tests biologiques.....	63
II.A.2. Matière végétale.....	63

II.A.3. Extraction de la matière végétale.....	64
II.A.4. Étude de l'activité anti-radicalaire des extraits.....	66
II.A.4.1. Capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC).....	66
II.A.4.2. Capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC).....	67
II.A.4.3. Réactivité avec le radical libre DPPH*.....	69
II.A.5. Analyse phytochimique.....	70
II.A.6. Estimation de la teneur en composés phénoliques totaux.....	71
II.A.7. Estimation de la teneur en composés flavonoïques totaux.....	71
II.A.8. Détermination de l'activité anti-radicalaire par CLHP-ABTS ^{•+}	72
II.A.9. Identification des composés par CLUHP-DAD-SMHR.....	73
II.A.10. Fractionnement de l'extrait AC _{Et} 50 par chromatographie CLHP semi-préparative.....	74
II.A.11. Isolement des composés de formule C ₉ H ₇ NO ₆ et C ₉ H ₇ NO ₅ de l'extrait AC _{Et} 50... 74	74
II.A.12. Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	74
PARTIE B - DEMARCHE EXPERIMENTALE POUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	75
II.B.1. Activité anticancéreuse.....	75
II.B.1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire AsPC-1.....	75
II.B.1.2. Préparation des cellules AsPC-1.....	75
II.B.1.3. Traitement des cellules avec les extraits des plantes.....	76
II.B.1.4. Principe du test d'induction de l'apoptose par cytométrie en flux.....	76
II.B.1.5. L'analyse du taux d'apoptose suite au traitement.....	77
II.B.2. Activité anti-inflammatoire.....	78
II.B.2.1. Préparation de la lignée cellulaire.....	78
II.B.2.2. Principe du test anti-inflammatoire.....	78
II.B.2.3. Activité anti-inflammatoire des extraits des plantes.....	79
II.B.3. Activité antimicrobienne.....	80
II. REFERENCES.....	82
CHAPITRE III - ASTRAGALUS EMARGINATUS LABILL - COMPOSES ANTIOXYDANTS ET ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	84
III. PARTIE A - RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE COMPOSES ANTIOXYDANTS DANS L'EXTRAIT D'AEL PAR CLHP-ABTS^{•+} ET CLUHP-DAD-SMHR.....	84
III.A. Publication - Hyphenated LC-ABTS ^{•+} and LC-DAD-HRMS for simultaenous analysis and identification of antioxidant compounds in <i>Astragalus emarginatus</i> Labill. extracts.....	84

III.A.1. Abstract	84
III.A.2. Introduction	85
III.A.3. Materials and methods.....	86
III.A.3.1. Collection and preparation of plant dry material.....	86
III.A.3.2. Chemicals and reagents	86
III.A.3.3. Preparation of reagents and stock solutions.....	87
III.A.3.4. Preparation of AEL extracts	87
III.A.3.5. TEAC assay	88
III.A.3.6. ORAC assay.....	88
III.A.3.7. Radical scavenging activity measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay.....	89
III.A.3.8. On-line HPLC-ABTS ^{•+} assay	89
III.A.3.9. UHPLC-DAD-HRMS.....	90
III.A.4. Results and Discussion.....	90
III.A.4.1. Selection of the extraction solvent.....	90
III.A.4.2. Optimization of extraction conditions	91
III.A.4.3. Antioxidant activity measurement by DPPH assay	93
III.A.4.4. Separation and identification of antioxidants and other isolated compounds	94
III.A.5. Conclusions	103
III.A.6. Acknowledgements	103
III.A.7. Declaration of Competing Interests.....	103
III.A.8. References	103
III. PARTIE B - CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET ESTIMATION DES TENEURS EN PHENOLS ET EN FLAVONOIDES TOTAUX DANS L'EXTRAIT AE _{Et} 30	108
III.B.1. Criblage phytochimique	108
III.B.2. Estimation des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux.....	109
III. PARTIE C - EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'EXTRAIT AE _{Et} 30	109
III.C.1. Activité anticancéreuse.....	109
III.C.2. Activité anti-inflammatoire	111
III.C.3. Activité antimicrobienne	113
III. Conclusion	114
III. REFERENCES	116

CHAPITRE IV - ASTRAGALUS COIUTEOIDES WILL., POUVOIR ANTOXYDANT, COMPOSITION CHIIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES	119
IV.1. Choix des conditions d'extraction des antioxydants de la partie aérienne d'ACW.	119
IV.1.1. Sélection du solvant d'extraction	119
IV.1.2. Optimisation des conditions d'extraction.....	120
IV.1.3. Essai d'épuisement	122
IV.2. Etude chimio-analytique de l'extrait AC _{Et50}	123
IV.2.1. Criblage phytochimique	123
IV.2.2. Estimation de la teneur en composés phénoliques et flavonoïques totaux.....	123
IV.2.3. Estimation de l'activité anti-radicalaire par DPPH	124
IV.2.4. Séparation et détermination des composés antioxydants par CLHP-ABTS ^{•+} ..	124
IV.2.5. Fractionnement par CLHP semi-préparative.....	126
IV.2.6. Identification des composés par CLUHP-DAD-SMHR et RMN	126
IV.3. Activités biologiques.....	144
IV.3.1. Activité anticancéreuse.....	144
IV.3.2. Activité anti-inflammatoire	147
IV.3.3. Activité antimicrobienne	148
IV.4. Conclusion	149
IV. REFERENCES	150
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152
ANNEXES	155

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

<i>Figure I. 1. Phylogénie et classification des sous-familles de légumineuses.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure I. 2. Distribution mondiale du genre Astragalus.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure I. 3. Classification historique du genre Astragalus.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure I. 4. A. emarginatus Labill.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure I. 5. A. coluteoides Will.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure I. 6. Description des quatre étapes de la réduction de l'oxygène avec formation d'intermédiaires partiellement réduits</i>	<i>35</i>
<i>Figure I. 7. Principales sources endogènes et exogènes responsable de la production des radicaux libres</i>	<i>36</i>
<i>Figure I. 8. Illustration d'un déséquilibre pro-oxydants/antioxydants dans l'organisme</i>	<i>36</i>
<i>Figure I. 9. Mécanisme de détoxification enzymatique des ERO.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure I. 10. Structure de quelques antioxydants synthétiques.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure I. 11. Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes</i>	<i>40</i>
<i>Figure I. 12. Estimation selon l'OMS de l'évolution de la mortalité annuelle liée au cancer au niveau mondial.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure I. 13. Etapes de la réaction inflammatoire aigue</i>	<i>46</i>

Chapitre II

<i>Figure II. 1. Lieu de la récolte des plantes</i>	<i>64</i>
<i>Figure II. 2. Représentation schématique du protocole suivi pour l'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants</i>	<i>66</i>
<i>Figure II. 3. Mécanisme de piégeage des radicaux ABTS^{•+}</i>	<i>67</i>
<i>Figure II. 4. Principe de la méthode ORAC</i>	<i>68</i>
<i>Figure II. 5. ORAC, courbe de la décroissance de la fluorescence en fonction du temps</i>	<i>68</i>
<i>Figure II. 6. Principe de la réduction des radicaux libres DPPH[•]</i>	<i>69</i>
<i>Figure II. 7. Représentation schématique du système du couplage CLHP-ABTS^{•+}</i>	<i>72</i>
<i>Figure II. 8. La lignée cellulaire AsPC-1</i>	<i>75</i>
<i>Figure II. 9. Double marquage à l'annexine V-FITC (A) et à l'iodure de propidium (IP) en vue de distinguer les cellules normales des cellules nécrotiques par cytométrie en flux.</i>	<i>77</i>
<i>Figure II. 10. Principe du test de sécrétion de TNF-α.....</i>	<i>79</i>

Chapitre III

➤ Partie A

- Figure III- 1.** Antioxidant activities of extracts from *Astragalus emarginatus* Labill. using various solvents. Activity is measured by TEAC (dark gray) and ORAC (light gray) assays and expressed as μ moles of trolox equivalents (TE) per gram of extract.91
- Figure III- 2.** Extraction of antioxidants from *Astragalus emarginatus* Labill. as a function of time with different concentrations of ethanol in water: 10% ethanol (open circle); 30% ethanol (dark circle); 50% ethanol (dark square); 70% ethanol (open square). The presence of antioxidants was assessed by the HPLC-ABTS^{•+} assay as the sum of peak areas at 412 nm..92
- Figure III- 3.** Percentage of total antioxidants extracted from *Astragalus emarginatus* Labill. as a function of the number of successive extractions using 30% ethanol for 30 min. The presence of antioxidants was assessed by the HPLC-ABTS^{•+} assay as the sum of peak areas at 412 nm.....93
- Figure III- 4.** UV (upper line) and antioxidant (under line) chromatograms of 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. (A) and the zoomed views (B) and (C) of UV chromatogram.....95
- Figure III- 5.** UV (325 nm) (A) and MS (B) chromatograms of the 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. and the zoomed views (C) and (D) of UV chromatogram.....96
- Figure III- 6.** The chemical structure of the compounds in the 30%- ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. as identified by ultra-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high resolution mass spectrometry.98

➤ Partie C

- Figure III. 1.** Cytogrammes présentant les résultats de l'analyse de l'activité anticancéreuse de l'extrait AE_{Ei}30 par cytométrie en flux avec une détection à l'annexine V-FITC / IP110
- Figure III. 2.** Cytogrammes illustrant l'apparition d'une fluorescence jaune suite une activation de cellules test en absence d'activité anti-inflammatoire111
- Figure III. 3.** Cytogrammes représentant l'effet de l'extrait AE_{Ei}30 sur la sécrétion de TNF- α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS.112
- Figure III. 4.** Contrôle positif du test de diffusion sur milieu de culture gélosé utilisant les surnageants de cultures bactériennes contenant des bactériocines113

Chapitre IV

Figure IV. 1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des six extraits d'ACW par TEAC et ORAC. L'activité est exprimée en $\mu\text{mol ET/g}$ extrait sec. TEAC (gris foncé) ; ORAC (gris clair)	119
Figure IV. 2. Activité anti-radicalaire des extraits d'ACW mesurée par CLHP-ABTS ⁺ après extraction par un mélange EtOH-eau en fonction du temps. L'activité est exprimée par la somme des aires des pics négatifs (412 nm). EtOH 10% (losange blanc) ; EtOH 30% (carré noir), EtOH 50% (triangle noir), EtOH 70% (cercle blanc) ; EtOH 90% (carré blanc).....	121
Figure IV. 3. Pourcentage d'extraction des composés antioxydants des extraits ACW en fonction du nombre d'extractions successives en utilisant de l'EtOH 50% pour 5 min. L'activité est exprimée par la somme des aires des pics négatifs (412 nm) en CLHP-ABTS ⁺	122
Figure IV. 4. Chromatogrammes CLHP-ABTS ⁺ de l'extrait AC _{Et50} représentant la détection à 325 nm des composés contenus dans l'extrait AC _{Et50} (partie supérieure), ainsi que celle de leur activité anti-radicalaire à 412 nm (partie inférieure).....	125
Figure IV. 5. Fractionnement de l'extrait AC _{Et50} par CLHP semi-préparative. La séparation a été réalisée sur une colonne Puriflach Prep C18-AQ (250×10 mm) et la détection a été faite en UV à 230 et à 265 nm.....	126
Figure IV. 6. Les chromatogrammes MS (A) et UV (325 nm) (B) de l'extrait AC _{Et50} d'ACW obtenus en CLUHP-DAD-SMHR sur une colonne C18-PFP (1,7 μm).....	127
Figure IV. 7. Structures des composés identifiés ou provisoirement identifiés de l'extrait AC _{Et50}	128
Figure IV. 8. Propositions des structures tautomères pour le composé 6 (A) et le composé 12 (B)	132
Figure IV. 9. Chromatogramme en UV (325 nm) d'une solution concentrée de.....	133
Figure IV. 10. Chromatogrammes en UV et en MS de la fraction LC-F1, correspondant au composé 6 (A), et de la fraction LC-F2, correspondant au composé 12 (B).....	134
Figure IV. 11. Spectre ¹ H-RMN de la fraction LC-F2 dans D ₂ O	135
Figure IV. 12. Spectre ¹ H-RMN de la fraction LC-F2 dans le mélange DMSO-d ₆ /H ₂ O	136
Figure IV. 13. Chromatogrammes en UV, MS, EIC et spectres MS et MS/MS de l'étalon ANPP	137
Figure IV. 14. Chromatogrammes en UV, MS, EIC de la fraction LC-F2 et les spectres MS et MS/MS du composé 12 (Tr= 13,57 min).....	138
Figure IV. 15. Chromatogramme en MS de la LC-F2 supplémentée en étalon ANPP et les spectres UV correspondants	139

Figure IV. 16. Chromatogrammes en UV et en MS de la LC-F2 en utilisant H ₂ O-MQ et ACN comme phase mobile montrant un pic du composé 12 à Tr=0,99 min (A), ainsi que ses spectre MS (B) avec agrandissements (C et D), MS/MS (E) et UV (F). Le spectre du pic à Tr=13,57 min de la Figure IV.14 est également présenté (G)	140
Figure IV. 17. Cytogrammes présentant les résultats de l'analyse de l'activité anticancéreuse de l'extrait AC _{Ei} 50 et de ses fractions (S-F1 et S-F2) par cytométrie en flux avec une détection à l'annexine V-FITC / IP	145
Figure IV. 18. Résultats d'analyse de l'activité anticancéreuse de la rutine (300, 500 et 1000 µM) et de la fraction S-F2 (439 µM).....	146
Figure IV. 19. Cytogrammes représentant l'effet de l'extrait AC _{Ei} 50 sur la sécrétion de TNF-α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS	147
Figure IV. 20. Cytogrammes représentant l'effet des fractions S-F1 et S-F2 sur la sécrétion de TNF-α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS	148

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I. 1. Classification systématique d' <i>A. emarginatus</i> Labill et <i>A. coluteoides</i> Will.	25
Tableau I. 2. Exemples d'utilisations thérapeutiques des plantes du genre <i>Astragalus</i>	28
Tableau I. 3. Flavonoïdes isolés du genre <i>Astragalus</i>	29
Tableau I. 4. Les principaux acides hydroxycinnamiques	31
Tableau I. 5. Les principaux acides hydroxybenzoïques.....	31
Tableau I. 6. Activités biologiques des extraits ou des composés isolés des espèces d' <i>Astragalus</i>	33
Tableau I. 7. Relation entre le stress oxydant et certaines pathologies.....	37
Tableau I. 8. Principaux médiateurs impliqués dans le processus d'inflammation	47
Tableau I. 9. L'activité antimicrobienne de certaines métabolites secondaires des plantes ..	49

Chapitre II

Tableau II. 1. Détection des métabolites primaires et secondaires par analyse phytochimique	70
Tableau II. 2. Souches bactériennes et fongiques utilisées dans le test antimicrobien	80

Chapitre III

➤ Partie A

Table III. 1. Radical scavenging activity of the 30% ethanol extract of <i>Astragalus emarginatus</i> Labill. as determined by the DPPH ^a assay	93
Table III. 2. Identification of the compounds present in the 30% ethanol extract of <i>Astragalus emarginatus</i> Labill. by UHPLC-DAD-HRMS ^a . Peak numbers are as shown in Figs. 5 and 6.	97

➤ Partie B

Tableau III. 1. Les métabolites présents dans la partie aérienne d'AEL	108
---	-----

Chapitre IV

Tableau IV. 1. Criblage phytochimique de l'extrait AC _{Et} 50 préparé de la partie aérienne d'ACW.....	123
Tableau IV. 2. Activité anti-radicalaire de l'extrait sec AC _{Et} 50 déterminée par DPPH	124
Tableau IV. 3. Identification des composés présents dans l'extrait AC _{Et} 50 par CLUHP-DAD-SMHR	129
Tableau IV. 4. Formules proposées des Na- et K- adduits obtenus suite à l'ionisation du composé 12 à un pH d'environ 6	141

LISTE DES ANNEXES

<i>Annexe. 1. Effet de la température sur l'activité anti-radicalaire représenté par l'aire totale des pics à 412 nm en CLHP-ABTS^{•+}</i>	<i>155</i>
--	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

A : *Astragalus*

Abs : absorbance

ABTS : sel 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) diammonium

AC_{Et}50 : extrait D'ACW avec éthanol à 50%

ACN : acétonitrile

ACW : *Astragalus coluteoides* will.

ADN : acide désoxyribonucléique

AE_{Et}30 : extrait D'AEL avec éthanol à 30%

AEL : *Astragalus emarginatus* Labill.

AF : acide formique

AHNPP : acide hydroxy-nitrophénylpyruvique

AHOB : acide hydroxy-oxalylaminobenzoïque

ANPP : acide nitrophénylpyruvique

AOB : acide oxalylaminobenzoïque

AsPC-1 : lignée cellulaire du cancer pancréatique

ATP : adénosine triphosphate

BHT : hydroxytoluène butylé

CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CLUHP-DAD-SMHR : chromatographie liquide à ultra haute performance avec détecteur à barrettes d'iodes couplée à spectrométrie de masse haute résolution

COX : enzyme cyclooxygénase

DAD : détecteurs à barrette de diodes

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EIC : extracted ion chromatogram

ERO : espèce réactive d'oxygène

ET : équivalent trolox

FDA : Food and drug administration

GAE : Gallic acid equivalent

H₂O-MQ : eau milliQ

IL : interleukines

LPS : lipopolysaccharide

MS : spectrométrie de masse

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OH[•] : radical hydroxyle

ORAC : oxygen radical absorbance capacity

PBS : phosphate buffer saline

PFP : pentafluorophényle

RMN : resonance magnétique nucléaire

RUE : rutin equivalent

SOD : superoxyde dismutase

TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity

THP-1 : lignée cellulaire monocyttaire humaine

TNF- α : tumor necrosis factor α

Tr : temps de rétention

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des millénaires, l'homme utilise les plantes, non seulement pour se nourrir, mais aussi pour guérir. Les scripts anciens des différentes civilisations montrent que les plantes ont été utilisées à des fins médicinales depuis l'antiquité. Ils incluent par exemple les papyrus Ebers (1550 av. J.-C.), les travaux d'Hippocrate (459-370 av. J.-C.) et de Théophraste (371-287 av. J.-C.), les plaques d'argile sumériennes datant de 5000 ans, l'encyclopédie de la médecine traditionnelle chinoise, les écrits de la médecine ayurvédique indienne, de la médecine arabe du moyen âge, ainsi ceux des explorateurs européens (Marco Polo et Vasco de Gama notamment) qui ont introduit de nombreuses plantes médicinales en Europe et ont initié le développement des jardins botaniques [1].

A travers l'histoire, il apparaît que les plantes aux vertus thérapeutiques sont rarement consommées telles quelles, mais plutôt sous la forme d'extraits (décoctions, infusions, distillats ou autres préparations) servant à exalter et à concentrer l'activité des plantes. La composition chimique des plantes est toutefois très complexe comprenant une grande diversité de métabolites plus ou moins bioactifs et plus ou moins faciles à extraire et à mettre en évidence. Par ailleurs, l'activité biologique peut être dépendante du contexte physicochimique de la plante ou bien de l'action combinée de métabolites différents, ce qui peut compliquer les processus d'extraction et de concentration.

Avec la révolution industrielle et le développement de la chimie au XIX^e siècle, les premières molécules bioactives naturelles ont été isolées telles que la morphine, la quinine, la caféine, la nicotine, la codéine, l'atropine, la colchicine, la cocaïne et la capsaïcine [2,3]. L'identification de telles structures naturelles a ouvert la voie à la conception de nouvelles molécules bioactives, ce qui a été facilité par le développement de la chimie de synthèse [4].

Cependant, le recours à la médecine traditionnelle reste prédominant à travers le monde et concerne près de 80% de la population mondiale, ce qui peut être attribué au manque d'accès aux produits pharmaceutiques synthétiques ou à une plus grande confiance accordée aux produits naturels [4,5]. De plus, au milieu de la tendance générale du « retour à la nature », il y a eu un regain d'intérêt pour la recherche de nouveaux produits pharmaceutiques naturels. Si l'on considère que parmi les 400000 espèces des plantes identifiées, seul un faible pourcentage a été étudié, de nombreuses ressources restent encore à explorer [3].

Les études montrent que les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène sont à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies, notamment les chroniques d'entre elles telles que les

maladies cardiovasculaires, certains cancers et le diabète de type 2. Les radicaux libres sont des espèces moléculaires très réactives avec des électrons non appariés dans leur orbitale atomique, tandis que les espèces réactives de l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, etc. L'oxyde nitrique (NO[•]), les radicaux d'hydroxyle (OH[•]), les superoxydes (O₂[•]), les radicaux peroxyde (ROO[•]), les radicaux alcoyle (RO[•]) et l'oxygène singulet (¹O₂) sont des exemples des radicaux libres [6].

Ainsi, l'apport de composés à activité antioxydante, capables de neutraliser ces espèces réactives, à travers l'alimentation ou à travers des plantes médicinales peut jouer un rôle protecteur. Cette activité protectrice des plantes est liée à leur composition chimique, notamment leur contenu en produits antioxydants tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanines et les caroténoïdes [7].

Le Liban, situé à l'Est de la méditerranée, est un petit pays du Moyen-Orient de 10,452 km² de surface divisé en 5 régions géomorphologiques : la zone côtière (jusqu'à 250 m d'altitude) ; la chaîne du Mont Liban (de 250 à 3088 m d'altitude) ; la plaine de la Bekaa et la chaîne Anti-Liban (jusqu'à 2600 m d'altitude) [8]. Cette topographie accompagnée d'un climat méditerranéen unique ont fourni au Liban une richesse exceptionnelle en biodiversité comptant 9116 espèces, divisées entre faune (4,486 espèces) et flore (4630 espèces). Sa diversité florale est l'une des plus riches dans le bassin méditerranéen qui est considéré comme un haut lieu de la biodiversité au niveau mondial [9]. La flore libanaise a été étudiée par plusieurs botanistes au cours du temps dont Post (1932) [10], Mouterde (1966 [11], 1970 [12], 1983 [13]) et récemment Tohmé et Tohmé (2007 [14], 2013 [15]). La diversité en plantes aromatiques et médicinales au Liban a également été documentée dans de nombreuses publications. Le nombre d'espèces ayant des propriétés aromatiques et médicinales est estimé à 385 espèces réparties sur 260 genres et 90 familles botaniques et dont plusieurs sont endémiques au Liban [16]. Deeb *et al.* (2013) ont mené une enquête auprès de 26 herboristes libanais qui a permis d'identifier 128 espèces végétales utilisées dans le traitement des diverses maladies : 51 espèces concernant les troubles gastro-intestinaux; 32 concernant les maladies des reins et du système urinaire; 37 concernant la circulation et les maladies cardiovasculaires; 19 concernant les troubles du système nerveux; 21 concernant le diabète; 19 concernant les maladies respiratoires; 18 concernant les troubles sexuels; 17 concernant le système capillaire, 7 concernant les maladies du foie, 6 concernant les tumeurs, et le reste pour d'autres affections [17].

De nombreuses études ethnobotaniques ont été menées sur le genre *Astragalus* dans le monde, mais peu de données sont disponibles concernant les propriétés médicinales de ses espèces [18]. Arnold *et al.*, dans une étude ethnobotanique au Mont Hermon, une crête de la chaîne Anti-Liban, ont présenté l'utilisation médicinale de quatre espèces d'astragales : *A. coluteoides* Will., *A. oleaeifolius* DC. et *A. cruentiflorus* Boiss. dont les décoctions de racines sont utilisées par voie orale pour traiter le diabète et la jaunisse ; et *A. hermoneus* Boiss. qui est utilisé comme astringent [14]. L'activité anti-microbienne et anti-biofilm d'*A. angulosus* a également été montrée par Kanaan *et al.* [19]. Globalement, les astragales sont très connus dans la médecine traditionnelle chinoise où les racines d'*A. membranaceus* (Fisch.) BUNGE (*Astragali Radix*) sont largement utilisés [20]. Deux espèces d'*Astragalus*, *A. mongholicus* et *A. membranaceus*, ont été aussi incluses dans la pharmacopée chinoise et cinq autres pharmacopées majeures [21].

Le travail de cette thèse de doctorat a été mené dans le contexte des efforts de valorisation de la flore libanaise, particulièrement celle des plantes endémiques et précisément le genre *Astragalus*, un genre relativement peu étudié pour ce qu'il pourrait contenir comme molécules bioactives à intérêt thérapeutique. Nous nous sommes attelés à étudier la partie aérienne de deux espèces, *Astragalus emarginatus* Labill. (AEL) et *Astragalus coluteoides* will. (ACW), suivant une démarche expérimentale en plusieurs étapes :

- Recherche parmi des solvants de diverses polarités de celui qui permet une extraction efficace des molécules antioxydantes, l'extraction par ce solvant étant ensuite optimisée modulant sa composition, ainsi que le temps d'extraction. Le pouvoir antioxydant des extraits est évalué par deux méthodes différentes : la capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC) et la capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC).
- Criblage des molécules antioxydantes séparées par chromatographie en phase liquide à haute performance et testées en ligne par un réacteur couplé post-colonne de détection de l'activité antioxydante (CLHP-ABTS⁺).
- Identification des composés extraits à partir de la partie aérienne des deux plantes, y compris les molécules antioxydantes, par CLHP couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUHP-DAD-SMHR).
- Evaluation des propriétés antioxydantes, anticancéreuses sur une lignée cellulaire du cancer pancréatique (AsPC-1), anti-inflammatoires sur une lignée cellulaire monocyttaire humaine (THP-1) et antimicrobiennes sur diverses souches bactériennes.

Ce travail de thèse est divisé en 4 chapitres. Le premier chapitre comprend une revue bibliographique divisée en deux parties, la première présente une synthèse bibliographique sur la famille des fabacées et sur le genre *Astragalus*, la deuxième résume les activités biologiques décrites pour ce dernier. De plus, un rappel est fait concernant les principes des activités antioxydantes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, qui seront étudiés dans les extraits préparés de la partie aérienne des deux plantes à étudier. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième et le quatrième chapitre sont consacrés à la présentation des résultats et à la discussion.

CHAPITRE I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA FAMILLE DES FABACEES ET LE GENRE *ASTRAGALUS*

I.1. La famille des fabacées

I.1.1. Généralités

Avec 730 genres et plus de 19400 espèces, la famille des fabacées ou légumineuses constitue la troisième plus large famille des angiospermes après les orchidées et les astéracées. Cette famille, répandue dans les régions tropicales et tempérées, est classée deuxième après les poacées sur le plan économique et agricole.

Un fruit en forme de gousse ou légume et des feuilles stipulées constituent les traits communs pour la reconnaissance de cette famille très diversifiée qui comprend des arbres, des arbustes, des herbacées, des plantes vivaces et d'autres annuelles. Les légumineuses sont aussi caractérisées par leur capacité à fixer l'azote via une association symbiotique avec des bactéries qui vivent sur les nodules racinaires de ces plantes [22,23].

I.1.2. Classification des fabacées

La famille des fabacées appartient à l'ordre des fabales et constitue une importante famille parmi les dicotylédones [24]. En 2009, le groupe de phylogénie des angiospermes (*Angiosperm Phylogeny Group*) a proposé la classification APG III dans laquelle les fabacées sont divisées en trois sous-familles : les Papilionoideae ; les Caesalpinioideae et les Mimosoideae [25]. Plus récemment, en 2017, une nouvelle classification a été annoncée par le Legume Phylogeny Working Group selon laquelle la famille des fabacées est divisée en six sous-familles : les Duparquetioideae ; les Cercidoideae ; les Detarioideae ; les Dialioideae ; les Caesalpinioideae et les Papilionoideae (*Figure I.1*) [26].

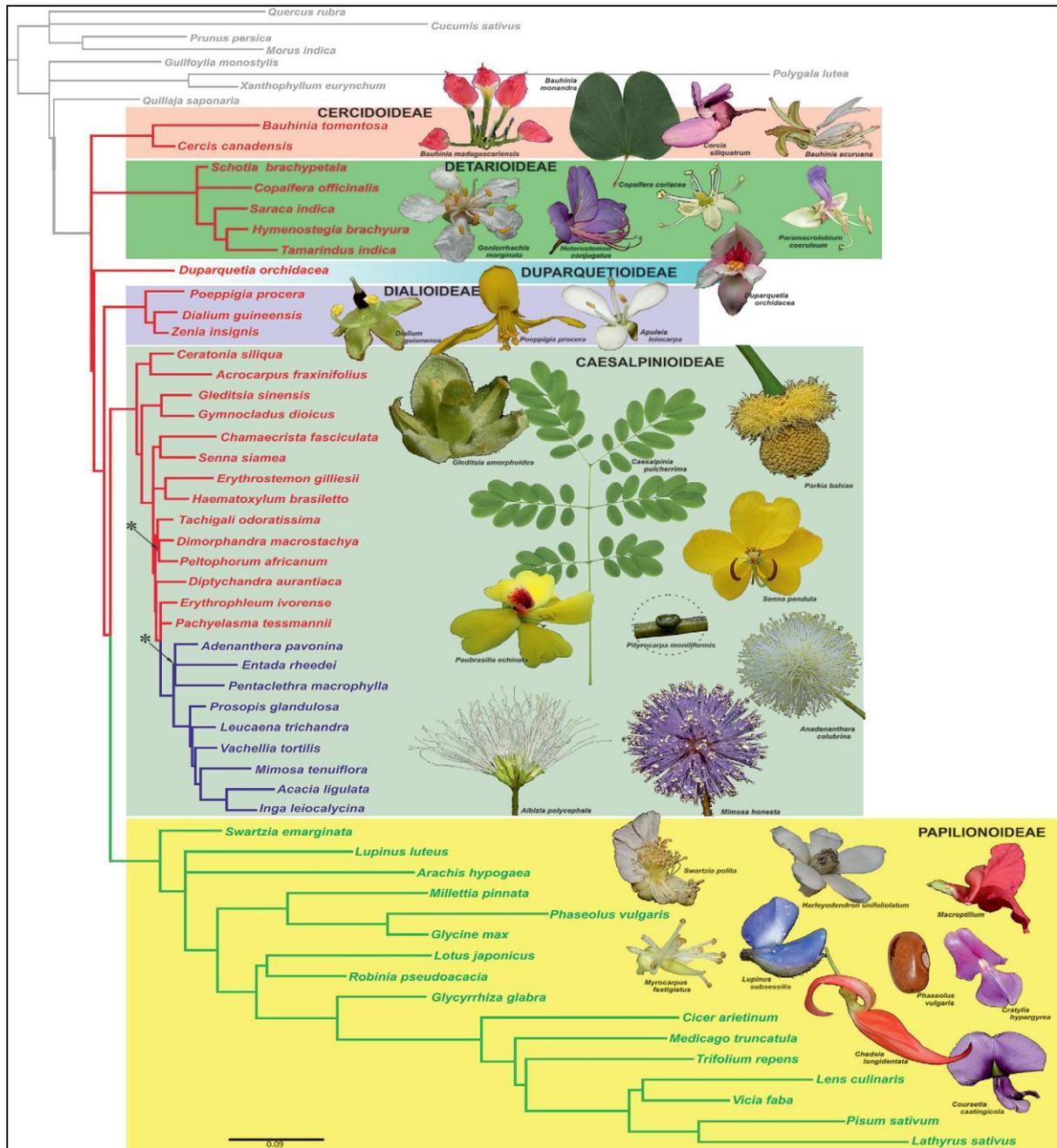


Figure I. 1. Phylogénie et classification des sous-familles de légumineuses.

Les six sous-familles sont indiquées par les cases colorées à droite de la phylogénie. Les branches colorées indiquent les trois sous-familles traditionnellement reconnues des Leguminosae. Le rouge montrant les Caesalpinioideae paraphylétiques à l'ancienne, le bleu les Mimosoideae et le vert les Papilionoideae.

I.1.3. Sous-famille des papilionacées

C'est la plus large et la plus variée parmi les six sous-familles des fabacées, comptant approximativement 476 genres et 13860 espèces et comprenant des petits arbustes (ex. : *Arbus precatorius*), des herbes (ex. : *Pisum sativum*) et des arbres (ex. : *Dalbergia sissoo*). Les fleurs sous forme de papillon avec un calice ayant 5 sépales plus ou moins soudés dans un tube et une

corolle formée de 5 pétales inégaux et ayant une symétrie bilatérale. Les feuilles sont généralement simples, alternantes et se terminent parfois par des vrilles. Les fruits sont des gousses bivalves [23,27].

I.1.4. Importance des fabacées

I.1.4.a. Importances alimentaire, agronomique et industrielle

Les fabacées, surtout celles à graines, ont un intérêt dans l'alimentation humaine (fève, pois sec, pois chiche, lentille, haricot, arachide, soja, etc.) et animale (luzerne, vesce, trèfle, etc.) et ceci en raison de leur richesse en lipides et en protéines. La capacité des fabacées à fixer l'azote atmosphérique grâce à l'association symbiotique des nodules racinaires avec les bactéries du sol (rhizobium) est utile sur le plan agronomique parce qu'elle favorise la fertilisation du sol. Par ailleurs, plusieurs espèces de fabacées ont un intérêt industriel. On peut citer à titre d'exemples les *Derris* et les *Lonchocarpus* (production de roténone, un insecticide) ou encore le soja (*Glycine max*) dont l'importance économique est aujourd'hui mondiale [28].

I.1.4.b. Importance thérapeutique

La famille des fabacées est riche en espèces utilisées dans différentes médecines traditionnelles et ayant des propriétés thérapeutiques plus ou moins avérées. Parmi ces espèces, on peut citer :

- ❖ **Le soja** : très riche en protéines, en vitamines, en calcium et en composés bioactifs d'où son intérêt nutritionnel et sanitaire. Il est utilisé dans le régime alimentaire des personnes diabétiques et permet d'abaisser le taux de cholestérol selon la FDA. Des études ont également montré que les isoflavones présentes dans le soja contribuent à la réduction du risque de cancer de la prostate [29].

- ❖ **L'arachide (*Arachis hypogaea* L.)** : il s'agit d'une excellente source des composés bioactifs comme le resvératrol, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les phytostérols et le co-enzyme Q10, en plus des acides aminés, particulièrement l'arginine. Ces composés sont reconnus pour leurs activités préventives de maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, cancer, Alzheimer...) et sont supposés favoriser la longévité [30].

- ❖ Diverses autres espèces de la famille des fabacées sont connues dans les médecines traditionnelles pour leurs propriétés anti-inflammatoires (genre *Acacia*),

antimicrobiennes (*Caesalpinia pulcherrima*), antidiabétiques (*Delonix regia*), antipaludiques (*Pisum sativum*), antipyrétiques (*Trigonella foenum-graecum*) et laxative (*Tamarindus indica*), etc. [31].

I.2. Le genre *Astragalus*

I.2.1. Généralités

Astragalus est un genre très diversifié de la sous-famille des papilionacées, le plus important parmi les plantes à fleurs, comportant plus de 2500 espèces dont de nombreuses sont endémiques. L'Eurasie, et surtout les régions situées entre les montagnes du sud-ouest asiatique et le plateau de l'Himalaya constituent l'origine probable des Astragales [32].

I.2.2. Répartition géographique

Le genre *Astragalus* est largement réparti sur le globe avec une présence importante dans la région de l'Asie du sud (1000-1500 espèces), en Amérique du nord (400-500 espèces), en Amérique du sud (100 espèces), en Europe (133 espèces) et autour de la chaîne de l'Himalaya (500 espèces) [33]. Cinq cents espèces ont été décrites dans les pays du bassin Méditerranéen dont une centaine en Afrique du Nord (*Figure I.2*) [34]. Au Liban, ce genre est représenté par 62 espèces et sous espèces dont 22 espèces sont endémiques [15].

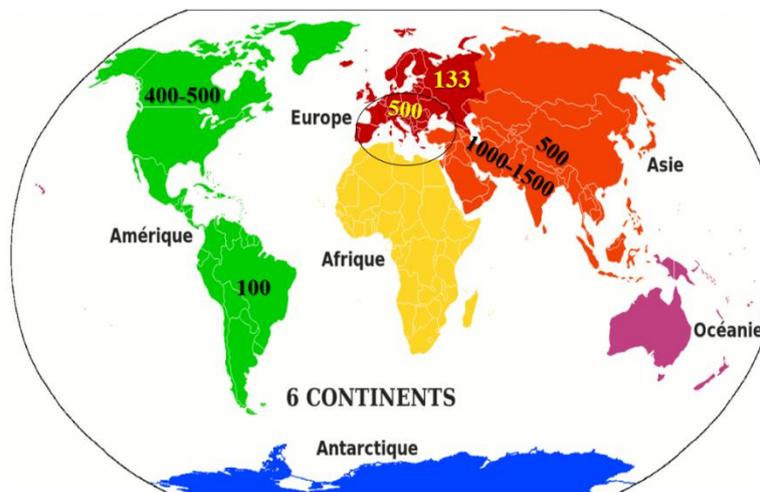


Figure I. 2. Distribution mondiale du genre *Astragalus*

I.2.3. Classification et botanique du genre *Astragalus*

I.2.3.a. Classification du genre

La classification des astragales (*Figure I.3*) a commencé avec Tournefort en 1700 qui a distingué deux genres très proches : *Tragacantha* et *Astragaloides* [35]. Linné en 1753 a réuni les genres *Astragalus* et *Tragacantha* sous un seul genre, *Astragalus*, qu'il a distingué d'un

autre genre encore très voisin, *Phaca* (correspondant à *Astragaloides* L.) en se basant sur le caractère de la présence ou de l'absence d'une séparation longitudinale des gousses [36]. Plus tard, Candolle en 1802 a divisé le genre *Astragalus* en deux genres distincts ; *Astragalus* possédant une carène obtuse et une gousse biloculaire à suture ventrale et *Oxytropis* ayant une carène apiculée et une gousse biloculaire à suture dorsale [37]. Ensuite, de nombreuses études ont été réalisées sur les astragales, notamment les espèces Européennes [38–40] et Américaines [41–49]. Les travaux de Bunge en 1868 ont distingué huit sous-genres (*Pogonophace*, *Trimeniaeus*, *Phaca*, *Hypoglottis*, *Calycophysa*, *Tragacantha*, *Cercidothrix* et *Calycocystis*) et 105 sections [38]. Alors que Podlech (1983), en se basant sur des critères phytodermologiques (trichomes simples ou latéraux), suggère de réduire le nombre de sous-genres à trois, suite à des ressemblances constatées dans les caractéristiques morphologiques utilisées dans la classification infra-générique de Bunge [50]. Cependant, Zarre et Podlech (1997), suite à l'évaluation des différences anatomiques et morphologiques, ont décidé de regrouper le genre *Astracantha* dans le genre *Astragalus* [51].

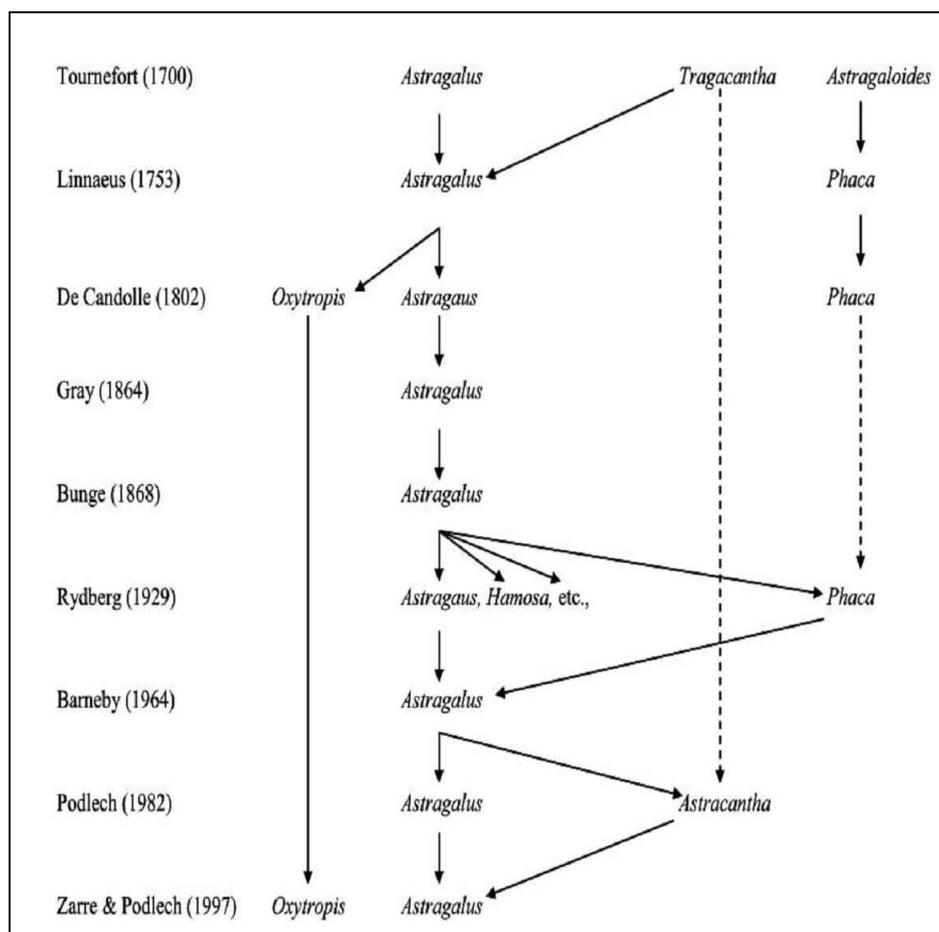


Figure I. 3. Classification historique du genre *Astragalus*

[52]

I.2.3.b. Description botanique

Les plantes du genre *Astragalus* sont vivaces ou annuelles, ce sont des herbes à tige ou de petits arbustes (150 à 200 cm), poussant à partir de racines souterraines. Les feuilles sont alternes, imparipennées ou paripennées se terminant parfois en épine [53]. Les fleurs sont réunies en grappes racémiques ou axillaires, sessiles ou pédicellées, et selon Quézel et Santa (1962), ces fleurs sont caractérisées par un calice persistant ou caduque, tubuleux en cloche, à 5 sépales subégales ou inégales. La corolle est caractéristique des papilionacées et les pétales sont généralement longuement onguiculés avec un ovaire pluri-ovulé à ovules sur 2 rangs de formes variées au sommet. Le fruit est une gousse sèche de formes variées généralement pluriloculaire à deux loges plus ou moins complètes par introflexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente [54].

I.2.3.c. Cas d'*A. emarginatus* Labill. (AEL) et d'*A. coluteoides* Will.

I.2.3.c.1. Position systématique

La classification systématique de ces deux espèces d'astragales se réfère à la classification phylogénétique APG III établie par l'*Angiosperm Phylogeny Group* (Tableau I.1) [25].

Tableau I. 1. Classification systématique d'*A. emarginatus* Labill et *A. coluteoides* Will.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabale
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Papilionaceae
Genre	<i>Astragalus</i>
Espèce	- <i>A. emarginatus</i> Labill. - <i>A. coluteoides</i> Will.

I.2.3.c.2. Écologie et description botanique

➤ *A. emarginatus* Labill.

Il s'agit d'une plante endémique au Liban et à la Syrie où elle pousse dans les régions montagneuses (Figure I.4). Au Liban, on la retrouve à Aarsal, Nahleh, Ourghouch, Tannourine, Kneisseh, Arz-chouf et Barouk. Plante non épineuse à tige courte de 5 à 15 cm et vêtue d'un duvet gris à jaunâtre. Les feuilles qui peuvent faire jusqu'à 20 cm de long, sont formées de 18 à 30 paires de folioles linéaires-oblongues, rétuses, gris-claires ou gris-jaunâtres et ayant des

stipules réunies en une seule stipule triangulaire-lancéolée et biacuminée. Les fleurs possèdent de longs pédoncules épais pouvant mesurer avec la fleur plus de 50 cm. La grappe florale est dense et se présente en capitule ovée à ovée-oblongue de 2 à 5 cm de long. Les bractées sont lancéolées et très hispides. Le calice, également très hispide, possède des dents subulées plus courtes que le tube ou l'égalant. La corolle est pourpre et dépasse de peu le calice avec un étendard plus long que les autres pétales. La floraison dure du juin à août. Le fruit est en forme de gousses courtes, mucronées et entourées par un revêtement hirsute à poils très longs [10,55].

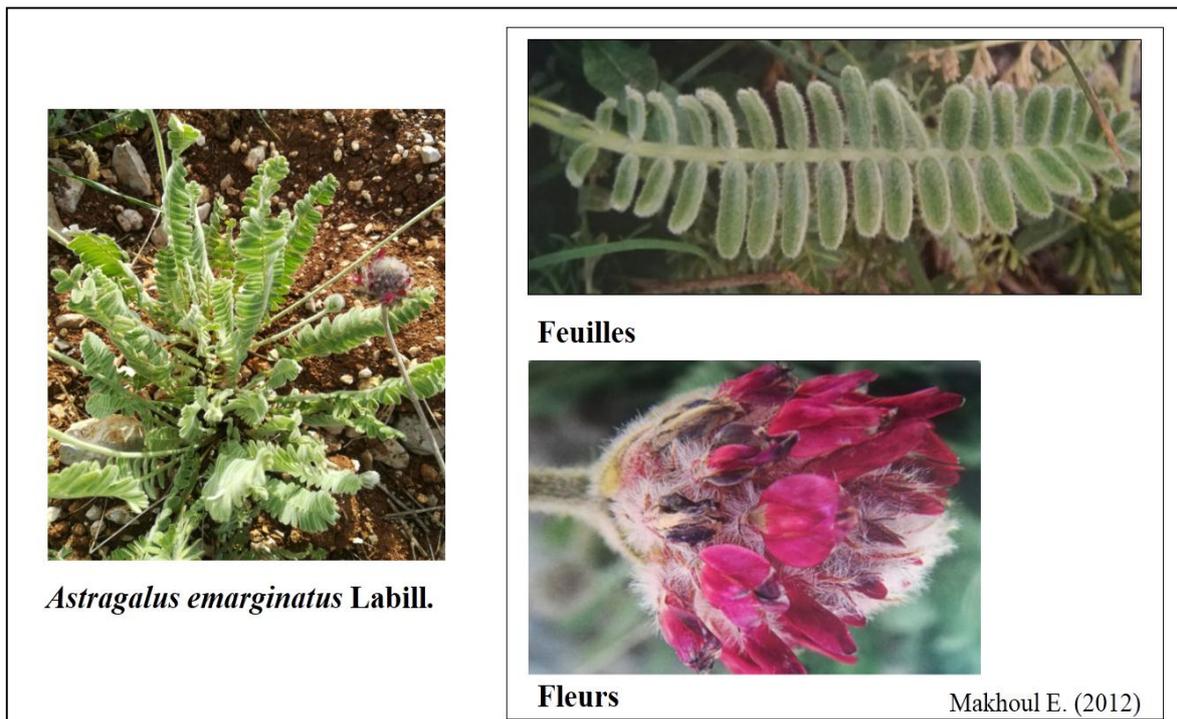


Figure I. 4. *A. emarginatus* Labill.

➤ **A. coluteoides Will.**

Il s'agit d'un sous-arbrisseau de 10 à 30 cm de taille endémique aux régions montagneuses du Liban et de la Syrie (Figure I.5). Au Liban, on le retrouve à Yammouneh, Bcharreh, Barouk, Ehden et Aarsal. Les feuilles sont nombreuses, épineuses, serrées et composées de 15 à 20 paires de folioles décroissantes de la base au sommet, ovées à elliptiques et pubescentes sur les 2 faces. Les fleurs sont composées de 1 à 6 fleurs subsessiles tenues par des pédoncules scapiliformes de même longueur que les feuilles. Les bractées sont ovées, assez larges et caduques. Les bractéoles sont linéaires, ciliées et courtes. Le calice, d'environ 1 cm de longueur, est rougeâtre, tubulaire, hirsute et à dents lancéolées. Après l'anthèse, il devient dilaté, vésiculeux et strié de lignes pourpres longitudinales. La corolle est rose-pale et les fruits sont sous formes des graines réniformes [10,55].

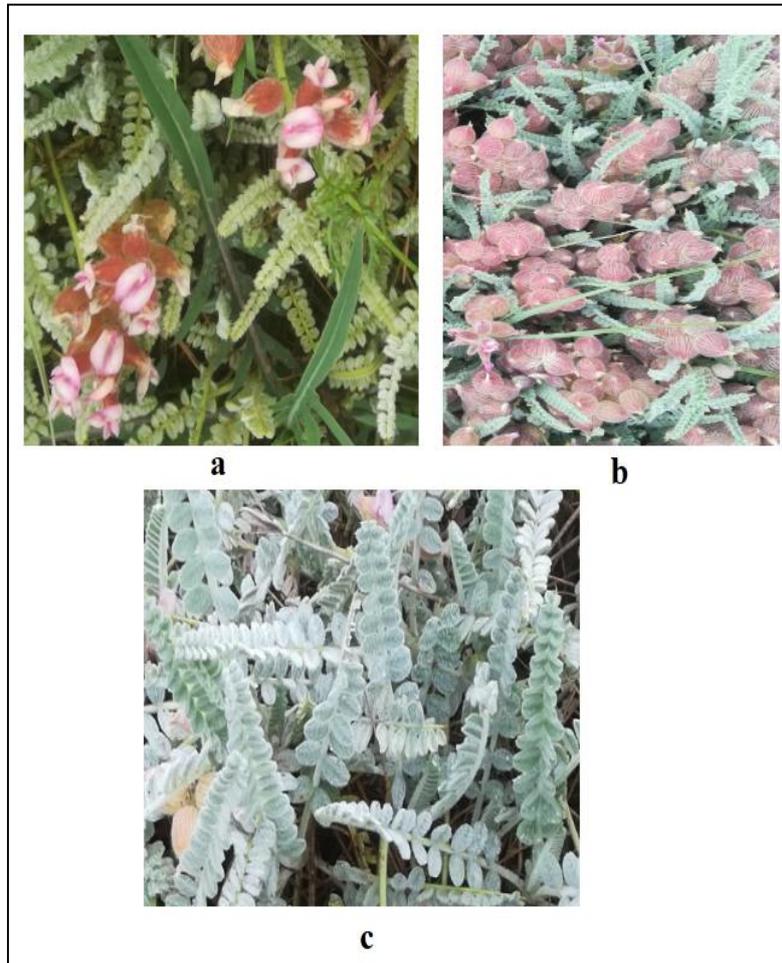


Figure 1.5. *A. coluteoides* Will.

a : fleurs, b : fruits, c : feuilles

1.2.4. Importance du genre Astragalus

1.2.4.a. Importance économique

Plusieurs espèces d'*Astragalus*, comme *A. gummifer* et *A. microcephalos*, sont largement utilisées dans les industries pharmaceutique et alimentaire. L'exsudat (tragacathe) obtenu à partir de la sève mucilagineuse de ces plantes est utilisé pour ses propriétés émulsifiantes et épaississantes dans la production des divers produits pharmaceutiques (lotions et lubrifiants) et alimentaires (sauces, boissons, crèmes glacées, etc.) [56].

1.2.4.b. Importances pharmaceutique et médicinale.

Depuis des millénaires, les espèces d'astragales ont été utilisées dans les médecines traditionnelles, notamment chinoise. D'ailleurs, des études portant sur des extraits de diverses espèces d'*Astragalus* ont montré une grande diversité d'activités biologiques comprenant des activités immunostimulantes, anti-inflammatoires, antidiabétiques, anticancéreuses, cardio-

protectrices antifongiques, antimicrobiennes et antioxydantes [57,58]. Au-delà des extraits, des études ont montré que des composés isolés d’astragales tels que la formononétine, un phytoestrogène, accélèrent la cicatrisation, d’autres tels que l’astragaloside IV protègent les cellules endothéliales contre le stress oxydant en exerçant des effets antioxydants protecteurs des acides gras libres ou de l’homocystéine [59]. Dans le cadre d’essais cliniques, des extraits standardisés ont même été testés avec succès en injections intraveineuses comme adjuvants pour le traitement du cancer, de la tuberculose, de l’anémie et d’autres affections [60]. Diverses autres utilisations médicinales des espèces d’*Astragalus* sont présentées au *Tableau I.2*.

Tableau I. 2. Exemples d’utilisations thérapeutiques des plantes du genre *Astragalus*

Nom scientifique	Partie utilisée	Usage
<i>A. membranaceus</i>	Racines séchées	- Traitement du rhume, d’anorexie, de la fatigue et de la diarrhée et des maladies cardiovasculaires [61]. - Renforcement du système immunitaire et réduction du développement des tumeurs [62].
<i>A. caprinus</i>	Feuilles	-Traitement d’hémorroïdes [63]
<i>A. gombo</i>	Racines	-Traitement de pityriasis [63]
<i>A. armatus</i>	Partie aérienne	-Soulagement des morsures de scorpions et de serpents [64]
<i>A. tenuifolios</i>	Tiges feuillées	-Contre la fatigue [64]
<i>A. tenuifolios</i>	Racines avec feuilles	-Traitement d’helminthiase [64]

I.3. Métabolites secondaires du genre

Les principaux composés bioactifs du genre *Astragalus* sont les saponines, les flavonoïdes et les polysaccharides, les acides phénoliques, les stérols, les lignanes, les coumarines et les complexes sesquiterpéniques-flavonoliques, les acides aminés et les alcaloïdes [65].

I.3.1. Les saponines

Les saponines triterpènes et les sapogénines sont les métabolites secondaires les plus étudiés chez le genre *Astragalus*. Ils sont rassemblés en 4 groupes :

a. Triterpénoïdes de type cycloartanes

Les astragales forment une source dominante de saponines de type cycloartanes qui ont été découvertes pour la première fois dans ce genre. Les cycloartanes se trouvent dans les plantes soit sous forme libre, soit liées aux sucres. Ces terpènes peuvent être divisés en 4 sous-groupes : les cycloastragénols, les cyclogalégénines, les cyclocanthogénines et les cyclocephalogénines. Ce sont des dérivés du cycloartenol qui subit des oxydations (typiques en C6, C16, C20, C23, C24), suivies d’éventuelles fermetures du cycle pour former le cycloastragénol ou la

cyclogalégénine (époxyde en C20,C24), la cycloalpigénine (diépoxyde en C16,C24 ; C20,C24 ou époxyde en C20,C25), et la cycloorbigénine B (diépoxyde en C16,C23 ; C16,C24) [66,67].

b. Lanostanes

Cinq lanostanes sans cycle entre C9 et C10 ont été identifiés chez des espèces d'*Astragalus* au cours de la dernière décennie. En 2003, l'obergénine et son dérivé le 3-*O*-xylopyranoside orbicoside ont été isolés de l'espèce *A. orbiculatus*, alors que les 3 autres ont été isolés plus tard à partir d'*A. leucocephalus* [67].

c. Oléananes

Plusieurs composés de type oléananes ont été identifiés et isolés du genre *Astragalus*. La caractéristique structurale de ce type de saponines est la substitution du méthyle en position 23 par un β -hydroxyméthyle [68].

d. Autres triterpènes

Un triterpène du type ursane (acide ursolique) et deux sapogénines du type lupane (la népéhinone et l'acide bétulinique) ont été également identifiés chez le genre d'*Astragalus* [67].

I.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des constituants majeurs du genre *Astragalus* qui ont attiré l'attention des chercheurs par leurs structures et leurs activités biologiques. Ils comprennent les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavonoïdes et d'autres structures encore. Parmi ceux-ci, les flavonols sont majoritaires, suivis par les isoflavonoïdes. Le *Tableau I.3* présente des exemples de flavonoïdes qui ont été isolés du genre *Astragalus* [65,67–69].

Tableau I. 3. Flavonoïdes isolés du genre *Astragalus*

Catégorie	Nom du composé	Espèces
Flavones	- Apigénine	- <i>A. verrucosus</i>
		- <i>A. bombycinus</i>
	- Apigénine-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	- <i>A. bombycinus</i>
	- Apigénine-7- <i>O</i> -gentobioside	
	- Apigénine-7- <i>O</i> - β -D-rutinoside	- <i>A. onobrychis</i> L.
	- Lutéoline	- <i>A. sinicus</i> L.
		- <i>A. propinquus</i>
	- Lutéoline-7- <i>O</i> - β glucopyranoside	- <i>A. bombycinus</i>
	- Lutéoline-8-C-glucoside (Orientin)	- <i>A. corniculatus</i>
	- Cosmoisine	- <i>A. ammodendron</i>
- Salvigénine	- <i>A. propinquus</i>	

	- 5,7,2'-trihydroxyflavone	- <i>A. cruciatus</i>
	- 7-Hydroxyflavone	- <i>A. microcephalus</i>
Flavonols	- Kaempférol	- <i>A. asper</i> - <i>A. corniculatus</i>
	- Kaempférol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (Astragaline)	- <i>A. hamosus</i> - <i>A. asper</i>
	- Kaempférol-3- <i>O</i> -robinobioside	- <i>A. verrucosus</i>
	- Isorhamnétine	- <i>A. corniculatus</i>
	- Isorhamnétine-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	- <i>A. tribuloides</i> - <i>A. annularis</i>
	- Isorhamnétine-3- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (Narcissine)	- <i>A. maximus Willd</i> - <i>A. galegiformis L.</i>
	- Quercétine	- <i>A. corniculatus</i> - <i>A. asper</i>
	- Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	- <i>A. asper</i>
	- Rutine (quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside)	- <i>A. asper</i> - <i>A. verrucosus</i>
	- Quercétine-3- <i>O</i> -robinobioside	- <i>A. capriosus Borris</i>
	- Quercimeritrine	- <i>A. asper</i>
	- Hyperin	- <i>A. corniculatus</i>
	- Rhamnétine	- <i>A. floccosifolius</i>
	- Myricétine	- <i>A. cornplanatus R. Br.</i>
	- Flagalosite C	- <i>A. galegiformis</i>
	- Flagalosite D	
	- Complanatuside	- <i>A. cornplanatus R. Br.</i>
	- Narcissine	<i>A. armatus</i>
	- Astragalosite	- <i>A. torrentum Bunge</i>
Isoflavanes	- 8-Methoxyvestitol	- <i>A. trimestris</i>
	- Isomucronulatol	- <i>Astragali radix (Astragalus membranaceus)</i>
	- Isomucronulatol 7- <i>O</i> -glucoside	
Flavanones	- Naringenin	- <i>A. sinicus L.</i>
	- Liquiritigenin	- <i>A. membranaceus</i>
Isoflavones	- Acicerone	- <i>A. cicer L.</i>
	- Calycosin	- <i>A. complanatus R. Br.</i>
	- Calycosin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	
	- Daidzeine	- <i>A. sinicus</i> - <i>A. peregrinus</i>
	- Formononétine	- <i>A. cicer</i>
	- Ononine	- <i>A. mongholicus</i> - <i>A. verrucosus</i>
	- Cajanine	- <i>A. cicer</i>
	- Pratenseine-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	- <i>A. membranaceus var. mongholicus</i>

1.3.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des constituants importants des astragales connus pour leurs fonctions immunomodulatrices dans le *Radix astragali* (racines sèches) notamment. Ils sont essentiellement composés de glucose, de rhamnose, de galactose, d'arabinose, de xylose, de mannose et d'acides glucuronique et galacturonique [72]. Treize polysaccharides ont été isolés à partir d'un extrait de la partie aérienne d'*A. mongholicus* Bunge dont les bioactifs (activité immunomodulatrice) étaient composés d'arabinogalactanes, d'arabinogalactanes pectiques ou de pectines [73]. Des galactomannanes ont également été isolés à partir de graines d'*A. alpinus* et *A. tibetanus* [74].

1.3.4. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires aromatiques caractérisés par la présence d'un groupement carboxylique. Ils sont très répandus dans le règne végétal où on les trouve par exemple dans les baies tels que les raisins, les framboises, les fraises, les canneberges, ainsi que dans les fruits à coque tels que les noix. Ils sont divisés en deux groupes distincts selon la taille de la chaîne carbonée, les acides hydroxycinnamiques ayant une chaîne à 9 carbones (C6-C3) et les acides hydroxybenzoïques ayant une chaîne à 7 carbones (C6-C1). Les principaux acides phénoliques appartenant à ces deux groupes d'acide phénoliques sont représentés par le *Tableau I.4* et le *Tableau I.5*.

Tableau I. 4. Les principaux acides hydroxycinnamiques

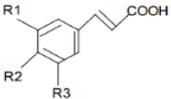
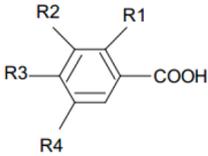
	R1	R2	R3	Acides hydroxycinnamiques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Tableau I. 5. Les principaux acides hydroxybenzoïques.

	R1	R2	R3	R4	Acides hydroxybenzoïques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p- hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicilique

Les activités biologiques des acides phénoliques comprennent des activités anti-cancéreuses, anti-inflammatoires, anti-diabétiques, antioxydantes, antimicrobiennes et plusieurs autres [75]. Parmi les autres métabolites secondaires isolés du genre *Astragalus*, on peut citer les phénylpropanoïdes (acide phenylpropioniques, coumarines et lignanes), les alcaloïdes (uridine, adénosine et astragaline) et les stéroïdes [67].

I.4. Toxicité du genre *Astragalus*

Selon la nature de la toxine dominante et le type d'intoxication qu'elle provoque, les espèces toxiques d'astragales sont classées en trois groupes [33] :

- Les astragales qui synthétisent des produits nitrés.
- Les astragales qui accumulent du sélénium.
- Les astragales qui contiennent des alcaloïdes indolizidiques

PARTIE II - ACTIVITES BIOLOGIQUES

II.1. Spectre d'activités chez *Astragalus*

Les plantes médicinales sont riches en métabolites secondaires qui sont à l'origine des nombreuses activités biologiques. Les extraits ou les composés isolés du genre *Astragalus* ont montré une multitude d'activités biologiques qui sont résumées dans le *Tableau I.6.*

Tableau I. 6. Activités biologiques des extraits ou des composés isolés des espèces d'Astragalus

Activités biologiques	Extraits ou composés isolés des espèces d' <i>Astragalus</i>
Antimicrobienne	- Extrait hexanoïque d' <i>A. verrucosus</i> [76] - Extrait CHCl ₃ d' <i>A. danicus</i> [77] - Soyasaponine I [78]
Antifongique	- Apigénin-7- <i>O</i> - β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D- glucopyranoside [78] - Extraits BuOH et EtOH d' <i>A. verrucosus</i> - Astraverrucine II [76]
Anticancéreuse	- Formononetine [79] - Saponines totales d' <i>A. membranaceus</i> [80] - Rhamnocitrin 4'- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside [81]
Antioxydante	- <i>Radix astragali</i> [82] - Daidzeine et Daidzine [83]
Anti-inflammatoire	- Calycosin-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside [84] - Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [85]
Cytotoxique	- Extrait (injecté) d' <i>A. membranaceus</i> [86] - Quercétine et apigénine [87] - Extraits volatils d' <i>A. hamosus</i> [88]
Hépatoprotective	- Astragaloside IV [89] - Flavonoïdes Totaux d' <i>A. membranaceus</i> [90]
Anti-VIH	- Calycosin-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside [91]
Immunomodulatrice	- Astraverrucine IV et cycloaraloside isolés d' <i>A. Peregrinus</i> [92] - Extrait éthanolique de <i>Radix astragali</i> [93] - Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [94]
Anti-ulcéreuse	- Les racines <i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao [95]
Anti-hypertensive	- Les racines <i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao [96] - Astragaloside IV [97] - Flavonoïdes d' <i>A. complanatus</i> [98]
Anti-diabétique	- Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [99] - Formononetine, ononine, calycosine et calycosin-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside isolés de <i>Radix astragali</i> [100] - Astragaloside II, isoastragaloside I [101]
Neuro-protective	- Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [102]
Cardio-protective	- Formononetine [103] - Astragaloside IV [104]

	- Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [105]
Rénal-protective	- Extrait aqueux de <i>Radix astragali</i> [105]
Gastro-protective	- Astragaloside IV [106]

II.2. Activité antioxydante

II.2.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules, atomes ou ions ayant des électrons non appariés dans leur orbitale atomique externe. Ils sont très actifs et capables de réagir avec d'autres molécules en leurs arrachant un électron [6]. L'oxygène, l'azote et le soufre sont à l'origine de la formation de ces radicaux qui comprennent des espèces réactives de l'oxygène (ERO), des espèces réactives de l'azote (ERN) et des espèces réactives du soufre (ERS) [107]. Parmi ces espèces, les ERO constituent la classe de radicaux la plus importante. Les radicaux primaires tel que l'anion superoxyde O_2^{\bullet} , le radical hydroxyle OH^{\bullet} et le monoxyde d'azote NO^{\bullet} sont formés directement à partir de l'oxygène ou de l'azote par une réaction de réduction; alors que les radicaux secondaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le nitroperoxyde (ONOOH) et l'oxygène singulet 1O_2 proviennent des radicaux primaires qui ne possèdent pas d'électrons libres mais qui peuvent être des précurseurs de radicaux libres suite à leur réaction avec des composés cellulaires [108]. Deux voies endogènes majeures sont à l'origine de la production d'ERO par l'organisme. La première a lieu au niveau des mitochondries, notamment par le processus de la phosphorylation oxydative (production d'ATP) qui s'effectue au niveau de leur membranes internes par l'intermédiaire des chaînes de transport d'électrons et qui conduit à la réduction tétravalente de l' O_2 en eau et donne naissance à des ERO. La *Figure 1.6* présente les quatre étapes de la réduction de l'oxygène ; la formation des intermédiaires partiellement réduits y est aussi décrite [109].

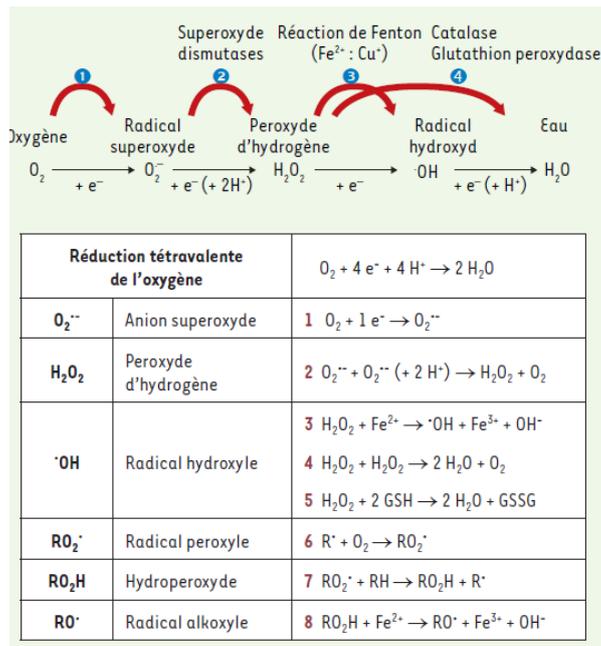


Figure I. 6. Description des quatre étapes de la réduction de l'oxygène avec formation d'intermédiaires partiellement réduits

La deuxième voie de production d'ERO fait intervenir les enzymes NOx (NAD(P)H oxydases), essentiellement localisées au niveau de la membrane plasmique. Elles sont responsables de la formation des radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$ en transférant l'électron de la NADPH à l'accepteur final qui est l'oxygène. Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans la défense contre les pathogènes [109].



D'autres enzymes, cytosoliques ou présentes dans divers organites, sont également responsables de la production d'ERO. On peut citer la xanthine oxydase, les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochromes P450), les enzymes de la voie de l'acide arachidonique et les NO synthétases [109]. Enfin, certains processus physiologiques comme le stress et le vieillissement peuvent aussi être à l'origine de la formation d'ERO.

En plus de ces sources endogènes, il existe des sources exogènes de nature physique comme les radiations, ou chimique comme les polluants environnementaux, la fumée (tabac), les pesticides, les solvants industriels et certains médicaments et aliments (Figure I.7) [6].

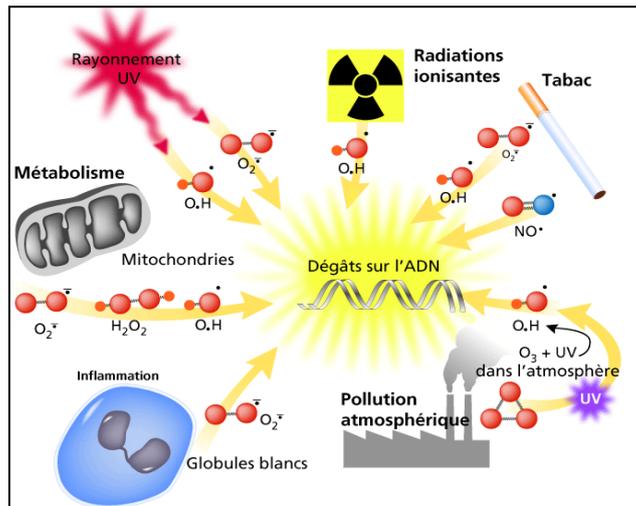


Figure I. 7. Principales sources endogènes et exogènes responsable de la production des radicaux libres

[110]

II.2.2. Stress oxydant

Les radicaux libres sont produits en permanence et en faibles quantités par divers processus physiologiques. Ils sont essentiels pour l'organisme à une dose raisonnable et leur production est parfaitement contrôlée par les systèmes de défense. Il s'agit d'un équilibre pro-oxydants/antioxydants qui peut être perdu suite à une surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire ou à cause d'un déficit nutritionnel en antioxydants ou d'une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (*Figure I.8*). Une quantité excessive des radicaux s'accumule alors dans l'organisme ce qui est désigné par stress oxydant, un phénomène à l'origine de dégradations dans les constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines et glucides) [111].



Figure I. 8. Illustration d'un déséquilibre pro-oxydants/antioxydants dans l'organisme

[112]

Ceci résulte en diverses anomalies pathologiques telles que des mutations, une accumulation anormale de lipides oxydés, la baisse de la fluidité membranaire, la diminution de la sensibilité à l'insuline, la fibrose, la formation d'auto-anticorps, la cancérogenèse, l'immunosuppression

et les malformations fœtales. Ces anomalies sont liées au stress oxydant et sont à l'origine de nombreuses maladies résumées dans le *Tableau I.7* [113].

Tableau I. 7. Relation entre le stress oxydant et certaines pathologies

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
- Agranulomatose septique - Psoriasis	- Cancer - Auto-immunité - Cataracte - Dégénérescence maculaire - Sclérose latérale amyotrophique - Photo-vieillissement cutané - Photosensibilisation - Irradiation - Intoxications (CCl ₄ , Cd, Fe, alcool) - Hémochromatose	-Maladie d'Alzheimer -Stérilité masculine - Maladies virales : EBV, HVB - Rhumatismes - Athéromes - Asthme -Insuffisance respiratoire	- Diabète - Insuffisance rénale - Mucoviscidose - Sida - Choc septique - Infarctus du myocarde - Ishémies/reperfusion - Parkinson - Brûlures - Thalassémie - Greffe d'organes

II.2.3. Antioxydants

Les antioxydants constituent le système de défense de l'organisme contre les ERO qui le protège contre les maladies et le vieillissement. L'antioxydant est défini comme toute substance qui lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde ou empêche considérablement l'oxydation de ce substrat [114]. Les antioxydants peuvent avoir une origine endogène ou exogène à l'organisme.

II.2.3.a. Antioxydants endogènes

Des systèmes de défense enzymatique et non enzymatique au sein des cellules contrôlent la production physiologique de radicaux libres dans notre organisme.

A. Système enzymatique

Les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT) et les glutathion peroxydases (GPx) sont les principales enzymes antioxydantes intervenant dans le piégeage et l'élimination des radicaux libres (*Figure I.9*) [115].

a) Superoxyde dismutases (SOD)

Faisant partie de la famille des métalloenzymes, les SOD forment la première ligne de défense contre les radicaux superoxydes (O₂^{•-}) produits dans les différents compartiments cellulaires en catalysant la dismutation de ces radicaux en H₂O₂ et O₂.



Il existe trois types de SOD communes contenant le Mn, le Fe ou le Cu et le Zn comme métaux protéiques [115].

b) Catalases (CAT)

Les catalases se trouvent essentiellement dans les peroxyzomes où elles transforment le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elles ont des structures tétramériques où chaque sous-unité contient un groupement héminique et est liée à une molécule de NADPH qui renforce son activité et la protège de l'inactivation [116].



c) Glutathion peroxydases (GPx)

Ces enzymes réduisent à la fois le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes organiques (R-OOH), ce sont des enzymes tétramériques à sélénium localisées dans le cytosol et la mitochondrie. Le glutathion réduit (GSH) est utilisé comme un cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène en le transformant en glutathion oxydé (GSSG) [115]. La régénération de glutathion oxydé se fait grâce à l'intervention de la glutathion réductase en présence de NADPH (cofacteur).

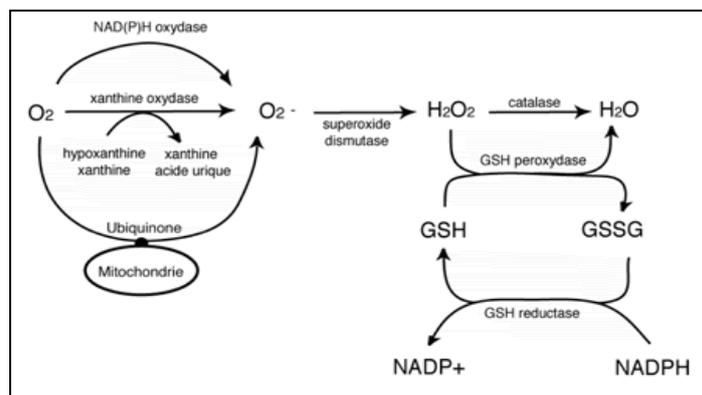


Figure I. 9. Mécanisme de détoxification enzymatique des ERO

[117]

B. Système non enzymatique

Ce système fait intervenir des composés produits par les cellules au cours du métabolisme tels que le glutathion, l'acide lipoïque, la L-arginine, l'ubiquinone, l'acide urique, la mélatonine et la transferrine [118]. Parmi ceux-ci, le glutathion est le métabolite le plus important du fait de

son rôle protecteur non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes et le monoxyde d'azote [111].

II.2.3.b. Antioxydants exogènes

Ces antioxydants sont divisés selon leur origine en deux groupes : les synthétiques et les naturels.

A. Antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA) et le gallate de propyle (GP) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, parce qu'ils sont efficaces et moins chers à produire que les antioxydants naturels (*Figure I.10*). Cependant, ils sont susceptibles de manifester des effets secondaires, même toxiques, ce qui pose des problèmes de sécurité et augmente la demande pour les antioxydants naturels [119].

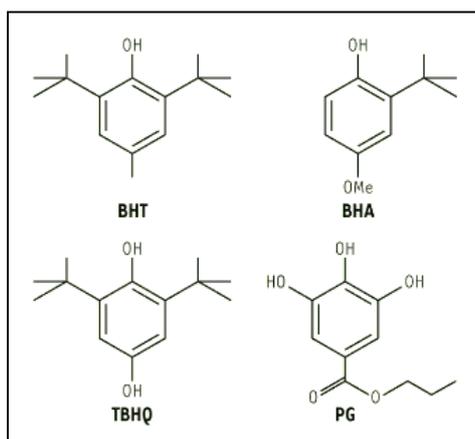


Figure I. 10. Structure de quelques antioxydants synthétiques.

BHT, butylhydroxytoluène ; BHA, butylhydroxyanisole ; PG, gallate de propyle ; TBHQ, tert-butylhydroquinone
[120]

B. Antioxydants naturels

Ce sont des antioxydants le plus souvent apportés par l'alimentation, il s'agit par exemple de la vitamine E (tocophérol), de la vitamine C (acide ascorbique), des caroténoïdes (β -carotène), des polyphénols (flavonoïdes, flavones) ou encore du lycopène (*Figure I.11*) [120].

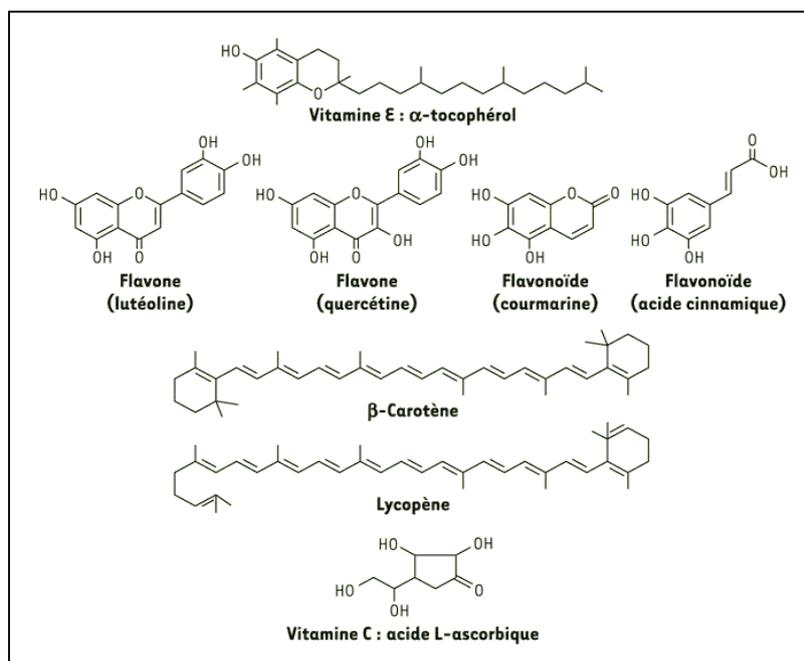


Figure I. 11. Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes

a) Vitamine E

De nature lipidique, la vitamine E regroupe deux familles de quatre tocophérols et quatre tocotriénols dont l' α -tocophérol est la forme la plus active sur le plan biologique. Elle joue un rôle dans la protection des lipides polyinsaturés des membranes biologiques de la lipoperoxydation en piégeant les radicaux peroxydes [121]. Les principales sources alimentaires de vitamine E sont les huiles végétales, les amandes, les noix, les graines, les œufs, le lait et les légumes à feuilles vertes.

b) Vitamine C

La vitamine C se trouve surtout dans les fruits et les légumes frais, elle est particulièrement abondante dans les agrumes et les fruits rouges. Il s'agit d'un antioxydant hydrosoluble au fort pouvoir réducteur qui constitue avec la vitamine E, le sélénium et le bêta-carotène les quatre principaux antioxydants apportés par l'alimentation [122].

c) Caroténoïdes

Les caroténoïdes tels que le β -carotène, la lycopène, la lutéine, le β -cryptoxanthine, la zéaxanthine et l'astaxanthine sont un ensemble d'antioxydants liposolubles d'origine naturelle actifs généralement au niveau des membranes biologiques. Parmi eux, le β -carotène est le plus étudié et le plus abondant dans notre régime alimentaire, il se trouve surtout dans les légumes

à feuilles vertes (ex. épinard), ainsi que dans les fruits et les légumes colorés (ex. carotte, abricot, poivron rouge et chou frisé) [123].

d) Polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires hydrosolubles, présents dans tous les végétaux. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues dont plus de 4000 flavonoïdes. Ces polyphénols sont classés selon leur origine, leur activité biologique et leur structure chimique. Leur caractéristique structurale commune est la présence d'un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyle, et la majorité d'entre eux se trouve sous forme glycosilée. Ils présentent néanmoins des structures très diverses incluant les acides phénoliques, les flavonoïdes, les sous-groupes de flavonoïdes (les isoflavones, les néoflavonoïdes, les chalcones, les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les procyanidines, les anthocyanidines) et les polyphénols amides. L'acide ellagique, le resvératrol, les lignanes, l'acide rosmarinique et la curcumine appartiennent aussi aux polyphénols. De par leur abondance et leur pouvoir antioxydant, les polyphénols jouent un rôle important dans la prévention de nombreuses maladies chroniques [124].

II.3. Activité anticancéreuse

II.3.1. Généralités sur le cancer

Le cancer a été décrit depuis l'antiquité, Hippocrate a attribué le mot grec *Karkinos* (écrevisse) aux tumeurs par analogie aux pattes d'un crabe en raison des ramifications en rayon que présentent certaines d'entre elles [125]. Par définition, le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération excessive des cellules anormales pour former des tumeurs malignes. Ces cellules ont la capacité d'envahir les tissus voisins et de se propager dans le corps pour former des métastases. Selon l'OMS, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité et le nombre de décès va s'accroître dans les prochaines années pour dépasser les 13 millions de morts en 2030 (*Figure I.12*). L'apparition des cancers est liée soit à des facteurs internes tels que l'activité hormonale, les mutations héréditaires et les maladies immunitaires ; soit à des facteurs externes ou environnementaux tels que le tabac, les radiations, le régime alimentaire, l'alcool, etc. [126].

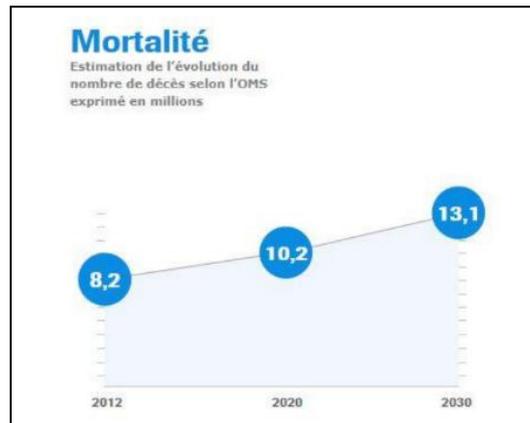


Figure I. 12. Estimation selon l'OMS de l'évolution de la mortalité annuelle liée au cancer au niveau mondial

II.3.2. Cancer du pancréas

Le cancer du pancréas est la forme la plus mortelle de cancer au niveau mondial, il se place au 4^{ème} rang de la mortalité liée au cancer au Japon et dans d'autres pays industrialisés et au 5^{ème} rang aux États-Unis. En général, le diagnostic de ce type de cancer se fait à un stade avancé chez les patients (53%) et le taux de survie à 5 ans ne dépasse pas 2 à 5%. Les cellules cancéreuses pancréatiques sont caractérisées par une tolérance remarquable à la privation de nutriments. Le traitement de ce cancer est un défi étant donné que les cellules souches cancéreuses à l'origine des tumeurs résistent à la chimiothérapie et aux radiothérapies actuelles [127,128].

II.3.3 Relation entre stress oxydant et le cancer

Le stress oxydant est impliqué dans le processus normal de vieillissement, mais aussi dans le développement et la progression de diverses pathologies humaines tels que le diabète, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, mais aussi les cancers. Plus précisément, le stress oxydatif endommage la molécule d'ADN, modifie les voies de signalisation et agit sur la progression de divers cancers. Des études ont montré que les ERO contribuent au développement des tumeurs à travers la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase [129].

1- Ion superoxyde (O₂^{•-})

Il s'agit d'un radical libre peu réactif généré au cours de la synthèse mitochondriale d'ATP, il peut aussi être produit via certaines enzymes des cellules phagocytaires. Ces radicaux sont principalement présents dans les mitochondries où leur accumulation affecte la fonction mitochondriale en inactivant les centres Fe-S dans la chaîne de transport d'électrons ce qui peut

conduire à l'initiation de l'apoptose. Leur niveau est contrôlé par la manganèse-superoxyde dismutase (Mn-SOD) via une conversion en H_2O_2 et en eau [130].

2- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène peut se former spontanément à partir d'oxygène moléculaire dans les peroxisomes, mais il s'en forme quatre fois plus à partir d' $O_2^{\cdot-}$ via l'activité catalytique des SOD. Il est connu pour être mutagène et cancérigène [130].

3- Radical hydroxyle (OH^{\cdot})

Le radical hydroxyle a une structure électronique très instable et il est parmi les espèces réactives d'oxygène les plus préjudiciables aux cellules animales. Sa principale voie de formation passe par la réaction de Fenton en présence des métaux de transition (fer et cuivre) qui décompose l' H_2O_2 en présence de Fe^{2+} . Il est capable d'endommager le squelette du désoxyribose de l'ADN et les quatre bases d'ADN de diverses manières en induisant des ruptures des brins et des modifications structurales. Il est aussi capable d'endommager les gènes suppresseurs de tumeurs et d'augmenter l'expression des proto-oncogènes [130]. Les dommages à l'ADN comprennent la génération de 8-hydroxyguanosine (8-OHG) dont l'hydrolyse génère le 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) qui est impliqué dans la carcinogénèse et est un très bon indicateur d'une attaque radicale contre l'ADN. Sa présence est par exemple constatée dans les tumeurs primaires du sein [131].

4- Oxyde nitrique (NO^{\cdot})

Il s'agit d'un radical libre de courte durée de vie. Il est synthétisé à partir de la L-arginine par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). Les formes neuronales et endothéliales de NOS produisent de petites quantités de NO qui agissent comme un neurotransmetteur et un vasodilatateur, respectivement [132]. L'isoforme inductible de NOS (iNOS) est exprimé seulement en cas d'inflammation et génère des quantités beaucoup plus importantes de NO. Le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) formé suite à la réaction de l'oxyde nitrique avec le superoxyde, est un puissant oxydant impliqué dans de nombreux événements potentiellement cancérigènes, il peut perturber la chaîne de respiration mitochondriale, déclencher la peroxydation lipidique, induire des mutations par transversion (substitution de bases) et hydrolyser l'ADN. Il agit enfin sur la phosphorylation de protéines en nitrant les résidus tyrosine comme dans la protéine p53 [130].

II.3.4. Traitement du cancer

II.3.4.a. Traitement préventif

Il consiste en des mesures destinées à lutter contre l'exposition aux facteurs de risque de la carcinogenèse (prévention primaire), le plus souvent à travers des changements dans les modes de vie : le tabac (cancers broncho-pulmonaires et cancers oro-pharyngo-laryngés et oesophagiens) ; l'alcoolisme (cancers des voies aérodigestives supérieures), le régime alimentaire (cancers de l'estomac, du côlon, du rectum, mais aussi du sein, de l'endomètre et de la prostate) ; l'exposition aux rayonnements (cancers cutanés) ; les infections à papillomavirus (cancers ano-génitaux) ; les infections par les virus des hépatites B et C (cancers du foie) ; et l'infection par le virus VIH (cancer du col utérin et cancer du système lymphatique).

Le traitement préventif peut également consister à traiter les états précancéreux (prévention secondaire), par exemple à travers le dépistage systématique et l'ablation chirurgicale des lésions précancéreuses [133].

II.3.4.b. Traitement curatif

Il comprend des traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, ou l'immunothérapie. Le choix d'un et/ou des traitements dépend du type de cancer, de son stade de développement et du patient. La thérapie chimique consiste à utiliser des molécules le plus souvent synthétiques. Alors qu'elles sont censées cibler les cellules tumorales, ces molécules affectent les cellules saines également, ce qui provoque des effets secondaires considérables. Afin de réduire ces effets indésirables, les recherches ont été orientées vers les produits naturels issus de diverses sources telles que les microorganismes, les plantes, les animaux et les organismes marins comme alternatives aux molécules de synthèse. Il s'agit de découvrir des molécules ayant une activité anticancéreuse plus ciblée et une toxicité réduite. Plusieurs médicaments anti-tumoraux d'origine naturels ont ainsi été approuvés par la FDA au cours des dernières décennies [134,135].

II.3.5. Médicaments anticancéreux à base de plantes

Depuis l'antiquité, les plantes ont été utilisées pour leurs propriétés médicinales. De nos jours, l'intérêt de nombreux composés phytochimiques bioactifs dans la lutte contre l'initiation et la progression du cancer a été démontré. Alors que certains de ces composés peuvent être utilisés dans le traitement de cancers avancés, d'autres ont un rôle préventif en agissant comme des inhibiteurs au cours de premiers stades de la carcinogenèse. Au total, 187 espèces végétales

appartenant à 102 genres et 61 familles ont été identifiées comme sources effectives ou potentielles de composés phytochimiques aux propriétés anti-tumorales. Parmi elles, seules 15 espèces appartenant à dix genres et neuf familles ont été utilisées au niveau clinique dans la chimiothérapie anticancéreuse, le reste étant resté au stade expérimental [136]. Sept médicaments anticancéreux d'origine végétale ont été approuvés par FDA ; la vincristine (1963) ; le vinblastine (1965) ; l'analogue semi synthétique de podophyllotoxine (l'étoposide, 1983) ; le paclitaxel (1989) ; les 2 analogues de camptothécine (l'irinotécan et le topotécan, 1996) ; et le docétaxel (1996). Une autre molécule, la trabectédine, isolée du tunicier marin, a quant à elle été approuvée pour l'usage clinique par la commission européenne en 2007 [134], avant de l'être par la FDA en 2015 pour le traitement des sarcomes [137]. Ces molécules sont aujourd'hui approuvées et utilisées comme anticancéreux dans des dizaines de pays à travers le monde.

II.4. Activité anti-inflammatoire

II.4.1. Généralités

L'inflammation est connue comme une réponse immunitaire naturelle de l'organisme qui se développe suite à une lésion tissulaire. La réaction inflammatoire est la première ligne de défense de l'organisme contre les agents agresseurs. Elle libère rapidement des médiateurs de défense aux endroits infectés ou au niveau des lésions tissulaires. Divers agents peuvent être à l'origine du déclenchement d'une réaction inflammatoire :

- 1- agents infectieux** tels que les bactéries, les parasites, les virus et les champignons ;
- 2- agents physiques** tels que les radiations (rayons UV, X), la chaleur (brûlure), les corps étrangers (prothèse), les traumatismes (plaie), et les nécroses tissulaires (infarctus) ;
- 3- agents chimiques** tels que les toxines et les venins.

Les symptômes de la réaction inflammatoire se ressemblent quelle que soit la nature de l'agent stimulant. La douleur, la rougeur, la chaleur et le gonflement sont les principaux signes de l'inflammation, mais c'est la nature de cytokines secrétées, la durée et l'intensité des manifestations qui changent [138].

II.4.2. Types d'inflammation

Il existe deux types d'inflammation, l'inflammation aiguë qui traduit une réponse initiale du corps à une agression extérieure, et l'inflammation chronique qui traduit une réponse inflammatoire disproportionnée conduisant à des dommages corporels.

II.4.2.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue (*Figure I.13*), c'est la réponse typique du système immunitaire inné, elle est immédiate, de courte durée et fait suite à une exposition à un agent agresseur. En général, ce type d'inflammation guérit rapidement avec ou sans traitement.

L'inflammation aigue comprend trois phases [139] :

- 1- Phase vasculaire.** Elle débute par l'activation des plaquettes qui conduit à une vasoconstriction brève des vaisseaux. Les médiateurs présents dans le sang sont activés contribuant à une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux, puis un recrutement des cellules de l'immunité innée (les macrophages et les cellules dendritiques) vers le lieu de l'inflammation provoquant rougeur et chaleur. La diapédèse s'ensuit et le transfert de l'exsudat plasmatique (eau, protéine plasmatique et cellules immunitaires) conduit à l'apparition de l'œdème.
- 2- Phase cellulaire.** Elle commence suite à l'arrivée des leucocytes au site inflammatoire. Les principaux acteurs de cette étape sont les cellules polynucléaires des neutrophiles qui sont progressivement remplacées par les macrophages qui détruisent les agents pathogènes par leur pouvoir phagocytaire.
- 3- Phase de résolution et de réparation.** Les agents pathogènes, les produits de la dégradation tissulaire et les neutrophiles sont éliminés pendant cette phase. Des cytokines (IL-4 et IL-10), des fibroblastes et des médiateurs vont intervenir pour la cicatrisation, la réparation et la régénération tissulaires.

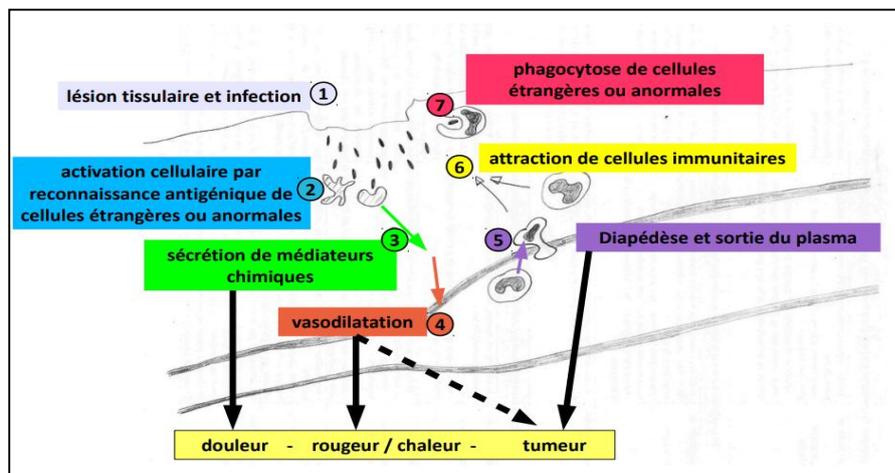


Figure I. 13. Etapes de la réaction inflammatoire aigue

[140]

II.4.2.2. Inflammation chronique

L'échec de la réponse inflammatoire aiguë ou une réponse inappropriée conduit à la persistance de l'agent pathogène et au développement d'une inflammation chronique. Une perturbation de l'équilibre entre les molécules anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13 et TGF- β) et les molécules pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF- α) peut conduire à la destruction des tissus enflammés et entraîner des pathologies [139].

La réponse inflammatoire a pour but "l'encerclement" et l'élimination des agents agressifs, suivie d'une élimination des composants tissulaires endommagés et la guérison des tissus, organes ou systèmes affectés. Les macrophages et les neutrophiles sont impliqués dans la réaction inflammatoire par la sécrétion de divers médiateurs responsables de l'initiation, la progression, la persistance, la régulation et la résolution éventuelle d'une inflammation aiguë [141].

Le *Tableau I.8* résume les principaux médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire, leurs origines et leur activités biologiques.

Tableau I. 8. Principaux médiateurs impliqués dans le processus d'inflammation

Médiateurs	Origines	Effets biologiques
Les cytokines [142] - Pro-inflammatoire (IL-1, IL-6, IFN-γ) - Anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, TGF-β)	Monocytes Macrophages Lymphocytes	- Déclenchent les voies de transduction du signal qui modifient l'expression des gènes de leurs cellules cibles. - Leur action peut être autocrine, paracrine ou endocrine (rare) [143].
Histamine	Basophiles Mastocytes	- C'est un médiateur chimique important qui provoque une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et peut même contribuer à des réactions anaphylactiques [144].
Facteur de la nécrose tumorale (TNF-α)	Macrophages actifs Monocytes	- Favorise la production des cytokines inflammatoires. - Améliore l'adhésion et la perméabilité des cellules endothéliales. - Favorise le recrutement des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes vers les sites d'inflammation [145].
Oxyde nitrique (NO)	Macrophages Mastocytes	- Vasodilatation [146] - Formation d'œdèmes - Induction de la cytotoxicité tissulaire

Médiateurs lipidiques :	Acide arachidonique	- Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, douleur, fièvre et agrégation plaquettaire [147].
- Les prostaglandines (PGE2)		
- Le thromboxane		

II.4.3. Anti-inflammatoires

La douleur, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation sont dues à la sécrétion des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes qui sont synthétisés suite à l'activation de l'enzyme COX (cyclooxygénase) [148]. Deux principaux groupes d'anti-inflammatoires sont couramment utilisés, les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS) [149]. Ces médicaments bloquent l'activité des enzymes COX-1 et COX-2 [150]. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les médicaments les plus fréquemment utilisés par la population, mais ils sont associés à divers effets indésirables sur la santé, notamment des lésions gastro-intestinales, des effets sur les fonctions rénales et des insuffisances cardiovasculaires, etc. [148].

II.4.4. Pouvoir anti-inflammatoire des plantes

De nombreuses plantes médicinales offrent des remèdes à action anti-inflammatoire avec peu ou pas d'effets secondaires. Plusieurs molécules au pouvoir anti-inflammatoire ont été isolées de plantes, comme par exemple la curcumine, le resvératrol, la baicaléine, l'acide bêtaulinique, l'acide ursolique, l'acide oléanolique, la capsaïcine, et l'hypéricine [151]. L'action anti-inflammatoire des extraits des plantes intervient à des stades différents du processus d'inflammation, elle peut agir sur l'inhibition de la formation des cytokines et des eicosanoïdes ; sur la prévention de la cascade des réactions inflammatoires, ou encore sur la réduction de l'irritation et l'exfoliation excessive [141]. Les polyphénols ont été cités pour leur activité anti-inflammatoire. Les flavonoïdes et les acides phénoliques par exemple modulent les niveaux d'expression de diverses cytokines. La lutéoline et la quercétine inhibent la sécrétion de TNF- α par les cellules RAW 264,7 stimulées par des LPS, de même l'apigénine inhibe la production de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-8 [151].

II.5. Activité antimicrobienne

II.5.1. Généralités

Face à la crise mondiale que constitue la résistance des pathogènes aux antibiotiques, la recherche de nouveaux antimicrobiens dans des sources naturelles constitue l'une des voies poursuivies afin de trouver des solutions. A ce titre, les plantes constituent une source

importante de métabolites antimicrobiens faisant partie de leur système naturel de défense et qui peuvent être valorisés dans la lutte contre les microorganismes antibiorésistants [152].

II.5.2. Pouvoir antimicrobien des plantes

Les plantes disposent d'un système de défense contre les microorganismes pathogènes ou invasifs (bactéries, levures et moisissures) basé essentiellement sur la production et la sécrétion de métabolites secondaires. Ce potentiel est exploité par l'homme depuis l'antiquité à travers l'utilisation des plantes et de leurs extraits dans le traitement des infections.

Les métabolites en question sont souvent produits et stockés par les plantes et libérés lors d'une infection ou d'une blessure. Parmi les métabolites bioactifs doués d'un pouvoir antimicrobien, on peut citer les composés phénoliques, les flavonoïdes ou encore les alcaloïdes. Parmi ceux-ci, quelques exemples sont présentés avec leurs modes d'action au *Tableau I.9* [153].

Tableau I. 9. *L'activité antimicrobienne de certaines métabolites secondaires des plantes*

Métabolites	Modes d'action	Exemples
Phénols simples et acides phénoliques	- Privation en substrat - Perturbation de la membrane	- Catéchol - Acide cinnamique - Epicatéchine
Quinones	- Liaison aux adhésines - Complexation aux parois cellulaires - Inactivation des enzymes	- Hypéricine
- Flavonoïdes	- Liaison aux protéines solubles extracellulaires	- Catéchines
- Flavonols	- Liaison aux parois cellulaires	- Chrysrine
- Flavones		
Tannins	- Liaison aux protéines - Liaison aux adhésines - Liaison aux parois cellulaires - Inhibition des enzymes - Privation en substrat - Perturbation de la membrane - Complexation d'ions métalliques	- Ellagitanine
Terpenoïdes, huiles essentielles	Perturbation de la membrane	-Capsaïcine
Alcaloïdes	Intercalants de la paroi et de l'ADN	- Berbérine - Pipérine
Coumarines	Interaction avec l'ADN (activité antivirale)	-Warfarine

I. REFERENCES

- [1] B. B. Petrovska, 'Historical review of medicinal plants usage', *Phcog. Rev.* 6 (2012) 1–5.
- [2] A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E. M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirsch, H. Stuppner, 'Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review', *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1582–1614.
- [3] K. Hostettmann, O. Potterat, J. L. Wolfender, 'The potential of higher plants as a source of new drugs', *Chimia (Aarau).* 52 (1998) 10–17.
- [4] S. M. K. Rates, 'Plants as source of drugs', *Toxicon.* 39 (2001) 603–613.
- [5] M. Daniel, Medicinal Plants: Chemistry and Properties, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, US, 2006.
- [6] G. A. Engwa, 'Free radicals and the role of plant phytochemicals as antioxidants against oxidative stress-related diseases', *IntechOpen.* 2018.
- [7] G. Cao, R. M. Russell, N. Lischner, R. L. Prior, 'Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women', *J. Nutr.* 128 (1998) 2383–2390.
- [8] K. Addam, M. Bou-hamdan, N. Sabbagh, J. Takkoush, K. Hout, 'Crocus baalbekensis and its three forms (IRIDACEAE), new endemic species and forms from Lebanon , joined the Lebanese Flora', *MOJ. Ecol. Environ Sci.* 4 (2019) 75–83.
- [9] R. Khoury, N. Antoun, C. Khater, N. Abou Habib, '<<Revision/Updating of the national biodiversity strategy and action plan (NBSAP) and preparation of the 5th national report (5NR) to the convention on biological diversity (CBD)>>', Beirut, Lebanon, 2015.
- [10] G. E. Post, Flora of Syria, Palestine and Sinai (Volume 1), American University Press, Beirut, Lebanon, 1932.
- [11] P. Mouterde, Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Editions de l'Impr. catholique, Beirut, Lebanon, 1966.
- [12] P. Mouterde, Nouvelle flore du Liban et de la Syrie (Tome 2), Dar El Machreq (imprimerie catholique), 1970.
- [13] P. Mouterde, Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Dar el-Machreq, Beirut, Lebanon, 1983.
- [14] G. Tohmé, H. Tohmé, Illustrated flora of Lebanon, National Council for Scientific

- Research, Beirut, Lebanon, 2007.
- [15] G. Tohmé, H. Tohmé, Illustrated Flora of Lebanon, 2nd ed., National Council for Scientific Research, Beirut, Lebanon, 2014.
- [16] K. Nisrine, N. Jihad, Y. Mariana, ‘Opportunities and limitations in medicinal and aromatic plants’ markets and research in developing countries: Lebanon as a case study’, 2015.
- [17] T. Deeb, K. Knio, Z. K. Shinwari, S. Kreydiyyeh, E. Baydoun, ‘Survey of medicinal plants currently used by herbalists in Lebanon’, *Pak. J. Bot.* 45 (2013) 543–555.
- [18] M. S. Amiri, M. R. Joharchi, M. Nadaf, Y. Nasseh, ‘Ethnobotanical knowledge of *Astragalus* spp. : The world’s largest genus of vascular plants’, *Avicenna J. Phytomed.* 10 (2020) 128–142.
- [19] H. Kanaan, M. El-Mestrah, A. Sweidan, F. As-Sadi, A. A. Bazzal, A. Chokr, ‘Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*’, *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 6 (2016) 50–57.
- [20] A. Adigüzel, M. Sökmen, H. Özkan, G. Açar, M. Güllüce, F. Şahin, ‘In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of *Astragalus* species growing in the eastern Anatolia Region of Turkey’, *Turk. J. Biol.* 33 (2009) 65–71.
- [21] International Organization for Standardization, Traditional Chinese medicine - *Astragalus mongholicus* root, ISO Standard (2020) 22988:2020
- [22] A. H. M. Mahbubur Rahman, M. Ismot Ara Parvin, ‘Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh’, *Res. Plant. Sci.* 2 (2014) 6–8.
- [23] M. F. Wojciechowski, M. Lavin, M. J. Sanderson, ‘A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family’, *Am. J. Bot.* 91 (2004) 1846–1862.
- [24] B. Gaston, Cours de botanique, Librairie générale de l’enseignement, Paris, 1905.
- [25] The Angiosperm Phylogeny Group (APG), ‘An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III’, *Bot. J. Linn. Soc.* 161 (2009) 105–121.
- [26] The Legume Phylogeny Working Group (LPWG), ‘A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny’, *Taxon.* 66 (2017) 44–77.
- [27] N. K. Soni, Fundamentals of botany, Tata McGraw-Hill Education, New York, USA, 2010.

- [28] B. Ouahiba, "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae)", Thèse de doctorat, Université Mentouri - Constantine, 2017.
- [29] M. Kurosu, Chapter 10 - Biologically active molecules from soybeans. In: soybean and health, 1st ed., InTech, Rijeka, Croatia, 2011.
- [30] S. S. Arya, A. R. Salve, S. Chauhan, 'Peanuts as functional food: a review', *J. Food Sci. Technol.* 53 (2016) 31–41.
- [31] F. Ahmad, F. Anwar, S. Hira, 'Review on medicinal importance of fabaceae family', *Pharmacologyonline.* 3 (2016) 151–156.
- [32] M. F. Wojciechowski, 'Astragalus (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective', *Brittonia.* 57 (2005) 382–396.
- [33] S. M. Miri, Y. Shamsolshoara, "Phytochemical and pharmacological properties of *Astragalus* species". In: 2nd National Conference: Medicinal plants and species affecting the fatty liver, Tehran, Iran, 2019.
- [34] A. LABED, "Investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Astragalus armatus* ssp. *numidicus* (Coss. et Dur.) Maire et Synthèse catalytique de nouveaux dérivés julolidines", Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri-Constantine, 2016.
- [35] J. P. D. Tournefort, *Institutiones rei herbariae*, 1700.
- [36] C. Linnaeus, *Species Plantarum*, 1753.
- [37] P. Candolle, *Astragalologia, nempe Astragali, Biserrulae et Oxytropidis, nec non Phaca, Coluteae et Lessertiae, Historia iconibus illustrata*, Parisiis Joann. Bapt. Garnery, 1802.
- [38] A. V. Bunge, *Generis Astragali species Gerontogaeae*, Mem. Acad. Imp. Sci., Saint Petersburg, 1868.
- [39] A. V. Bunge, *Generis Astragali species Gerontogaeae*, Mem. Acad. Imp. Sci., Saint Petersburg, 1869.
- [40] E. Boissier, *Flora Orientalis*, H. Georg., Geneva, Switzerland, 1872.
- [41] J. Torrey, A. Gray, *Tribe Astragaleae. A Flora of North America*, 1838.
- [42] A. Gray, 'A revision and arrangement (mainly by the fruit) of the North American species of *Astragalus* and *Oxytropis*', *Proc. Amer. Acad. Arts.* 6 (1864) 188–236.
- [43] M. E. Jones, *Revision of North American species of Astragalus*, 1923.
- [44] P. A. Rydberg, *Astragalanae, North American Flora*, 1929.
- [45] I. M. Johnston, 'Notes on some *Astragalus* species of Ecuador and Peru', *J. Arnold Arbor.* 19 (1938) 88–96.
- [46] R. C. Barneby, *Atlas of North American Astragalus*, (Memories of the New York

- Botanical Garden), 1964.
- [47] E. Gomez-Sosa, 'Las especies Sudamericanas del genero Astragalus (Leguminosae) I. Las especies Patagónicas Argentinas', *Darwiniana*. 22 (1979) 313–376.
- [48] E. Gomez-Sosa, 'Novedades en el genero Astragalus (Leguminosae Galegeae)', *Darwiniana*. 23 (1981) 507–516.
- [49] E. Gomez-Sosa, 'Novedades en el genero Astragalus, II (Leguminosae- Galegeae)', *Darwiniana*. 24 (1982) 23–31.
- [50] D. Podlech, Zur Taxonomie und Nomenklatur der tragacanthoiden Astragali, Mitt. Bot. Staatss., München, 1983.
- [51] M. S. Zarre, D. Podlech, 'Problems in the taxonomy of tragacanthic Astragalus', *Sendtnera*. 4 (1997) 243–250.
- [52] M. F. Wojciechowski, M. J. Sanderson, J.-M. Hu, 'Evidence on the Monophyly of Astragalus (Fabaceae) and its Major Subgroups Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS and Chloroplast DNA trnL Intron Data', *Syst. Bot.* 24 (1999) 409–437.
- [53] D. Gorai, K. S. Jash, R. Roy, 'Flavonoids from astragalus genus', *International J. Pharm. Sci. Res.* 7 (2016) 2732–2747.
- [54] Q. Pierre, S. Sébastien, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1), CNRS, Paris, 1962.
- [55] E. Makhoul, Les Astragales : A la découverte de la flore libanaise, Presses de l'Université Saint-Joseph, 2012.
- [56] R. L. Whistler, 'Chapter 12 – Exudate gums', 1993.
- [57] R. Arumugam, B. Kirkan, C. Sarikurkcü, 'Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of Astragalus ponticus Pall', *South African J. Bot.* 120 (2019) 268–273.
- [58] H. Teyeb, O. Houta, H. Najjaa, A. Lamari, M. Neffati, W. Douki, M. F. Najjar, 'Biological and chemical study of Astragalus gombiformis', *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 67 (2012) 367–374.
- [59] D. Siwicka, E. Skopińska-Różewska, P. Boderá, 'Review paper Immunotropic and anti-tumor effects of plant adaptogens . III . Astragalus (Fabaceae)', *Cent. Eur. J. Immunol.* 36 (2011) 104–107.
- [60] P. Lefrançois, F. Ruby, 'https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=astragale_ps', (2006).
- [61] M. M. Tin, C. H. Cho, K. Chan, A. E. James, J. K. Ko, 'Astragalus saponins induce

- growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft', *Carcinogenesis*. 28 (2007) 1347–1355.
- [62] M. Mcculloch, C. See, X. Shu, M. Broffman, A. Kramer, W. Fan, J. Gao, W. Lieb, K. Shieh, J. M. jr Colford, 'Astragalus - Based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non - small-cell lung cancer : meta-analysis of randomized trials', *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 419–430.
- [63] H. Teyeb, O. Houta, W. Douki, M. Nefdati, 'Composition chimique et activite antioxydante de l'huile essentielle d'astragalus gombo collectée a partir de deux sites de la tunisie', *J. Soc. Chim. Tunisie*. 14 (2012) 63–67.
- [64] L. El Rhaffari, A. Zaid, "Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée". In: 4ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, Paris, 2002.
- [65] V. M. Bratkov, A. M. Shkondrov, P. K. Zdraveva, I. N. Krasteva, 'Flavonoids from the genus *Astragalus*: Phytochemistry and biological activity', *Pharmacogn. Rev.* 10 (2016) 11–32.
- [66] L. Verotta, N. A. El-Sebakhy, 'Cycloartane and oleanane saponins from *Astragalus* sp.', *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25 (2001) 179–234.
- [67] L. P. Yang, J. G. Shen, W. C. Xuc, J. Lia, J. Q. Jiang, 'Secondary metabolites of genus *Astragalus*: Structure and biological activity update', *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 1004–1054.
- [68] X. Li, L. Qu, Y. Dong, L. Han, E. Liu, S. Fang, Y. Zhang, T. Wang, 'A review of recent research progress on the *Astragalus* genus', *Molecules*. 19 (2014) 18850–18880.
- [69] D. Gorai, S. K. Jash, R. Roy, 'Flavonoids From *Astragalus* Genus', *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7 (2016) 2732–2747.
- [70] I. Krasteva, I. Nikolova, N. Danchev, S. Nikolov, 'Phytochemical analysis of ethyl acetate extract from *Astragalus corniculatus* Bieb. and brain antihypoxic activity', *Acta Pharm.* 54 (2004) 151–156.
- [71] N. N. Guzhva, 'Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *astragalus asper*', *Chem. Nat. Compd.* 46 (2010) 303–304.
- [72] J. Wang, J. Jia, L. Song, X. Gong, J. Xu, M. Yang, 'Extraction , Structure , and Pharmacological Activities of *Astragalus* Polysaccharides', *Appl. Sci.* 9 (2019).
- [73] H. Kiyohara, T. Uchida, M. Takakiwa, T. Matsuzaki, N. Hada, T. Takeda, T. Shibata, H. Yamada, 'Different contributions of side-chains in beta-D-(1-->3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus*

- mongholicus Bunge. Phytochemistry', *Phytochemistry*. 71 (2010) 280–293.
- [74] D. N. Olennikov, A. V. Rokhin, 'Polysaccharides of fabaceae. VI. Galactomannans from seeds of *Astragalus alpinus* and *A. tibetanus*', *Chem. Nat. Compd.* 47 (2011) 343–346.
- [75] V. Saibabu, Z. Fatima, L. A. Khan, S. Hameed, 'Therapeutic potential of dietary phenolic acids', *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015 (2015).
- [76] L. Pistelli, A. Bertoli, E. Lepori, I. Morelli, L. Panizzi, 'Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*', *Fitoterapia*. 73 (2002) 336–339.
- [77] A. S. Gromova, V. I. Lutsky, J. G. Cannon, D. Li, N. L. Owen, 'Secondary metabolites of *Astragalus danicus* Retz. and *A. inopinatus* Boriss', *Russ. Chem. Bull.* 50 (2001) 1107–1112.
- [78] A. El-Hawiet, S. M. Toaima, A. Asaad, M. Radwan, N. El-Sebakhy, 'Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae', *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 860–865.
- [79] K. Auyeung, J. Ko, 'Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell.', *Invest. New Drugs*. 28 (2010) 1–13.
- [80] K. K. Auyeung, P. C. Law, J. K. Ko, 'Astragalus saponins induce apoptosis via an ERK-independent NF- κ B signaling pathway in the human hepatocellular HepG2 cell line', *Int. J. Mol. Med.* 23 (2009) 189–196.
- [81] I. Krasteva, G. Momekov, P. Zdraveva, S. Konstantinov, S. Nikolov, 'Antiproliferative effects of a flavonoid and saponins from *Astragalus hamosus* against human tumor cell lines', *Pharmacogn. Mag.* 4 (2008) 269–272.
- [82] S. Toda, Y. Yase, Y. Shirataki, 'Inhibitory effects of *Astragali Radix*, crude drug in Oriental medicines on lipid peroxidation and protein oxidative modification of mouse brain homogenate by copper', *Phyther. Res.* 14 (2000) 294–296.
- [83] S. Toda, Y. Shirataki, 'Comparison of antioxidative and chelating effects of daidzein and daidzin on protein oxidative modification by copper in vitro', *Biol. Trace Elem. Res.* 79 (2001) 83–89.
- [84] S. I. Choi, T. R. Heo, B. H. Min, J. H. Cui, B. H. Choi, S. . Park, 'Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-O-beta-D-glucopyranoside (CG) isolated from *Astragali Radix* (AR) in rabbit osteoarthritis (OA) model', *Osteoarthr. Cartil.* 15 (2007) 1086–1092.
- [85] Y. H. Shon, K. S. Nam, 'Protective Effect of *Astragali Radix* Extract on Interleukin 1beta-induced Inflammation in Human Amnion', *Phyther. Res.* 17 (2003) 1016–1020.

- [86] R. F. Zhou, P. X. Liu, M. Tan, 'Mongholicus, Effect of Astragalus Cell, injection on proliferation and apoptosis of hormone sensitive (MCF-7) breast cancer E2, lines with physiological dose', *Zhong Yao Cai*. 32 (2009) 744–747.
- [87] J. A. Buhagiar, A. Bertoli, M. T. Camilleri-Podesta, L. Pistelli, 'In vitro apoptotic bioactivity of flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris', *Nat. Prod. Commun.* 3 (2008) 2007–2012.
- [88] G. Momekov, I. Krasteva, S. Platikanov, S. Nikolov, S. Konstantinov, 'Cytotoxic activity of volatiles from four *Astragalus* species', *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 60 (2007) 1023–1026.
- [89] H. Liu, W. Wei, W. Sun, X. Li, 'Protective effects of astragaloside IV on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on hepatic stellate cells', *J. Ethnopharmacol.* 122 (2009) 502–508.
- [90] D. Q. Wang, B. G. Ding, Y. Q. Ma, H. L. Zhao, T. G. Neil, T. Brian, Y. P. Tian, C. B. Wang, J. A. Critchley, 'Studies on protective effect of total flavonoids of *Astragalus membranaceus* on liver paracetamol-induced damage', *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 26 (2001) 483–486.
- [91] C. H. Ma, R. R. Wang, R. R. Tian, G. Ye, M. S. Fan, Y. T. Zheng, C. G. Huang, 'Calycosin 7-O-beta-D-glucopyranoside, an anti-HIV agent from the roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*', *Chem. Nat. Compd.* 45 (2009) 282–285.
- [92] L. Verotta, M. Guerrini, N. A. El-Sebakhy, A. M. Asaad, S. M. Toaima, M. E. Abou-Sheer, Y. D. Luo, J. M. Pezzuto, 'Cycloartane saponins from *Astragalus peregrinus* as modulators of lymphocyte proliferation', *Fitoterapia*. 72 (2001) 894–905.
- [93] H. Kang, K. S. Ahn, C. Cho, H. S. Bae, 'Immunomodulatory effect of *Astragali Radix* extract on murine TH1/TH2 cell lineage development', *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 1946–1950.
- [94] Y. S. Lee, O. K. Han, C. W. Park, S. I. Suh, S. W. Shin, C. H. Yang, T. W. Jeon, E. S. Lee, K. J. Kim, S. H. Kim, W. K. Yoo, H. J. Kim, 'Immunomodulatory effects of aqueous extracted *Astragali Radix* in methotrexate-treated mouse spleen cells', *J. Ethnopharmacol.* 84 (2003) 193–198.
- [95] J. K. Ko, F. Y. Lam, A. P. Cheung, 'Amelioration of experimental colitis by *Astragalus membranaceus* through anti-oxidation and inhibition of adhesion molecule synthesis', *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 5787–5794.
- [96] Z. k. Chen, S. j. Hu, X. Zhen, G. b. Wang, J. Sun, Q. Xia, Y. L. Sheng, 'Effect of

- Astragalus membranaceus on baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats', *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 28 (2003) 155–158.
- [97] S. Hai-Lian, L. Yan, M. Chun-Lai, H. Zhi-Bi, W. Da-Zheng, 'Effect of astragaloside IV on relaxation and molecule mechanism in isolated rat aortic rings from hypertensive rats', *Chinese J. New Drugs Clin. Remedies*. 28 (2009) 905–910.
- [98] B. Xue, J. X. Li, Q. Chai, Z. X. Liu, L. B. Chen, 'Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats', *Phytomedicine*. 15 (2008) 759–762.
- [99] K. Motomura, Y. Fujiwara, N. Kiyota, K. Tsurushima, M. Takeya, T. Nohara, R. Nagai, T. Ikeda, 'Astragalosides isolated from the root of *Astragalus Radix* inhibit the formation of advanced glycation end products', *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7666–7772.
- [100] R. L. Hoo, J. Y. Wong, C. Qiao, A. Xu, H. Xu, K. S. Lam, 'The effective fraction isolated from *Radix Astragali* alleviates glucose intolerance, insulin resistance and hypertriglyceridemia in db/db diabetic mice through its anti-inflammatory activity', *Nutr. Metab.* 7 (2010).
- [101] A. Xu, H. Wang, R. L. C. Hoo, G. Sweeney, P. M. Vanhoutte, Y. Wang, D. Wu, W. Chu, G. Qin, K. S. Lam, 'Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice', *Endocrinology*. 150 (2009) 625–633.
- [102] W. K. Fang, F. Y. Ko, H. L. Wang, C. H. Kuo, L. M. Chen, F. J. Tsai, C. H. Tsai, Y. S. Chen, W. W. Kuo, C. Y. Huang, 'The proliferation and migration effects of huangqi on RSC96 Schwann cells', *Am. J. Chin. Med.* 37 (2009) 945–959.
- [103] J. H. Wu, Q. Li, M. Y. Wu, D. J. Guo, H. L. Chen, S. L. Chen, S. W. Seto, A. L. Au, C. C. Poon, G. P. Leung, S. M. Lee, Y. W. Kwan, S. W. Chan, 'Formononetin, an isoflavone, relaxes rat isolated aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent pathways', *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 613–620.
- [104] X. L. Xu, H. Ji, S. Y. Gu, Q. Shao, Q. J. Huang, Y. P. Cheng, 'Cardioprotective effects of *Astragali Radix* against isoproterenol-induced myocardial injury in rats and its possible mechanism', *Phyther. Res.* 22 (2008) 389–394.
- [105] Y. Liu, S. D. Hua, Y. G. He, Y. Z. Jin, X. Cui, 'Effects of *Astragalus membranaceus* on atrial dynamics and ANP secretion', *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 33 (2008) 2226–2229.
- [106] A. Navarrete, J. Arrieta, L. Terrones, H. Abou-Gazar, I. Calis, 'Gastroprotective effect

- of Astragaloside IV: Role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide', *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 1059–1064.
- [107] M. Caroch, I. C. Ferreira, 'A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives', *Food Chem. Toxicol.* 51 (2013) 15–25.
- [108] P. M. GUEYE, "Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge", Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur – Strasbourg I, 2007.
- [109] C. Migdal, M. Serres, 'Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant', *Med. Sci.* 27 (2011) 405–412.
- [110] '<https://www.xn--namast-gva.fr/128-hydrogene-moleculaire-fontaine-de-jouvence.html>'.
- [111] A. Favier, 'Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique', *Actual. Chim.* (2003) 108–115.
- [112] '<https://doucefrugalite.com/2019/02/20/le-stress-oxydatif-pour-les-nuls-signes-causes-et-solutions/>'.
- [113] A. Favier, 'Stress oxydant et pathologies humaines', *Ann. Pharm. Françaises.* 64 (2006) 390–396.
- [114] B. Halliwell, 'Antioxidant characterization : methodology and mechanism', *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 1341–1348.
- [115] J. M. Matés, C. Pérez-Gómez, I. Núñez de Castro, 'Antioxidant enzymes and human diseases', *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595–603.
- [116] J. Goudable, A. Favier, 'Radicaux libres oxygénés et antioxydants', *Nutr. Clin. Metab.* 11 (1997) 115–120.
- [117] O. Huet, Toxicité de l'oxygène : mythe ou réalité, in: Conférences d'actualisation, Elsevier Masson SAS, 2006: pp. 207–215.
- [118] L. A. Pham-huy, H. He, C. Pham-huy, 'Free radical, antioxidants in disease and health', *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 89–96.
- [119] L. Wang, J. H. Yen, H. L. Liang, M. J. Wu, 'Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.)', *J. Food Drug Anal.* 11 (2003) 60–66.
- [120] F. Marc, A. Davin, L. Deglène-Benbrahim, C. Ferrand, M. Baccaunaud, P. Fritsch, 'Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments', *Med. Sci.* 20 (2004) 458–463.

- [121] S. A. van Acker, L. M. Koymans, A. Bast, 'Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity', *Free Radic. Biol. Med.* 15 (1993) 311–328.
- [122] O. Fain, 'Carences en vitamine C', *Rev. Med. Interne.* 25 (2004) 872–880.
- [123] L. Mueller, V. Boehm, 'Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays', *Molecules.* 16 (2011) 1055–1069.
- [124] R. Tsao, 'Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols', *Nutrients.* 2 (2010) 1231–1246.
- [125] '<https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>'.
- [126] 'https://www.leem.org/sites/default/files/2018-03/Cancer_2_0.pdf'.
- [127] M. T. Nguyen, N. T. Nguyen, S. Awale, 'Prenylated dihydrochalcones from *Artocarpus altilis* as antiausterity agents', *Enzymes.* 37 (2015) 95–110.
- [128] R. Dong, P. Chen, Q. Chen, 'Inhibition of pancreatic cancer stem cells by *Rauwolfia vomitoria* extract', *Oncol. Rep.* 40 (2018) 3144–3154.
- [129] V. Aggarwal, H. S. Tuli, A. Varol, F. Thakral, M. B. Yerer, K. Sak, M. Varol, A. Jain, M. A. Khan, G. Sethi, 'Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements', *Biomolecules.* 9 (2019) 735.
- [130] P. Karihtala, Y. Soini, 'Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies', *Apmis.* 115 (2007) 81–103.
- [131] A. Matsui, T. Ikeda, K. Enomoto, K. Hosoda, H. Nakashima, K. Omae, M. Watanabe, T. Hibi, M. Kitajima, 'Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes', *Cancer Lett.* 151 (2000) 87–95.
- [132] S. Moncada, A. Higgs, 'The L-arginine-nitric oxide pathway', *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 2002–2012.
- [133] M. Y. Congo, "Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora persica* L. (Salvadoraceae) ", Thèse de doctorat, Univeristé de Ouagadougou, 2012.
- [134] X. Ma, Z. Wang, 'Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective', *Drug Discov. Today.* 14 (2009) 1136–1142.
- [135] C. C. Chang, W. C. Chen, T. F. Ho, H. S. Wu, Y. H. Wei, 'Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms', *J. Biosci. Bioeng.* 111 (2011) 501–511.
- [136] S. E. Kintzios, 'Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research', *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 25 (2006) 79–113.

- [137] A. Barone, D. C. Chi, M. R. Theoret, H. Chen, K. He, D. Kufrin, W. S. Helms, S. Subramaniam, H. Zhao, A. Patel, K. B. Goldberg, P. Keegan, R. Pazdur, 'FDA Approval Summary: Trabectedin for Unresectable or Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma Following an Anthracycline-Containing Regimen', *Clin. Cancer Res.* 23 (2017) 7448–7453.
- [138] K. Schwartz, 'Inflammation et maladies : clés de compréhension. Mise en place d'une réaction inflammatoire aiguë', Chapitre 3. Inserm. 16–31.
- [139] I. Diallo, "Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de Lentinula edodes (Shiitake) sous différentes conditions de culture", Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 2019.
- [140] 'https://blogpeda.ac-bordeaux.fr/svtpapeclement/files/2016/11/schéma-reaction-inflammatoire_2016-1.pdf'.
- [141] O. O. Oguntibeju, 'Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa', *J. Inflamm. Res.* 11 (2018) 307–317.
- [142] D. Le Bars, F. Adam, 'Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire', *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 21 (2002) 315–335.
- [143] H. Le Thi Thu, A. Nguyen Thi Van, H. Thuc Thanh, T. Nguyen Thi Dieu, H. Le Thi Minh, 'Rôle des cytokines dans l'asthme', *J. Fr. Pneumol.* 5 (2014) 25–31.
- [144] A. Branco, F. S. Yoshikawa, A. J. Pietrobon, M. Sato, 'Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation', *Mediators Inflamm.* 2018 (2018).
- [145] S. Yang, J. Wang, D. D. Brand, S. G. Zheng, 'Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications', *Front. Immunol.* 9 (2018).
- [146] P. Tripathi, L. Kashyap, V. Singh, 'The role of nitric oxide in inflammatory reactions', *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 443–452.
- [147] E. Ricciotti, G. A. Fitzgerald, 'Prostaglandins and Inflammation', *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 986–1000.
- [148] A. Pilotto, D. Sancarlo, F. Addante, C. Scarcelli, M. Franceschi, 'Non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly', *Surg. Oncol.* 19 (2010) 167–172.
- [149] M. Chevassu, *Les anti-inflammatoires*, 2018.
- [150] S. Verma, 'Medicinal plants with anti-inflammatory activity', *J. Phytopharm.* 5 (2016) 157–159.
- [151] R. Gautam, S. M. Jachak, 'Recent developments in anti-inflammatory natural products', *Med. Res. Rev.* 29 (2009) 767–820.
- [152] G. G. F. Nascimento, J. Locatelli, P. C. Freitas, G. L. Silva, 'Antibacterial activity of

plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria', *Braz. J. Microbiol.* 31 (2000).

[153] M. M. Cowan, 'Plant products as antimicrobial agents', *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 564–582.

CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES

Nos travaux ont d'abord été dirigés vers l'optimisation des conditions d'extraction des métabolites secondaires à partir du matériel végétal, notamment ceux ayant une activité antioxydante en raison de leur importance dans l'activité préventive contre les maladies chroniques. Dans une deuxième étape, une étude analytique a été réalisée pour séparer les divers composés présents dans les extraits préparés afin de déterminer ceux qui présentent une activité antioxydante. Ceci a été réalisé par le système CLHP-ABTS⁺. Ensuite, l'identification de ces composés antioxydants, ainsi que d'autres composés chimiques présents dans les extraits a été réalisée par le système CLUHP-DAD-SMHR. Enfin, dans une troisième étape, les activités anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes des extraits ont été évaluées.

PARTIE A - ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES EXTRAITS

II.A.1. Solvants, réactifs et autres produits chimiques

II.A.1.1. Analyses chimiques

Les solvants utilisés, de qualité analytique, sont : l'éthanol (EtOH), l'acétate d'éthyle (EtOAc), l'acétonitrile (ACN), et l'acide chlorhydrique (HCl) fournis par Fisher (Illkirch Graffenstaden, France) ; le méthanol (MeOH), le chloroforme (CHCl₃) fournis par Carlo Erba (Val de Reuil, France) ; l'acide formique (AF), l'acide sulfurique (H₂SO₄), l'acétone, l'acide acétique glacial, diméthylsulfoxyde-d₆ (DMSO-d₆), oxyde de deutérium (D₂O) fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ; et l'eau ultra-pure (MQ-H₂O, 18,2 MU) produite par un système de purification Synergy UV (Millipore, Molsheim, France).

Le chlorure de potassium (KCl) et le phosphate de potassium (KH₂PO₄) ont été fournis par VWR (Fontenay-sous-bois, France) et Merck (Darmstadt, Allemagne) respectivement. Le chlorure de sodium (NaCl), l'hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄), le réactif du Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium (Na₂CO₃), le chlorure d'ammonium (NH₄Cl), le réactif Fehlings (A et B), le réactif de ninhydrin 0,25%, l'ammonique (10%), le chlorure de fer III (FeCl₃), l'acétate de cuivre (Cu₂(OAc)₄), l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH), le ferricyanure de potassium (K₃[Fe(CN)₆]), le réactif de Dragendorff, le sel 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) diammonium (ABTS), l'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (trolox), le 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), la fluorescéine, le 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'acide caftarique, l'acide gallique,

l'isoquercitrine ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) a été fourni par Prolabo (Paris, France). La lutéoline-7-O-glucoside, l'isorhamnetin-3-O-rutinoside et l'apigénine-7-O-glucoside ont été fournis par Extrasynthèse (Genay, France), la rutine a été fournie par Phytolab (Vestenbergsgreuth, Allemagne) et l'acide 2-nitrophénylpyruvique a été fourni par Abcr (Lyon, France).

II.A.1.2. Tests biologiques

La lignée cellulaire d'adénocarcinome pancréatique humain AsPC-1, la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 et le milieu de culture RPMI-1640 ont été obtenus auprès de l'ATCC (30-2001 ; LGC Standard, Molsheim, France). Le milieu de culture DMEM^{high glucose} a été obtenu chez Dominique Dutscher (67,172 Brumath, France, Cat No. L0102-500) et le DMSO chez Sigma-Aldrich (Saint-quentin Fallavier, France).

La solution de Trypsine à 0,5% EDTA 0,2% a été achetée chez PAN Biotech (Aidenbach, Allemagne), l'iodure de propidium chez Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, USA, Cat No. 130-093-233), l'Annexine V-FITC chez ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Allemagne, Cat No. 31490011X2), et le célastrol chez Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). La pénicilline, la streptomycine ont été achetées chez Life Technologies (Paisley, UK, Cat No. 15140-122), le sérum de veau fœtal (FBS) chez Life Technologies (Paisley, UK, Cat No. 10270-106), et le lipopolysaccharide (LPS) issu de *Salmonella abortus equi* chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'agar et le milieu Mueller-Hinton en poudre ont été fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne).

II.A.2. Matière végétale

Les parties aériennes d'AEL et d'ACW ont été récoltées de la réserve naturelle des cèdres (Chouf, Liban) (*Figure II.1*). Elles ont ensuite été lavées, séchées puis broyées dans un broyeur Ultra centrifuge ZM 200 (Retsch) à une vitesse de 6000 rpm/min en utilisant un tamis avec des mailles de 1 mm de diamètre. Les échantillons obtenus ont été stockés dans des sacs en plastique bien scellés et conservés à l'abri de la lumière.

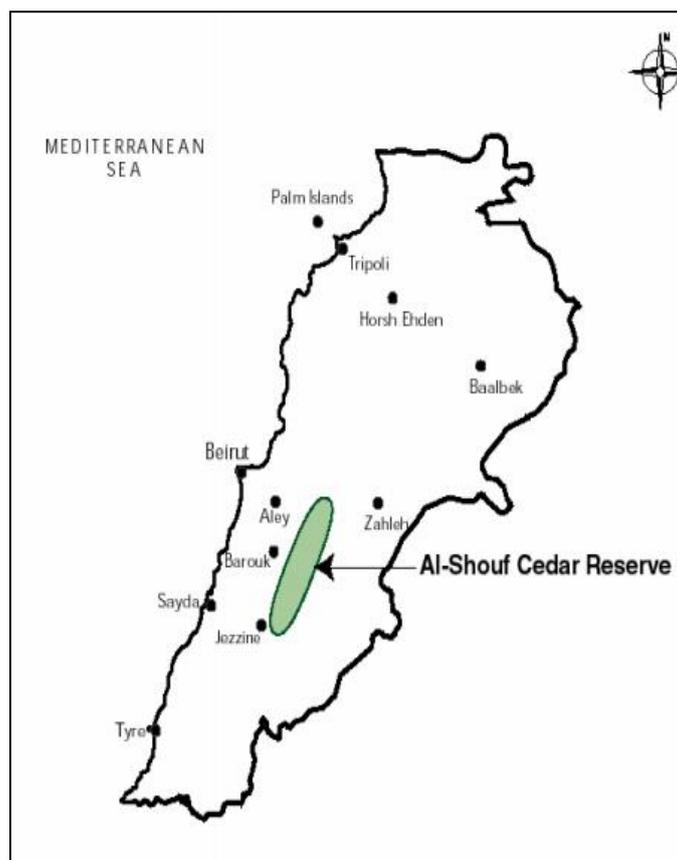


Figure II. 1. Lieu de la récolte des plantes

[1]

II.A.3. Extraction de la matière végétale

Les conditions finales utilisées pour extraire efficacement les composés antioxydants de la partie aérienne d'AEL et d'ACW, ont été choisies suite à différents essais résumés en trois étapes (*Figure II.2*). La première étape consistait à évaluer l'efficacité de l'extraction des composés antioxydants par six solvants de polarités différentes couramment utilisés pour extraire des métabolites secondaires des plantes. La deuxième étape consistait à améliorer l'extraction avec le solvant sélectionné (mélange éthanol/eau) en modifiant les proportions des deux constituants et le temps d'extraction. La troisième étape consistait à déterminer le nombre d'extractions nécessaire pour obtenir une quantité d'extrait satisfaisante.

Étape 1 - L'extraction de la partie aérienne d'ACE et d'ACW a été faite dans un bain à ultrasons (Elmasonic S 30H, Fisher Brand 15051, Loughborough, Leicestershire-England) en utilisant six solvants de polarités différentes (eau, eau acidifiée à pH 3,0, EtOH 70%, MeOH 70%, CHCl₃ et EtOAc) et un temps d'extraction de 30 min à température ambiante. La prise d'essai était de 1 g pour 15 mL de solvant pour AEL, mais seulement de 150 mg pour 20 mL

de solvant pour ACW (en raison de la prédominance d'un antioxydant, la rutine). Ensuite, les mélanges ont été filtrés sous vide par un système Büchner en utilisant du papier filtre (125 mm, ref : 1004125B, Dutscher, Brumath, France). Les filtrats des extraits d'eau et d'eau acidifiée ont été directement lyophilisés (Labconco, Free Zone 4.5, Kansas, ÉTATS-UNIS). Ceux des extraits de CHCl_3 et d'EtOAc ont été évaporés à sec dans un évaporateur rotatif (Heidolph VV 2000, Schwabach, Allemagne). Pour ce qui est des filtrats issus des extraits d'EtOH 70% et de MeOH 70%, les solvants organiques ont été éliminés à l'évaporateur rotatif et les résidus aqueux ont été lyophilisés. Les extraits secs ont été conservés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à leur utilisation.

Étape 2 - Afin d'optimiser les conditions d'extraction des antioxydants, différents pourcentages d'EtOH (10, 30, 50 et 70% pour AEL et 10, 30, 50, 70 et 90% pour ACW) et temps d'extraction (5, 15, 30 et 60 min pour AEL et 5, 15, 30, 45 et 60 min pour ACW) ont été testés. Un volume de 200 μL de chaque extrait a été prélevé, filtré à 0,45 nm (filtre à seringue) et analysé par le système CLHP-ABTS^{•+}. La somme des surfaces des pics chromatographiques observés à 412 nm a été utilisée pour évaluer l'efficacité de l'extraction des composés antioxydants.

Étape 3 - Des extractions successives ont été réalisées dans les conditions choisies (EtOH à 30% pendant 30 min pour AEL et EtOH à 50% pendant 5 min) en renouvelant à chaque fois le solvant d'extraction. Après chaque extraction, le mélange a été centrifugé à 9000 tour/min pendant 10 min (centrifugeuse Beckman GS-15R) et le surnageant a été récupéré. Les extractions ont été répétées jusqu'à épuisement des composés antioxydants.

Les différents surnageants actifs de chaque plante ont été rassemblés, les solvants organiques ont été éliminés à l'évaporateur rotatif et les résidus aqueux restants ont été lyophilisés. Les extraits secs ainsi obtenus ont été utilisés pour tous les essais expérimentaux de l'étude (DPPH, CLHP-ABTS^{•+}, CLUHP-DAD-SMHR, CLHP semi-préparative et activités biologiques) à l'exception des tests ORAC et TEAC. Chaque essai a été répété 3 fois.

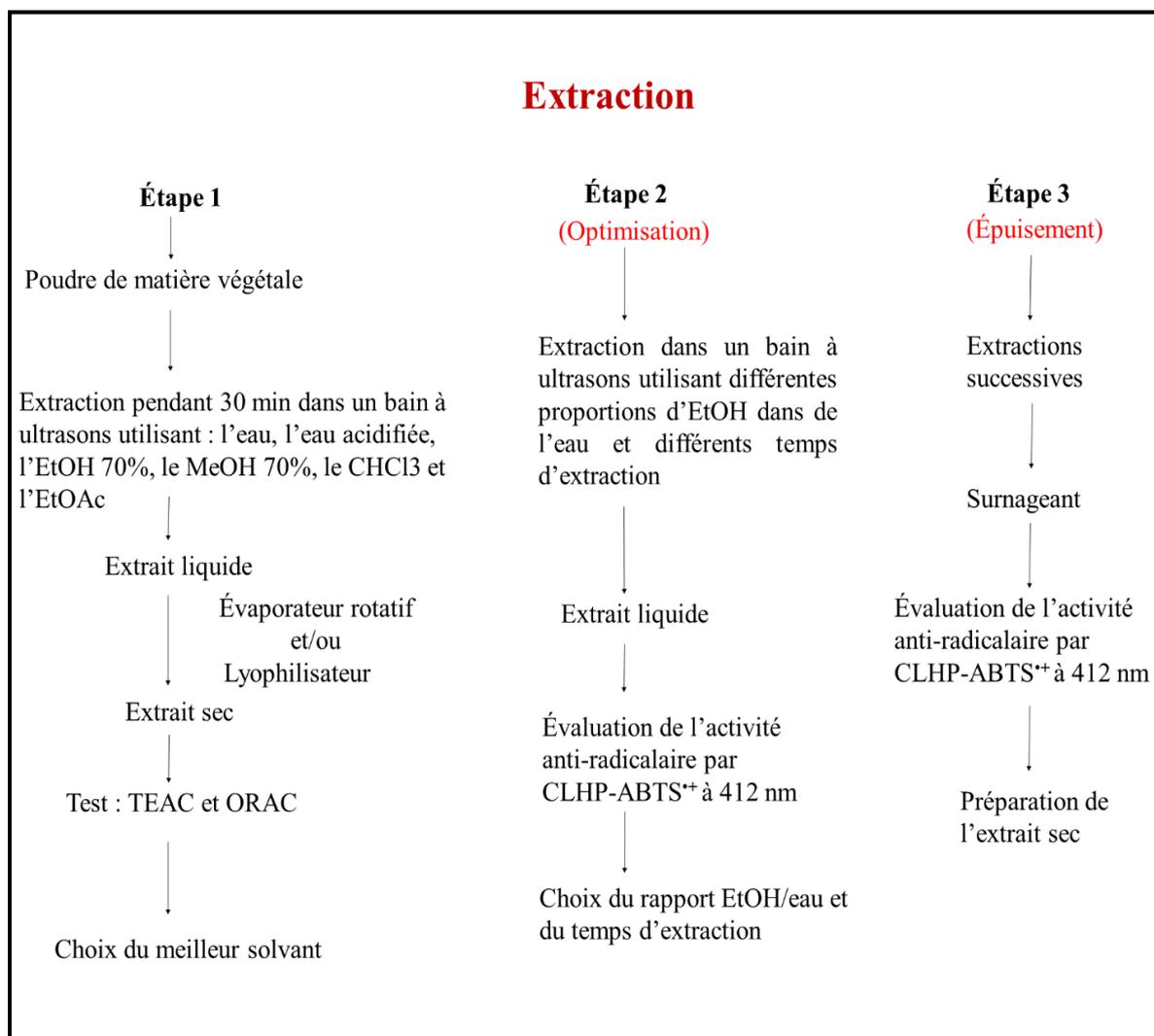


Figure II. 2. Représentation schématique du protocole suivi pour l'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants

II.A.4. Étude de l'activité anti-radicalaire des extraits

II.A.4.1. Capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC)

L'activité anti-radicalaire des extraits secs d'AEL et d'ACW obtenus à la première étape d'extraction et utilisant divers solvants (eau, eau acidifiée à pH 3,0, MeOH 70%, EtOH 70%, CHCl₃ et EtOAc) a été évaluée par la méthode TEAC en microplaques selon *Re et al.* avec de légères modifications [2]. Cette méthode est en effet basée sur un mécanisme de transfert d'électrons et mesure la capacité d'un composé à réduire les radicaux libres d'ABTS^{•+} dont la solution est de couleur bleu-vert avec des maxima d'absorption à 412, 645, 734 et 815 nm (*Figure II.3*) [3]. Cette réduction se manifeste par une décoloration de la solution d'ABTS^{•+} et une diminution de l'absorbance aux quatre longueurs d'onde. L'activité anti-radicalaire est généralement exprimée en équivalent de celle d'un antioxydant de référence, le trolox, qui est

un dérivé synthétique hydrosoluble de la vitamine E. Une gamme étalon de trolox (50, 100, 300, 600, 700 et 800 μM) a été préparée par une série de dilutions dans un mélange d'ACN/MQ-H₂O (50/50) d'une solution mère à 1000 μM . L'étalonnage a été réalisé pour chaque mesure.

Une solution mère de 2,0 mg/mL a été préparée à partir des extraits secs d'AEL et d'ACW en utilisant différents solvants : MQ-H₂O pour les extraits eau et eau acidifiée ; MQ-H₂O/ACN (50/50) pour les extraits EtOH 70% et MeOH 70% ; et ACN pour les extraits acétate d'éthyle et chloroforme. Ensuite, des dilutions ont été préparées en utilisant les solvants correspondants. Un volume de 10 μL de chaque solution mère d'extrait et de chaque solution de la gamme étalon de trolox ont été déposés en triplicat dans les puits d'une microplaque transparente de 96 puits (spectrophotométrie) et auquel ont été ajoutés 200 μL d'une solution d'ABTS^{•+} à 7 mM. Un blanc a été réalisé en utilisant 10 μL de solution PBS à la place d'échantillon. L'absorbance a été mesurée à 734 nm par un spectrophotomètre Vario Scan (Thermo Fisher Scientific) après 10 min d'incubation. L'expérience a été répétée 3 fois et les résultats ont été exprimés en μmol de trolox équivalent par gramme d'extrait sec ($\mu\text{mol ET/g}$ extrait sec).

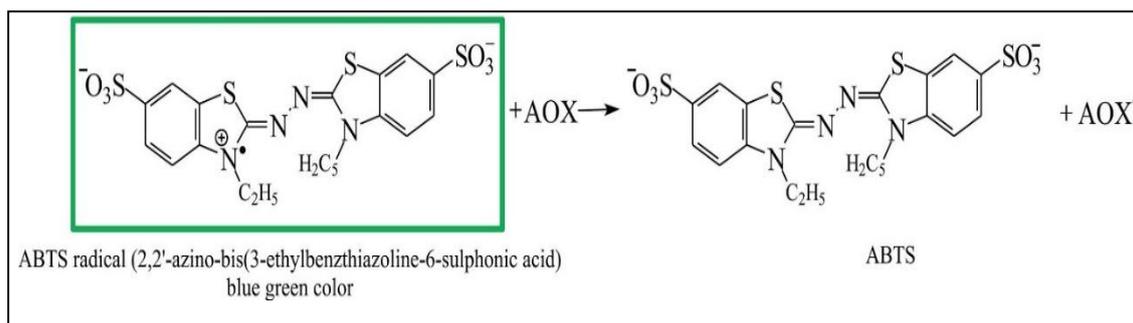


Figure II. 3. Mécanisme de piégeage des radicaux ABTS^{•+}

[4]

II.A.4.2. Capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC)

La méthode ORAC se base sur un principe de compétition pour des radicaux peroxydes entre les molécules antioxydantes et une sonde fluorescente. La fluorescéine (sonde) est oxydable par les radicaux peroxydes produits par l'AAPH (composé azoïque ayant une groupe N=N) à 37 °C résultant en l'extinction de sa fluorescence. La présence d'un antioxydant protège la fluorescéine des dommages oxydatifs et prolonge alors son temps de fluorescence (Figure II.4) [3,5].

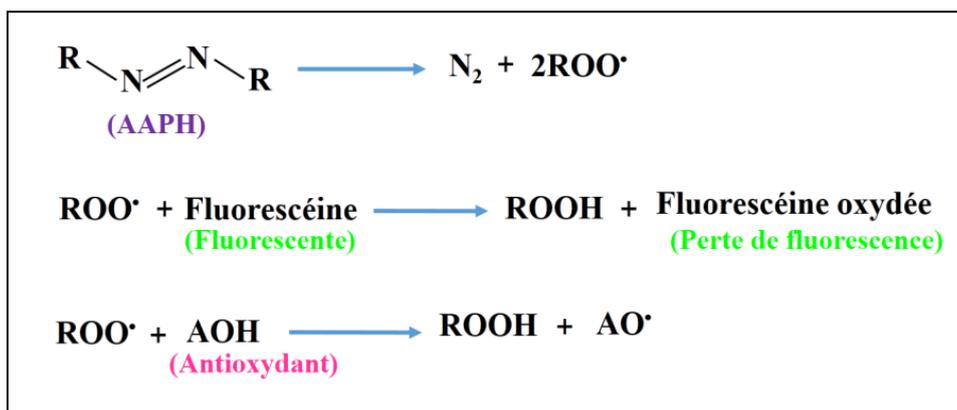


Figure II. 4. Principe de la méthode ORAC

[5]

Les résultats finaux reflètent le degré de protection de la sonde suite à l'ajout d'un antioxydant donné. La décroissance de la fluorescence en fonction du temps a été représentée par des courbes descendantes, et l'aire sous la courbe (area under curve, AUC) pour chaque échantillon, y compris le blanc, a été calculée. Ensuite, l'AUC nette a été calculée en soustrayant l'AUC du blanc de celle de l'échantillon (Figure II.5).

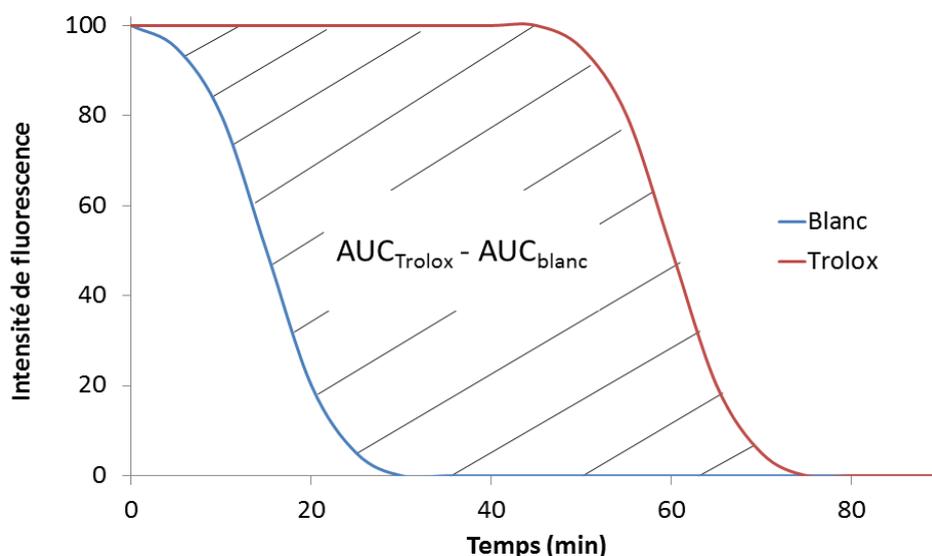


Figure II. 5. ORAC, courbe de la décroissance de la fluorescence en fonction du temps

[6]

Le test ORAC a été réalisé afin d'évaluer l'activité anti-radicalaire des différents extraits d'AEL et d'ACW (extraction étape 1) selon la méthode d'Ou *et al.* [7]. 150 µL de fluorescéine à $2,8 \times 10^{-5}$ mg/mL dans du PBS 1X ont été mélangés en triplicat à 10 µL de solutions d'extraits, de solutions de la gamme de trolox (50, 100, 300, 600, 800 et 1000 µM) et de PBS (blanc), puis déposés dans des microplaques noires (fluorimétrie) à 96 puits. Après 10 min d'incubation à

37 °C, la réaction a été démarrée par une addition automatique de 30 µL d'APPH (41,5 mg/mL de PBS 1X). L'intensité de la fluorescence émise à 518 nm a été mesurée à raison d'un point toutes les 5 min pendant 2 h par un lecteur de plaque Vario Scan (Thermo Fisher Scientific) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 485 nm. L'expérience a été répétée 3 fois. Les résultats ont été exprimés en µmol ET/g d'extrait sec.

II.A.4.3. Réactivité avec le radical libre DPPH[•]

Le test DPPH est basé sur le principe du transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) par un antioxydant, conduisant à la réduction des radicaux libres DPPH[•] en DPPH-H (Figure II.6). Un changement de couleur du violet au jaune est alors observé et une diminution d'absorbance peut être mesurée à 517 nm [8].

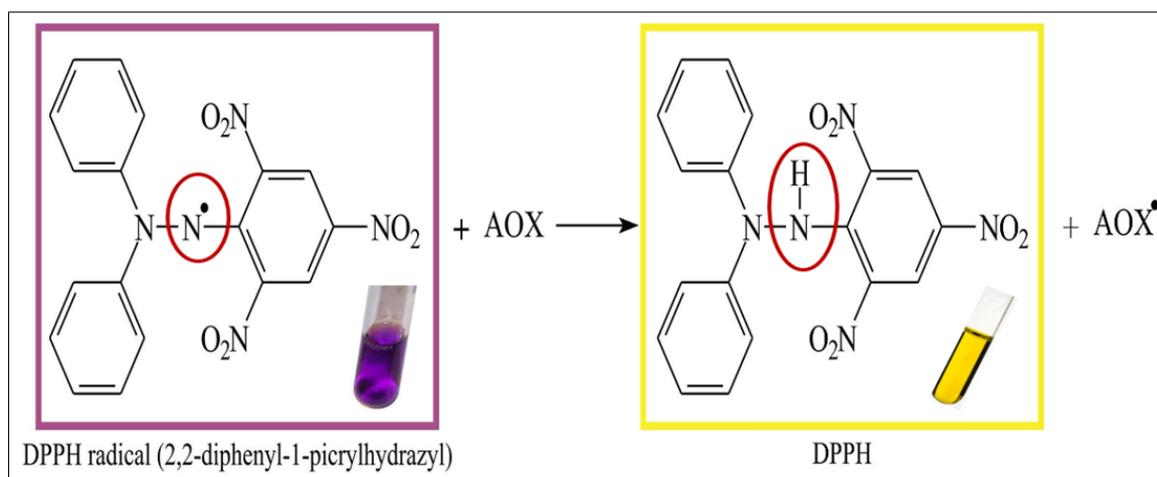


Figure II. 6. Principe de la réduction des radicaux libres DPPH[•]

[4]

L'activité anti-radicalaire des extraits AE_{Et30} et AC_{Et50} a été évaluée par le test DPPH selon la méthode de Hassan et *al.* [9]. Ce test étant l'un des plus utilisés pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres par les extraits de plantes, il a pu servir à comparer la capacité anti-radicalaire de nos extraits à celle des extraits des autres espèces d'*Astragalus* décrites dans la littérature. Une solution mère (1,0 mg/mL) de chaque extrait a été préparée dans deux solvants différents, 30% EtOH pour AEL et 50% EtOH pour ACW, puis diluée dans le même solvant pour obtenir des solutions à 25, 50, 100, 200 et 400 µg/mL. Ensuite, 1,0 mL d'une solution de DPPH (0,15 mM dans le méthanol) fraîchement préparée a été ajoutée en triplicat à 1,0 mL de chaque solution dans des tubes à essai. Les mélanges ainsi obtenus ont été vortexés pendant quelques secondes avant d'être incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre à

double faisceau Hitachi U-2900 (Hitachi Corporation, Tokyo, Japon). Deux contrôles ont été utilisés. Un contrôle négatif constitué d'un mélange de 1 mL de solvant (EtOH 30% pour AEL et EtOH 50% pour ACW) et de 1 mL de la solution de DPPH. Un contrôle positif constitué d'1 mL de chacune des solutions d'une gamme d'hydroxytoluène butylé (BHT) (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70 µg/mL) et de 1 mL de la solution DPPH. L'expérience a été répétée 3 fois. Les résultats sont exprimés en pourcentage de piégeage du DPPH^{*} (P%) calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$P\% = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}) \times 100 / (Abs_{\text{contrôle}})]$$

Avec $Abs_{\text{contrôle}}$: absorbance du contrôle (DPPH + solvant)

$Abs_{\text{échantillon}}$: absorbance de l'échantillon

La concentration de l'échantillon capable de piéger 50% des radicaux libres de DPPH^{*} (CI_{50}) a été calculée à partir de la courbe P% en fonction de concentrations des solutions. CI_{50} est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire, une faible CI_{50} représente une importante activité anti-radicalaire.

II.A.5. Analyse phytochimique

Une analyse qualitative de la composition des extraits hydroéthanoliques AE_{E130} et AC_{E150} (surnageants ou extraits secs issus de l'étape 3 d'extraction) a été réalisée selon Nasser *et al.* et Daman *et al.* (Tableau II.1) [10,11]. Des critères visuels ont été utilisés pour déterminer les résultats de ce test qualitatifs tels que la formation d'un précipité, la turbidité et le changement de couleur.

Tableau II. 1. Détection des métabolites primaires et secondaires par analyse phytochimique

Métabolites	Méthodes expérimentales et réactifs ajoutés au surnageant ou extrait dissous	Surnageant (mL)	Résultats attendus
Sucres réducteurs	1 mL (extrait dissous dans l'eau) + 5-8 gouttes de solution de Fehling (A+B) + porter à ébullition	-	Précipité rouge brique
Protéines et acides aminés	1 mL de ninhydrine à 0,25%, porter à ébullition	1	Coloration bleue
Alcaloïdes	5 gouttes du réactif de Dragendorff	1	Précipité rouge orangé
Tannins	1 mL $FeCl_3$ (1%)	1	Coloration bleue
Résines	1 mL acétone et 1 mL eau, agiter	1	Turbidité du mélange
Terpénoïdes	2 mL chloroforme et 3 mL H_2SO_4 concentré	1	Coloration brun-rougeâtre en surface
Flavonoïdes	1 mL KOH 50%	1	Coloration jaune

Quinones	1 mL HCl concentré	1	Précipité jaune
Diterpènes	1 mL extrait (dissous dans l'eau) + 3-5 gouttes de la solution Cu ₂ (OAc) ₄	-	Coloration verte émeraude
Anthocyanines	1 mL NaOH (10%)	1	Coloration bleue
Flavanones	1 mL H ₂ SO ₄ concentré	1	Coloration rouge pourpre
Glycosides Cardiaques	1 mL acide acétique glacial, 1 goutte FeCl ₃ (5%) et 1 mL H ₂ SO ₄ concentré	2	Formation d'anneaux
Saponines	2-3 mL extrait (dissous dans l'eau) + Agitation vigoureuse	-	Formation d'une mousse qui persiste pendant 10 min
Phénols	1 mL FeCl ₃ (1%) et 1 mL K ₃ [Fe(CN) ₆] (1%)	5	Coloration bleu verdâtre
Huiles et graisses	Spot test (surnagent placé entre 2 papiers filtre)	1	Tache d'huile

II.A.6. Estimation de la teneur en composés phénoliques totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour estimer la teneur en composés phénoliques totaux des extraits hydroéthanoliques AE_{Et}30 et AC_{Et}50 selon Farhan *et al.*, avec de légères modifications [12]. Un volume de 100 µL de chaque solution d'extrait (1 mg/mL) a été mélangé à 1 mL d'une solution diluée du réactif de Folin-Ciocalteu (1/10 dans MQ-H₂O). Après 5 min dans l'obscurité, 1 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7% (m/v) a été ajouté. Après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. Une gamme d'étalonnage a été préparée en utilisant l'acide gallique comme produit de référence. La quantité de composés phénoliques totaux a été exprimée en équivalent d'acide gallique, (mg GAE/g d'extrait sec). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois.

II.A.7. Estimation de la teneur en composés flavonoïques totaux

La teneur en composés flavonoïques totaux des extraits hydroéthanoliques AE_{Et}30 et AC_{Et}50 a été estimée par la méthode au trichlorure d'aluminium selon Quettier-deleu *et al.*, avec de légères modifications [13]. Un volume de 1 mL de chaque solution d'extrait (1 mg/mL) a été mélangé avec 1 mL d'une solution de trichlorure d'aluminium méthanolique (AlCl₃ 2%, m/v). Après 30 min d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance à 415 nm a été mesurée. Une gamme d'étalonnage a été préparée en utilisant la rutine comme produit de référence. La quantité de flavonoïdes totaux a été exprimée en équivalent rutine, (mg RUE/g d'extrait sec). Toutes les mesures ont été effectuées 3 fois.

II.A.8. Détermination de l'activité anti-radicalaire par CLHP-ABTS^{•+}

La détermination des composés anti-radicalaires dans les extraits hydroéthanoliques AE_{Et}30 et AC_{Et}50 a été réalisée selon la méthode CLHP-ABTS^{•+} de Leitao *et al.*: par l'association d'une technique séparative, la CLHP, et d'un système de réaction post-colonne et de détection basé sur le principe de la méthode TEAC et mettant en évidence la capacité des molécules individuelles à réduire une espèce radicalaire (*Figure II.7*) [14]. Le système chromatographique utilisé était une chaîne CLHP Ultimate 3000 Dual System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) possédant deux pompes indépendantes et deux détecteurs UV-visible.

Les composés sont séparés sur une colonne chromatographique, puis détectés par un premier détecteur. En sortant de ce détecteur, la phase mobile, véhiculant les composés séparés est mélangée à l'aide d'un T mélangeur à une solution du radical ABTS^{•+} distribuée par une pompe indépendante, puis acheminée à travers une boucle de réaction (3 m × 0,25 mm) jusqu'à un deuxième détecteur destiné à enregistrer la décoloration la solution du radical à 412 nm. Les résultats se présentent sous-forme de deux chromatogrammes parallèles : le premier correspond à la détection des composés présentant un chromophore au sein de leur structure, et le second à l'activité anti-radicalaire des composés antioxydants se traduisant par l'apparition de pics négatifs.

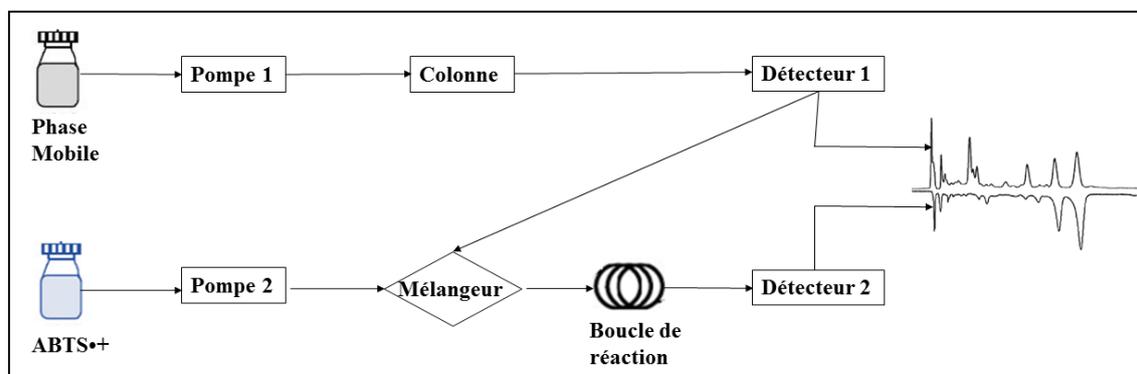


Figure II. 7. Représentation schématique du système du couplage CLHP-ABTS^{•+}

Après une étape d'optimisation, les conditions analytiques ont été fixées et la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C18-PFP (250 x 4,6 mm, 3 µm, ACE, Aberdeen, Scotland) et à une température de 20 °C ± 2 °C. Le volume d'injection était de 20 µL. La phase mobile était constituée de MQ-H₂O/AF (99,9/0,1 ; v/v) (éluant A) et d'ACN/ AF (99,9/0,1 ; v/v) (éluant B). Le débit de la phase mobile était 1 mL/min. Le gradient de la phase mobile était : 2-10% B (0-8 min) ; 10-10% B (8-15 min) ; 10-45% B (15-29 min) ; 45-2% B (29-30 min) ; 2-2% B (30-42 min) pour AE_{Et}30 et 5-5 % B (0-4 min) ; 5-25% B (4-14 min) ;

25-25% B (14-21 min) ; 25-5% B (21-22 min) ; 5-5 % B (22-34 min) pour AC_{Et}50. Les composés élués étaient détectés à 325 nm leurs spectres dans l'UV-visible ont été enregistrés entre 200 et 700 nm. La solution du radical ABTS^{•+} (7 mM) diluée à 2% dans du PBS a été distribuée à un débit de 0,5 mL/min et sa décoloration a été suivie à 412 nm.

En vue de leur analyse par CLHP-ABTS^{•+}, les extraits AE_{Et}30 et AC_{Et}50 ont été dissous dans le solvant d'extraction correspondant à une concentration de 2,5 mg/mL et de 6,5 mg/mL, respectivement.

II.A.9. Identification des composés par CLUHP-DAD-SMHR

Un système CLUHP Acquity (Waters, Guyancourt, France) disposant d'un détecteur DAD et couplé à un spectromètre de masse à haute résolution avec une source d'ionisation electrospray (ESI) (Bruker micrOTOF-Q II, Karlsruhe, Allemagne) a été utilisé pour identifier les composés présents dans les extraits AE_{Et}30 et AC_{Et}50.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C18-PFP (2,1 x 100 mm, 1,7 µm, 130 Å, ACE, Aberdeen, Scotland). La phase mobile était constituée de MQ-H₂O/AF (99,9/0,1 ; v/v) (éluant A) et d'ACN/AF (99,95/0,05 ; v/v) (éluant B) pour AE_{Et}30 ; (99,5/0,5 ; v/v) (éluant A et B) pour AC_{Et}50. La phase mobile a été distribuée à 0,3 mL/min selon le gradient suivant : 5-12% B (0-10 min) ; 12-12% B (10-11min) ; 12-25% B (11-16 min) ; 25-25% B (16-19 min) ; 25-100% B (19-23 min) ; 100% B (23-26 min) pour l'extrait AE_{Et}30 ; et 4-12% B (0-10 min) ; 12-25% B (10-15min) ; 25-80% B (15-19 min) ; 80-80% B (19-22 min) pour l'extrait AC_{Et}50. Le volume d'injection était de 5 µL.

L'analyse en spectrométrie de masse (MS) a été réalisée en mode d'ionisation négatif et les spectres de masse ont été enregistrés entre *m/z* 100 et 1000. Les paramètres d'ionisation par electrospray étaient les suivantes : tension du capillaire, 4500 V ; débit du gaz de séchage (N₂), 9,0 L/min à 200°C et pression du nébuliseur (N₂), 40,6 psi.

Pour l'analyse en MS/MS, l'azote a été utilisé comme gaz de collision à une énergie de 10 V (0,5 - 14 min) et 50 v (14 - 28 min) pour l'extrait AE_{Et}30 et de 20 v (0,5 - 14,1 min) et 50 v (14,1 - 29 min) pour l'extrait AC_{Et}50. Avant l'analyse, l'instrument a été calibré avec une solution de calibrant de formiate de sodium. Pour chaque analyse, celui-ci a été injecté comme calibrant interne. Le logiciel d'exploitation était le micrOTOF 3,0 combiné avec Hystar 3,2, et les données ont été analysées par le logiciel Compass Data Analysis 4,0 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne).

II.A.10. Fractionnement de l'extrait AC_{Et}50 par chromatographie CLHP semi-préparative

Le système chromatographique PLC 2020 (Gilson, Middleton, USA) a été utilisé pour fractionner l'extrait AC_{Et}50. Le but de ce fractionnement était de séparer la rutine, composé majoritaire, des autres constituants de l'extrait afin d'abord de faciliter la collecte de certains composés (exemple : composé de formule C₉H₇NO₅ purifié ensuite par CLHP, mais aussi de s'assurer que la rutine ne masquait pas l'activité biologique d'autres composés.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Puriflach Prep C18-AQ (250×10 mm, Interchim, France). La phase mobile était constituée de MQ-H₂O (éluant A) et d'ACN (éluant B) et distribuée à un débit de 5 mL/min selon le gradient suivant : 10-55% B (0-8 min), 55-100% B (8-13 min), 100% B (13-16 min). Un volume de 0,7 mL d'une solution d'extrait de 40 mg/mL préparée dans l'EtOH 65% a été injecté. La détection a été réalisée à 230 et 265 nm. Trois fractions ont été collectées : Fraction 1 (SF-1 ; 1-7 min) ; Fraction 2 (SF-2 ; 7-10 min) ; et Fraction 3 (SF-3 ; 10-13,5 min). Enfin, les solvants organiques ont été évaporés par l'évaporateur rotatif et les parties aqueuses ont été lyophilisées et conservées à 4 °C pour l'évaluation des activités biologiques et la purification des composés actifs.

II.A.11. Isolement des composés de formule C₉H₇NO₆ et C₉H₇NO₅ de l'extrait AC_{Et}50

La Fraction (S-F1) obtenue précédemment par CLHP semi-préparative a été fractionnée davantage sur une colonne C18-PFP (250 x 4,6 mm, 3 µm) en utilisant la chaîne CLHP Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) afin d'isoler les deux composés d'intérêt de formule brute C₉H₇NO₆ et C₉H₇NO₅. La phase mobile était constituée de MQ-H₂O/AF (99,6/0,4 ; v/v) (éluant A) et d'ACN/AF (99,9/0,1 ; v/v) (éluant B), et distribuée à 1 mL/min selon le gradient suivant : 5% B (0-4 min) ; 5-25% B (4-14min) ; 25% B (14-20 min). Le volume d'injection était de 15 µL. Les fractions éluées entre 13,57 - 13,80 et 17,90 - 18,30 min ont été collectées de nombreuses fois en répétant la chromatographie. L'ensemble des collectes réunies de chaque fraction a été passé à l'évaporateur rotatif à 35 °C afin d'éliminer le solvant organique, la partie aqueuse restante a été lyophilisée. Les résidus secs obtenus ont été analysés afin d'identifier les molécules d'intérêt.

II.A.12. Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton du composé de formule moléculaire C₉H₇NO₅, isolé de l'extrait AC_{Et}50, ont été enregistrés par un spectromètre RMN Bruker 500 MHz (Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une console Avance III et d'une sonde TBI. Deux solvants ont été utilisés soit le D₂O,

soit le DMSO-d6/H₂O (2,5/1, v/v). Les spectres RMN du proton de l'acide 2-nitrophénylpyruvique de formule moléculaire C₉H₇NO₅, un composé soupçonné d'être le composé isolé, ont été également enregistrés dans les mêmes conditions.

PARTIE B - DEMARCHE EXPERIMENTALE POUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

II.B.1. Activité anticancéreuse

II.B.1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire AsPC-1

La lignée cellulaire AsPC-1 utilisée a été obtenue auprès d'ATCC (LGC Standard, Molsheim, France). Elle est constituée de cellules épithéliales adhérentes dérivées de xénogreffes de souris nues initiées avec des cellules d'ascite d'un patient âgé de 62 ans présentant un cancer du pancréas (*Figure II.8*) [15].



Figure II. 8. La lignée cellulaire AsPC-1

II.B.1.2. Préparation des cellules AsPC-1

Les cellules AsPC-1 ont été cultivées dans un milieu DMEM^{High-glucose}. Ce milieu a été d'abord supplémenté de 2 mM de glutamine, 10% FBS et 1% pénicilline-streptomycine (100 U/mL et 100 µg/mL respectivement) et disposé dans une flasque de 75 cm² de surface de croissance. Ensuite, les cellules ont été mises en culture dans un incubateur thermostaté à 37 °C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂. Le milieu de culture a été renouvelé toutes les 48 h. A l'approche de la confluence (80-90%), les cellules ont été récupérées à l'aide de trypsine. La trypsine à 0,5% EDTA 0,2% (2,5 mL) est ajoutée au flasque. Le flasque a été placé dans l'incubateur pendant 3 à 5 min jusqu'au le décollément des cellules. 5 mL de DMEM ont été ajoutés pour inactiver la trypsine. Ensuite, les cellules ont été récupérées dans un tube falcon, centrifugées (1000 rpm, 5 min) pour éliminer le surnagent. Puis les cellules ont été remis en suspension en ajoutant 10 ml de DMEM complet frais et ils ont étéensemencés dans

des microplaques stériles à 96 puits à fond plat (Cat. N°353072, BD Falcon, Arizona, USA) à une concentration de 1×10^5 cellules/mL. Enfin, elles ont été incubées pendant une nuit à 37 °C et à 5% CO₂ avant de pouvoir les traiter.

II.B.1.3. Traitement des cellules avec les extraits des plantes

Les extraits des plantes (AE_{Et}30 et AC_{Et}50) ainsi que la fraction 2 (S-F2) issue de chromatographie semi-préparative ont été dissouts dans du DMSO à 1%. La fraction 1 (S-F1) quant à elle a été dissoute dans de l'eau. Les échantillons ont été ensuite dilués dans le milieu de culture de façon à obtenir des solutions de concentrations allant de 100 à 300 µg/mL. Les microplaques contenant les cellules AsPC-1 pré-incubées ont été récupérées et le milieu de culture a été retiré, les cellules étant adhérentes au fond des puits. Un volume de 200 µl de chacune des solutions contenant les extraits des plantes préalablement préparées a été rajouté. Des témoins négatifs ont été préparés en utilisant le même volume de milieu de culture frais avec et sans DMSO à 1%. Un témoin négatif a été préparé contenant du célastrol à 50 µM dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 72 h et leurs aspect et morphologie ont été examinés chaque jour au microscope (Leitz Diavert, Oberkochen, Allemagne).

II.B.1.4. Principe du test d'induction de l'apoptose par cytométrie en flux

La phosphatidylsérine (PS) se trouve dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules vivantes. Dans les premiers stades de l'apoptose, la PS bascule vers le feuillet externe ce qui l'expose à la surface des cellules et permet à l'annexine V-FITC de s'y lier. Au stade de la nécrose, les membranes cellulaires seront rompues. Dans ce cas, l'annexine V-FITC se lie toujours à la PS de la membrane plasmique, mais l'iodure de propidium peut pénétrer dans les cellules et se lier à l'ADN. Grâce à un marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium, il est possible de distinguer par cytométrie en flux les cellules normales des cellules nécrotiques (*Figure II.9*) [16].

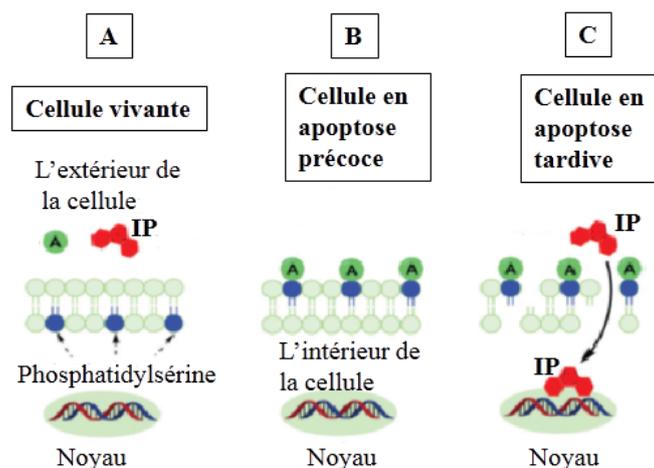


Figure II. 9. Double marquage à l'annexine V-FITC (A) et à l'iodure de propidium (IP) en vue de distinguer les cellules normales des cellules nécrotiques par cytométrie en flux.

Cas A : L'annexine V-FITC et l'iodure de propidium sont libres à l'extérieur de la cellule. **Cas B :** Liaison de l'annexine V-FITC à la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules. **Cas C :** Pénétration de l'IP via la membrane cellulaire.

II.B.1.5. L'analyse du taux d'apoptose suite au traitement

Le taux d'apoptose a été évalué après 72 h par cytométrie en flux Guava^R easyCyteTM 12HT (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). La première étape consistait à détacher les cellules. Pour cela, les milieux de culture des différents puits ont été transférés dans des puits vides de la plaque. Ensuite, 25 µl de la solution de trypsine ont été ajoutés dans les puits originels et la plaque a été incubée pendant 3 à 5 min. Enfin, les milieux de culture transférés ont été retournés dans les puits originels, ce qui permet d'inactiver la trypsine par les facteurs de croissance du FBS qui inactivent l'activité protéasique de la trypsine, mais aussi de garder les cellules mortes qui seraient éventuellement présentes et qui sont planctoniques (flottantes). Les cellules de chaque puits «essais et contrôles» ont été ensuite marquées par l'addition de 2 µL d'iodure de propidium et 2 µL de l'annexine V-FITC. L'annexine V-FITC a une émission à 520 nm (vert), l'iodure de propidium a une émission à 620 nm (rouge). Cependant, les deux peuvent être excités par un laser bleu à 488 nm par le cytomètre. Enfin, les cellules ont été incubées pendant 10 min à l'obscurité la fluorescence émise a été mesurée par cytométrie en flux à 488 nm. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel GuavaSoft (InCyte 3.1.1). Le potentiel apoptotique des extraits testés a été comparé au potentiel apoptotique de contrôle positif (célastrol à 50 µM). Ce dernier est un composé triterpénoïde naturel connu comme un agent cytotoxique qui induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses [17].

II.B.2. Activité anti-inflammatoire

II.B.2.1. Préparation de la lignée cellulaire

L'activité anti-inflammatoire des extraits a été évaluée sur les cellules THP-1 (lignée cellulaire monocyttaire humaine). Les cellules ont été d'abord décongelées, puis centrifugées pendant 6 min (500 tr/min) afin de les débarrasser du DMSO utilisé comme cryoprotecteur. Ensuite, elles ont été placées dans une flasque de 75 cm² de surface de croissance ayant un bouchon à membrane filtrante de 0,2 µm. Puis, ces cellules ont été remises en suspension dans un milieu RPMI-1640 (Thermofisher Scientific, Illkirch, France), supplémenté avec 10% de FBS, 1% d'un mélange de deux antibiotiques, la pénicilline (100 UI/mL) et la streptomycine (1 µg/mL). Il faut noter que le milieu de culture et les autres solutions utilisées ont été réchauffés dans un bain marie à 37 °C avant d'être mis en contact avec les cellules. Finalement, les cellules (non adhérentes) ont été incubées à 37 °C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂, afin d'atteindre une concentration de $1,0 \times 10^6$ cellules/mL.

II.B.2.2. Principe du test anti-inflammatoire

Le test utilisé est basé sur l'inhibition de la libération de TNF- α par des médiateurs anti-inflammatoires (*Figure II.10*). La stimulation des cellules THP-1 par les lipopolysaccharides entraîne le relargage de TNF- α dans le milieu extracellulaire [18]. La cytométrie en flux détecte la présence de TNF- α dans le milieu grâce à un complexe d'anticorps (TNF- α secretion assay, Miltenyi Biotec, Auburn, États-Unis). Le premier complexe appelé anticorps I ou anticorps de capture, est formé d'un anticorps monoclonal anti TNF- α (IgG1, souris), conjugué à un anticorps monoclonal spécifique à la surface cellulaire (IgG2a, souris). Ce complexe va contribuer à la capture et à la fixation de TNF- α à la surface des cellules. Ensuite un anticorps monoclonal anti TNF- α (IgG1 humain) appelé anticorps II ou anticorps de détection, conjugué à la R-phycoérythrine va se fixer sur le premier complexe d'anticorps capturant alors les TNF- α et conduisant par la suite à leur détection dans le milieu extracellulaire par cytométrie en flux. Le R-phycoérythrine est un fluorophore jaune extrait d'algues rouges qui absorbe à 496, 546, 565 nm et émet à 578 nm. Il permet la détection de TNF- α dans le milieu extracellulaire d'où une forte fluorescence jaune est lié à la présence d'une forte concentration en TNF- α . Cela signifie l'absence d'une activité anti-inflammatoire.

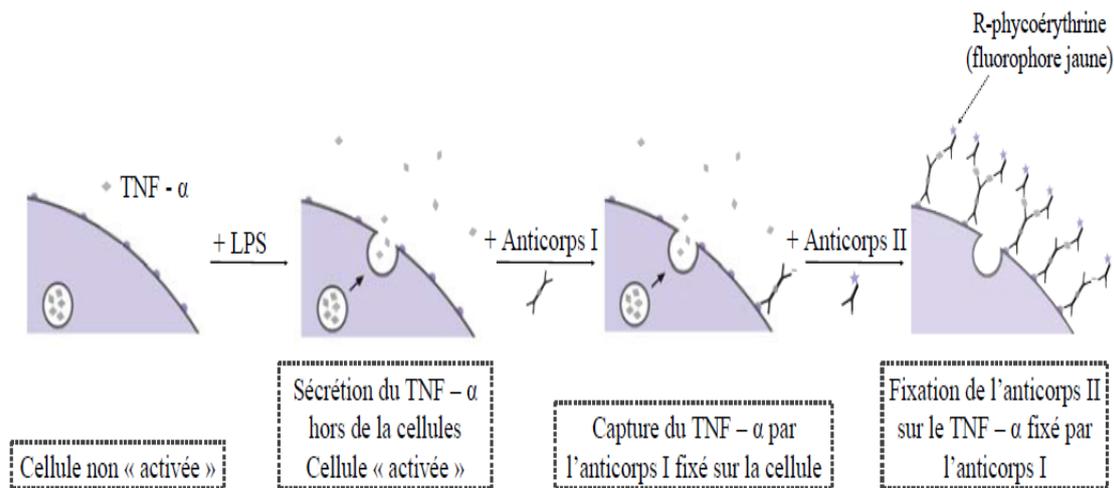


Figure II. 10. Principe du test de sécrétion de TNF- α .

[19]

II.B.2.3. Activité anti-inflammatoire des extraits des plantes

Les extraits des plantes (AE_{EI}30, AC_{EI}50), ainsi que la fraction SF-2 ont été dissouts dans du DMSO à 1%. La fraction SF-1 a été quant à elle dissoute dans de l'eau. Les échantillons ont été ensuite dilués dans le milieu de culture de façon à obtenir des solutions de concentrations allant de 100 à 300 $\mu\text{g/mL}$. Le test anti-inflammatoire a été réalisé dans des plaques de 96 puits (Corning International, Avon, France). Les cellules THP-1 ont été ensemencées en triplicat dans des puits à une densité de 1×10^5 cellules/mL, les extraits ont ensuite été ajoutés aux différentes concentrations (volume final : 200 μL). L'ensemble a été incubé pendant 1 h à 37 °C sous une atmosphère humide contrôlé à 5% de CO₂. Ensuite, 2 μL de LPS issu de *Salmonella abortus equi* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) à (100 nM) ont été additionnés avant une incubation pendant 2 h. Après l'addition de 2 μL de l'anticorps I (anticorps de capture) et de 2 μL de l'anticorps II (anticorps de détection), le milieu est ré-incubé pendant 2h. Enfin, la fluorescence a été mesurée par un cytomètre en flux Guava^R easyCyteTM 12HT (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Trois différents contrôles ont été utilisés dans ce test : un contrôle négatif constitué de cellules non stimulées (sans LPS) et deux contrôles positifs constitués de cellules stimulées avec LPS, l'un contenant du célastrol (50 μM) et l'autre n'en contenant pas.

II.B.3. Activité antimicrobienne

Le test utilisé pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne repose sur la diffusion des agents antibactériens dans un milieu de culture gélosé ce qui résulte en des zones claires d'absence de croissance visible des microorganismes mis en culture. Le test est réalisé en conditions stériles sous poste de sécurité microbiologique. Cinq mL de gélose de Mueller Hinton, fondue etensemencée de 50 µl d'une souche bactérienne cible (souche indicatrice), sont coulés dans une boîte de Pétri. Après solidification et séchage, 10 µl d'une solution d'extrait de plante (AE_{Et}30, AC_{Et}50, SF-1 et SF-2) diluée à 100 et à 300 µg/mL dans le solvant d'extraction sont déposés sur la gélose. Après incubation à 37 °C pendant une nuit, la culture bactérienne forme une nappe trouble de colonies sauf dans la zone de dépôt d'un composé antimicrobien. Le diamètre des zones claires observées rend compte de l'importance de l'activité antimicrobienne. Des contrôles négatifs constitués de d'éthanol à 30% et à 50% ont été utilisés.

Plusieurs souches bactériennes, à Gram-positif et à Gram-négatif, ainsi qu'une souche de levure et une souche de moisissure ont été utilisées comme souches cibles (*Tableau II.2*). Les souches choisies ne sont pas multi-résistantes par souci de sécurité pour les utilisateurs du laboratoire, celui-ci n'étant pas adapté à la manipulation de tels micro-organismes. Toutes les souches sont stockées à -80°C. Leur mise en culture a été réalisée dans le bouillon de culture appelé de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) avec incubation à 37 °C pendant une nuit.

Tableau II. 2. Souches bactériennes et fongiques utilisées dans le test antimicrobien

Espèce	Référence
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 78.3
<i>Bacillus cereus</i>	LC 447
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Enterococcus faecalis</i>	LC G9h
<i>Enterococcus faecalis</i>	LC G8b
<i>Enterococcus faecium</i>	LC WHE 81
<i>Enterococcus faecium</i>	LC 25
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Fusarium oxysporum</i>	DSM 2018
<i>Fusarium solani</i>	ATCC 36031
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LC 660
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LC 804
<i>Lactococcus lactis</i>	LC WHE 53
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LC 258
<i>Listeria innocua</i>	LC 14
<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	LC 10
<i>Listeria monocytogenes 1/2b</i>	LC 11
<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC FA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Salmonella enteritidis</i>	LC 216
<i>Salmonella typhimurium</i>	LC 443
<i>Serratia marcescens</i>	LC 448

<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus xylosus</i>	LC 57
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6303
<i>Ulocladium botrytis</i>	DSM 62465

II. REFERENCES

- [1] [‘http://www.moe.gov.lb/protectedareas/publications/FinalReportShouf-Cedar.pdf’](http://www.moe.gov.lb/protectedareas/publications/FinalReportShouf-Cedar.pdf).
- [2] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, ‘Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay’, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [3] A. Zulueta, M. J. Esteve, A. Frígola, ‘ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products’, *Food Chem.* 114 (2009) 310–316.
- [4] M. Becker, G. Nunes, D. Ribeiro, F. Silva, G. Catanante, J.-L. Marty, ‘Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays’, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (2019) 1108–1114.
- [5] G. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler, ‘Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants’, *Free Radic. Biol. Med.* 14 (1993) 303–311.
- [6] R. VAN DER WERF, "Evaluation du pouvoir anti-oxydant des aliments. Recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète", Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2013.
- [7] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, ‘Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe’, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619–4626.
- [8] K. Mishra, H. Ojha, N. K. Chaudhury, ‘Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results’, *Food Chem.* 130 (2012) 1036–1043.
- [9] R. Hassan, F. Hussein, M. Hawraa, H. Akram, K. Ahmad, D. Ahmad, B. Bassam, ‘Antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical screening of two lebanese medicinal plants’, *Int. Res. J. Pharm.* 4 (2013) 132–136.
- [10] N. Mohamad, A. Falah, J. Fatima, K. Hussein, H. Akram, C. Ali, R. Hassan, ‘Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of the hydroalcoholic extract of the lebanese plant: ephedra campylopoda’, *Int. Res. J. Pharm.* 7 (2017) 23–29.
- [11] R. Daman, M. Choudhary, Anurag, ‘Qualitative Chemical Evaluation And Anthelmintic Activity Of Different Extracts Of Pelargonium’, *World J. Pharm. Res.* 4 (2015) 1105–1115.
- [12] H. Farhan, H. Rammal, A. Hijazi, A. Daher, M. Reda, H. Annan, A. Chokr, A. Bassal, B. Badran, ‘Chemical composition and antioxidant activity of a Lebanese plant *Euphorbia macroclada schyzoceras*’, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (2013) 542–548.

- [13] C. Quettier-Deleu, B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine, C. Brunet, M. Luyckx, M. Cazin, J. C. Cazin, F. Bailleul, F. Trotin, 'Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour', *J. Ethnopharmacol.* 72 (2000) 35–42.
- [14] C. Leitao, E. Marchioni, M. Bergaentzlé, M. Zhao, L. Didierjean, B. Taidi, S. Ennahar, 'Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer', *J. Agric. Food. Chem.* 59 (2011) 1249–1255.
- [15] 'https://www.elabscience.com/p-aspc_1_cell_line-58693.html'.
- [16] M. Cini, T. D. Bradshaw, S. Woodward, 'Using titanium complexes to defeat cancer : the view from the shoulders of titans', *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 1040–1051.
- [17] L. Feng, D. Zhang, C. Fan, C. Ma, W. Yang, Y. Meng, W. Wu, S. Guan, B. Jiang, M. Yang, X. Liu, D. Guo, 'ER stress-mediated apoptosis induced by celastrol in cancer cells and important role of glycogen synthase kinase-3 β in the signal network', *Cell Death Dis.* 4 (2013).
- [18] J. D. M. Campbell, 'Detection and enrichment of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on cytokine secretion', *Methods.* 31 (2003) 150–159.
- [19] Z. Triaux, "Développement de méthodes d'extraction et d'analyse des molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire", Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2019.

CHAPITRE III - ASTRAGALUS EMARGINATUS LABILL - COMPOSES ANTIOXYDANTS ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

Ce chapitre présente les résultats concernant les activités antioxydantes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes dans l'extrait ETOH 30% de la partie aérienne d'AEL. Il est divisé en trois parties : la partie A qui présente les données concernant l'activité antioxydante sous la forme d'un article soumis pour publication dans "*Journal of Pharmaceutical Analysis*"; la partie B qui présente les résultats de l'analyse phytochimique de l'extrait étudié ; et la partie C qui présente les résultats de l'évaluation de ses activités biologiques.

III. PARTIE A - RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE COMPOSES ANTIOXYDANTS DANS L'EXTRAIT D'AEL PAR CLHP-ABTS⁺ ET CLUHP-DAD-SMHR

Article soumis pour publication dans Journal of Pharmaceutical Analysis

III.A. PUBLICATION - HYPHENATED LC-ABTS⁺ AND LC-DAD-HRMS FOR SIMULTANEOUS ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN ASTRAGALUS EMARGINATUS LABILL. EXTRACTS

Chamandy Abir,^{a,b} Zhao Minjie,^a Rammal Hassan,^{b,c} and Ennahar Saïd ^{*,a}

^a Hubert Curien Multidisciplinary Institute (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, IPHC), Joint Research Unit (Unité Mixte de Recherche, UMR) 7178, National Center for Scientific Research (Centre national de la recherche scientifique, CNRS), Analytical Chemistry of Bioactive Molecules and Pharmacognosy Team (Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie, CAMBAP), Université de Strasbourg, 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France

^b Lebanese University, Research Platform of Analysis and Environmental Science (PRASE), Rafic Hariri Campus, Hadath, Lebanon

^c Lebanese University, Faculty of Agronomy, Dekwaneh, Lebanon

*Corresponding author. Tel. +33-368-854-322; e-mail address: ennahar@unistra.fr

III.A.1. Abstract

Antioxidant compounds in the leaves and stems of *Astragalus emarginatus* Labill., a species used in traditional Lebanese medicine, were investigated. First, the activity of various extracts was assessed by trolox equivalent antioxidant capacity, oxygen radical absorption capacity and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assays. The extract using 30% ethanol was the most active. The antioxidant compounds in this extract were then screened using a hyphenated high

performance liquid chromatography-2,2-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate] radical system before being separated by ultra-high performance liquid chromatography and identified by high resolution mass spectrometry and UV-visible diode array detection. About forty compounds were identified. Hydroxycinnamates (caffeic, ferrulic and p-coumaric acids derivatives) and flavonoids (quercetin, luteolin, apigenin and isorhamnetin derivatives) were the two main categories. Active compounds were identified as caffeic acid derivatives and quercetin glycosides. The catechol moiety was shown to be key in the antioxidant activity. This study showed that *A. emarginatus* Labill. is a source of natural antioxidants, which may explain its medicinal use.

Keywords: Antioxidant; *Astragalus emarginatus*; catechol; flavonoids; hydroxycinnamates; caffeic acid; quercetin.

III.A.2. Introduction

Oxidative stress is a major player in the genesis and development of age-related diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. It occurs when excessive build up of reactive oxygen species such as hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in the human body and damage cell constituents such as proteins, lipids and DNA [1,2]. The endogenous antioxidant system boosted by the exogenous antioxidant compounds works out to limit and overcome this process. Plants generally synthesize a variety of compounds with antioxidant properties, such as flavonoids, phenolic acids, alkaloids, terpenoids, carotenoids and others as a part of their defense system against environmental stress. Plants constitute therefore a source of natural antioxidants that can potentially be used to fight oxidative stress in humans [3,4].

With 2000 to 3000 species, *Astragalus* is the largest genus of the angiosperm group and a member of the legume family (Fabaceae). It is mostly found in regions with temperate and arid climate in Asia, Europe and North America [5,6]. *Astragalus* species are annual, perennial; stemmed herbs and shrubs [7]. *Astragalus* root (also called *Astragali Radix* or Huang Qi in Mandarin) has been used in traditional medicines, in particular the Chinese one, for thousands of years and it is still used today to treat diseases and conditions such as inflammation, immune system disorders, tumors, diabetes, hypertension, leukemia and stomach ulcer [8,9]. *Astragalus* extracts also show antioxidant, antibacterial and antifungal activities [10]. As a consequence, two *Astragalus* species, namely *Astragalus mongholicus* and *Astragalus membranaceus*, have been included in the Chinese Pharmacopoeia and five other major

pharmacopoeias [11]. Flavonoids, polysaccharides and saponins have been shown to be the main active ingredients in *Astragalus* species [12-14].

As in other parts of the world, *Astragalus* species are used in Lebanon to treat a number of diseases. Arnold et al. [15] described the use of 4 such species: *Astragalus hermoneus* Boiss. is used as an astringent and root decoctions of *Astragalus coluteoides* Will., *Astragalus oleaefolius* DC. and *Astragalus cruentiflorus* Boiss. are used orally to treat diabetes and jaundice. Yet, with a few exceptions, such as a study by Kanaan et al. [16] describing the antibacterial and antibiofilm activities of *Astragalus angulosus*, our knowledge of the therapeutic use of *Astragalus* species in Lebanese medicine is limited to ethnobotanical reports [17].

In the present study, we decided to investigate the antioxidant activity of *Astragalus emarginatus* Labill. (AEL), one of the 56 species of *Astragalus* endemic to Lebanon and Syria listed by Tohmé and Tohmé [18] and which is widely used in traditional medicine. This was done by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with an online post-column antioxidant system using 2,2-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate] radical (ABTS^{•+}) assay. The isolated antioxidant compounds, as well as other compounds, were subsequently identified by ultra-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high resolution mass spectrometry (UHPLC-DAD-HRMS).

III.A.3. Materials and methods

III.A.3.1. Collection and preparation of plant dry material

The aerial parts (leaves and stems) of AEL were collected from Shouf Biosphere Reserve in the spring of 2018. The botanical authentication was performed at the National Council for Scientific Research in Lebanon. After being washed with distilled water, plant samples were air dried in a shady location at room temperature, then grinded by Ultra centrifugal ZM 200 mill (Retsch, Eragny-sur-Oise, France) at 6000 rpm using a 1 mm sieve. The obtained powder was stored in well-sealed plastic bags in a dry environment

III.A.3.2. Chemicals and reagents

Caftaric acid; 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonic acid; trolox; butylated hydroxytoluene; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; fluorescein; 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride; disodium phosphate and sodium chloride were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Potassium chloride and potassium persulfate were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France), and potassium dihydrogen phosphate was

purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Isoquercitrin, rutin, luteolin-7-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside and apigenin-7-*O*-glucoside were purchased from Extrasynthese (Genay, France).

Water used for extraction and chromatography was of ultra-pure grade (18.2 MU) and was prepared by a Millipore® Synergy system (Molsheim, France). Hydrochloric acid, acetonitrile (ACN), ethyl acetate, ethanol (EtOH) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Methanol (MeOH) and chloroform were from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Formic acid was from Sigma-Aldrich.

III.A.3.3. Preparation of reagents and stock solutions

A stock solution (1000 µM) of trolox was prepared in ACN:H₂O (50:50, V/V). Serial dilutions were made in a range of 5 to 1000 µM for the calibration curves of the oxygen radical absorption capacity (ORAC) and the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays. Phosphate buffer saline (PBS 1X) was prepared by mixing sodium chloride (137 mM), disodium phosphate (10 mM), potassium phosphate (1.76 mM) and potassium chloride (2.7 mM). A stock solution of the ABTS cation radical (ABTS^{•+}) was prepared by mixing 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in water. It was then kept in the dark at 4°C for at least 12h to allow ABTS^{•+} generation. Before use, this stock solution was diluted in PBS 1X to a final concentration of 0.14 mM ABTS.

III.A.3.4. Preparation of AEL extracts

Six solvents covering a range of polarity indices (water [P' =10.2], acidified water at pH=3 [P' =10.2], 70% MeOH [P' =6.58], 70% EtOH [P' =6.07], ethyl acetate [P' =4.4] and chloroform [P' =4.1]) were used to prepare AEL extracts. One gram of the plant's powder was mixed with 15 mL of the extraction solvent and sonicated for 30 min at 25°C in a Fisherbrand 15051 ultrasonic bath (Fisher Scientific Loughborough, UK; 37 kHz, 280 W, ultrasonic peak max. 320 W, standard sine-wave modulation). The mixture was then filtered through a 125 mm paper filter using a Buchner vacuum filtration system (Dutscher, Brumath, France). With the 70% MeOH and 70% EtOH extractions, organic solvents were removed by a VV 2000 rotary evaporator (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) and the water residue was dried using a Free Zone 4.5 freeze-dryer (Labconco, Kansas-City, MO, USA) yielding dry extracts. With ethyl acetate and chloroform extractions, dry extracts were obtained after complete removal of solvents in a rotary evaporator. With water and acidified water extractions, the filtrates were directly freeze-dried to obtain dry extracts. All dry extracts were

stored at -20°C until use. A stock solution (2.0 mg/mL) was prepared from dry extracts using H₂O, ACN:H₂O (50:50, V/V) and ACN as solvents for water and acidified water extracts, 70% MeOH and 70% EtOH extracts, and chloroform and the ethyl acetate extracts, respectively. Dilutions were made for the antioxidant activity tests using the corresponding solvents.

To optimize the extraction conditions, different concentrations of EtOH (10, 30, 50 and 70% EtOH), and different extraction times (5, 15, 30 and 60 min) were used to investigate the effect of these parameters on the antioxidants extraction efficiency. After ultrasonic extraction, the filtered extracts (200 µL) were assessed for their antioxidant activity by the HPLC-ABTS⁺ assay as described in section 4.8. For the complete extraction of the antioxidants from AEL, successive extractions were carried out using 30% EtOH with 30 min of sonication. The successive extracts were pooled, dried and stored as previously described. All experiments were carried out in triplicate.

III.A.3.5. TEAC assay

TEAC assay was used to assess the antioxidant capacity of the AEL extracts in 96-well microplates as described by Re et al. [19] with slight modifications. 10 µL of each sample solution (blank [PBS], trolox, extracts) were deposited in wells in triplicate. After adding 200 µL of ABTS⁺ solution (7 mM), the mixture was incubated at 37°C for 10 min, and the absorption was measured at 734 nm (A_{734}) with a Varioskan plate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

A calibration curve was performed with trolox over a concentration range of 10 - 800 µM. The antioxidant capacity of each AEL extract was expressed in µmol of trolox equivalent (TE) per gram of dry extract (µmol TE/g dry extract). The experiment was repeated three independent times.

III.A.3.6. ORAC assay

ORAC assay was used to assess the antioxidant capacity of the AEL extracts in 96-well dark microplates as described by Ou et al. [20] 150 µL of fluorescein in PBS (1X) (2.8×10^{-5} mg/mL) were mixed in wells with 10 µL of each sample solution (blank [PBS], trolox, extracts) in triplicate. After 10 min of incubation at 37°C, the reaction was started by an automated addition of 30 µL of a 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) solution (41.5 mg/mL in PBS (1X)). The fluorescence intensity emitted at 518 nm was measured by the Varioskan plate reader every minute for 2 h using an excitation wavelength of 485 nm. The decay of fluorescence as a function of time was represented by descending curves, and the area

under the curve (AUC) for each sample including the blank was calculated. Then the net AUC was calculated by subtracting AUC of the sample from AUC of the blank. As in TEAC assay, trolox was used as a reference compound and a calibration curve was constructed (5 - 1000 μM). The antioxidant capacity of each extract was expressed in $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract. The experiment was repeated three independent times.

III.A.3.7. Radical scavenging activity measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

To measure the radical scavenging activity of the 30% EtOH AEL extract, the DPPH assay was used as described by Hassan et al. [21]. Briefly, 1.0 mL of the extract at different concentrations (25 - 400 $\mu\text{g/mL}$) was added to 1.0 mL of a freshly prepared DPPH solution (0.15 mM in methanol). Mixtures were briefly vortexed and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance at 517 nm, monitored by a Hitachi U-2900 double beam spectrophotometer (Hitachi Corporation, Tokyo, Japan), decreased in the presence of an antiradical compound. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a positive control. The DPPH radical scavenging activity (RSA) was expressed as a percentage inhibition calculated using the following equation:

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

where A_{control} and A_{sample} represent the absorbance at 517 nm of the reaction mixture in the absence and presence of a test sample, respectively. The sample concentration yielding 50% of inhibition (IC_{50}) was calculated based on the curve of RSA vs. sample concentration. A lower IC_{50} value signifies a higher antioxidant activity. All experiments were carried out in triplicate.

III.A.3.8. On-line HPLC-ABTS^{•+} assay

The screening of the antioxidants present in the 30% EtOH AEL extract was performed by the HPLC-ABTS^{•+} on-line system according to Leitao et al. [22]. Chromatographic separation was achieved at room temperature on a 250 \times 4.6 mm, 3 μm C18-PFP column (ACE, Aberdeen, Scotland). The mobile phase consisted of H₂O (A) and ACN (B), both containing 0.1% formic acid, and was delivered at 1 mL/min as follows: 2-10% B (0-8 min); 10-10% B (8-15 min) and 10-45% B (15-29 min). Twenty μL of sample solution were injected and UV detection was carried out at 325 nm. The ABTS^{•+} solution was delivered via a second pump at 0.5 mL/min and mixed with the eluent from the analytical column. The mixture passed through the reaction coil, then through a second detector where discoloration was monitored at 412 nm. Compounds

with antioxidant activity displayed negative peaks. The sum of the negative peaks areas was used to evaluate the overall activity of AEL extracts.

III.A.3.9. UHPLC-DAD-HRMS

The UHPLC-DAD-HRMS separation and identification of the antioxidants and other components of the 30% EtOH AEL extract was performed using an Acquity UHPLC system (Waters, Guyancourt, France) connected to a Bruker micrOTOF-Q II mass spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) with an electrospray as an ionization source (ESI). For chromatographic separation, a sample volume of 5 μ l was injected into a C18-PFP column (2.1x100 mm, 1.7 μ m, 130 Å, ACE, Aberdeen, Scotland). The mobile phase consisted of H₂O containing 0.1% formic acid (A) and ACN containing 0.05% formic acid (B) and was delivered at 0.3 mL/min as follows: 5-12% B (0-10 min), 12-12% B (10-11min), 12-20% B (11-16 min) and 20-25% B (16-19 min).

The mass spectrometry (MS) was carried out in negative scan mode from m/z 100 to m/z 1000. ESI setting was as follows: capillary tension, 4500 V; end plate offset, 500 V; drying gas (N₂) flow rate, 9.0 L/min; temperature of drying gas, 200°C; nebulizer pressure, 280 kPa. For MS/MS experiments, nitrogen was used with collision cell energy of 7.0 eV and collision Rf of 200 Vpp. Two collision energies, 10 and 50 V, were used for the compounds eluting in 0-14 min and 14-28 min ranges, respectively. The operating software was micrOTOF 3.0 combined with Hystar 3.2 and data analysis software was Compass Data Analysis 4.0 (Bruker). The mass spectrometer calibration was done over a mass range of m/z 100 - 1000 using a sodium formate solution.

III.A.4. Results and Discussion

III.A.4.1. Selection of the extraction solvent

The efficiency of six solvents (water, acidified water, 70% MeOH, 70% EtOH, chloroform and ethyl acetate) to extract antioxidants from AEL was assessed by ORAC and TEAC assays. In the ORAC assay, the decrease of fluorescence from fluorescein damaged by the peroxy radicals produced by AAPH is monitored. This translates an antioxidant's radical scavenging activity of via hydrogen atom transfer. The presence of antioxidants protects fluorescein from oxidative damage resulting in fluorescence time extension [23]. The TEAC assay, on the other hand, is based on electron transfer and measures an antioxidant's ability to scavenge the ABTS^{•+} radicals which leads to a decrease in color intensity [23]. The obtained data showed that the measured antioxidant activity in AEL extracts was very dependent on the polarity of

the extraction solvent (Fig. 1). The antioxidant activity of extracts with 70% MeOH and 70% EtOH was about 1.4 times higher than that of extracts with water and acidified water, and 5 times higher than that of extracts with chloroform and ethyl acetate. Consistent results were obtained with the ORAC and TEAC assays.

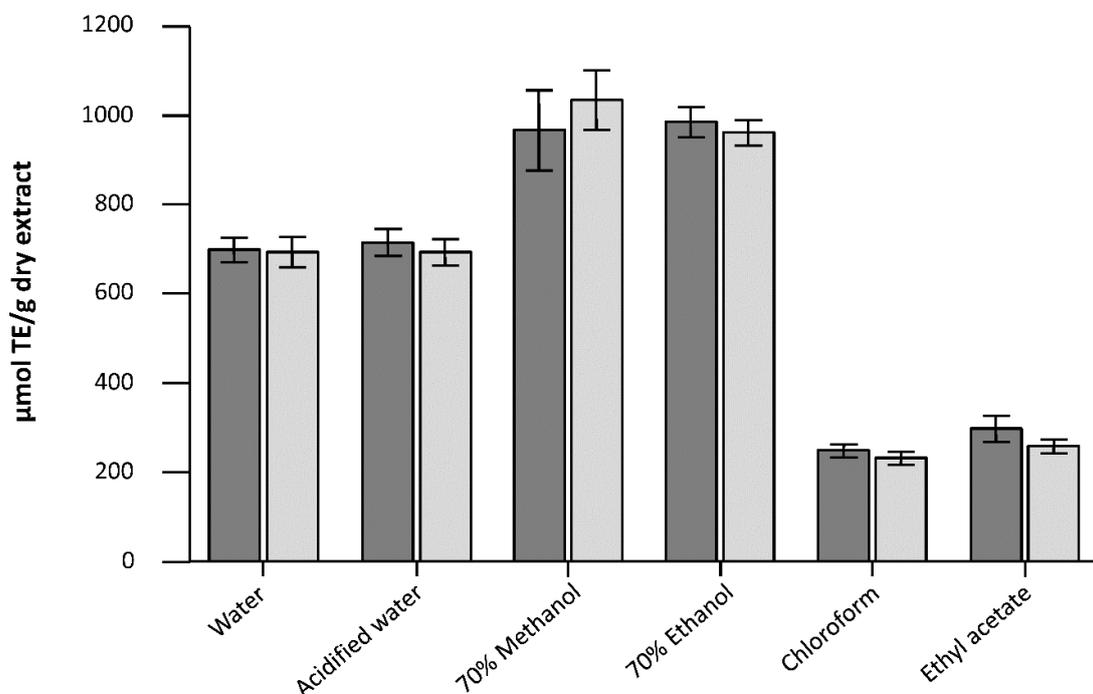


Figure III- 1. Antioxidant activities of extracts from *Astragalus emarginatus* Labill. using various solvents. Activity is measured by TEAC (dark gray) and ORAC (light gray) assays and expressed as μ moles of trolox equivalents (TE) per gram of extract.

The antioxidant activity observed for AEL extracts is not surprising as such activity has been reported with other *Astragalus* species in previous studies [24-26]. Our data indicate that the antioxidant activity of AEL is mainly attributed to polar compounds. Ethanol/water and methanol/water mixtures showed similar efficiencies in extracting antioxidant molecules from AEL. The hydroethanolic mixture was selected for further investigation of AEL's antioxidant potential.

III.A.4.2. Optimization of extraction conditions

During the first extraction trials, an extraction with 70% EtOH during 30 min was selected as the combination yielding the highest recovery of antioxidant compounds. The next step was an optimization step which consisted in fine tuning the extraction with EtOH by testing various EtOH proportions of ethanol in water and extraction durations. Fig. 2 shows the obtained

activity data of the extracts expressed as the sum of the negative peak areas in the on-line HPLC-ABTS^{•+} assay as a function of the extraction time. It appeared that the extraction using 30% EtOH yielded the highest activity value, while the lowest value was obtained with 70% EtOH. This indicates that among the tested solvents, 30% EtOH is the most suitable one for the extraction of antioxidants from AEL. In addition, extraction durations beyond 30 min did not yield significantly higher activities. Based on these results, extraction with 30% EtOH during 30 min was selected as the optimal condition.

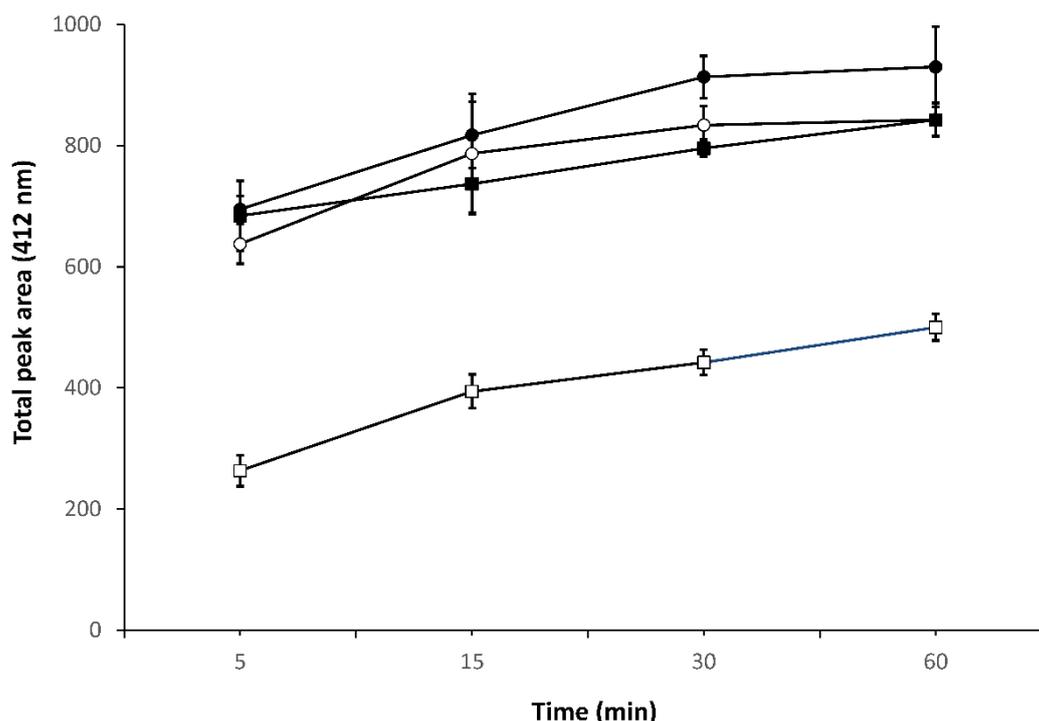


Figure III- 2. Extraction of antioxidants from *Astragalus emarginatus* Labill. as a function of time with different concentrations of ethanol in water: 10% ethanol (open circle); 30% ethanol (dark circle); 50% ethanol (dark square); 70% ethanol (open square). The presence of antioxidants was assessed by the HPLC-ABTS^{•+} assay as the sum of peak areas at 412 nm

Fig. 3 shows the total antioxidant activity of AEL extracts as a function of the number of successive extractions using 30% EtOH for 30 min. It appeared that about 85% of the total antioxidants (represented by the measured activity) were recovered following the first extraction and two additional extractions were needed to increase the percentage to 98%. This indicates that three extractions are sufficient to extract nearly all antioxidants from AEL in the selected conditions.

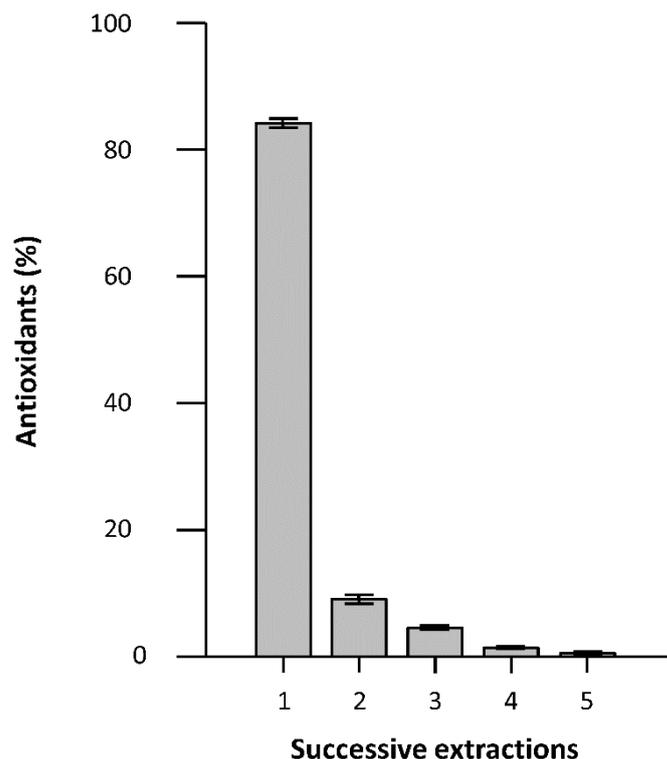


Figure III- 3. Percentage of total antioxidants extracted from *Astragalus emarginatus* Labill. as a function of the number of successive extractions using 30% ethanol for 30 min. The presence of antioxidants was assessed by the HPLC-ABTS^{•+} assay as the sum of peak areas at 412 nm

III.A.4.3. Antioxidant activity measurement by DPPH assay

The DPPH assay, a well established method for the assessment of free radical scavenging activity through hydrogen transfer [27], was applied to AEL extracts. The assay was performed taking BHT as a positive control. The results indicated that the AEL extract exhibited significant radical scavenging activity with an IC₅₀ of 102 ± 4.4 µg/mL, while the IC₅₀ value of BHT was determined to be 18.5 ± 2.0 µg/mL (Table 1).

Table III. 1. Radical scavenging activity of the 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. as determined by the DPPH^a assay

Concentration (µg/mL)	RSA (%) ^b
25	10 ± 0.3
50	22 ± 1.6
100	46 ± 0.2
200	75 ± 0.8
400	95 ± 3.4

^a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ^b radical scavenging activity.

Adigüzel et al. [24] have used the same assay to evaluate the antiradical activity of methanol extracts of the aerial parts of 13 *Astragalus* species. The obtained IC₅₀ values were between 68.8 and 400.4 µg/mL with an IC₅₀ of 19.8 µg/mL for BHT as a positive control. By comparison, the 30% EtOH extract from AEL's aerial parts showed a higher antiradical activity than the methanol extracts of most species of *Astragalus* investigated.

III.A.4.4. Separation and identification of antioxidants and other isolated compounds

HPLC-ABTS^{•+}, a hyphenated system consisting of an HPLC and a post-column ABTS^{•+} assay was used to identify the antioxidant molecules present in the 30% EtOH AEL extract. The individually separated antioxidant compounds react with the ABTS^{•+} radicals and appear as upside-down or negative peaks at 412 nm following a discoloration of the radical's solution. Two chromatograms are obtained, a regular chromatogram of all analytes absorbing UV at 325 nm and a radical scavenging chromatogram at 412 nm (Fig. 4A). It can be noted that the majority of the peaks detected at 325 nm gave rise to corresponding negative ones, which means that they have antioxidant activity. Among them, five major negative peaks were observed (peaks N₀ 2, 13 & 14, 24, 35 and 36 with respective retention times of 10.0; 14.8; 21.3; 24.1 and 25.1 min) representing about 73% of the total negative peaks areas.

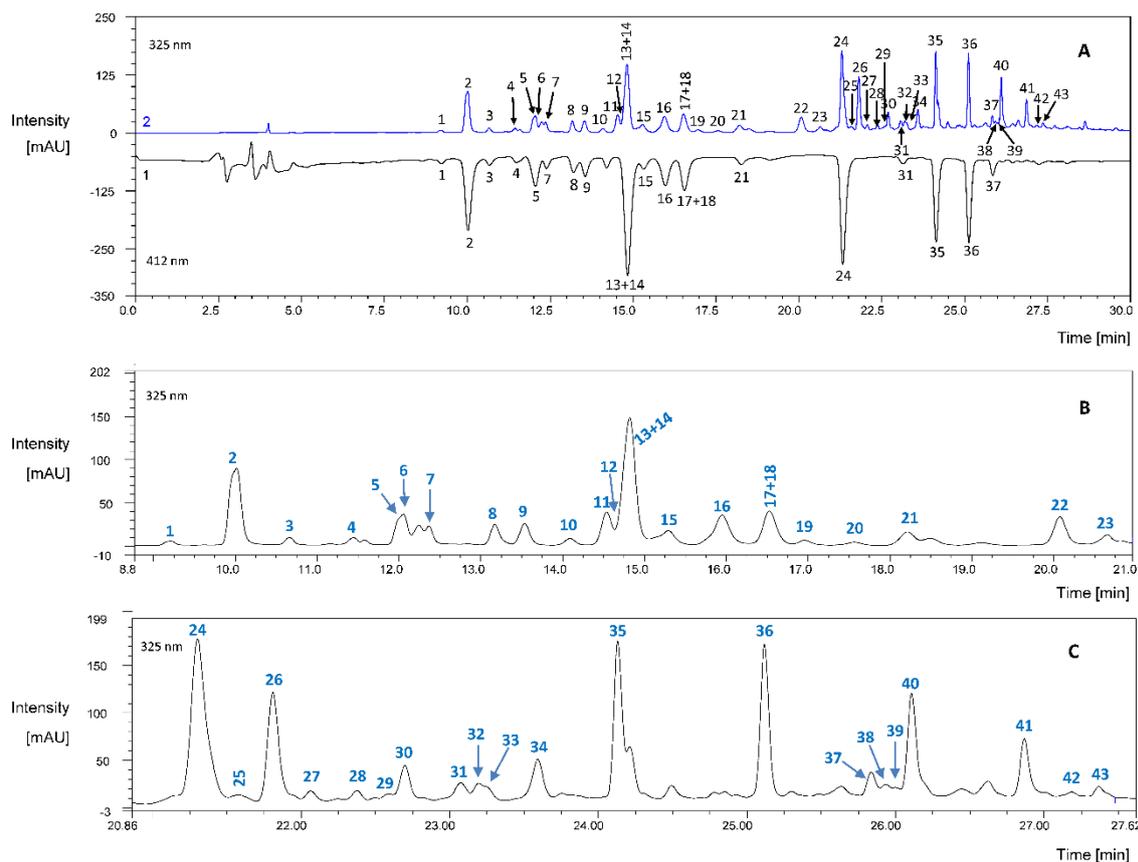


Figure III- 4. UV (upper line) and antioxidant (under line) chromatograms of 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. (A) and the zoomed views (B) and (C) of UV chromatogram

Examination of the UV spectra of all chromatographic peaks revealed that they were mainly phenolic compounds, either hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) eluting before 24 min (peaks N₀ 1 - 34) and showing specific UV absorption peaking at 310 - 328 nm and ca. 300 nm, or flavonoids eluting after 24 min with typical UV absorption peaking at 328 - 355 nm and ca. 265 nm (peaks N₀ 35 - 43) (Fig. 4B). In addition, the negative peak areas corresponding to HCAD accounted for 80% of the total area, while the flavonoids accounted for only 20%. These results showed that the activity of the 30%-EtOH AEL extract came mainly from HCAD. This goes against a report by Pistelli et al. [28] designating flavonoids as the main antioxidants in the areal parts of *Astragalus* species. Much focus has indeed been given to flavonoids compared to HCAD [29-31].

To identify the antioxidants and other compounds extracted from AEL, the 30% EtOH extract was run through UHPLC-DAD-HRMS. The molecular identification was achieved on the basis of UV, MS and MS/MS spectra, the comparison with databases of the literature, and when possible with the data of the available authentic standards [32]. As shown in Fig. 5, the obtained

UV (325 nm) chromatographic profile was similar to that observed with HPLC-ABTS⁺⁺ assay (Fig. 4), although retention times and retention time intervals were different. As a result, the peaks corresponding to the antioxidant compounds in the HPLC-ABTS⁺⁺ assay could easily be identified following UHPLC-DAD-HRMS chromatography.

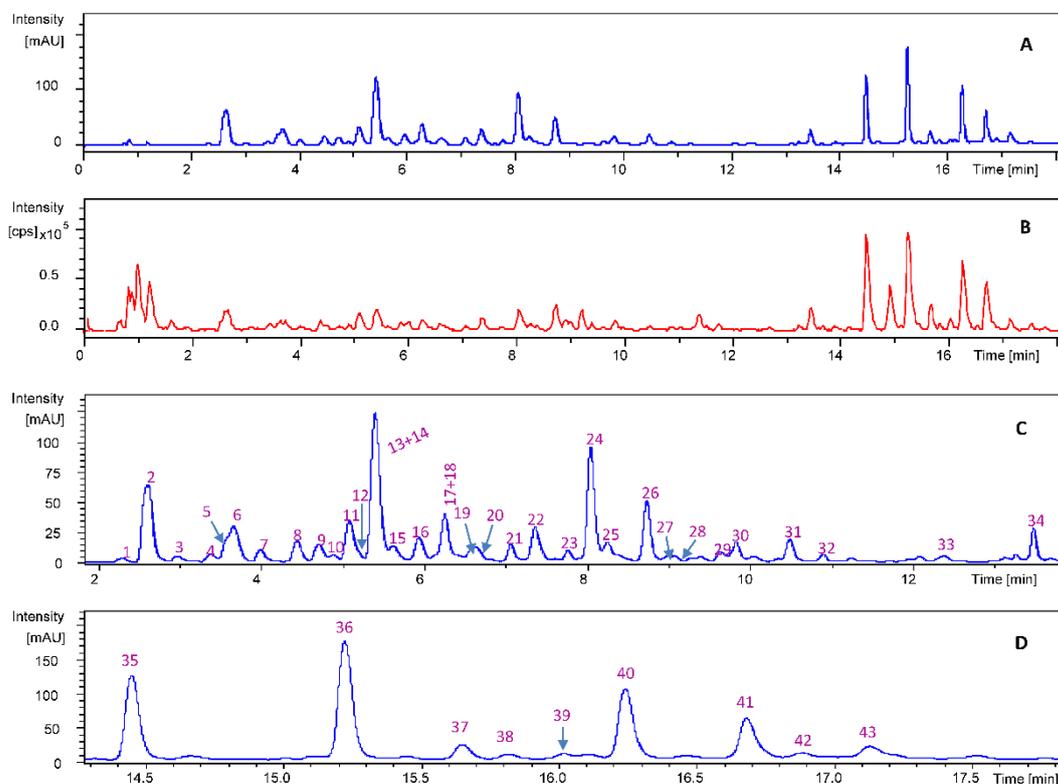


Figure III- 5. UV (325 nm) (A) and MS (B) chromatograms of the 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. and the zoomed views (C) and (D) of UV chromatogram

Compounds corresponding to peaks 1-5, 7-9, 13, 15, 16 and 18 showed UV absorption spectra with characteristics of two hydroxycinnamic acids: caffeic or ferulic acids (λ_{\max} 325-328 and ca. 295-300 nm). Their mass spectra exhibited a common pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 371. The HRMS analysis of each ion proposed the same molecular formula of $C_{15}H_{15}O_{11}$. The main product ion of m/z 371 was m/z 209 ($C_6H_9O_8$) which originated from the cleavage of a caffeoyl moiety ($C_9H_6O_3$, 162 Da) and corresponded to hexaric acid [33]. Since hexaric acid has four OH-groups in its structure, it can form different diastereoisomeric caffeoyl esters [34]. Compounds corresponding to peaks 1-5, 7-9, 13, 15, 16 and 18 were therefore tentatively identified as various caffeoylhexaric acid isomers. *Table 2* summarizes the UV and mass spectral characteristics of the main components in the 30%-EtOH AEL extract as well as their identities. The corresponding chemical structures are illustrated in Fig. 6.

Table III. 2. Identification of the compounds present in the 30% ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. by UHPLC-DAD-HRMS^a. Peak numbers are as shown in Figs. 5 and 6.

Peak N ^o	Rt (min)	λ (nm)	Formula	Mass (<i>m/z</i>)		Error (ppm)	Mass of fragments (<i>m/z</i>)	Identified compound
				c	d			
1 ^b	2.33	295, 325	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0606	3.8	209.0300	Caffeoylhexaric acid isomer
2 ^b	2.65	240, 300, 325	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0608	3.2	209.0295	Caffeoylhexaric acid isomer
3 ^b	3.00	295, 325	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0603	4.4	209.0277	Caffeoylhexaric acid isomer
4 ^b	3.35	300, 324	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0610	2.6	209.0303	Caffeoylhexaric acid isomer
5 ^b	3.64	300, 324	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0615	1.3	209.0303	Caffeoylhexaric acid isomer
6	3.74	313	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	355.0671	355.0661	2.7	209.0294, 191.0209	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid isomer
7 ^b	4.03	300, 325	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0615	1.3	209.0290	Caffeoylhexaric acid isomer
8 ^b	4.48	245, 300, 327	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0610	2.7	209.0291	Caffeoylhexaric acid isomer
9 ^b	4.73	245, 302, 327	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0612	2.0	209.0289	Caffeoylhexaric acid isomer
10	4.91	310	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	355.0671	355.0666	1.2	209.0285, 191.0248	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid isomer
11	5.11	300, 324	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁	385.0776	385.0764	3.3	209.0308, 191.0211, 147.0297	Feruloylhexaric acid isomer
12	5.19	315	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	355.0671	355.0672	-0.3	209.0322, 191.0179	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid isomer
13 ^b	5.42	242, 300, 328	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0616	0.9	209.0298	Caffeoylhexaric acid isomer
14 ^b	5.48	240, 300, 327	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311.0409	311.0399	3.2	179.0340, 149.0085	Caftaric acid ^e
15 ^b	5.62	300, 325	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0603	4.4	209.0281	Caffeoylhexaric acid isomer
16 ^b	5.96	295, 327	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0617	0.8	209.0283	Caffeoylhexaric acid isomer
17 ^b	6.27	240, 300, 328	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁	385.0776	385.0770	1.6	223.0447	Caffeoylhexaric acid derivative
18 ^b	6.30	245, 300, 327	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	371.0620	371.0614	1.5	209.0313	Caffeoylhexaric acid isomer
19	6.60	313	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	355.0671	355.0667	1.1	209.0326, 191.0159	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid isomer
20	6.67	300, 323	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁	385.0776	385.0768	2.1	209.0299, 191.0197	Feruloylhexaric acid isomer
21 ^b	7.08	300, 326	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁	385.0776	385.0764	3.3	223.0462	Caffeoylhexaric acid derivative
22	7.37	313	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	355.0671	355.0670	0.2	209.0300, 191.0194	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid isomer
23	7.42	310	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295.0459	295.0458	0.1	163.0391, 149.0322	Coutaric acid isomer
24 ^b	8.06	244, 300, 328	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311.0409	311.0408	0.2	179.0350, 149.0085	Caftaric acid isomer
25	8.26	314	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₀	369.0822	369.0816	3.1	223.0456, 205.0354, 129.0183	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid derivative
26	8.74	300, 328	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁	385.0776	385.0772	1.0	209.0278, 191.0191, 147.0281	Feruloylhexaric acid isomer
27	8.96	325	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	325.0560	325.0563	0.5	193.0486	Fertaric acid isomer
28	9.08	310	C ₁₆ H ₁₇ O ₁₀	369.0822	369.0822	1.5	223.0464, 205.0379, 129.0189	<i>p</i> -coumaroylhexaric acid derivative
29	9.65	312	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295.0459	295.0556	1.1	163.0355, 149.0093	Coutaric acid isomer
30	9.83	300, 327	C ₁₇ H ₁₉ O ₁₁	399.0933	399.0920	3.2	223.0484, 205.0354	Feruloylhexaric acid derivative
31	10.48	313	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295.0459	295.0557	1.0	163.0383, 149.0090	Coutaric acid isomer
32	10.88	300, 326	C ₁₇ H ₁₉ O ₁₁	399.0933	399.0919	3.4	223.0496, 205.0328	Feruloylhexaric acid derivative
33	12.36	300, 327	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	325.0560	325.0549	4.9	193.0513	Fertaric acid isomer
34	13.45	300, 325	C ₁₉ H ₂₃ O ₁₂	443.1195	443.1203	-1.8	267.0713	Ferulic acid derivative
35 ^b	14.47	255, 267, 354	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀	741.1884	741.1920	-4.9	609.1437, 301.0324, 300.0273, 271.0262, 255.0311	Quercetin-3-(2 <i>G</i> -xylosylrutinoside)
36 ^b	15.24	255, 267, 355	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1461	609.1478	-2.8	301.0345, 300.0280, 271.0258, 255.0300	Rutin ^e
37 ^b	15.66	255, 267, 353	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	463.0890	-1.7	301.0305, 300.0264, 271.0242, 255.0242	Isoquercitrin ^e
38	15.83	268, 346	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0933	447.0934	-0.3	285.0384, 284.0336	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside ^e
39	16.03	266, 334	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1512	593.1524	-2.1	285.0406, 284.0322	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside
40	16.25	254, 267, 355	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆	623.1618	623.1631	-2.2	315.0510, 314.0429, 300.0258, 299.0203, 271.0254, 243.0275	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside ^e

41	16.69	254, 267, 354	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477.1038	477.1030	1.8	314.0432, 300.0249, 299.0217, 285.0405, 271.0247, 243.0298	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside or galactoside
42	16.88	268, 328	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0984	431.0976	1.7	269.0468, 268.0339	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside ^e
43	17.16	268, 340	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	533.0937	533.0943	-1.1	489.1016, 285.0397, 284.0330	Luteolin-7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonyl)- glucoside

^a ultra-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high resolution mass spectrometry; ^b Antioxidant compound; ^c theoretical value; ^d experimental value; ^e Confirmed by the use of an authentic standard.

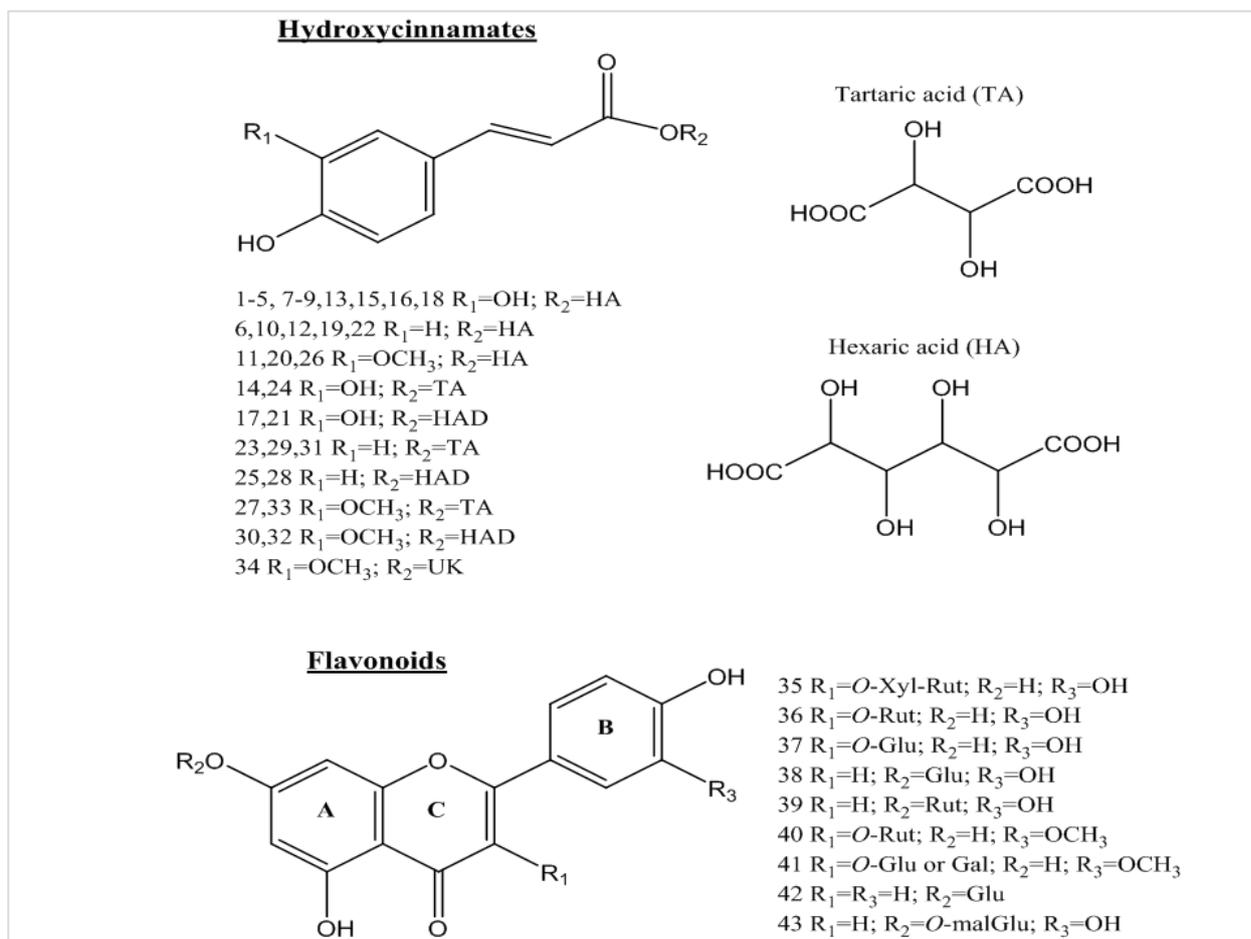


Figure III- 6. The chemical structure of the compounds in the 30%- ethanol extract of *Astragalus emarginatus* Labill. as identified by ultra-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high resolution mass spectrometry.

HA: hexaric acid; TA: tartaric acid, HAD: hexaric acid derivative; UK: unknown; Xyl: xylose; Rut: rutinose, Glu: glucose; Gal: galactose; malGlu: (6"-*O*-malonyl)-glucose

Compounds corresponding to peaks 6, 10, 12, 19 and 22 showed UV spectra similar to that of *p*-coumarate (λ_{\max} 310-315 nm) [35], with a [M-H]⁻ ion at *m/z* 355 (C₁₅H₁₅O₁₀) and MS/MS fragments at *m/z* 209 (hexaric acid) [M-H-*p*-coumaroyl]⁻ and *m/z* 191 [M-H-*p*-coumaroyl-H₂O]⁻. These compounds were tentatively identified as *p*-coumaroylhexaric acid isomers

(Table 2; Fig. 6). Some other less intensive peaks at m/z 355 were also detected, consistent with previously published data in which eight different isomers of *p*-coumaroylhexaric acid have been identified in *Eupatorium cannabinum* subsp. *cannabinum* and in *Leonurus japonicus* and *Leonurus cardiac* [36].

Compounds corresponding to peaks 11, 20 and 26 showed UV spectra with λ_{\max} 324-328 and ca. 300 nm, and a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 385 ($C_{16}H_{17}O_{11}$). The observation of product ions at m/z 209 and 191 indicated in fact the presence of hexaric acid in the compounds and the loss of 176 Da ($385-209 = 176$ Da) corresponded to a feruoyl moiety. Based on these elements and knowing that caffeic and ferulic acids have similar UV spectra [37], these compounds were tentatively identified as feruloylhexaric acid isomers.

Compounds corresponding to peaks 14 and 24 showed the same UV spectrum (λ_{\max} ca. 240-244, ca. 300 and 327-328 nm), the same $[M-H]^-$ (m/z 311 ($C_{13}H_{11}O_9$)) and the same product ions (m/z 179 and 149) with those of the standard compound caffeoyltartaric acid (caftaric acid). Based on the retention time, peak 14 was definitively identified as caftaric acid (Tr = 5.48 min), and peak 24 (Tr = 8.06 min) was tentatively identified as caftaric acid isomer (Table 2; Fig. 6) [38].

Compounds corresponding to peaks 17 and 21 exhibited a $[M-H]^-$ ion at m/z 385 ($C_{16}H_{17}O_{11}$), and UV spectra with λ_{\max} at 326-328 and ca. 300 nm. Although these data were the same as that observed with the composes 11, 20 and 26, the MS/MS fragmentation behavior was different. A basic fragment ion at m/z 223 ($C_7H_{11}O_8$) was obtained instead of m/z 209 ($C_6H_9O_8$), showing a loss of 162 Da corresponding to a caffeoyl moiety ($C_9H_6O_3$), consistent with the UV data. Therefore, these compounds should be caffeates whose alcohol part could be an hexaric acid derivative with a more CH_2 in the structure. Indeed, 2,4,5-trihydroxy-3-methoxy hexanedioic acid ($C_7H_{12}O_8$) is a natural organic acid. As a result, the compounds 17 and 21 could be tentatively classified as caffeoylhexaric acid derivatives.

Compounds corresponding to peaks 23, 29 and 31 showed UV spectra with λ_{\max} at 310-313 nm and a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 295 ($C_{13}H_{11}O_8$). These compounds, displaying both tartaric (149 Da) and *p*-coumaric acids (163 Da) fragments, were tentatively identified as coutaric acid (*p*-coumaroyl tartaric acid) isomers in agreement with published data [39,40].

Compounds corresponding to peaks 25 and 28 exhibited characteristic UV spectra of *p*-coumarates (λ_{\max} 310-315 nm) with a common $[M-H]^-$ ion at m/z 369.0822 ($C_{16}H_{17}O_{10}$). MS/MS fragmentation resulted in three fragments at m/z 223 ($C_7H_{11}O_8$) $[M-H-p\text{-coumaroyl}]^-$, m/z 205 $[M-H-p\text{-coumaroyl-H}_2O]^-$ and m/z 129 $[M-H-p\text{-coumaroyl-H}_2O-C_2H_4O_3]^-$. As the fragment at m/z 223 ($C_7H_{11}O_8$) was the same as that observed for compounds 17 and 21, the

compounds 25 and 28 could be tentatively identified as *p*-coumaroylhexaric acid derivatives (Table 2; Fig. 6). The loss of C₂H₄O₃ for the fragment at *m/z* 129 could correspond to the end structure of hexaric acid derivative, CH₂(OH)COOH.

Compounds corresponding to peaks 27 and 33 yielded a molecular ion of *m/z* 325 (C₁₄H₁₃O₉) and UV spectra with characteristics of caffeoyl or feruloyl derivatives (λ_{max} at 325-327 nm). A basic product ion at *m/z* 193 (C₁₀H₉O₄), resulting from the elimination of tartaric acid moiety (C₄H₄O₅), was observed corresponding to ferulic acid. Therefore, these compounds were tentatively classified as feruloyltartaric acid (fertaric acid) isomers, which have been identified in other plants (*Asteraceae*) and in wine [39,41].

Compounds corresponding to peaks 30 and 32 displayed characteristic UV spectra of caffeoyl or feruloyl derivatives (λ_{max} 326-327 and 295 nm) with a common [M-H]⁻ ion at *m/z* 399.0933 (C₁₇H₁₉O₁₁). Their MS/MS pattern was similar to that of compounds 17 and 21 (caffeoylhexaric acid derivatives). The same fragment ions (*m/z* 223) were observed as compounds 17 and 21, suggesting a loss of a feruloyl moiety (339 - 223 = 176 Da), which was further fragmented to *m/z* 205 through elimination of a water molecule [42]. Based on these results, compounds 30 and 32 were tentatively identified as feruloylhexaric acid derivatives (Table 2; Fig. 6).

The compound corresponding to peak 34 exhibited a pseudomolecular ion at *m/z* 443.1195 (C₁₉H₂₃O₁₂), and a basic product ion at *m/z* 267 (C₉H₁₅O₉) presenting a loss of feruloyl moiety (443-267 = 176). Moreover, its UV data (λ_{max} 325 and 300 nm) strongly supported the presence of feruloyl moiety in its structure. Compound 34 was tentatively identified as ferulic acid ester. Unfortunately, the alcohol part of the ester could not be proposed with the known data.

Compounds corresponding to peaks 35-37 showed a UV λ_{max} at 255, ca. 267 and 353-355 nm meaning that the three compounds belong to the group of flavonoids. They displayed a common product ion at *m/z* 301 corresponding to an aglycone moiety. Consequently, they were identified as quercetin derivatives. The MS spectra of these compounds exhibited pseudomolecular ions [M-H]⁻ at *m/z* 741.1920, 609.1478 and 463.0890 with the corresponding molecular formula C₃₂H₃₇O₂₀, C₂₇H₂₉O₁₆ and C₂₁H₁₉O₁₂ respectively. The product ions at *m/z* 301 indicated a neutral loss of 440, 308 and 162 Da, corresponding probably to 2G-xylosylrutinose, rutinose and glucopyranose (or galactose) moiety for peaks 35, 36 and 37 respectively, suggesting that those compounds are *O*-glycosides (Table 2; Fig. 6). Thus peak 36 was identified as rutin and the result was further confirmed by the retention time, UV and MS/MS data of the authentic standard. A product ion at *m/z* 609.1437, corresponding to rutin moiety was observed for peak 35, proposing the loss of 132 Da which could be attributed to

xylose moiety. Moreover, the rest of the product ions were similar to those of rutin, suggesting a tentative identity of the peak 35 as quercetin-3-(2G-xylosylrutinoside). For peak 37, the proposed identification was isoquercitrin (quercetin-3-*O*-glucoside) or hyperoside (quercetin-3-*O*-galactoside). The use of an authentic standard confirmed the identity of compound 37 as isoquercitrin.

Compounds corresponding to peaks 38, 39 and 43 presented similar UV spectra (λ_{max} 340-348 and ca. 266-268 nm). Compound 38, showed a pseudomolecular ion at m/z 447.0934 ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$) and MS/MS fragment ions at m/z 285 and m/z 284 originating from the loss of a hexose moiety $[\text{M}-\text{H}-162]^-$. It was identified as luteolin-7-*O*-glucoside and further confirmed by the use of an authentic standard. Compound 39 exhibited a pseudomolecular ion at m/z 593.1524 ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$), and had a similar fragmentation pattern as compound 38 (Table 2). The presence of the fragment ions at m/z 285 and m/z 284 generated from the loss of rutinose moiety $[\text{M}-\text{H}-308]^-$ allowed the identification of this compound as luteolin-7-*O*-rutinoside [43]. Compound 43, presenting a pseudomolecular ion at m/z 533.0943 ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{O}_{14}$), produced fragments ions at m/z 285, 284 as well as trace amounts at m/z 489. The presence of the fragment ion at m/z 489 in the MS spectrum (fragmentation in the source) resulted from the loss of CO_2 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$ and suggested the presence of malonyl moiety in the molecule [44]. Based on these results, compound 43 was tentatively identified as luteolin-7-*O*-(6''-*O*-malonyl hexoside) which has already been identified in *Chrysanthemum morifolium* [45].

Compound corresponding to peak 40 showed a pseudomolecular ion at m/z 623.1631 ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_{16}$) and the UV characteristic of isorhamnetin glycoside (λ_{max} 355, ca. 267 and 254 nm). The MS/MS fragment ion at m/z 315 was assigned to isorhamnetin due to the loss of rutinose moiety $[\text{M}-\text{H}-308]^-$. Further dissociation of the aglycone moiety yielded ions at m/z 300 from the loss of the methyl group. Based on the above analysis, this compound was identified as isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, which was confirmed by the use of an authentic standard.

Compound 41 showed a pseudomolecular ion at m/z 477.1030 ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_{12}$), a UV spectrum (λ_{max} 354, ca. 267, 254 nm) and a MS/MS fragmentation pattern similar to those of compound 40 (Table 2). A fragment ion of m/z 315 was obtained which corresponded to the loss of a hexose moiety $[\text{M}-\text{H}-162]^-$, probably glucose or galactose. The compound 41 was tentatively identified as isorhamnetin-3-*O*-glucoside or isorhamnetin-3-*O*-galactoside (Scheme 1) [46]. However, further investigation with authentic standards is necessary to ensure full identification.

The compound corresponding to peak 42 exhibited a pseudomolecular ion at m/z 431.0976 ($C_{21}H_{19}O_{10}$). It generated a typical UV spectrum of apigenin glycoside (λ_{max} 328 and ca. 268 nm) and a basic product ion at m/z 268 corresponding to the radical anion of apigenin [Y_0-H] $^-$. The fragments observed at m/z 269, although much less intense, suggested the loss of a hexose [$M-H-162$] $^-$. Therefore, the compound 42 was identified as apigenin-7-*O*-glucoside, an identity which was confirmed by the use of an authentic standard.

As previously mentioned, the 30%-EtOH AEL extract contained mainly two classes of phenolic compounds, hydroxycinnamates and flavonoids derivatives. Hydroxycinnamates were formed between three hydroxycinnamic acids (caffeic, ferrulic and *p*-coumaric acids) and three polyhydroxy organic acids (hexaric acid, tartaric acid and hexaric acid derivative) by cross formation. Consequently, nine kinds of hydroxycinnamates were tentatively identified and some have more stereoisomers or diastereoisomers than others. Further confirmation of some of the structures is needed after complicated isolation, purification and structural identification, and/or with the use of authentic compounds which are not yet commercially available. To the best of our knowledge, hydroxycinnamate derivatives linked to hexaric acid or tartaric acid were identified for the first time in the *Astragalus* genus.

The main flavonoids detected were quercetin derivatives (compounds 35, 36 and 37) and isorhamnetin derivatives (compounds 40 and 41). Only trace amounts of three luteolin derivatives (compounds 38, 39 and 43) and one apigenin derivative (compound 42) were detected.

The major antioxidants of the 30%-EtOH AEL extract were identified as caffeic acid derivatives (peaks 2, 13+14 and 24) and quercetin glycosides (peaks 35 and 36). These compounds have a common catechol moiety in their structure. The individual antioxidant activity detected by HPLC-ABTS⁺⁺ assay appears to be related completely or partially to the presence of this catechol structure. Substitution of one of the two catechol OH-groups might make the compound much less active or inactive [47]. For example, compound 2 (caffeoylhexaric acid isomer) and compound 26 (feruloylhexaric acid isomer) have similar UV and MS peak intensities. Yet, compound 2 showed strong antioxidant activity, while compound 26 has no activity. The only structural difference between these two compounds is the substitution of one of the catechol OH-groups in compound 2 with -OCH₃ in compound 26. Another illustration of the importance of the catechol moiety in the antioxidant activity is the fact that two quercetin derivatives with a catechol moiety (ring B), compounds 36 (rutin) and 37 (isoquercitrin), showed strong antioxidant activity, while compound 40 (isorhamnetin-3-*O*-

rutinoside), where one OH-group of the catechol structure in the ring B is replaced with -OCH₃, was far less active.

III.A.5. Conclusions

This study demonstrated the antioxidant activity of the extracts of the aerial parts of AEL using different assays, TEAC, ORAC, DPPH and on-line HPLC-ABTS⁺. About forty compounds were identified or tentatively identified by UHPLC-DAD-HRMS method, belonging to two families of compounds, hydroxycinnamate and flavonoid derivatives. Among these compounds, caffeic acid derivatives and quercetin glycosides showed strong antioxidant activity. The catechol moiety was shown to be the key structural feature for the antioxidant activity. The obtained data indicates that AEL is a potential source of natural antioxidants. Further investigations are however needed to assess the biological activity of this plant with relation to its traditional medicinal use.

III.A.6. Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Georges Tohmé (CNRS, Lebanon) for the identification of the plant specimens and to the Shouf Biosphere Reserve for providing the permission for the plant collection and facilitating our work within the reserve.

III.A.7. Declaration of Competing Interests

There is no conflict of interest to be declared.

III.A.8. References

- [1] Z. Liu, Z. Ren, J. Zhang, et al., Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases, *Front. Physiol.* 9 (2018), 477.
- [2] B. Poljsak, D. Šuput, I. Milisav, Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2013), 2013.
- [3] G. A. Engwa, Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases, in: *Phytochemicals, Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, IntechOpen, Shimane University, Shimane, Japan, 2018, pp. 1-27.
- [4] B. Salehi, E. Azzini, P. Zucca, et al., Plant-derived bioactives and oxidative stress-related disorders: A key trend towards healthy aging and longevity promotion, *Appl. Sci.* 10 (2020), 947.

- [5] S. Naghiloo, A. Movafeghi, A. Delazar, et al., Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae), *BioImpacts* 2 (2012) 105-109.
- [6] J. Asgarpanah, S. M. Motamed, A. Farzaneh, et al., Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of *Astragalus squarrosus* Bunge, *African J. Biotechnol.* 10 (2011) 19176-19180.
- [7] I.I. Ionkova, A. Shkondrov, I. Krasteva, et al., Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of *Astragalus* saponins, *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 343-374.
- [8] N.A. Jaradat, A.N. Zaid, A. Abuzant, et al., Phytochemical and biological properties of four *Astragalus* species commonly used in traditional Palestinian medicine, *Eur. J. Integr. Med.* 9 (2017) 1-8.
- [9] R. Arumugam, B. Kirkan, C. Sarikurkcü, Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall., *South African J. Bot.* 120 (2019) 268-273.
- [10] H. Teyeb, O. Houta, H. Najjaa, et al., Biological and chemical study of *Astragalus gombiformis*, *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 67 (2012) 367–374.
- [11] International Organization for Standardization, Traditional Chinese medicine — *Astragalus mongholicus* root, ISO Standard (2020) 22988:2020.
- [12] V.N. Hristo, I.I. Ionkova, Proceedings of the eighth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Durrës, Albania, 2014, 293.
- [13] H. Vasilev, S. Ross, K. Šmejkal, et al., Flavonoid glycosides from endemic bulgarian *Astragalus aitosis* (Ivanisch.), *Molecules* 24 (2019), 1419.
- [14] J. Ghasemian-Yadegari, H. Nazemiyeh, S. Hamedeyazdan, et al., Secondary metabolites from the roots of *Astragalus maximus*, *Res. J. Pharmacogn.* 4 (2017) 31–38.
- [15] N. Arnold, S. Baydoun, L. Chalak, et al., A contribution to the flora and ethnobotanical knowledge of Mount Hermon, Lebanon, *Fl. Medit.* 25 (2015) 13–55.
- [16] H. Kanaan, M. El-Mestrah, A. Sweidan, et al., Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*, *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 6 (2016) 50–57.
- [17] M. S. Amiri, M.R. Joharchi, M. Nadaf, et al., Ethnobotanical knowledge of *Astragalus* spp.: The world's largest genus of vascular plants, *Avicenna J. Phytomed.* 10 (2020) 128–142.
- [18] G. Tohmé, H.S. Tohmé, *Illustrated Flora of Lebanon*, National Council for Scientific Research, Beirut, Lebanon, 2014.

- [19] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [20] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619-4626.
- [21] R. Hassan, F. Hussein, M. Hawraa, et al., Antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical screening of two lebanese medicinal plants, *Int. Res. J. Pharm.* 4 (2013) 132–136.
- [22] C. Leitao, E. Marchioni, M. Bergaentzlé, et al., Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1249–1255.
- [23] A. Zulueta, M.J. Esteve, A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chem.* 114 (2009) 310–316.
- [24] A. Adigüzel, M. Sökmen, H. Özkan, et al., In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of *Astragalus* species growing in the eastern Anatolia Region of Turkey, *Turk. J. Biol.* 33 (2009) 65–71.
- [25] S. Bourezzane, H. Haba, C. Long, et al., Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L. growing in semiarid areas of Algeria, *J. Serb. Chem. Soc.* 83 (2018) 31–38.
- [26] W. Pu, D. Wang, D. Zhou, Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds from *Astragalus taipashanensis* and their structure-activity relationship, *Sci. Rep.* 5 (2015), 13914.
- [27] K. Mishra, H. Ojha, N.K. Chaudhury, Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results, *Food Chem.* 130 (2012) 1036–1043.
- [28] L.F. Pistelli, Secondary metabolites of genus *Astragalus*: Structure and biological activity, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 27 (2002) 443-545.
- [29] N. Haşimi, A. Ertaş, M.A. Yilmaz, et al., LC-MS/MS and GC-MS analyses of three endemic *Astragalus* species from Anatolia towards their total phenolic-flavonoid contents and biological activities, *Biol. Divers. Conserv.* 10 (2017) 18-30.
- [30] K.A. Al-shammary, K.R. Al-joboury, Chemical study for some species of *Astragalus* L.(Fabaceae family) in Iraq, *J. Genet. Environ. Resour. Conserv.* 4 (2016) 66–71.
- [31] N.N. Guzhva, Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *astragalus asper*, *Chem. Nat. Compd.* 46 (2010) 303-304.

- [32] H. Kelebek, S. Selli, P. Kadiroğlu, et al., Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process, *Food Chem.* 220 (2017) 31–41.
- [33] J.P. Piwowarski, B. Waltenberger, H. Stuppner, et al., The analysis of phenolic compounds from the aerial parts of *Eupatorium cannabinum* L. subsp. *cannabinum*, *Biochem. Syst. Ecol.* 79 (2018) 37–43.
- [34] P. Lorenz, J. Conrad, J. Bertrams, et al., Investigations into the phenolic constituents of Dog's mercury (*Mercurialis perennis* L.) by LC-MS/MS and GC-MS analyses, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 60–71.
- [35] L.Z. Lin, J.M. Harnly, M.S. Pastor-Corrales, et al., The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chem.* 107 (2008) 399–410.
- [36] T.A. Garran, R. Ji, J.L. Chen, et al., Elucidation of metabolite isomers of *Leonurus japonicus* and *Leonurus cardiaca* using discriminating metabolite isomerism strategy based on ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 141–153.
- [37] L. Bengoechea, T. Hernández, C. Quesada, et al., Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *Chromatographia* 41 (1995) 94–98.
- [38] I.M. Abu-Reidah, M.M. Contreras, D. Arráez-Román, et al., Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 212–227.
- [39] B.S. Khoza, S. Gbashi, P.A. Steenkamp, et al., Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry, *South African J. Bot.* 103 (2016) 95–100.
- [40] K. Schütz, D.R. Kammerer, R. Carle, et al., Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 179–186.
- [41] F. Buiarelli, F. Coccioli, M. Merolle, et al., Identification of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters in wine by HPLC- tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 123 (2010) 827–833.

- [42] M.F. Chamorro, G. Reiner, C. Theoduloz, et al., Polyphenol composition and (bio)activity of *Berberis* species and wild strawberry from the Argentinean Patagonia, *Molecules* 24 (2019), 3331.
- [43] H. Li, W. Yao, Q. Liu, et al., Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine *Ligustri Lucidi Fructus*, *Molecules* 22 (2017), 689.
- [44] M. Mosić, J. Trifković, I. Vovk, et al., Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen, *Biomolecules* 9 (2019), 783.
- [45] N. Zhang, Z. He, S. He, et al., Insights into the importance of dietary chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* cv. Hangju)-wolfberry (*Lycium barbarum* fruit) combination in antioxidant and anti-inflammatory properties, *Food Res. Int.* 116 (2019) 810–818.
- [46] A. Schieber, P. Keller, P. Streker, et al., Carle, Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. “Brettacher”) by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 87–94.
- [47] M. Kessler, G. Ubeaud, L. Jung, Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 131–142.

III. PARTIE B - CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET ESTIMATION DES TENEURS EN PHÉNOLS ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX DANS L'EXTRAIT AE_{ET30}

III.B.1. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique qualitatif a été réalisé sur l'extrait AE_{EI30} en mélangeant le surnageant après extraction ou l'extrait sec (dissous) avec des réactifs spécifiques qui indiquent la présence ou l'absence d'un métabolite donné par un changement des caractéristiques physico-chimique de la solution. Ce criblage a montré que les parties aériennes d'AEL contenaient divers métabolites connus pour leur importance thérapeutique et médicinale (*Tableau III.1*). Il s'agit notamment de phénols, de flavonoïdes et d'alcaloïdes, en plus d'autres composés connus pour être bioactifs [2]. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature où la présence de ces métabolites a été citée chez plusieurs espèces d'*Astragalus* [3–5]. La partie aérienne d'AEL pourrait ainsi constituer une source de molécules bioactives antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses.

Tableau III. 1. Les métabolites présents dans la partie aérienne d'AEL

Métabolites	Résultats
Sucres réducteurs	-
Protéines et acides aminés	+
Alcaloïdes	+
Tannins	+
Résines	+
Terpénoïdes	+
Flavonoïdes	+
Quinones	-
Diterpènes	+
Anthocyanines	-
Flavanones	-
Glycosides Cardiaques	-
Saponines	-
Phénols	+
Huiles et graisses	-

(+) = Présence du métabolite cité

(-) = Absence du métabolite cité

III.B.2. Estimation des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux

Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine dont la protection contre le développement de nombreuses maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'ostéoporose [6].

La teneur en composés phénoliques totaux exprimée en équivalents d'acide gallique a été évaluée à $59,6 \pm 2,5$ mg GAE/g d'extrait sec dans l'extrait AE_{Et}30. Cette valeur est comparable à celle décrite pour l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. angustifolius*, $60,1 \pm 1,1$ mg GAE/g d'extrait sec [5], mais elle est plus importante que celles obtenues dans les extraits méthanoliques d'*A. squarrosus* Bunge (23,3 mg GAE/g d'extrait sec [7]) et d'*A. aleppicus* et *A. annularis* (35,34 et 35,34 mg GAE/g extrait sec respectivement [5]).

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes totaux exprimée en équivalents de rutine, une valeur de $49,8 \pm 3,8$ mg RUE/g d'extrait sec a été trouvée pour l'extrait AE_{Et}30. Cette valeur est très proche de celle rapportée par Arumugam *et al.* pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*A. ponticus*, soit $49,1 \pm 0,5$ mg RUE/g d'extrait sec [8], mais elle est plus importante que celles obtenues dans les extraits méthanoliques d'*A. squarrosus* Bunge (26 mg RUE/g d'extrait sec [7]) et d'*A. aleppicus* et *A. annularis* (23,97 et 33,97 mg RUE/g extrait sec respectivement [5]).

Comparativement à des plantes médicinales autres que des astragales, les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux chez AEL sont égales ou supérieures celles rapportées pour des extraits méthanoliques de plusieurs plantes médicinales indiennes [9], mais légèrement inférieures à celles de décoctions de certaines plantes médicinales du Sri Lanka pour ce qui concerne les composés phénoliques (69 à 81 mg GAE/g extrait sec) [10].

Il apparaît ainsi que dans l'extrait AE_{Et}30, les teneurs en ces deux constituants, essentiels pour certaines activités biologiques, sont relativement importantes ce qui laisserait penser qu'AEL serait un astragale intéressant sur le plan médicinal et pourrait expliquer en partie son utilisation dans la médecine traditionnelle libanaise.

III. PARTIE C - EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'EXTRAIT AE_{Et}30

III.C.1. Activité anticancéreuse

La chimiothérapie à base de molécules de synthèse utilisée pour traiter un certain nombre de cancers a des effets secondaires toxiques très importants [11]. De nombreux composés naturels ont à l'inverse montrés des propriétés intéressantes à la fois en ce qui concerne leur efficacité

anticancéreuse, mais également pour ce qui est de leur capacité à cibler les cellules malades et d'induire moins d'effets secondaires.

Des molécules naturelles isolées de plantes ont montré une activité contre des cellules du cancer du pancréas, l'un des cancers les plus meurtriers. Au Japon, l'arctigénine a par exemple montré des effets positifs chez des patients en stade avancé du cancer sans effets secondaires notables, elle est à la base d'un médicament anticancéreux en phase II d'essais cliniques [12]. D'autres études faites sur divers extraits d'espèces d'*Astragalus* ont montré des résultats prometteurs quant à l'activité anticancéreuse [13–16].

Dans notre cas, des cellules de la lignée AsPC-1 (représentant des cellules du cancer du pancréas humain) ont été choisies pour évaluer l'activité anticancéreuse de l'extrait AE_{Et}30. Différentes concentrations (100, 150 et 300 µg/mL) ont été testées sur ces cellules pendant 72 h. Les résultats ont montré que l'extrait, même à une concentration de 300 µg/mL, n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules AsPC-1 comparativement au témoin négatif (cellules non traitées) (*Figure III.1a,c*). Aucune activité anticancéreuse n'a donc été constatée bien que l'extrait AE_{Et}30 contienne des acides phénoliques et des flavonoïdes à des teneurs relativement importantes (Section III.B.2.), et que plusieurs de ces composés soient connus pour des effets anticancéreux [6,17,18]. Le célastrol utilisé à 50 µM comme contrôle positif a quant à lui conduit 96% de mortalité cellulaire (*Figure III.1d*).

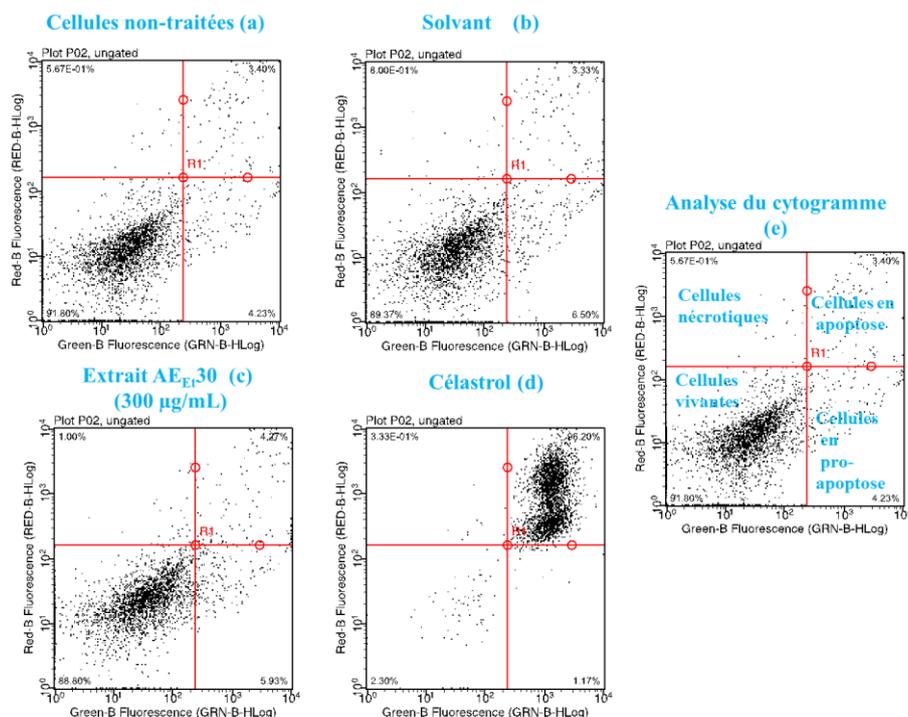


Figure III. 1. Cytogrammes présentant les résultats de l'analyse de l'activité anticancéreuse de l'extrait AE_{Et}30 par cytométrie en flux avec une détection à l'annexine V-FITC / IP

L'absence d'activité anticancéreuse de l'extrait AE_{E1}30 pourrait être liée à des quantités insuffisantes d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans le milieu de culture cellulaire. Toutefois, en raison de la solubilité limitée des extraits d'AEL dans ce milieu, l'utilisation de solutions de concentrations supérieures à 300 µg d'extrait/mL n'a pas été possible. L'absence d'activité constatée peut aussi être due à la matrice de l'extrait qui conduirait à effets inhibiteurs ou antagonistes entre les différents composés. Une purification partielle des acides phénoliques et des flavonoïdes, par CLHP-semi préparative par exemple, aurait pu permettre l'utilisation de solutions de concentrations plus élevées en ces composés, et de réduire parallèlement les effets de matrice éventuels.

III.C.2. Activité anti-inflammatoire

Le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) est une cytokine pro-inflammatoire produite et sécrétée par les macrophages. Il joue un rôle important dans les réactions inflammatoires et immunitaires surtout en présence d'agents pathogènes. Une production excessive de TNF- α peut être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques [19]. L'activité anti-inflammatoire d'une molécule peut être évaluée à travers la mesure de sa capacité à inhiber la sécrétion de TNF- α par des cellules test stimulées. Sur un cytogramme, une forte fluorescence jaune correspond à une forte concentration en TNF- α et donc à l'absence d'une activité anti-TNF- α ou anti-inflammatoire de l'extrait. Inversement, une absence de fluorescence jaune correspond à une absence de TNF- α dans le milieu cellulaire et donc à un pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait testé. La *Figure III.2* représente une illustration de l'augmentation de la fluorescence jaune chez des cellules stimulées en absence d'activité anti-inflammatoire.

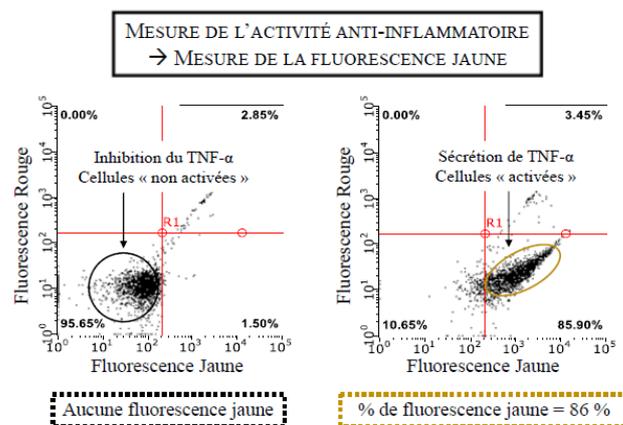


Figure III. 2. Cytogrammes illustrant l'apparition d'une fluorescence jaune suite une activation de cellules test en absence d'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait AE_{Et}30 a été ainsi mesurée en utilisant des cellules THP-1 stimulées par des LPS. Ces cellules ont été traitées par l'extrait AE_{Et}30 à des concentrations de 50, 100 et 300 µg/mL. Les cytogrammes obtenus ont montré que l'activation des cellules THP-1 par l'ajout de LPS résulte en une augmentation importante de l'intensité de la fluorescence jaune par libération de TNF-α (*Figure III.3b*). Cette fluorescence est très peu visible chez les cellules témoins non activées. Le contrôle positif de ce test a été réalisé en utilisant un agent anti-inflammatoire connu, le célastrol. Son ajout aux cellules activées résulte en une diminution importante de la fluorescence jaune suite à une inhibition de la sécrétion de TNF-α (*Figure III.3c*). Le contrôle négatif quant à lui, consistant en l'ajout de DMSO, solvant utilisé pour dissoudre l'extrait, n'a pas montré d'inhibition de la sécrétion de TNF-α, étant donné l'absence d'effet sur la fluorescence jaune (*Figure III.3d*). En ce qui concerne l'extrait AE_{Et}30, aucune réduction de la fluorescence jaune n'a été observée, même à une concentration de 300 µg/mL (*Figure III.3e*). Ces résultats nous ont conduit à conclure que l'extrait AE_{Et}30 n'avait pas d'activité anti-inflammatoire telle que mesurée à travers l'effet sur la sécrétion de TNF-α par les cellules THP-1.

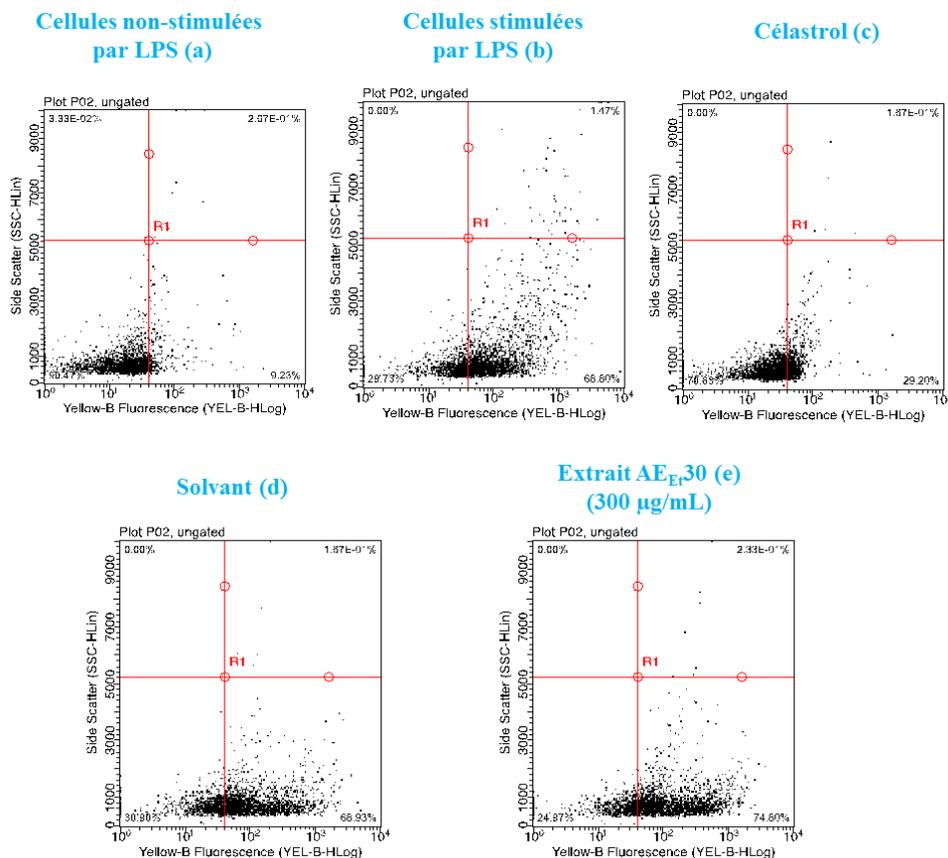


Figure III. 3. Cytogrammes représentant l'effet de l'extrait AE_{Et}30 sur la sécrétion de TNF-α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS.

L'effet anti-inflammatoire des polyphénols et des flavonoïdes est bien documenté dans la littérature [8-9]. D'après Yahfoufi *et al.*, ces deux familles de composés interviennent dans l'inhibition de la production de nombreuses cytokines [21]. A titre d'exemple, dans un essai mené sur des macrophages murins RAW 264,7, une baisse dose-dépendante des niveaux d'ARNm de TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS et COX-2 a été constatée suite à l'utilisation de flavonoïdes extraits de racines d'*A. membranaceus* [22].

Malgré la présence de concentrations importantes en composés phénoliques ($59,6 \pm 2,5$ mg GAE/g) et en flavonoïdes ($49,8 \pm 3,8$ mg RUE/g) dans l'extrait AE_{E1}30, aucune activité anti-inflammatoire n'a pu être observée. Ceci peut être lié aux conditions du test utilisé et notamment la lignée cellulaire qui pourrait ne pas être sensible selon la structure du composé actif considéré [21]. Une certaine spécificité de l'activité des polyphénols a en effet été rapportée [23].

III.C.3. Activité antimicrobienne

En utilisant un test de diffusion sur milieu de culture gélosé, l'activité antimicrobienne de l'extrait AE_{E1}30 a été testée contre une trentaine souches bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif, une souche de levure et une souche de moisissure. Avec ce test, une activité antimicrobienne se traduit par l'apparition d'une zone claire correspondant à une absence de croissance du microorganisme cible. Sachant que l'activité antimicrobienne des molécules naturelles peut être restreinte à un spectre étroit de souches microbiennes, une gamme assez large de microorganismes cibles a été utilisée.

Le test n'a pas permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne de l'extrait AE_{E1}30 contre les microorganismes testés. Le contrôle positif utilisé consistant en des peptides antimicrobiens de type bactériocine a quant à lui permis d'obtenir des zones d'inhibitions claires (*Figure III.4*).

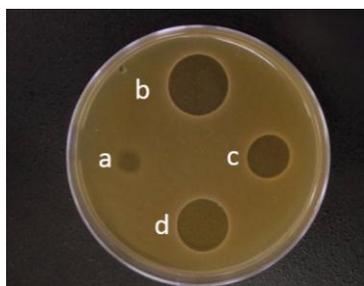


Figure III. 4. Contrôle positif du test de diffusion sur milieu de culture gélosé utilisant les surnageants de cultures bactériennes contenant des bactériocines

a), nisine A ; b), pédiocine PA-I ; c), entéroïcine P ; d), entéroïcine AS-48. Indicateur : *Staphylococcus xylosus* L57

Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Adiguzel *et al.* qui n'ont pas pu observer d'activité antimicrobienne dans les extraits méthanoliques de 13 espèces d'*Astragalus* contre une gamme de 40 microorganismes comprenant des bactéries, des moisissures et une espèce de levure [24]. A l'inverse, une telle activité a été constatée dans extraits méthanoliques et/ou aqueux d'*A. boeticus*, d'*A. aleppicus*, d'*A. annularis* et *A. angustifolius* contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Candida albicans* [5]. De même les extraits de la partie aérienne d'*A. gombiformis* utilisant le chloroforme, le méthanol et l'acétate d'éthyle ont montré une activité contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* [25].

Chez les astragales, les acides phénoliques (p-coumarique, ferulique et caféique), ainsi que les flavonoïdes, les flavones, les isoflavones sont les composés les plus souvent impliqués dans l'activité antimicrobienne [26,27]. Pourtant, malgré la présence de ces composés dans l'extrait d'AEL, aucune activité antimicrobienne n'a pu être observée. Sachant que le test antimicrobien permet de détecter des antimicrobiens à des concentrations de l'ordre du μM , ceci peut être lié aux quantités présentes de molécules bioactives dans l'extrait AE_{Et}30 qui seraient insuffisantes. En effet, l'extraction avait été optimisée pour la recherche de molécules antioxydantes, et il est donc possible que les antimicrobiens ne soient pas extraits en quantités suffisantes dans les conditions choisies.

III. CONCLUSION

La partie aérienne d'AEL a été utilisée afin de rechercher et d'identifier des molécules bioactives qui pourraient permettre d'expliquer l'utilisation médicinale de cette plante. La première étape de cette étude a consisté à définir et à optimiser les conditions d'extraction en se basant sur l'activité antioxydante et en utilisant diverses approches expérimentales : TEAC, ORAC, DPPH et CLHP-ABTS⁺⁺. Cela a permis de retenir l'éthanol à 30% dans l'eau comme solvant d'extraction pour les composés antioxydants. Ensuite, une quarantaine de composés ont été identifiés par CLUHP-DAD-SMHR appartenant à deux familles moléculaires : les hydroxycinnamates et les flavonoïdes. Parmi ceux-ci, de nombreux composés ont été identifiés comme antioxydants par CLHP/ABTS⁺⁺. Il s'agit principalement de dérivés de l'acide caféique et de dérivés glycosylés de quercétine. La fonction catéchol s'est avérée être une caractéristique structurale clé de l'activité antioxydante. Bien que l'extrait AE_{Et}30 ait montré une forte activité antioxydante, aucune activité anticancéreuse, anti-inflammatoire ou antimicrobienne n'y a été détectée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'optimisation de l'extraction qui a permis de

retenir l'extrait AE_{Et}30 a été réalisée sur la base de l'activité antioxydante et n'a pas pris en compte ces trois activités biologiques. Toutefois, sachant que l'activité antioxydante n'est pas étrangère aux effets anti-inflammatoire ou anticancéreux, certaines molécules parmi celles identifiées dans l'extrait AE_{Et}30 sont en effet connues pour avoir de tels effets. Ces molécules pourraient simplement être présentes en quantités insuffisantes pour avoir une activité détectable. D'autre part, la nature des lignées cellulaires utilisées dans les essais peut être déterminante dans la mesure où l'activité de certaines molécules peut être souche-dépendante. Finalement, les données obtenues indiquent que la partie aérienne d'AEL est une source potentielle de composés antioxydants naturels pour les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Cela pourrait contribuer à expliquer son utilisation médicinale traditionnelle, mais des études complémentaires sont bien entendu nécessaires pour évaluer l'activité biologique de cette plante chez l'Homme.

III. REFERENCES

- [1] R. Hassan, F. Hussein, M. Hawraa, H. Akram, K. Ahmad, D. Ahmad, B. Bassam, 'Antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical screening of two lebanese medicinal plants', *Int. Res. J. Pharm.* 4 (2013) 132–136.
- [2] A. Hijazi, S. Bouchra, H. F. Kazan, H. Rammal, A. Kobeissy, B. Badran, Z. Saad, 'Extraction, phytochemical screening, chemical quantification and identification of bioactive compounds from Lebanese *Urtica dioica*', *Am. J. PharmTech Res.* 4 (2014).
- [3] X. Li, L. Qu, Y. Dong, L. Han, E. Liu, S. Fang, Y. Zhang, T. Wang, 'A review of recent research progress on the *Astragalus* genus', *Molecules.* 19 (2014) 18850–18880.
- [4] H. Kanaan, M. El-Mestrah, A. Sweidan, F. As-Sadi, A. A. Bazzal, A. Chokr, 'Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*', *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 6 (2016) 50–57.
- [5] N. A. Jaradat, A. N. Zaid, A. Abuzant, S. Khalaf, N. Abu-Hassan, 'Phytochemical and biological properties of four *Astragalus* species commonly used in traditional Palestinian medicine', *Eur. J. Integr. Med.* 9 (2017) 1–8.
- [6] K. B. Pandey, S. I. Rizvi, 'Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease', *Oxid. Med. Cell Longev.* 2 (2009) 270–278.
- [7] J. Asgarpanah, S. M. Motamed, A. Farzaneh, B. Ghanizadeh, S. Tomraee, 'Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of *Astragalus squarrosus* Bunge', *Afr. J. Biotechnol.* 10 (2011) 19176–19180.
- [8] R. Arumugam, B. Kirkan, C. Sarikurkcu, 'Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall', *South African J. Bot.* 120 (2019) 268–273.
- [9] G. M. Chaudhari, R. T. Mahajan, 'Comparative antioxidant activity of twenty traditional indian medicinal plants and its correlation with total flavonoid and phenolic content', *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 30 (2015) 105–111.
- [10] V. Y. Waisundara, M. I. Watawana, 'The classification of Sri Lankan medicinal herbs: An extensive comparison of the antioxidant activities', *J. Tradit. Complement. Med.* 4 (2014) 196–202.
- [11] X. Ji, A. Usman, N. H. Razalli, R. Sambanthamurthi, S. V. Gupta, 'Oil palm phenolics (OPP) inhibit pancreatic cancer cell proliferation via suppression of NF- κ B pathway', *Anticancer Res.* 35 (2015) 97–106.
- [12] S. Awale, D. F. Dibwe, C. Balachandran, S. Fayez, D. Feineis, B. K. Lombe, G.

- Bringmann, ‘Ancistrolikokine E3, a 5,8'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloid, Eliminates the Tolerance of Cancer Cells to Nutrition Starvation by Inhibition of the Akt/mTOR/Autophagy Signaling Pathway’, *J. Nat. Prod.* 81 (2018) 2282–2291.
- [13] T. Hu, Q. M. Liu, X. W. He, F. Huang, M. W. Zhang, J. G. Jiang, ‘Identification of bioactives from *Astragalus chinensis* L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects’, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2017) 4315–4323.
- [14] L. F. Ibrahim, M. M. Marzouk, S. R. Hussein, S. A. Kawashty, K. Mahmoud, N. A. Saleh, ‘Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss’, *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 386–393.
- [15] M. A. Ashour, ‘Comparative chemical and biological investigations of three Saudi *Astragalus* species’, *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 7 (2019) 56–61.
- [16] H. Teyeb, N. Zanina, M. Neffati, W. Douki, M. F. Najjar, ‘Cytotoxic and antibacterial activities of leaf extracts of *astragalus gombiformis* pomel (fabaceae) growing wild in tunisia’, *Turkish J. Biol.* 36 (2012) 53–58.
- [17] T. Senawong, S. Khaopha, S. Misuna, J. Komaikul, G. Senawong, P. Wongphakham, S. Yunchalard, ‘Phenolic acid composition and anticancer activity against human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of *Houttuynia cordata*’, *ScienceAsia.* 40 (2014) 420–427.
- [18] W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, ‘Flavonoids: Promising anticancer agents’, *Med. Res. Rev.* 23 (2003) 519–534.
- [19] H. Moreira-tabaka, J. Peluso, J.-L. Vonesch, D. Hentsch, P. Kessler, J.-M. Reimund, S. Dumont, C. D. Muller, ‘Unlike for Human Monocytes after LPS Activation , Release of TNF- α by THP-1 Cells Is Produced by a TACE Catalytically Different from Constitutive TACE’, *PLoS One.* 7 (2012).
- [20] Z. Triaux, "Développement de méthodes d'extraction et d'analyse des molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire", Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2019.
- [21] N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar, ‘The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols’, *Nutrients.* 10 (2018) 1618.
- [22] J. Li, L. Xu, R. Sang, Y. Yu, B. Ge, X. Zhang, ‘Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of *Astragalus* by regulating NF- κ B and MAPK signalling pathways in RAW 264.7 macrophages’, *Pharmazie.* 73 (2018) 589–593.
- [23] D. L. Ambriz-Pérez, N. Leyva-López, E. P. Gutierrez-Grijalva, J. B. Heredia, ‘Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review’, *Cogent Food*

- Agric. 2 (2016).
- [24] A. Adigüzel, M. Sökmen, H. Özkan, G. Açar, M. Güllüce, F. Şahin, 'In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of *Astragalus* species growing in the eastern Anatolia Region of Turkey', *Turk. J. Biol.* 33 (2009) 65–71.
- [25] H. Teyeb, O. Houta, H. Najjaa, A. Lamari, M. Neffati, W. Douki, M. F. Najjar, 'Biological and chemical study of *Astragalus gombiformis*', *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 67 (2012) 367–374.
- [26] S. A. Heleno, A. Martins, M. J. R. P. Queiroz, I. C. F. R. Ferreira, 'Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review', *Food Chem.* 173 (2015) 501–513.
- [27] E. Coppo, A. Marchese, 'Antibacterial Activity of Polyphenols', *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15 (2014) 380–390.

CHAPITRE IV - ASTRAGALUS COLUTEOIDES WILL., POUVOIR ANTOXYDANT, COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

L'autre Astragale qui a été incluse dans notre étude est *Astragalus coluteoides* will (ACW). Il s'agissait là aussi de rechercher et d'identifier des molécules bioactives en relation avec l'utilisation médicinale de cette plante dans la tradition libanaise. L'étude a consisté d'abord à optimiser l'extraction des molécules antioxydantes de la partie aérienne de cette plante. Les molécules contenues dans l'extrait le plus actif ont ensuite été séparées et identifiées. Enfin, une évaluation des activités anticancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobienne de cet extrait a été réalisée.

IV.1. Choix des conditions d'extraction des antioxydants de la partie aérienne d'ACW

IV.1.1. Sélection du solvant d'extraction

Des extractions de la partie aérienne d'ACW ont été réalisées en utilisant les solvants suivants : eau, eau acidifiée, EtOH 70%, MeOH 70%, CHCl₃ et EtOAc. Les essais TEAC et ORAC en microplaques ont été utilisés pour estimer l'activité anti-radicalaire des extraits obtenus.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux constatés avec AEL dans la mesure où ils montrent d'une part une influence directe de la polarité du solvant utilisé sur les quantités d'antioxydants extraites et d'autre part une proximité des valeurs obtenues entre eau et eau acidifiée ; MeOH 70% et EtOH 70% ; CHCl₃ et EtOAc, et ceci avec les deux méthodes utilisées (Figure IV.1).

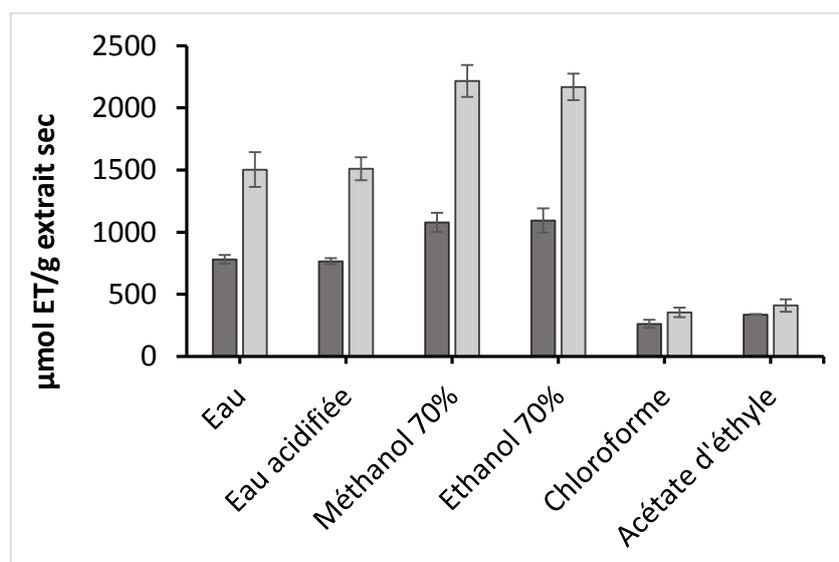


Figure IV. 1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des six extraits d'ACW par TEAC et ORAC. L'activité est exprimée en $\mu\text{mol ET/g}$ extrait sec. TEAC (gris foncé) ; ORAC (gris clair)

Par ailleurs, comme dans le cas d'AEL, le MeOH à 70% et l'EtOH à 70% ont permis l'extraction des quantités les plus importantes d'antioxydants, alors que le CHCl₃ et l'EtOAc se sont montrés les moins efficaces. Il apparaît ainsi que la majorité des composés antioxydants présents dans la partie aérienne d'ACW sont de nature polaire à moyennement polaire. Langari *et al.* qui ont extrait des antioxydants de la partie aérienne d'une autre Astragale (*A. glaucacanthus*), ont fait la même constatation concernant l'importance de la polarité du solvant dans l'extraction de ces composés [1].

Les résultats obtenus montrent enfin que l'activité anti-radicalaire exprimée en équivalents trolox est plus importante lorsqu'elle est mesurée par ORAC que lorsqu'elle est mesurée par TEAC : 2 fois plus importante pour les extraits eau, eau acidifiée, MeOH 70% et EtOH 70% ; et 1,2 fois plus importante pour les extraits de CHCl₃ et d'EtOAc. Cette différence, qui n'a pas été constatée dans le cas des extraits d'AEL, pourrait être expliquée par le fait que les antioxydants présents dans ces extraits sont majoritairement impliqués dans le transfert d'atomes d'hydrogènes que dans celui des électrons [2].

IV.1.2. Optimisation des conditions d'extraction

Le MeOH 70% et l'EtOH 70% ayant donné des résultats très similaires en termes d'efficacité d'extraction des antioxydants à partir de la partie aérienne d'ACW, le choix s'est porté sur l'éthanol pour l'optimisation de l'extraction des composés antioxydants puisqu'il s'agit d'un solvant vert à faible toxicité [3]. Cette optimisation a été réalisée en faisant varier le pourcentage d'éthanol (10, 30, 50, 70 et 90%) dans le solvant d'extraction et en testant différents temps d'extraction (5, 15, 30, 45 et 60 min). Les résultats de l'activité anti-radicalaire, représentée par la somme des surfaces des pics enregistrés à 412 nm par CLHP-ABTS^{•+}, ont montré des disparités selon la proportion d'EtOH utilisée pour l'extraction (*Figure IV.2*). Alors qu'avec l'EtOH à 90%, la quantité d'antioxydants extraite augmente avec le temps d'extraction jusqu'à 60 min sans atteindre un maximum, on ne constate aucune augmentation significative avec les autres proportions d'EtOH utilisées. Les quantités extraites restent en effet globalement stables ou baissent légèrement avec l'augmentation du temps d'extraction, le maximum étant atteint dès 5 min d'extraction.

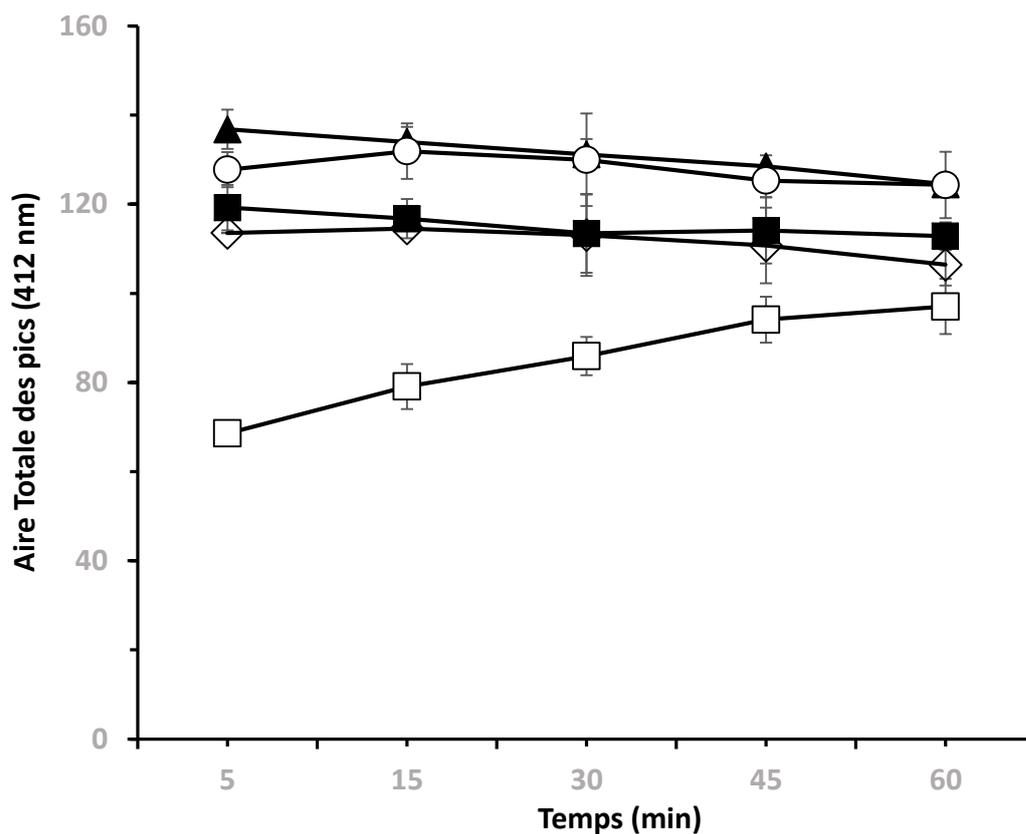


Figure IV. 2. *Activité anti-radicalaire des extraits d'ACW mesurée par CLHP-ABTS^{•+} après extraction par un mélange EtOH-eau en fonction du temps. L'activité est exprimée par la somme des aires des pics négatifs (412 nm). EtOH 10% (losange blanc) ; EtOH 30% (carré noir), EtOH 50% (triangle noir), EtOH 70% (cercle blanc) ; EtOH 90% (carré blanc)*

La légère baisse constatée n'est en réalité pas une baisse des quantités extraites d'antioxydants, mais une baisse de leur activité qui serait liée à une dégradation thermique dans le bain à ultrasons utilisé pour l'extraction. Cela a été confirmé par un test d'extraction à différentes températures réalisé pendant 5 min en utilisant l'EtOH 50%. Les résultats ont en effet montré une légère dégradation de l'activité anti-radicalaire (diminution de la somme des surfaces à 412 nm) avec l'augmentation de la température entre 20 et 55°C (*Annexe 1*).

Par ailleurs, il a été montré que l'EtOH à 90% est le solvant le moins efficace puisqu'en plus du temps d'extraction long (plus de 60 min) nécessaire, les quantités d'antioxydants extraites sont bien plus faibles qu'avec les autres proportions testées. Un solvant à 50% d'EtOH semble être le plus efficace puisqu'il permet d'extraire la quantité la plus importante d'antioxydants dans le temps le plus court (5 min). Ces résultats ont ainsi montré que le temps nécessaire pour une extraction maximale des antioxydants de la partie aérienne d'ACW varie selon la proportion d'EtOH dans l'eau utilisée, sans doute parce que ce ne sont pas les mêmes composés

qui sont extraits. Ils ont par ailleurs montré que la quantité d'antioxydants extraites variait également selon la proportion d'EtOH.

IV.1.3. Essai d'épuisement

Dans le but d'extraire la totalité des molécules antioxydantes contenues dans la partie aérienne d'ACW, des extractions successives ont été réalisées dans les conditions suivantes : une proportion d'EtOH dans de l'eau de 50% et un temps d'extraction de 5 min pour chaque extraction. Il est ainsi apparu que 99% des composés antioxydants ont été extraits dès la première extraction (*Figure IV.3*).

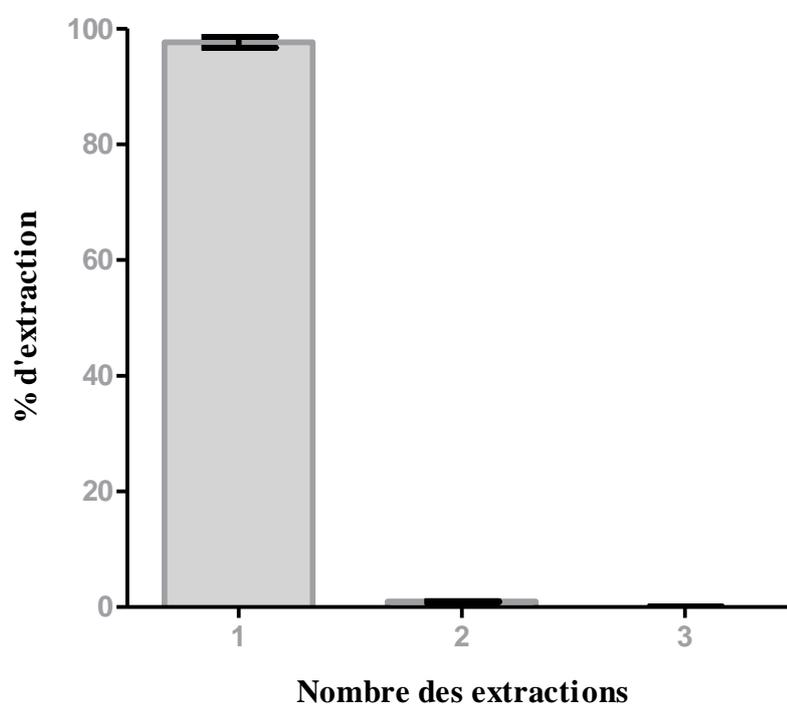


Figure IV. 3. Pourcentage d'extraction des composés antioxydants des extraits ACW en fonction du nombre d'extractions successives en utilisant de l'EtOH 50% pour 5 min. L'activité est exprimée par la somme des aires des pics négatifs (412 nm) en CLHP-ABTS⁺.

Ces résultats nous ont permis de retenir une seule extraction utilisant l'EtOH 50% comme solvant et un temps d'extraction de 5 min pour préparer l'extrait *A. coluteoides* EtOH 50% (AC_{Et50}) qui sera utilisé pour les expérimentations ultérieures de cette étude.

IV.2. Etude chimio-analytique de l'extrait AC_{Et}50

IV.2.1. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique qualitatif a été réalisé dans l'objectif d'identifier le plus large spectre possible de molécules présentes dans l'extrait AC_{Et}50. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait était riche en divers métabolites secondaires dont certains sont connus pour avoir des activités biologiques telles que des activités antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (*Tableau IV.1*) [4]. Cependant, les sucres réducteurs, les glycosides cardiaques, les tannins, les quinones, les anthocyanines, les flavanones, les saponines, les huiles et les acides gras n'ont pas été détectés.

Tableau IV. 1. Criblage phytochimique de l'extrait AC_{Et}50 préparé de la partie aérienne d'ACW

Métabolites	Résultats
Sucres réducteurs	-
Protéines et acides aminés	+
Alcaloïdes	+
Tannins	-
Résines	+
Terpénoïdes	-
Flavonoïdes	+
Quinones	-
Diterpènes	+
Anthocyanines	-
Flavanones	-
Glycosides Cardiaques	-
Saponines	-
Phénols	+
Huiles et graisses	-

(+) = Présence du métabolite cité

(-) = Absence du métabolite cité

Cette composition est similaire à celle de l'extrait AE_{Et}30 en ce qui concerne les principales familles de composés constituant la partie aérienne et ceci bien que les tannins et les terpénoïdes soient absents chez AC_{Et}50. Les constituants chacune de ces familles devront être analysés par CLUHP-DAD-SMHR afin d'évaluer le degré de similitude entre les deux compositions.

IV.2.2. Estimation de la teneur en composés phénoliques et flavonoïques totaux

Les teneurs en composés phénoliques et flavonoïques totaux de l'extrait AC_{Et}50 ont été déterminées. Elles correspondent à des valeurs respectives de $71,75 \pm 3,17$ mg GAE/g d'extrait

sec et $66,32 \pm 1,65$ mg RUE/g d'extrait sec, ce qui est plus élevé que dans le cas de l'extrait AE_{Et}30 ($59,6 \pm 2,5$ mg GAE/g d'extrait sec et $49,8 \pm 3,8$ mg RUE/g d'extrait sec, respectivement). Ces valeurs sont par contre comparables à celles obtenues dans l'extrait méthanolique d'*Astragalus boeticus* (composés phénoliques totaux : $66,37 \pm 1,1$ mg RUE/g extrait sec ; et composés flavonoïques totaux : $75,34 \pm 1,14$ mg GAE/g extrait sec) [5].

IV.2.3. Estimation de l'activité anti-radicalaire par DPPH

L'essai DPPH a été utilisé pour évaluer l'activité anti-radicalaire de l'extrait AC_{Et}50. Les résultats ont montré une activité dépendante de la concentration en extrait sec dans la mesure où l'activité variait entre $12,66 \pm 3,84\%$ pour 25 µg/mL d'extrait sec et $78,48 \pm 1,62\%$ pour 400 µg/mL d'extrait sec (Tableau IV.2).

Tableau IV. 2. Activité anti-radicalaire de l'extrait sec AC_{Et}50 déterminée par DPPH

Concentration (µg/mL)	Activité (%)
25	$12,66 \pm 3,84$
50	$31,11 \pm 2,7$
100	$49,1 \pm 1,76$
200	$63,2 \pm 1,55$
400	$78,48 \pm 1,62$
CI ₅₀ extrait= $113,99 \pm 2,66$ µg/mL	
CI ₅₀ BHT= $18,53 \pm 2$ µg/mL	

La CI₅₀ calculée pour l'extrait AC_{Et}50 est de $113,99 \pm 2,66$ µg/mL, ce qui est plus élevé que la valeur de $102 \pm 4,4$ µg/mL obtenue pour l'extrait AE_{Et}30. L'extrait éthanolique d'ACW serait ainsi moins actif que celui d'AEL. Comparativement aux données de la littérature, la valeur de la CI₅₀ de l'extrait AC_{Et}50 paraît toutefois plus faible que la plupart des valeurs rapportées. A titre d'exemple, Adigüzel *et al.* ont testé l'activité anti-radicalaire des extraits méthanoliques de 13 espèces d'*Astragalus* par DPPH [6]. Les valeurs de CI₅₀ obtenues, qui variaient entre 68,8 et 400 µg/mL, étaient en majorité supérieures à la CI₅₀ de l'extrait AC_{Et}50.

IV.2.4. Séparation et détermination des composés antioxydants par CLHP-ABTS^{•+}

La séparation des différents composés présents dans l'extrait AC_{Et}50 a été réalisée sur le système CLHP-ABTS^{•+} dans le but d'isoler les antioxydants parmi eux. Le résultat est toujours présenté sous la forme de deux chromatogrammes enregistrés, l'un enregistré à 325 nm en sortie de colonne et l'autre à 412 nm à la suite d'une mise au contact d'une solution d'ABTS^{•+}

(Figure IV.4). Ce dernier représente l'activité anti-radicalaire des composés antioxydants. Le chromatogramme obtenu à 325 nm ne présentait que 4 pics en tout dont un (pic 4 à 17,8 min) particulièrement intense. Ce dernier représente ainsi le composé majoritaire de l'extrait AC_{Et}50 qui correspond également à l'activité anti-radicalaire la plus intense (pic 2 à 412 nm). Un deuxième composé, correspondant au pic 1 à 13,1 min, présentait aussi une certaine activité anti-radicalaire. Le composé correspondant au pic 4 a été identifié comme étant la rutine et ceci par comparaison avec le temps de rétention et le spectre UV-visible d'un étalon chromatographique. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la rutine a déjà été identifiée parmi les flavonoïdes de plusieurs espèces d'*Astragalus* [7–9]. Elle a par ailleurs été identifiée comme composé majoritaire dans les extraits méthanoliques d'*A. leporinus* var. *hirsutus*, d'*A. distinctissimus* et d'*A. schizopterus* [10].

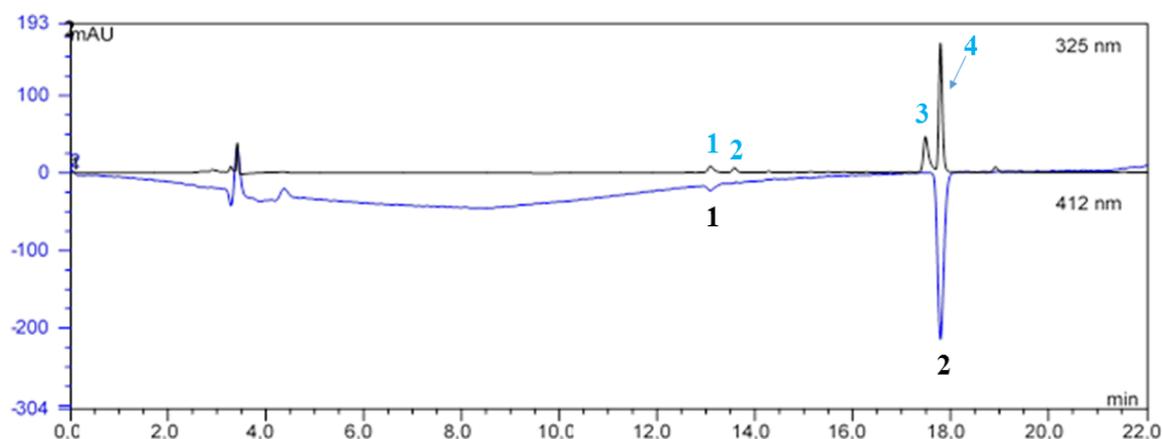


Figure IV. 4. Chromatogrammes CLHP-ABTS⁺ de l'extrait AC_{Et}50 représentant la détection à 325 nm des composés contenus dans l'extrait AC_{Et}50 (partie supérieure), ainsi que celle de leur activité anti-radicalaire à 412 nm (partie inférieure)

Des tentatives ont été faites afin d'isoler le composé correspondant au pic 1 dans le but de l'identifier par RMN, mais il n'a pas été possible de l'obtenir pur et en quantité suffisante pour cette identification. D'autres composés sont présents en très faibles quantités en comparaison avec le composé majoritaire (la rutine). Leur isolement en quantités suffisantes en vue de leur caractérisation aurait certainement nécessité de revoir les conditions d'extraction afin d'en recueillir plus au dépens de la rutine. Toutefois, notre objectif étant d'identifier les composés responsables de l'activité antioxydante d'ACW, nos efforts se sont portés sur l'extrait présentant l'activité la plus importante, à savoir l'extrait AC_{Et}50.

IV.2.5. Fractionnement par CLHP semi-préparative

Dans l'objectif de séparer et de pré-concentrer le composé actif dans l'extrait AC_{Et}50 en vue des tests d'activité biologique, une CLHP semi-préparative a été réalisée. L'extrait a ainsi été séparé en 3 fractions : la fraction 1 (SF-1) ; la fraction 2 (SF-2) contenant la rutine et la fraction 3 (SF-3) (*Figure IV.5*). Cette dernière SF-3 correspondant à une partie du chromatogramme ne présentant pas de pics aux longueurs d'onde utilisées (10-13,5 min), elle n'a pas été collectée.

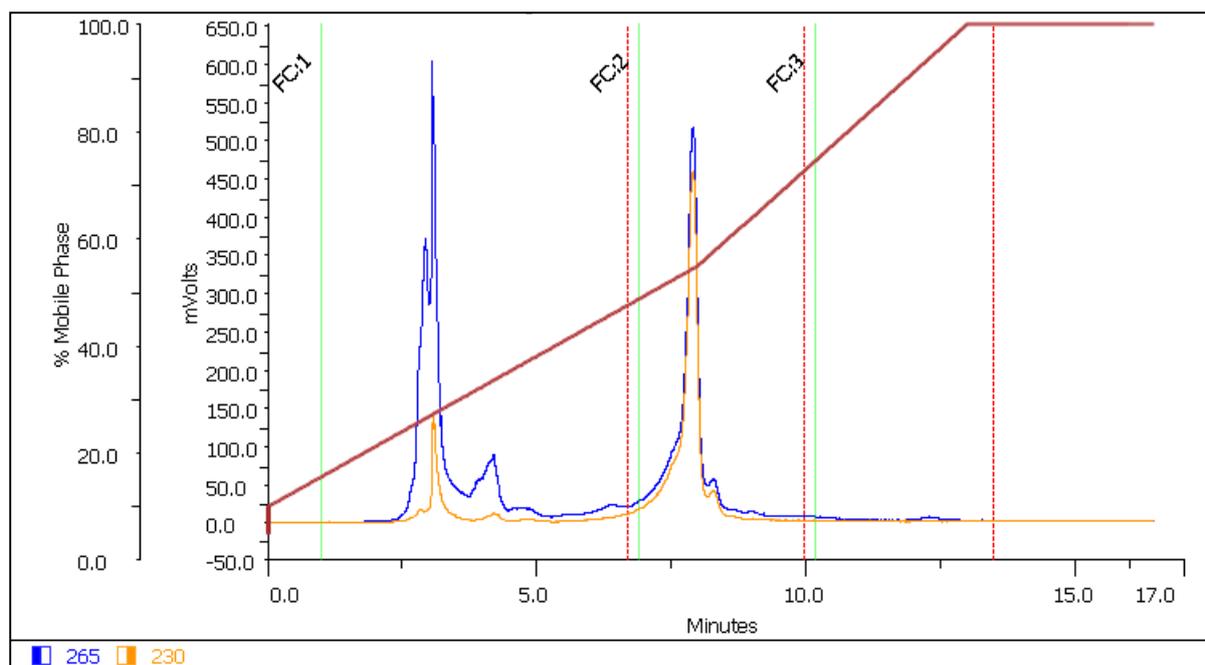


Figure IV. 5. Fractionnement de l'extrait AC_{Et}50 par CLHP semi-préparative. La séparation a été réalisée sur une colonne Puriflach Prep C18-AQ (250×10 mm) et la détection a été faite en UV à 230 et à 265 nm

IV.2.6. Identification des composés par CLUHP-DAD-SMHR et RMN

L'identification des composés présents dans l'extrait AC_{Et}50 a été réalisée en utilisant le système CLUHP-DAD-SMHR. Une colonne ACE-C18 PFP (taille des particules 1,7 µm) a été utilisée pour séparer les composés de cet extrait afin de les ioniser, les détecter et les analyser selon leur *m/z*. Les chromatogrammes UV et MS correspondants sont présentés à la *Figure IV.6*.

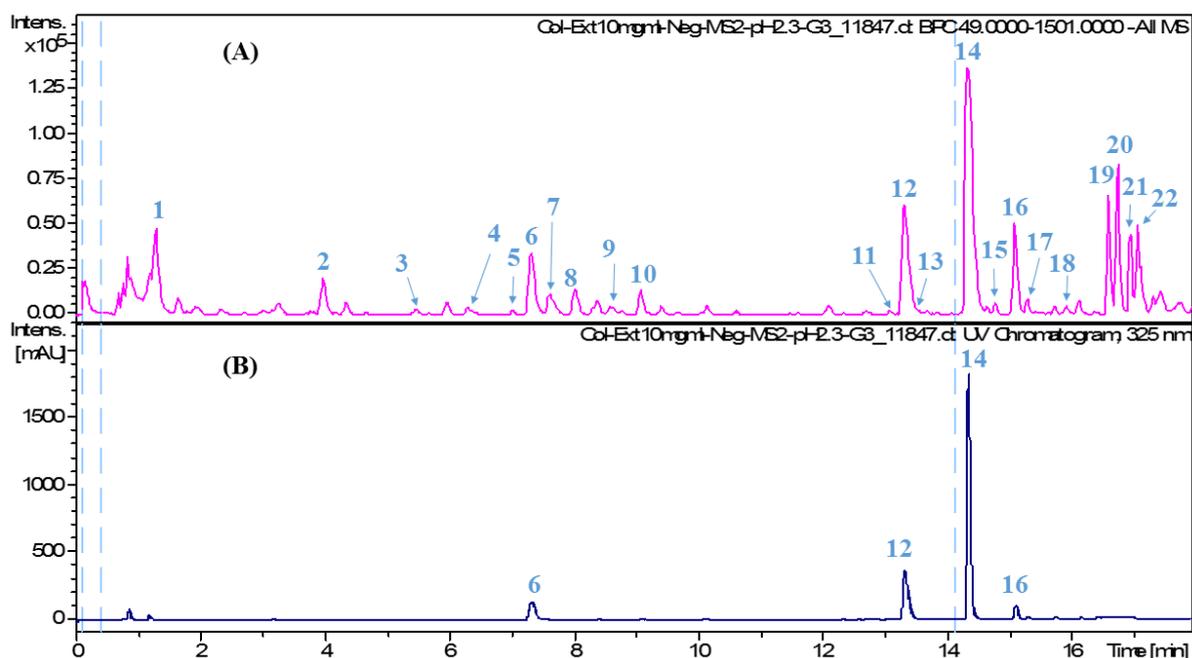


Figure IV. 6. Les chromatogrammes MS (A) et UV (325 nm) (B) de l'extrait AC_{Et}50 d'ACW obtenus en CLUHP-DAD-SMHR sur une colonne C18-PFP (1,7 μ m)

Le profil chromatographique obtenu en UV à 325 nm est similaire à celui obtenu par CLHP-ABTS⁺⁺ mais avec des temps de rétention plus courts. Ainsi, le pic majoritaire est détecté à 14,30 min (*Figure IV.6B*) au lieu de 17,8 min (*Figure IV.4*). Le chromatogramme de masse présente quant à lui de nombreux pics qui n'apparaissent pas en UV. L'identification structurale des composés correspondant à ces pics a été réalisée sur la base de leurs spectres UV, MS et MS/MS, et de la comparaison de ceux-ci aux données des composés étalons et/ou à celles des bases de données de la littérature. Le *Tableau IV.3* résume les caractéristiques spectrales UV et MS des principaux composants de l'extrait AC_{Et}50, ainsi que leurs identités. Les structures des composés identifiés ou provisoirement identifiés sont présentées dans la *Figure IV. 7*.

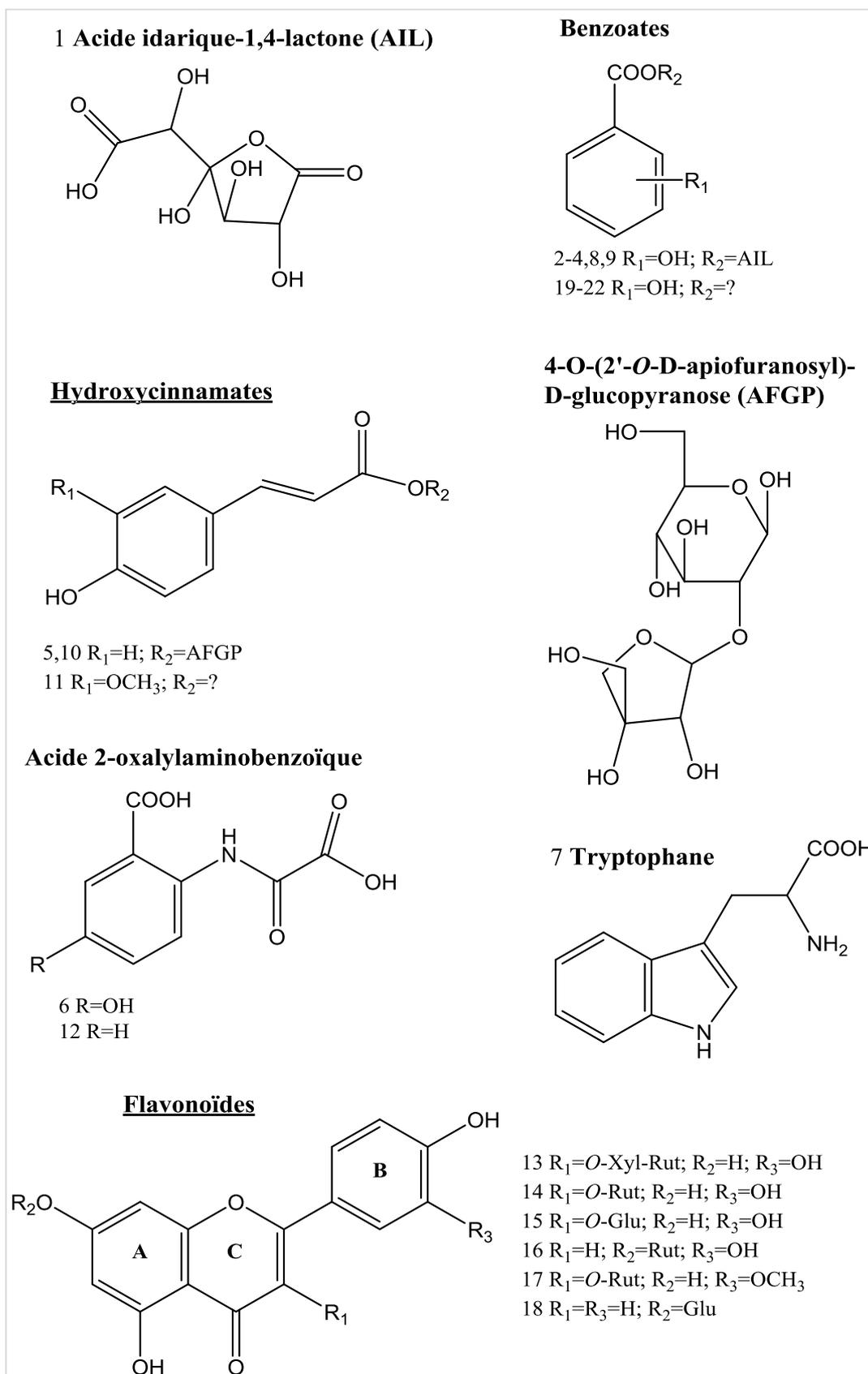


Figure IV. 7. Structures des composés identifiés ou provisoirement identifiés de l'extrait AC_{EI}50

Le composé **1** (Figure IV.6A) présentant un ion moléculaire $[M-H]^-$ m/z 191,0194 ($C_6H_7O_7$) pourrait correspondre soit à l'acide citrique ou isocitrique, soit à l'acide idarique-1,4-lactone. Deux fragments MS/MS, m/z 129,1091 et 111,0096 ont été obtenus correspondant respectivement aux formules $C_5H_5O_4$ et $C_5H_3O_3$. Le premier est issu d'une élimination de CO_2 et de H_2O , et le second d'une deuxième élimination de H_2O . Etant donné que les acides citrique et isocitrique ont un seul groupement hydroxyle (-OH) dans leur structure, la présence de deux molécules d'eau n'est pas envisageable. Par conséquent, le composé **1** a été provisoirement identifié comme étant l'acide idarique-1,4-lactone.

Tableau IV. 3. Identification des composés présents dans l'extrait AC_{E1}50 par CLUHHP-DAD-SMHR

(les numéros des pics sont comme indiqué dans la Figure IV.6A)

N° des pics	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Formule $[M-H]^-$	Masse théorique (m/z)	Masse Mesurée (m/z)	Différence (ppm)	Fragments (m/z)	Composés identifiés ou provisoirement identifiés
1	1,27	-	$C_6H_7O_7$	191,0197	191,0194	3,5	129,1091; 111,0096	Acide idarique-1,4-lactone
2	3,96	275	$C_{13}H_{13}O_9$	313,0565	313,0568	-0,9	191,0208; 147,0285; 129,0192	Isomère d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone
3	5,44	275	$C_{13}H_{13}O_9$	313,0565	313,0566	1,4	191,0197; 147,0293	Isomère d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone
4	6,29	-	$C_{13}H_{13}O_9$	313,0565	313,0561	1,4	191,0170; 147,0296	Isomère d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone
5	7,00	290, 270sh	$C_{20}H_{25}O_{12}$	457,1351	457,1347	1,1	163,0401	Isomère de l'acide trans- <i>p</i> -coumarique 4- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside
6	7,30	330, 280	$C_9H_6NO_6$	224,0201	224,0201	-0,4	152,0349; 136,0397	Acide 2-oxalylamino-5-hydroxybenzoïque
7	7,59	278	$C_{11}H_{11}N_2O_2$	203,0826	203,0822	1,8	186,0602; 142,0658; 116,0492	Tryptophane
8	8,00	275	$C_{13}H_{13}O_9$	313,0565	313,0568	-0,8	191,0211; 147,0304; 129,0213	Isomère d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone
9	8,74	-	$C_{13}H_{13}O_9$	313,0565	313,0569	-1,3	191,0190; 147,0281	Isomère d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone
10	9,06	296; 270sh	$C_{20}H_{25}O_{12}$	457,1351	457,1348	0,7	163,0409	Acide trans- <i>p</i> -coumarique 4- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside
11	13,06	290, 320	$C_{19}H_{23}O_{12}$	443,1195	443,1177	4,1	267,0723	Dérivé de l'acide férulique
12	13,28	310, 265	$C_9H_6NO_5$	208,0251	208,0396	2,3	136,0396; 120,0447	Acide 2-oxalylaminobenzoïque
13	13,57	355, 267sh	$C_{43}H_{33}O_{12}$	741,1978	741,1886	-0,4	-	Quercetin-3-(2 <i>G</i> -xylosylrutinoside)
14	14,30	355, 255, 267sh	$C_{27}H_{29}O_{16}$	609,1461	609,1461	-4,1	300,0274; 271,023; 255,0305; 178,9981; 151,0025	Rutine
15	14,74	350, 267sh	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463,0882	463,0892	-2,3	300,0276; 271,0244; 255,0288; 243,0328	Quercetine-3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrine)
16	15,06	350, 265	$C_{27}H_{29}O_{15}$	593,1512	593,1512	-3,1	285,0394; 284,0319; 255,0303; 227,0347	Lutéoline-7- <i>O</i> -rutinoside
17	15,26	350, 267sh	$C_{28}H_{31}O_{16}$	623,1618	623,1618	-4,8	315,0490; 299,0174; 271,0261	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside

18	15,89	321	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431,0984	431,0985	-0,3	269,0547; 268,0454	Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside
19	16,56	275,	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	417,0821	417,0834	-1,6	251,0540; 189,0546;	Ester de l'acide hydroxybenzoïque
		315sh	C ₄₀ H ₃₅ O ₂₀	835,1722	835,1833	-12,8	129,0205; 121,0295	
20	16,71	275,	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	417,0821	417,0829	-0,5	251,0560; 189,0554;	Ester de l'acide hydroxybenzoïque
		315sh	C ₄₀ H ₃₅ O ₂₀	835,1722	835,1827	-11,9	129,0199; 121,0298	
21	16,91	275,	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	417,0821	417,0827	0	251,0561; 189,0549;	Ester de l'acide hydroxybenzoïque
		315sh	C ₄₀ H ₃₅ O ₂₀	835,1722	835,1813	-10,3	129,0191; 121,0300	
22	17,03	275,	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	417,0821	417,0827	0	251,0549; 189,0562;	Ester de l'acide hydroxybenzoïque
		315sh	C ₄₀ H ₃₅ O ₂₀	835,1722	(835,1802)	-8,9	129,0190; 121,0297	

Les composés **2**, **3**, **4**, **8** et **9** ont présenté un ion moléculaire commun, $[M-H]^-$ m/z 313,05, correspondant à la formule C₁₃H₁₃O₉. Deux fragments communs ont été observés : m/z 191,02 (C₆H₇O₇) et 147,03 (C₅H₇O₅). Un troisième à m/z 129,02 (C₅H₅O₄) a été observé pour les composés **2** et **8** dont l'intensité est relativement plus importante. Le fragment à m/z 191,02 a été obtenu par une coupure de la liaison ester de l'hydroxybenzoate, C₁₃H₁₃O₉ - C₇H₆O₂ = C₆H₇O₇, correspondrait à l'acide idarique-1,4-lactone. La fragmentation de ce dernier a conduit à deux fragments à m/z 147,03 et 129,02 obtenus par les éliminations successives d'une molécule de CO₂ (C₆H₇O₇ - CO₂ = C₅H₇O₅) et d'une molécule d'eau (C₅H₇O₅ - H₂O = C₅H₅O₄). Puisque l'acide idarique-1,4-lactone a plusieurs groupes hydroxyles, et aussi plusieurs carbones asymétriques, la formation d'isomères des esters avec l'acide hydroxybenzoïque est possible. Par conséquent, les composés **2**, **3**, **4**, **8** et **9** pourraient être attribués aux isomères d'hydroxybenzoate de l'acide idarique-1,4-lactone.

Les composés **5** et **10** ont présenté un ion moléculaire commun $[M-H]^-$ m/z 457,13 (C₂₀H₂₅O₁₂) et un spectre UV caractéristique de l'acide coumarique (λ_{\max} 290 et 270 nm). La fragmentation de l'ion moléculaire a conduit à un fragment à m/z 163,04 (C₉H₇O₃) d'intensité très faible correspondant à l'élimination d'un diholoside de formule C₁₁H₁₈O₉ (un ose de 5 carbones et un de 6 carbones). Le fait que le fragment m/z 163,04 (C₉H₇O₃) contienne 3 atomes d'oxygène au lieu de 2 et que son intensité soit très faible confirme qu'il s'agit d'un acide coumarique glycosylé plutôt que d'un dérivé coumaroylé. La liaison glycosidique est formée entre le groupe -OH de l'acide coumarique et celui du diholoside. Nous avons attribué les composés **5** et **10** aux isomères de l'acide trans-*p*-coumarique 4-*O*-(2'-*O*- β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside qui est une molécule naturelle et déjà identifiée dans l'extrait de *Salvia officinalis* [11].

Les composés **6** et **12** ont montré un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 224,0201 (C₉H₆NO₆) et à m/z 208,0396 (C₉H₆NO₅), respectivement, avec une différence d'un atome d'oxygène. Leurs

spectres UV présentent les caractéristiques de l'acide cafféique (λ_{max} : 330, 280 nm) et de l'acide coumarique (λ_{max} : 310 et 265 nm), respectivement. Ceci suggère qu'il pourrait s'agir de l'acide nitrocafféique et de l'acide nitrocoumarique, respectivement. Pourtant, les fragments MS/MS n'ont pas confirmé cette identification. Deux fragments ont été obtenus pour le composé **6**, m/z 152,0349 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_3$) obtenu par l'élimination d'un C_2O_3 ($\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_6 - \text{C}_2\text{O}_3 = \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_3$) et m/z 136,0397 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2$) obtenu soit par l'élimination d'un atome d'oxygène en plus ($\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_6 - \text{C}_2\text{O}_3 - \text{O} = \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2$), soit par celle de deux CO_2 ($\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_6 - \text{CO}_2 - \text{CO}_2 = \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2$). Or, dans la structure de l'acide nitrocafféique, il est impossible d'éliminer un C_2O_3 , ni deux CO_2 . Le composé **6** ne pouvait ainsi pas être associé à la structure de l'acide nitrocafféique.

Le même profil de fragmentation MS/MS a été observé en ce qui concerne le composé **12**. Deux fragments ont été obtenus : m/z 136,0396 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2$) obtenu par l'élimination d'un C_2O_3 ($\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_5 - \text{C}_2\text{O}_3 = \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2$) ; m/z 120,0447 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}$) obtenu soit par l'élimination d'un atome d'oxygène en plus ($\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_5 - \text{C}_2\text{O}_3 - \text{O} = \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}$), soit par celle de deux CO_2 . Ce profil de fragmentation étant incompatible avec la structure de l'acide nitrocoumarique, le composé **12** ne pouvait pas être identifié en tant que tel.

L'exploitation des informations MS/MS, ainsi que celles issues des spectres UV ont conduit à deux propositions de structure pour les composés **6** et **12** tenant compte de leur formule brute : l'acide hydroxy-nitrophénylpyruvique (AHNPP) ou acide hydroxy-oxalylaminobenzoïque (AHOB) pour le composé **6** (*Figure IV.8A*) ; et acide nitrophénylpyruvique (ANPP) ou acide oxalylaminobenzoïque (AOB) pour le composé **12** (*Figure IV.8B*). En solution, ces molécules se présentant sous-forme d'un mélange de tautomères céto et énol (équilibre céto-énolique) [12], il semble que les formes énol soient celles observées pour les composés **6** et **12** sur le chromatogramme (*Figure IV.6*) et ceci en raison de leurs caractéristiques en UV montrant un système conjugué de type cinnamate.

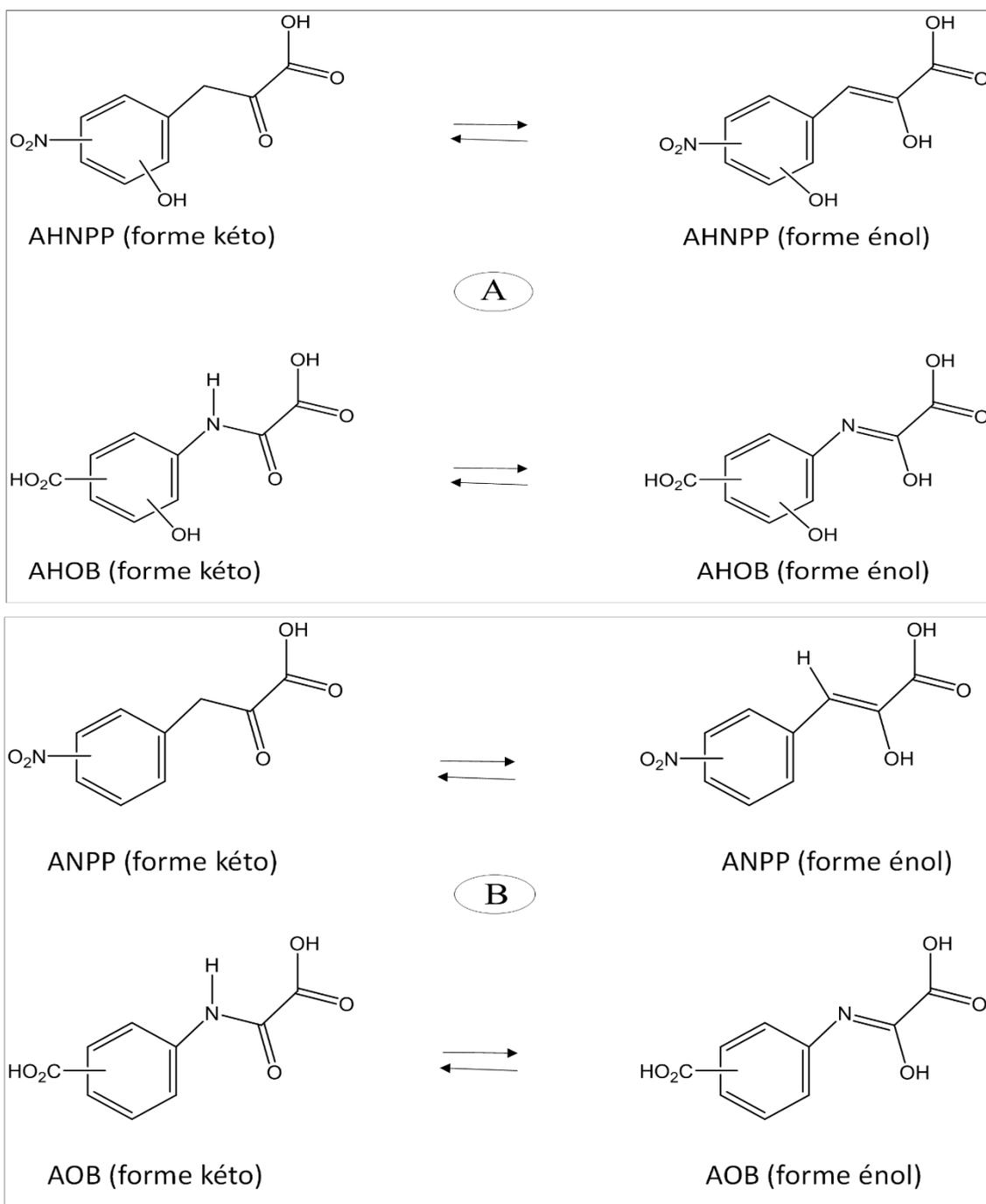


Figure IV. 8. Propositions des structures tautomères pour le composé **6** (A) et le composé **12** (B)
 AHNPP : acide hydroxy-nitrophénylpyruvique ; AHOB : acide hydroxy-oxalylaminobenzoïque ; ANPP : acide nitrophénylpyruvique ; AOB : acide oxalylaminobenzoïque

Afin d'identifier ces composés, nous avons essayé de les isoler par CLHP d'après des conditions décrites dans la partie II.A.11 en injectant de façon répétée une solution concentrée de S-F1 (fraction 1 issue de la CLHP semi-préparative) et en collectant à chaque fois les fractions correspondantes (LC-F1, correspondant au composé **6**, et LC-F2, correspondant au

composé **12**). LC-F1 et LC-F2 ont été retrouvées en CLHP en comparant les spectres UV et l'intensité des pics à 325 nm enregistrés en CLHP avec ceux enregistrés en CLUHP-DAD-SMHR.

Un exemple de chromatogramme montrant les fractions collectées en CLHP est présenté à la *Figure IV.9*.

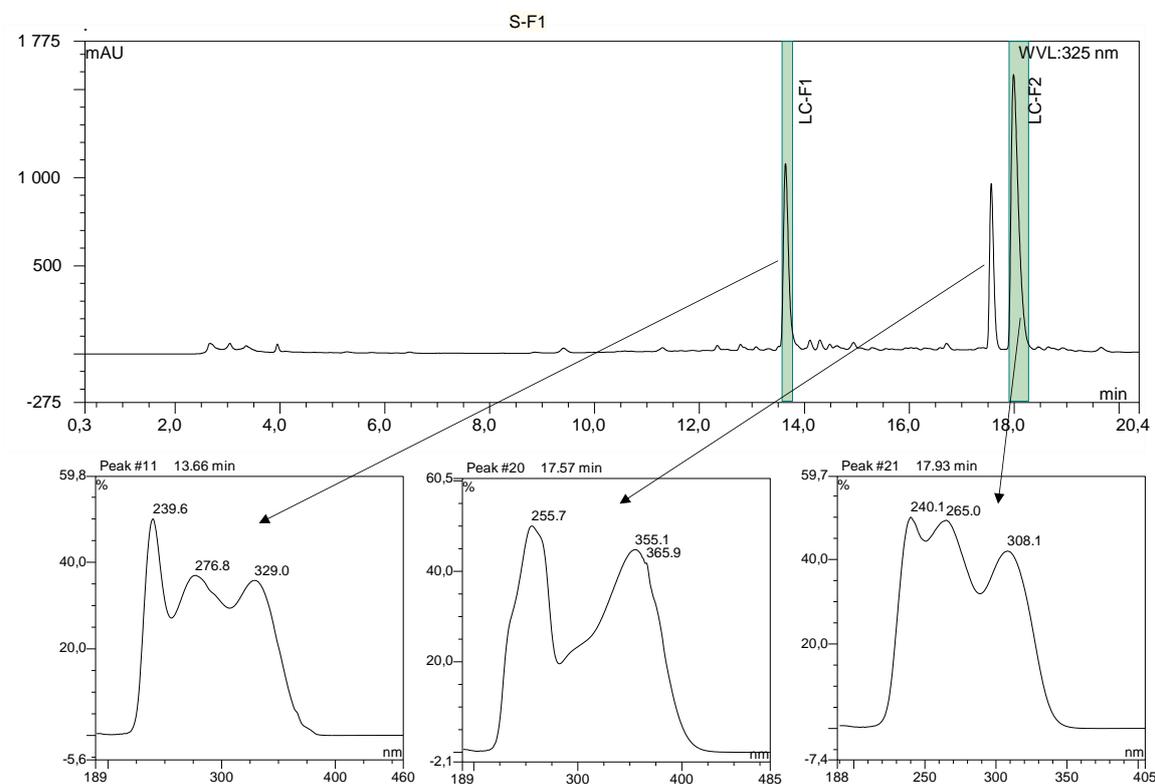


Figure IV. 9. Chromatogramme en UV (325 nm) d'une solution concentrée de *S-F1*. Les spectres UV des deux fractions collectées (LC-F1 et LC-F2, $T_r = 13,66$ et $17,93$ min respectivement) sont présentés, ainsi que celui d'un 3^{ème} pic ($T_r = 17,57$ min)

Après évaporation de l'ACN et de l'AF (contenus dans la phase mobile), les fractions LC-F1 et LC-F2 ont été analysées par CLUHP-DAD-SMHR. Les résultats obtenus ont montré que la fraction LC-F1 était loin d'être pure, alors que la fraction LC-F2 ne contenait que très peu d'acide idarique-1,4-lactone ($T_r = 1,27$ min), ainsi que de la rutine ($T_r = 14,49$ min) (*Figure IV.10*).

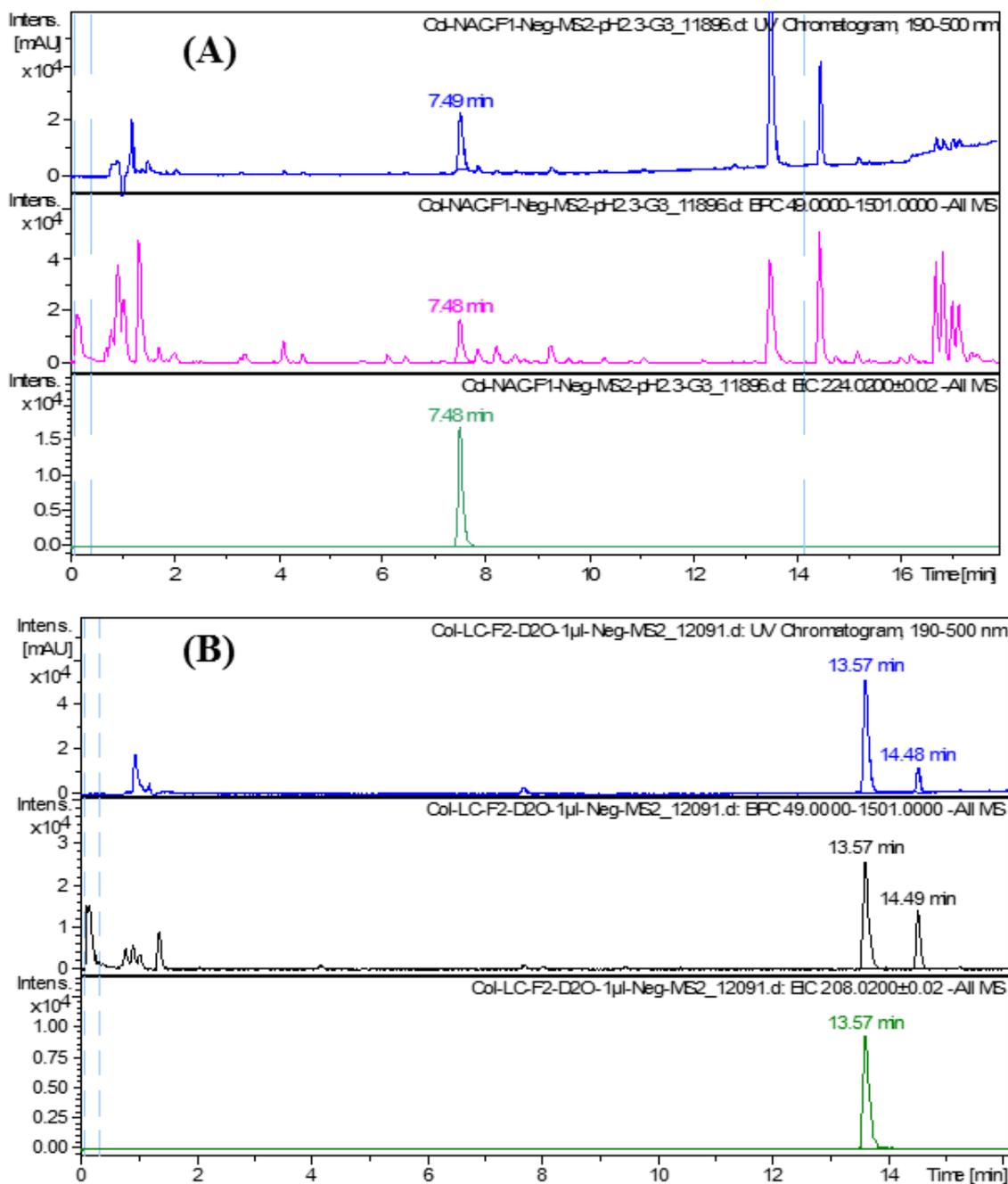


Figure IV. 10. Chromatogrammes en UV et en MS de la fraction LC-F1, correspondant au composé **6** (A), et de la fraction LC-F2, correspondant au composé **12** (B)

La fraction LC-F1 ne pouvait ainsi pas être analysée par RMN. La fraction LC-F2, correspondant au composé **12**, a quant à elle été analysée par RMN du proton (¹H-RMN) dans de l'oxyde de deutérium (D₂O). Le spectre obtenu est présenté dans la *Figure IV.11*.

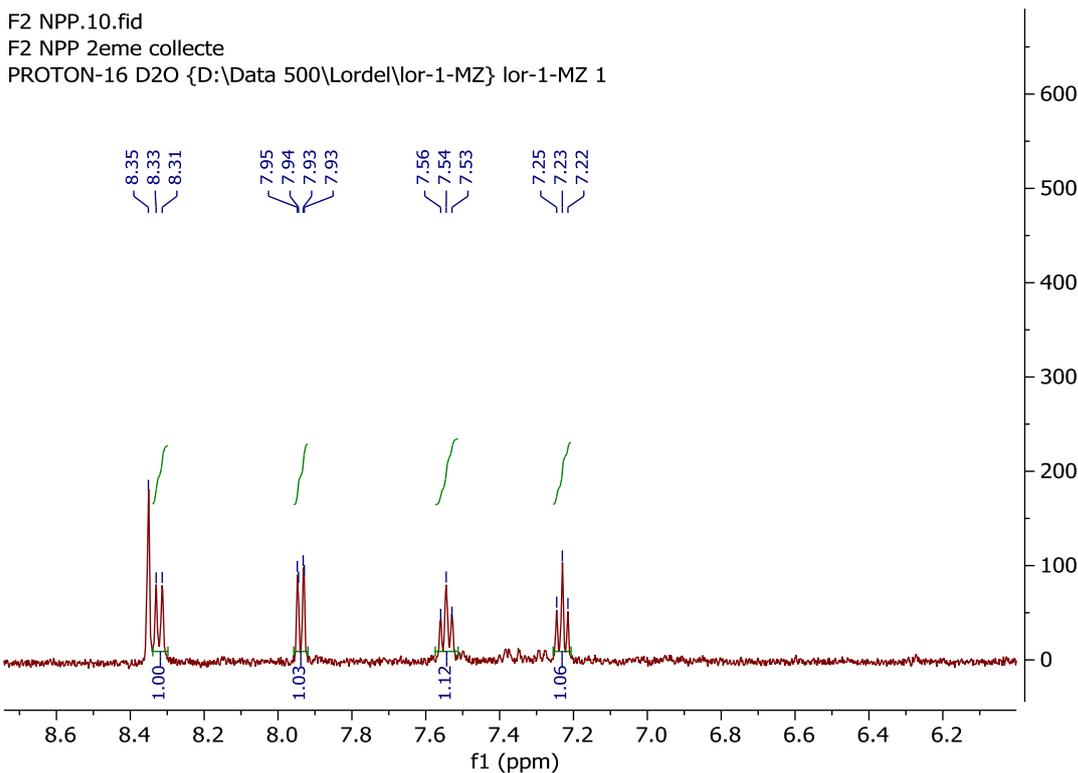


Figure IV. 11. Spectre ^1H -RMN de la fraction LC-F2 dans D_2O

On observe sur ce spectre 2 doublets et 2 triplets entre $\delta=7-9$ ppm. Ces informations correspondent à une structure typique d'un composé aromatique ayant une substitution en position-2, c'est-à-dire que les 4 protons aromatiques se positionnent côte à côte. Le fait qu'on n'ait pas obtenu d'autres signaux entre $\delta=1-5$ ppm indique que le composé **12** ne contient pas de protons aliphatiques ou saturés. Il faut noter que le signal à $\delta=8,35$ ppm correspond au proton de l'AF résiduel (HCOOH) utilisé dans la phase mobile pour la séparation de la fraction LC-F2.

Le fait qu'on n'ait pas observé de signaux correspondant aux deux protons Ar-CH=C(OH) dans le cas d'ANPP peut être expliqué par l'échange de ces protons avec le deutérium du solvant utilisé, ces protons étant en effet échangeables. C'est pourquoi l'analyse ^1H -RMN de la LC-F2 a été refaite dans le mélange $\text{DMSO-d}_6/\text{H}_2\text{O}$ (2,5/1, v/v) (*Figure IV.12*). L'utilisation de H_2O au lieu de D_2O permet d'observer les protons échangeables.

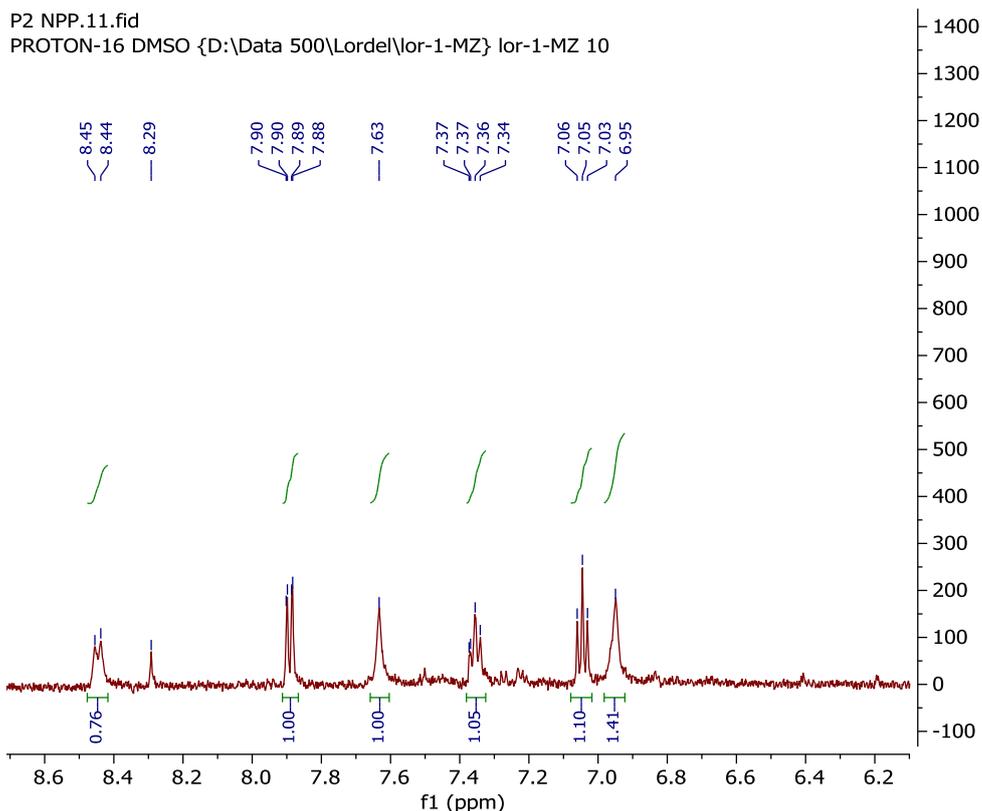


Figure IV. 12. Spectre ^1H -RMN de la fraction LC-F2 dans le mélange DMSO- d_6 / H_2O

Outre les signaux observés précédemment (2 doublets et 2 triplets), deux nouveaux singulets larges ont été observés à $\delta=7,63$ ppm et à $\delta=6,95$ ppm, qui pourraient correspondre soit aux 2 protons $\text{Ar}-\text{CH}=\text{C}(\text{OH})$ d'ANPP (forme énon) qui sont échangeables entre eux, soit aux 2 protons $\text{Ar}-\text{NH}$ (forme céto) et $\text{Ar}=\text{N}-\text{C}(\text{OH})$ (forme énon) d'AOB qui sont également échangeables entre eux.

Ces résultats ne pouvaient pas permettre de privilégier l'une ou l'autre structure (ANPP ou AOB) pour le composé **12**. Par ailleurs, la quantité de LC-F2 collectée était insuffisante pour envisager une analyse RMN du carbone ^{13}C .

Un étalon de l'ANPP a alors été utilisé afin de confirmer ou d'infirmer son identité de structure avec le composé **12**. Une analyse en CLUHP-DAD-SMHR de cet étalon a été réalisée en utilisant les mêmes conditions expérimentales que pour l'analyse de l'extrait et de la LC-F2. Les chromatogrammes en UV, MS, EIC (m/z 208,02) ainsi que les spectres MS et MS/MS sont présentés dans la *Figure IV.13*.

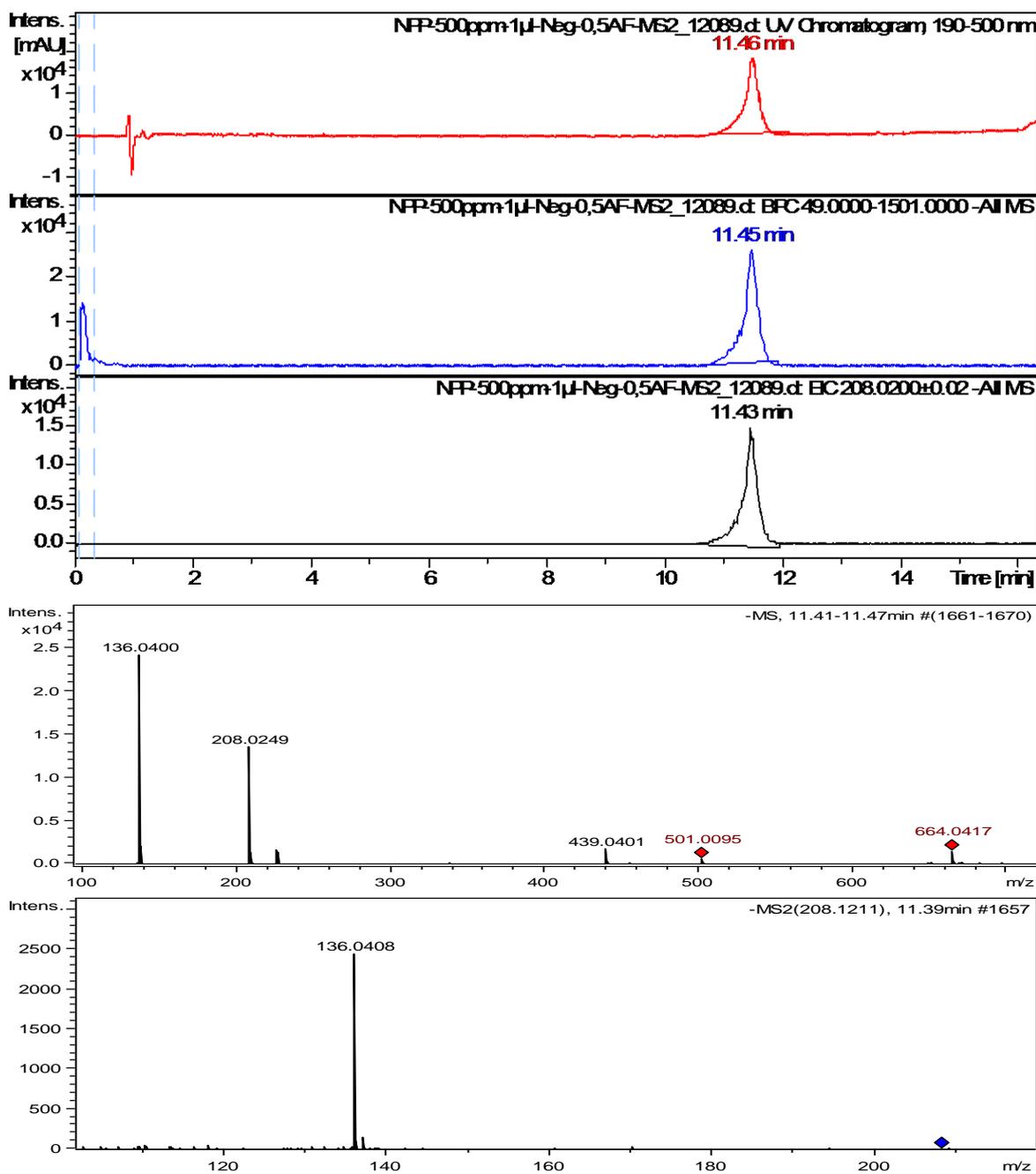


Figure IV. 13. Chromatogrammes en UV, MS, EIC et spectres MS et MS/MS de l'étalon ANPP

Le temps de rétention obtenu pour l'étalon ANPP (11,4 min) était différent de celui du composé **12** (13,5 min) dans les mêmes conditions (Figure IV.14).

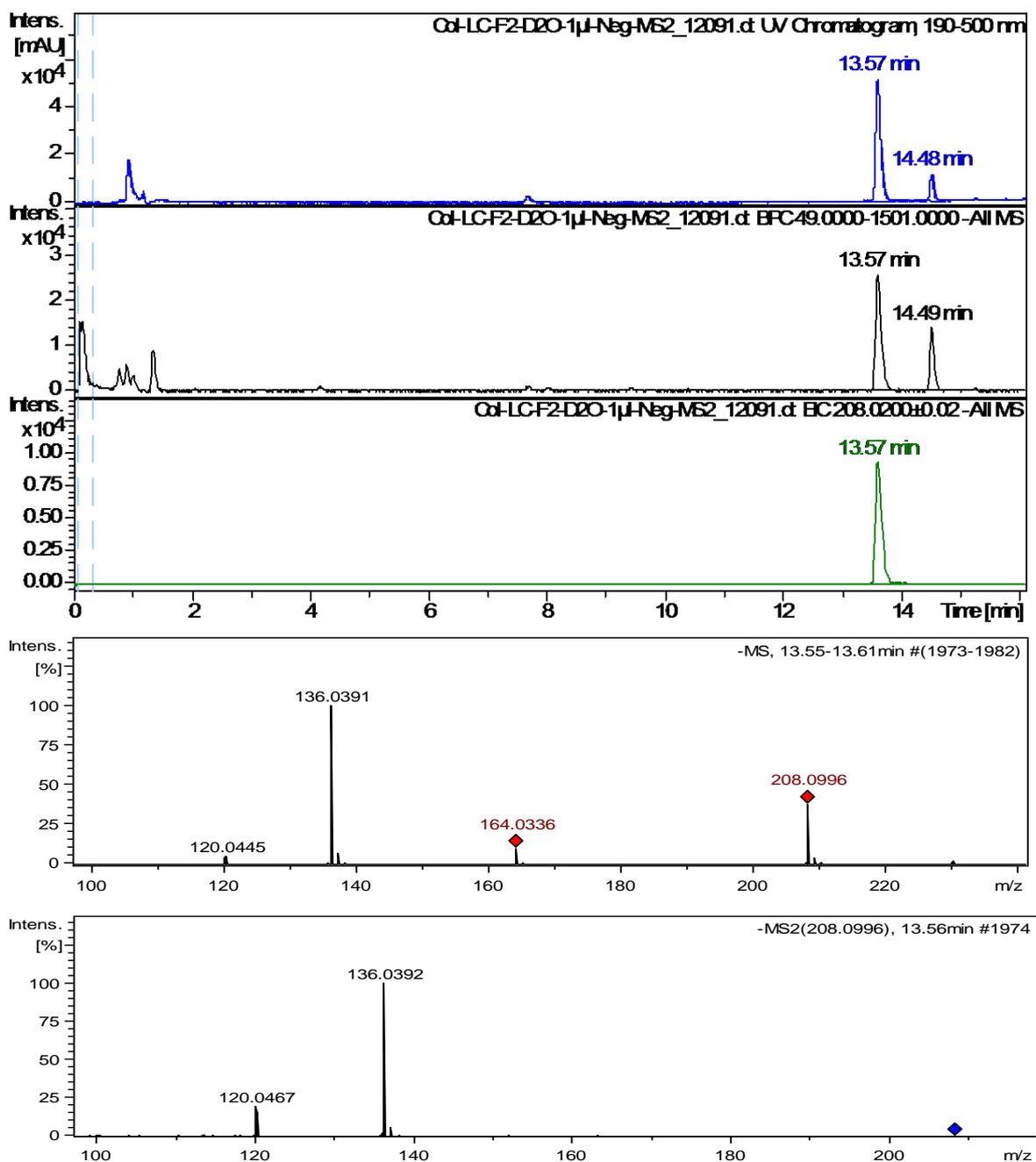


Figure IV. 14. Chromatogrammes en UV, MS, EIC de la fraction LC-F2 et les spectres MS et MS/MS du composé **12** ($T_r = 13,57$ min)

Une solution contenant un mélange de l'étalon ANPP et du composé **12** contenu la LC-F2 a ensuite été analysée afin de confirmer la différence de temps de rétention entre les deux et d'examiner leurs spectres UV dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont présentés à la *Figure IV. 15*.

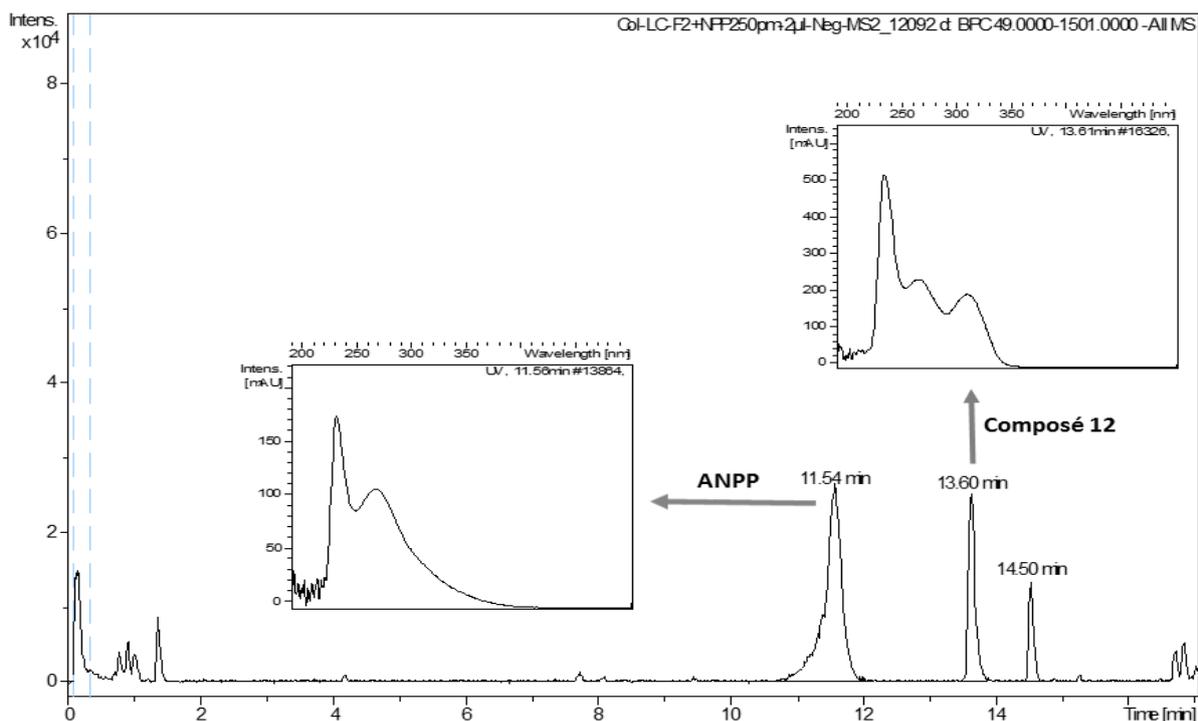


Figure IV. 15. Chromatogramme en MS de la LC-F2 supplémentée en étalon ANPP et les spectres UV correspondants

Il a été confirmé que le temps de rétention de l'ANPP est différent de celui du composé **12**, 11,54 min et 13,60 min respectivement. De plus, les spectres UV correspondants sont également différents tant au niveau du profil qu'au niveau des valeurs de λ_{\max} , 267 nm et 310-265 nm respectivement. Ces résultats nous ont conduit à conclure que le composé **12** n'était pas l'ANPP.

Nous avons alors exploré la deuxième possibilité envisagée concernant l'identité du composé **12** était, à savoir celle de l'AOB. Dans l'équilibre tautomère de ce dernier, un pH faible favorise la forme énol, alors qu'à pH élevé c'est la forme céto qui est favorisée (*Figure IV.8B*). Dans le cas où le composé **12** serait l'AOB, le pic à $T_r = 13,57$ min (*Figure IV.14*) doit correspondre à la forme énol de l'AOB, le pH de la phase mobile utilisée pour la CLUHP-DAD-SMHR étant d'environ 2,3 (0,5% d'AF). Le spectre UV du composé **12** montre bien le système conjugué de type acide coumarique. Partant de cette hypothèse, le composé **12** aurait également deux groupes carboxyliques (aliphatique et aromatique) qui seraient sous-forme protonée (*Figure IV.8B*). Dans ce cas, une augmentation du pH de la phase mobile résulterait en une réduction importante du temps de rétention en phase inverse du fait d'une déprotonation de ces deux carboxyles.

Afin de vérifier cela, nous avons utilisé de l'eau ultrapure (H₂O-MQ) à pH 6 environ et de l'ACN (sans ajout d'AF) comme phase mobile et on a re-analysé la LC-F2 en gardant le reste des conditions expérimentales inchangées. Les chromatogrammes ainsi que les spectres MS et UV sont présentés à la *Figure IV.16*.

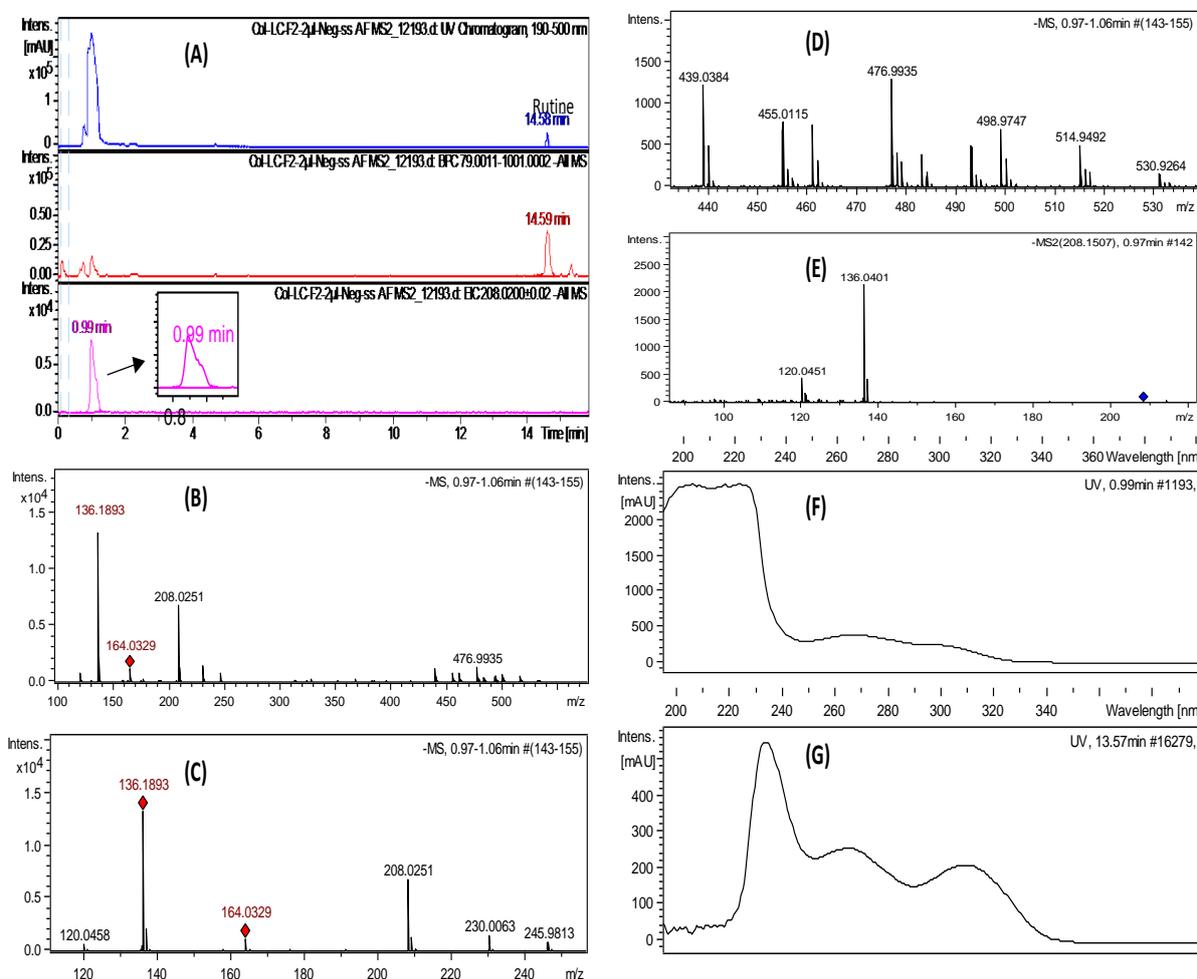


Figure IV. 16. Chromatogrammes en UV et en MS de la LC-F2 en utilisant H₂O-MQ et ACN comme phase mobile montrant un pic du composé 12 à Tr=0,99 min (A), ainsi que ses spectre MS (B) avec agrandissements (C et D), MS/MS (E) et UV (F). Le spectre du pic à Tr=13,57 min de la Figure IV.14 est également présenté (G)

On a ainsi pu constater que le composé **12** a été effectivement élué bien plus rapidement (Tr=0,99 min) qu'avec une phase mobile à 0,5% d'AF (Tr=13,57 min) (*Figure IV.16A*). Ce changement radical ne peut s'expliquer que par une déprotonation des composés carboxyliques dans l'H₂O-MQ (pH d'environ 6) sachant que le pKa de l'acide benzoïque est de 4,2 par exemple. On constate également que le profil du spectre UV (*Figure IV. 16F*) est différent de celui observé avec la phase mobile contenant 0,5% d'AF (*Figure IV. 16G*). Il y a un seul maximum d'absorption à λ_{\max} 266 nm avec un épaulement à 298sh au lieu de deux λ_{\max} 265 et

310 nm. De plus, l'absorption relative entre le λ_{\max} et l'épaulement est aussi différent par rapport à celle observé entre les deux λ_{\max} à 0,5% d'AF. Ce changement de profil du spectre UV implique un changement structural de la molécule. D'autre part, le pic du composé **12** est asymétrique avec un épaulement (Figure IV. 16A) ce qui signifie qu'au moins deux composés de structures différentes y sont présents. Sur la base de ces informations, le composé **12** pourrait correspondre à l'AOB qui se présente en équilibre tautomère dans les nouvelles conditions chromatographiques (pH d'environ 6), et à pH acide (2,3), il se présente sous forme énoil.

Les informations MS du composé **12** soutiennent cette hypothèse de l'AOB. Le spectre MS (Figure IV.16B,C) a montré que le composé **12** s'est bien décomposé dans la source en produisant trois fragments : m/z 164,0346 ($C_8H_6NO_3$) ; m/z 136,0404 ($C_7H_6NO_2$) ; et m/z 120,0458 (trace, C_7H_6NO), correspondant respectivement à l'élimination d'un CO_2 , d'un $-CO-CO_2$ et de deux CO_2 . D'autre part, en plus des adduits de sodium (m/z 230,0063 $[M-2H+Na]^-$) et de potassium (245,9813 $[M-2H+K]^-$), un groupe de masses a été observé entre m/z 439 et 531 (Figure IV.16D). Le détail des masses des ions, des formules correspondantes, ainsi que des ions proposés est présenté dans le *Tableau IV.4*. On a remarqué que le composé **12** peut perdre 2 protons et former un Na-adduit ou un K-adduit. Ceci implique 2 groupes du type carboxyles dans la structure et est donc cohérent avec la structure de l'AOB.

étalon de l'AOHB.

Tableau IV. 4. Formules proposées des Na- et K- adduits obtenus suite à l'ionisation du composé 12 à un pH d'environ 6

Formule [M-H] ⁻	Ions proposés	Masse théorique (m/z)	Masse Mesurée (m/z)	Différence (ppm)
C₉H₅NNaO₅	$[M-2H+Na]^-$	230,0071	230,0063	3,2
C₉H₅KNO₅	$[M-2H+K]^-$	245,9810	245,9813	-1,0
C₁₈H₁₂N₂NaO₁₀	$[2M-2H+Na]^-$	439,0395	439,0384	2,6
C₁₈H₁₂KN₂O₁₀	$[2M-2H+K]^-$	455,0135	455,0115	4,2
C₁₈H₁₁N₂Na₂O₁₀	$[2M-3H+2Na]^-$	461,0215	461,0196	4,1
C₁₈H₁₁KN₂NaO₁₀	$[2M-3H+K+Na]^-$	476,9954	476,9935	4,1
C₁₈H₁₀N₂Na₃O₁₀	$[2M-4H+3Na]^-$	483,0034	483,0010	5,1
C₁₈H₁₁K₂N₂O₁₀	$[2M-3H+2K]^-$	492,9693	492,9688	1,2
C₁₈H₁₀KN₂Na₂O₁₀	$[2M-4H+K+2Na]^-$	498,9773	498,9747	5,3
C₁₈H₁₀K₂N₂NaO₁₀	$[2M-4H+2K+Na]^-$	514,9513	514,9492	4,0
C₁₈H₁₀K₃N₂O₁₀	$[2M-4H+3K]^-$	530,9252	530,9264	-2,2

Le composé **12** peut aussi former un dimère, puis perdre 2, 3 ou 4 protons et former respectivement 1, 2 ou 3 Na-adduits, 1, 2 ou 3 K-adduits, 1Na-1K-adduits, 2Na-1K-adduits ou 1Na-2K-adduits. La formation d'autant d'adduits de Na et de K est possible grâce à la présence

des carboxyles et elle est certainement favorisée par l'ionisation du composé **12** à un pH d'environ 6. L'ensemble de ces résultats soutient fortement l'attribution du composé **12** à l'AOB.

Le spectre MS/MS du composé **12** (*Figure IV.16 E*) est similaire à celui obtenu avec 0,5% d'AF (*Figure IV.14*). Les deux fragments à m/z 136,0401 ($C_7H_6NO_2$) et à m/z 120,0451 (C_7H_6NO) correspondent en effet à ceux observés sur le spectre MS issus de la fragmentation dans la source décrit précédemment. En résumé, le composé **12** est sans doute l'AOB. Cette identification devra toutefois être confirmée soit par l'utilisation d'un étalon de l'AOB soit par une collecte plus importante suivie d'une analyse complète en RMN.

Partant de la conclusion que le composé **12** est bien l'AOB, le composé **6** serait un dérivé hydroxylé de l'AOB, soit acide 2-oxalylamino-5-hydroxylbenzoïque (AOHB). Cette hypothèse a été établie sur les constats suivant :

- qu'il y a un oxygène de plus dans sa formule ($C_9H_6NO_6$) par rapport à l'AOB ($C_9H_6NO_5$), soit un proton aromatique est remplacé par un groupe $-OH$;
- que son profil de fragmentation est similaire à celui de l'AOB avec à chaque fois un oxygène de plus dans la formule proposée (fragments m/z 152,0349 ($C_7H_6NO_3$) et m/z 136,0396 ($C_7H_6NO_2$) pour le composé **6** et fragments m/z 136,0397 ($C_7H_6NO_2$) et m/z 120,0447 (C_7H_6NO) pour l'AOB) ;
- et que ses λ_{max} en UV (330 et 280 nm) sont de 20 et 15 nm plus élevés que ceux de l'AOB (310 et 265 nm). Ce phénomène de déplacement bathochrome (déplacement vers le rouge) implique une substitution aromatique par un groupe portant une paire unique d'électrons (tel qu'un $-OH$). De plus, une augmentation aussi importante des λ_{max} (20 nm) est certainement la conséquence d'une substitution en position para- par rapport au système conjugué, car une substitution par $-OH$ en position ortho- ou méta- n'entraîne que quelques nm de déplacement bathochrome.

En résumé, le composé **6** a été identifié comme étant l'acide 2-oxalylamino-5-hydroxylbenzoïque, ce qui mérite bien évidemment une confirmation à travers l'utilisation d'un

Le composé correspondant au pic **7** a présenté un ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 203,0822 ($C_{11}H_{11}N_2O_2$) et un λ_{max} à 278 nm. Sa fragmentation MS/MS a conduit à la formation de 3 fragments à m/z 186,0602 ($C_{11}H_8N_1O_2$), 142,0658 ($C_{10}H_8N$) et 116,0492 (C_8H_6N). Ces fragments correspondent aux pertes successives d'une molécule de NH_3 , d'un CO_2 , puis d'un d'acétylène ($HC\equiv CH$). Ce composé a été identifié comme étant le tryptophane, ce qui a été confirmé par l'utilisation de tryptophane étalon.

Le composé **11** a présenté un ion moléculaire m/z 443,1177 ($C_{19}H_{23}O_{12}$) et un spectre UV caractéristique de l'acide caféique ou de l'acide férulique (λ_{\max} 290 et 320 nm). L'obtention d'un fragment de l'ion moléculaire à m/z 267,0723 ($C_9H_{15}O_9$) issu de la perte d'un groupe féruloyle a confirmé qu'il s'agissait bien d'un dérivé d'ester d'acide férulique. Le même composé a été observé dans l'extrait d'*A. emarginatus* Labill (chapitre III) nommé composé 34.

Le composé **13** a montré un ion moléculaire m/z 741,1886 ($C_{43}H_{33}O_{12}$) et un spectre UV caractéristique des dérivés de la quercétine glycosylé (λ_{\max} 355, 267sh). Ce composé a été également identifié chez *A. emarginatus* Labill (chapitre III) comme étant la quercétine-3-(2G-xylosylrutinoside).

Le composé **14** a exhibé un ion moléculaire m/z 609,1461 ($C_{27}H_{29}O_{16}$) et un spectre UV caractéristique de la rutine (λ_{\max} : 355, 255 nm et 267sh). Le fragment obtenu à m/z 300,0274 ($C_{15}H_8O_7$) est attribué à la quercétine en raison de la perte du groupe rutinosyle ($C_{27}H_{29}O_{16} - C_{15}H_8O_7 = C_{12}H_{21}O_9$). Ce composé a été identifié comme étant la rutine. Cette identification a par ailleurs été confirmée par les résultats de l'analyse d'un étalon.

Le composé **15** a présenté un ion moléculaire à m/z 463,0892 ($C_{21}H_{19}O_{12}$) et un spectre UV similaire à celui du composé **14** (λ_{\max} : 350 nm, 267sh). L'obtention du fragment à m/z 300,0276 ($C_{15}H_8O_7$), provenant d'une perte du groupe glucosyle ($C_{21}H_{19}O_{12} - C_{15}H_8O_7 = C_6H_{11}O_5$), indique qu'il s'agit d'un dérivé glycosylé de la quercétine. Ce composé a été identifié comme étant la quercétine-3-*O*-glucoside (isoquercitrine), ce qui a été confirmé par les résultats de l'analyse d'un étalon.

Le composé **16** a exhibé un ion moléculaire à m/z 593,1512 ($C_{29}H_{29}O_{15}$), et un spectre UV similaire à celui de la rutine (λ_{\max} : 350, 265 nm). Les fragments obtenus à m/z 285 ($C_{15}H_9O_6$) et 284 ($C_{15}H_8O_6$) confirment qu'il s'agit d'un flavonoïde avec 4 groupes hydroxyles dans son aglycone. Ce composé a ensuite été identifié comme étant lutéoline-7-*O*-rutinoside, ce qui a été confirmé par les résultats de l'analyse d'un étalon.

Le composé **17**, présentant un ion moléculaire à m/z 623,1618 ($C_{28}H_{31}O_{16}$) et un spectre UV caractéristique des dérivés glycosylés de la quercétine ou de l'isorhamnétine (λ_{\max} : 350 nm, 267sh), a été identifié comme étant l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside en raison de son profil de la fragmentation en MSMS. Les fragments observés aux m/z 315,0490 ($C_{16}H_{11}O_7$) et 299,0174

(C₁₅H₇O₇) sont caractéristiques de l'aglycone des flavonols ayant 4 groupes hydroxyles et un groupe méthoxy. Ces fragments ont été successivement obtenus par une élimination d'un groupe rutinosyle (C₂₈H₃₁O₁₆ - C₁₆H₁₁O₇ = C₁₂H₂₀O₉) et d'une molécule de méthane (C₁₆H₁₁O₇ - C₁₅H₇O₇ = CH₄). Cette identification a été confirmée par les résultats de l'analyse d'un étalon.

Le composé **18** a exhibé un ion moléculaire à m/z 431,0985 (C₂₁H₁₉O₁₀) et un spectre UV avec un λ_{max} à 321 nm. Un fragment de m/z 268,0454 (C₁₅H₈O₅) correspondant à un flavone ayant 3 groupes hydroxyle a été obtenu suite à la perte du groupe glucosyle (C₂₁H₁₉O₁₀ - C₆H₁₁O₅ = C₁₅H₈O₅). Le composé **18** a été identifié comme étant l'apigénine-7-*O*-glucoside, ce qui a été confirmé par les résultats de l'analyse d'un étalon.

Les composés **19**, **20**, **21** et **22** ont présenté un ion moléculaire commun à m/z 417,08 (C₂₀H₁₇O₁₀) et un ion de dimère 835,18 (C₄₀H₃₅O₂₀). La fragmentation MS/MS de l'ion moléculaire a produit plusieurs fragments dont l'un à m/z 121,03 (C₇H₅O₂) correspondrait à l'ion hydroxybenzoyle. Par conséquent, ces composés ont été provisoirement identifiés comme étant des esters de l'acide hydroxybenzoïque sans connaître l'identité de la partie de l'alcool.

Pour conclure, on peut constater une grande ressemblance de composition chimique entre AC_{Et}50 et AE_{Et}30 (l'extrait d'AEL) concernant les composés flavonoïques, mais avec une moindre richesse en hydroxycinnamates qui sont majoritaires chez AEL. Des molécules comme l'acide idarique-1,4-lactone et ses isomères, l'acide 2-oxalylamino-5-hydroxybenzoïque, l'acide 2-oxalylaminobenzoïque et les esters de l'acide hydroxybenzoïque, identifiés dans l'extrait AC_{Et}50, n'ont pas été détectés dans l'extrait AE_{Et}30. A notre connaissance, ces composés sont identifiés pour la première fois dans chez le genre *Astragalus*. Finalement, bien que ces deux plantes appartiennent au même genre et se développent dans les mêmes conditions climatiques, elles ont montré des compositions chimiques assez différentes.

IV.3. Activités biologiques

IV.3.1. Activité anticancéreuse

Comme pour l'extrait AE_{Et}30, l'activité anticancéreuse de l'extrait AC_{Et}50, ainsi que celle des fractions S-F1 et S-F2 (issues de la CLHP semi-préparative) ont été évaluées à différentes concentrations pour l'extrait et ses fractions (100, 150 et 300 µg/mL) sur la lignée cellulaire AsPC-1 pendant 72 h.

Les résultats ont montré d'abord que le DMSO, solvant utilisé pour dissoudre l'extrait et ses fractions, n'a pas d'effet sur la survie ni la croissance des cellules AsPC-1 comparativement au témoin négatif (cellules non traitées) (*Figure IV.17 a,b*). Le célastral utilisé à 50 μM comme un témoin positif, a quant à lui provoqué une mortalité cellulaire de 96% (*Figure IV.17 c*). Pour ce qui est de l'extrait AC_{Et}50 et des fractions S-F1 et S-F2, aucune différence ne pouvait être observée entre les cytogrammes obtenus et celui du control négatif (*Figure IV.17 a,d,e,f*).

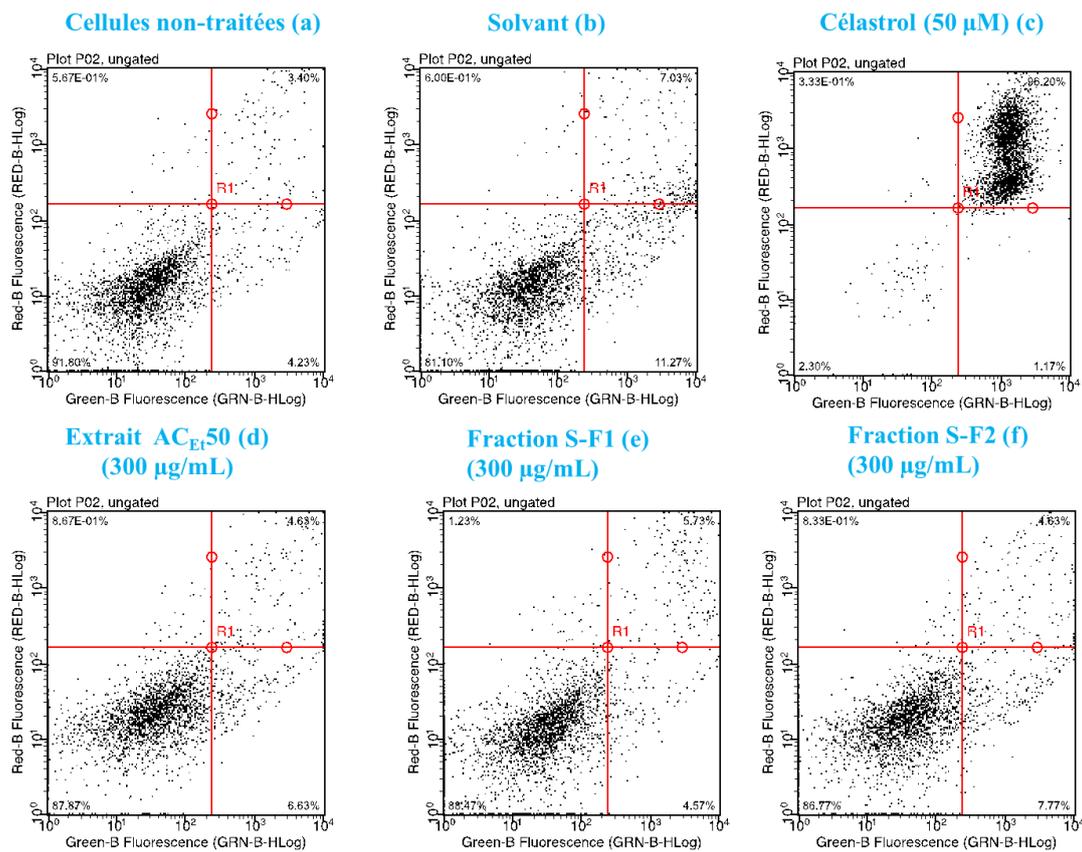


Figure IV. 17. Cytogrammes présentant les résultats de l'analyse de l'activité anticancéreuse de l'extrait AC_{Et}50 et de ses fractions (S-F1 et S-F2) par cytométrie en flux avec une détection à l'annexine V-FITC / IP

Ce résultat est surprenant dans la mesure où l'activité anticancéreuse de la rutine, identifiée comme constituant majoritaire de l'extrait AC_{Et}50, a été rapportée par plusieurs études [13–15]. Ben Sghaier *et al.* ont par exemple montré sa cytotoxicité sur diverses cellules cancéreuses (A549, HT29 and Caco-2) [16]. Caparica *et al.* ont étudié l'activité anticancéreuse de la rutine sur les cellules cancéreuses rénales (vero et 786-O) et ont montré qu'une concentration de 250 μM provoquait une diminution de viabilité des cellules vero de 52,1% et des cellules 786-O de 25,3% [17].

Partant de ce constat, la fraction S-F2 a été préparée à 439 μM (équivalent à 250 μM de rutine pure) en se basant sur un rapport de 5 mg rutine pour 100 mg extrait sec (calculé d'après les surfaces des pics et le rendement de l'extraction) et son activité a été évaluée contre les cellules AsPC-1. Parallèlement, l'activité de la rutine pure a été évaluée aux concentrations de 300, 500 et 1000 μM . L'analyse par cytométrie en flux n'a permis de mettre en évidence aucune activité anticancéreuse, ni de la fraction S-F2 (439 μM), ni même de la rutine aux concentrations utilisées (*Figure IV.18*).

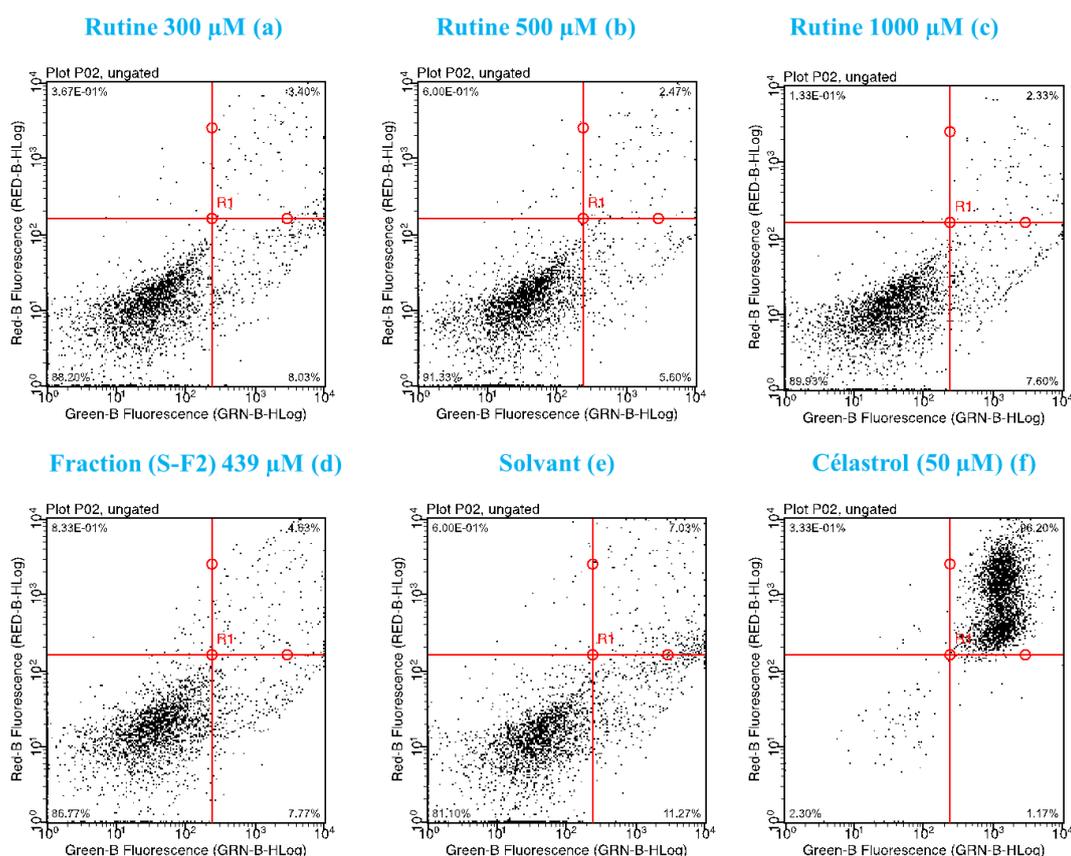


Figure IV. 18. Résultats d'analyse de l'activité anticancéreuse de la rutine (300, 500 et 1000 μM) et de la fraction S-F2 (439 μM)

Sachant que le célastrol montre une activité nettement visible sur la viabilité des cellules AsPC-1, cette absence d'activité de la rutine et de la fraction S-F2 (contenant la rutine) est à mettre sans doute sur le compte du mode d'action de cette molécule en rapport avec le type de cellules cancéreuses utilisées. Ce résultat pose la question du choix des cellules test en fonction des molécules anticancéreuses considérées dont certaines, selon leurs structures, pourraient avoir une action bien plus ciblée que d'autres. Cela pose également la question des résultats négatifs obtenus sur les cellules AsPC-1 avec l'extrait AE_{EI}30 et qui pourraient eux aussi être liés aux

structures et au spectre d'activité des molécules bioactives contenues dans cet extrait. L'utilisation d'autres lignées cellulaires aurait sans doute permis d'observer un effet antiprolifératif des extraits d'AEL et d'ACW.

IV.3.2. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait AC_{Ei}50 et de ses fractions S-F1 et S-F2 a été évaluée par mesure de la capacité de l'extrait à inhiber la sécrétion du TNF- α libéré par les cellules THP-1 stimulées par LPS. Les résultats ont montré que l'extrait AC_{Ei}50 à une concentration de 300 μ g/mL permet d'inhiber la sécrétion de TNF- α par les cellules stimulées par des LPS (Figure IV.19 a,b,d). L'effet observé est comparable à celui du célastrol utilisé comme contrôle positif (Figure IV.19e).

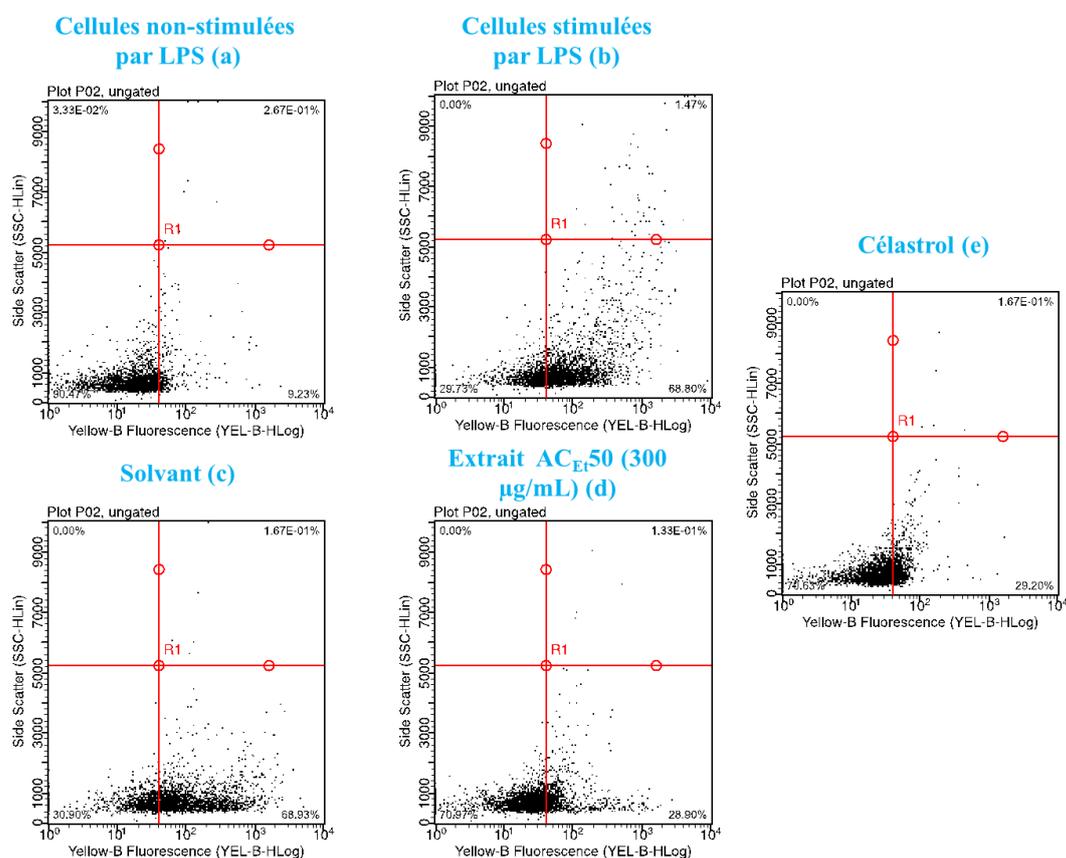


Figure IV. 19. Cytogrammes représentant l'effet de l'extrait AC_{Ei} 50 sur la sécrétion de TNF- α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS

Les fractions F1 et F2 quant à elles n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur la sécrétion de TNF- α (Figure IV.20 c,d). Ceci pose la question de l'origine de l'activité observée de l'extrait total AC_{Ei}50, constitué essentiellement des fractions S-F1 et S-F2. Une action synergique entre deux

ou plusieurs molécules contenues dans AC_{Et}50 n'est pas à exclure pour expliquer l'activité de cet extrait. Cette synergie serait perdue suite au fractionnement et de la séparation des molécules qui y seraient impliquées.

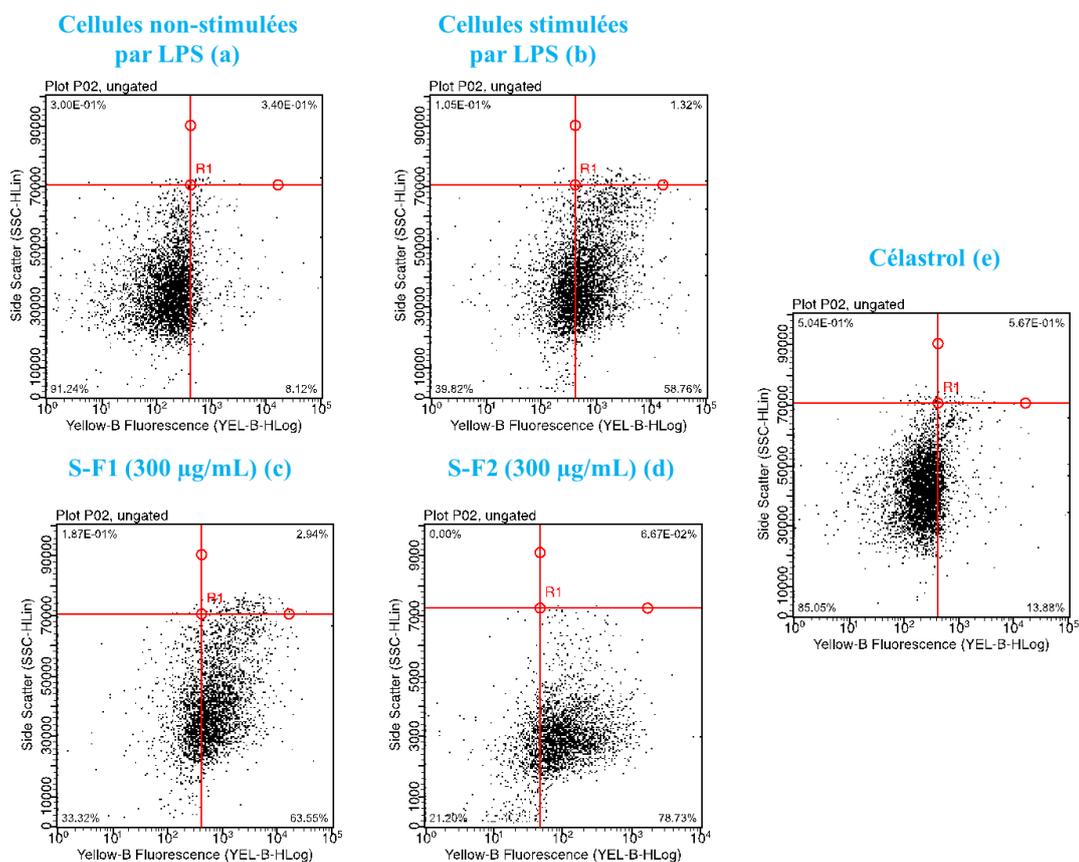


Figure IV. 20. Cytogrammes représentant l'effet des fractions S-F1 et S-F2 sur la sécrétion de TNF- α par des cellules THP-1 stimulées par des LPS

IV.3.3. Activité antimicrobienne

En utilisant le test de diffusion sur milieu de culture gélosé, l'activité antimicrobienne de l'extrait AC_{Et}50 et de ses fractions S-F1 et S-F2 a été testée contre une trentaine souches bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif, une souche de levure et une souche de moisissure. Avec ce test, il n'a pas été possible de mettre en évidence une quelconque activité antimicrobienne de l'extrait AC_{Et}50, ni de ses deux fractions contre les microorganismes testés. Le contrôle positif utilisé consistant en des peptides antimicrobiens de type bactériocine a quant à lui permis d'obtenir des zones claires d'inhibition de croissance.

Le constituant majoritaire d'AC_{Et}50 et de la fraction F2, la rutine, n'est pas connue pour avoir une activité antimicrobienne. Une étude réalisée par Nizer *et al.* est en effet arrivée à cette conclusion en testant la rutine sur 4 espèces de champignons, 9 souches bactériennes Gram⁻ et

5 souches Gram⁺ [18]. Toutefois, comme il n'y a pas que la rutine dans l'extrait (d'autres molécules y sont présentes ainsi que dans la fraction S-F1), cette absence d'activité antimicrobienne pourrait simplement être due à l'absence de molécules ayant une telle activité biologique ou à leur présence en quantités très faibles.

IV.4. Conclusion

Ce chapitre a illustré les résultats d'une étude faite pour analyser la composition chimique, l'activité anti-radicalaire et les activités anticancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobienne de la partie aérienne d'*A. coluteoides* Will (ACW). Les essais TEAC, ORAC, DPPH et CLHP-ABTS^{•+} ont révélé la présence d'une activité anti-radicalaire importante dans l'extrait AC_{Et}50. Parmi les solvants testés, l'éthanol à 50% a en effet montré la meilleure capacité d'extraction des composés antioxydants de la partie aérienne d'ACW. En utilisant la CLHP-ABTS^{•+}, il a été montré que la rutine était le composé majoritaire de cet extrait et le principal contributeur à son activité anti-radicalaire. Une vingtaine d'autres composés a été identifiée par UHPLC-DAD-HRMS comprenant des flavonoïdes, des dérivés des acides phénoliques et des composés non flavonoïques. Parmi ces derniers, des molécules comme l'acide idarique-1,4-lactone et ses isomères, l'acide 2-oxalylamino-5-hydroxybenzoïque, l'acide 2-oxalylaminobenzoïque et les esters de l'acide hydroxybenzoïque, ont été identifiés pour la première fois chez le genre *Astragalus*.

En plus de l'activité anti-radicalaire, l'extrait AC_{Et}50 a exhibé une activité anti-inflammatoire, mais il n'a pas été possible d'observer d'activité anticancéreuse ou antimicrobienne. Il faut toutefois noter que le protocole d'extraction a été bioguidé par des tests d'activité antioxydante. Bien que cette activité puisse être liée à des activités anticancéreuses ou antimicrobiennes, ces dernières n'ont pas été directement prises en compte lors de l'optimisation de ce protocole. La présence de molécules ayant de telles activités dans la partie aérienne d'ACW n'est donc pas à exclure entièrement. Il n'en reste pas moins que cette plante pourrait être une source naturelle de rutine qui est largement utilisée dans les industries chimiques, cosmétiques et alimentaires.

IV. REFERENCES

- [1] S. Langari, E. A. Salehi, 'Evaluation of the Antioxidant Capacity of Different Extracts of *Astragalus glaucacanthus*', *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 4 (2015) 14–17.
- [2] T. S. Souza, F. F. Dias, J. P. Oliveira, J. M. de Moura Bell, M. G. Koblitiz, 'Biological properties of almond proteins produced by aqueous and enzyme-assisted aqueous extraction processes from almond cake', *Sci. Rep.* 10 (2020).
- [3] J. O. Chaves, M. C. de Souza, L. C. da Silva, D. Lachos-Perez, P. C. Torres-Mayanga, A. Machado, T. Forster-Carneiro, M. Vázquez-Espinosa, A. V. González-de-Peredo, G. F. Barbero, M. A. Rostagno, 'Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques', *Front. Chem.* 8 (2020) 507887.
- [4] A. Hijazi, S. Bouchra, H. F. Kazan, H. Rammal, A. Kobeissy, B. Badran, Z. Saad, 'Extraction, phytochemical screening, chemical quantification and identification of bioactive compounds from Lebanese *Urtica dioica*', *Am. J. PharmTech Res.* 4 (2014).
- [5] N. A. Jaradat, A. N. Zaid, A. Abuzant, S. Khalaf, N. Abu-Hassan, 'Phytochemical and biological properties of four *Astragalus* species commonly used in traditional Palestinian medicine', *Eur. J. Integr. Med.* 9 (2017) 1–8.
- [6] A. Adigüzel, M. Sökmen, H. Özkan, G. Ağar, M. Güllüce, F. Şahin, 'In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of *Astragalus* species growing in the eastern Anatolia Region of Turkey', *Turk. J. Biol.* 33 (2009) 65–71.
- [7] S. Bourezzane, H. Haba, C. Long, M. Benkhaled, 'Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L. growing in semiarid areas of Algeria', *J. Serb. Chem. Soc.* 83 (2018) 31–38.
- [8] N. N. Guzhva, 'Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *astragalus asper*', *Chem. Nat. Compd.* 46 (2010) 303–304.
- [9] K. A. Al-shammary, K. R. Al-joboury, 'Chemical study for some species of *Astragalus* L. (Fabaceae family) in Iraq', *J. Genet. Environ. Resour. Conserv.* 4 (2016) 66–71.
- [10] N. Haşimi, A. Ertaş, M. A. Yilmaz, M. Boğa, H. Temel, S. Demirci, T. Yılmaz-Özden, İ. Yener, U. Kolak, 'LC-MS/MS and GC-MS analyses of three endemic *Astragalus* species from Anatolia towards their total phenolic-flavonoid contents and biological activities', *Biol. Divers. Conserv.* (2017).
- [11] Y. Lu, L. Yeap Foo, 'Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*', *Phytochemistry.* 55 (2000) 263–267.

- [12] A. J. M. Carpy, P. P. Haasbroek, J. Ouhabi, D. W. Oliver, 'Keto/enol tautomerism in phenylpyruvic acids: Structure of the o- nitrophenylpyruvic acid', *J. Mol. Struct.* 520 (2000) 191–198.
- [13] A. Saleh, H. M. ELFayoumi, M. Youns, W. Barakat, 'Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions', *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 392 (2018) 165–175.
- [14] A. Ganeshpurkar, A. K. Saluja., 'The Pharmacological Potential of Rutin', *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 149–164.
- [15] P. Jayameena, K. Sivakumari, K. Ashok, S. Rajesh, 'Rutin: a potential anticancer drug against human colon cancer (HCT116) cells', *IJBPAS.* 7 (2018) 1731–1745.
- [16] M. ben Sghaier, A. Pagano, M. Mousslim, Y. Ammari, H. Kovacic, J. Luis, 'Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells', *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 1972–1978.
- [17] R. Caparica, A. Júlio, M. E. M. Araújo, A. R. Baby, P. Fonte, J. G. Costa, T. S. de Almeida, 'Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells', *Biomolecules.* 10 (2020) 233.
- [18] W. Nizer, A. Ferraz, T. Moraes, F. Ferreira, C. Magalhães, S. Vieira-Filho, L. Duarte, J. D. Magalhães, 'Lack of activity of rutin isolated from *Tontelea micrantha* leaves against Vero and BHK, fungi, bacteria and Mayaro virus and its in silico activity', *J. Pharm. Negat. Results.* 11 (2020) 9–14.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le recours aux plantes médicinales pour soulager des douleurs et guérir des maladies reste une pratique répandue, non seulement dans les régions du monde où l'accès à la médecine moderne est difficile, mais aussi dans les pays développés où il connaît un regain d'intérêt. A tort ou à raison, la médication par les plantes est en effet réputée avoir un pouvoir thérapeutique efficace, tout en étant "plus douce" et en ayant moins d'effets secondaires que la médecine conventionnelle. Ce regain d'intérêt est également favorisé par une tendance plus globale de "retour à la naturalité" des citoyens consommateurs et par conséquent par un intérêt croissant des industries, pharmaceutique et dermo-cosmétique entre autres, pour les molécules bioactives d'origine végétale. Si l'on considère que la vaste majorité des ressources végétales restent inexplorées pour ce qui est de leur bioactivité, il s'agit là d'une tendance qui ne pourrait que s'accroître.

Le pouvoir thérapeutique des plantes est attribué aux métabolites secondaires qu'elles produisent tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tannins, les alcaloïdes et les terpénoïdes qui sont capables d'interférer avec les processus d'initiation et de développement d'une grande diversité de pathologies. Des progrès considérables ont été réalisés ces deux dernières décennies dans la compréhension des interactions entre ces métabolites et les processus pathologiques. Ces progrès n'auront pas été possibles sans le développement de techniques analytiques performantes et leur association à des tests biochimiques ou biologiques, ce qui permet de bioguider les processus de fractionnement et de purification vers la découverte des molécules ayant réellement un intérêt.

Notre étude a été inscrite dans ce contexte et a consisté à explorer l'activité anti-radicalaire et les activités biologiques (anticancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobienne) des parties aériennes d'*A. emarginatus* Labill. (AEL) et *A. coluteoides* Will. (ACW), deux plantes de la famille de fabacées et du genre *Astragalus* utilisées dans la médecine traditionnelle libanaise. Parallèlement, les compositions chimiques d'AEL et d'ACW ont été étudiées dans l'objectif d'isoler et d'identifier les molécules responsables des activités observées.

Des extraits de ces deux plantes utilisant des solvants de polarités différentes ont exprimé une activité anti-radicalaire qui a été évaluée par plusieurs essais (TEAC, ORAC, DPPH et CLHP-ABTS⁺). Les résultats ont révélé que les extraits hydroéthanoliques avaient l'activité anti-radicalaire la plus importante : l'éthanol à 30% pour AEL (AE_{Et30}) et à 50% pour ACW (AC_{Et50}). Nos efforts ont alors porté sur l'étude de la composition chimique de chacun de ces deux extraits afin d'identifier les composés antioxydants.

Ainsi, une quarantaine de composés ont été identifiés dans l'extrait AE_{EI}30 par CLUHP-DAD-SMHR. Ces composés pouvaient être regroupés en deux familles : les dérivés des hydroxycinnamates et les flavonoïdes. Parmi ceux-ci, une dizaine de composés, des dérivés de l'acide caféique et des dérivés glycosides de la quercétine, ont été identifiés comme antioxydants par CLHP-ABTS⁺. L'une des caractéristiques structurales communes de ces dérivés est la présence d'une fonction catéchol. Une étude de la relation structure-activité a montré que le rôle de cette fonction était central dans leur pouvoir antioxydant. Les essais menés sur l'extrait AE_{EI}30 et portant sur la recherche d'activités anticancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobienne n'ont pas permis de mettre en évidence de telles activités. Au vu de ces résultats, l'intérêt avéré de cet extrait d'AEL est celui d'une source potentielle d'antioxydants naturels.

En ce qui concerne l'extrait AC_{EI}50, l'analyse par CLUHP-DAD-SMHR a montré une composition chimique sensiblement différente de celle de l'extrait AE_{EI}30, particulièrement en ce qui concerne les composés non flavonoïques. Des composés tels que l'acide idarique-1,4-lactone et ses isomères, l'acide 2-oxalylamino-5-hydroxybenzoïque, l'acide 2-oxalylaminobenzoïque et les esters de l'acide hydroxybenzoïque ont pu pour la première fois être identifiés chez les astragales. Une vingtaine de composés au total a été identifiée comprenant en particulier des flavonoïdes et des dérivés des acides phénoliques. Du point de vue du pouvoir antioxydant, les analyses effectuées sur l'extrait AC_{EI}50 par CLHP-ABTS⁺ ont montré qu'un composé majoritaire, la rutine, était le principal responsable de l'activité observée. La partie aérienne d'ACW pourrait ainsi constituer une source naturelle de cet antioxydant. Comme pour AEL, il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité anticancéreuse ou antimicrobienne dans le cas d'ACW, mais une activité anti-inflammatoire a pu être observée à travers la mesure de la capacité de l'extrait AC_{EI}50 à inhiber la sécrétion du TNF- α libéré par les cellules THP-1. Cette activité mérite d'être confirmée sur d'autres lignées cellulaires et le ou les composés qui y sont impliqués devront être identifiés.

Les deux astragales ayant fait l'objet de ce travail ont exhibé une activité antioxydante et les composés responsables de cette activité ont été identifiés. Elles pourraient constituer des sources naturelles pour ces composés avec des applications possibles dans les industries chimiques, cosmétiques et alimentaires. Le protocole d'extraction pourrait être davantage optimisé afin de cibler prioritairement les molécules individuelles recherchées.

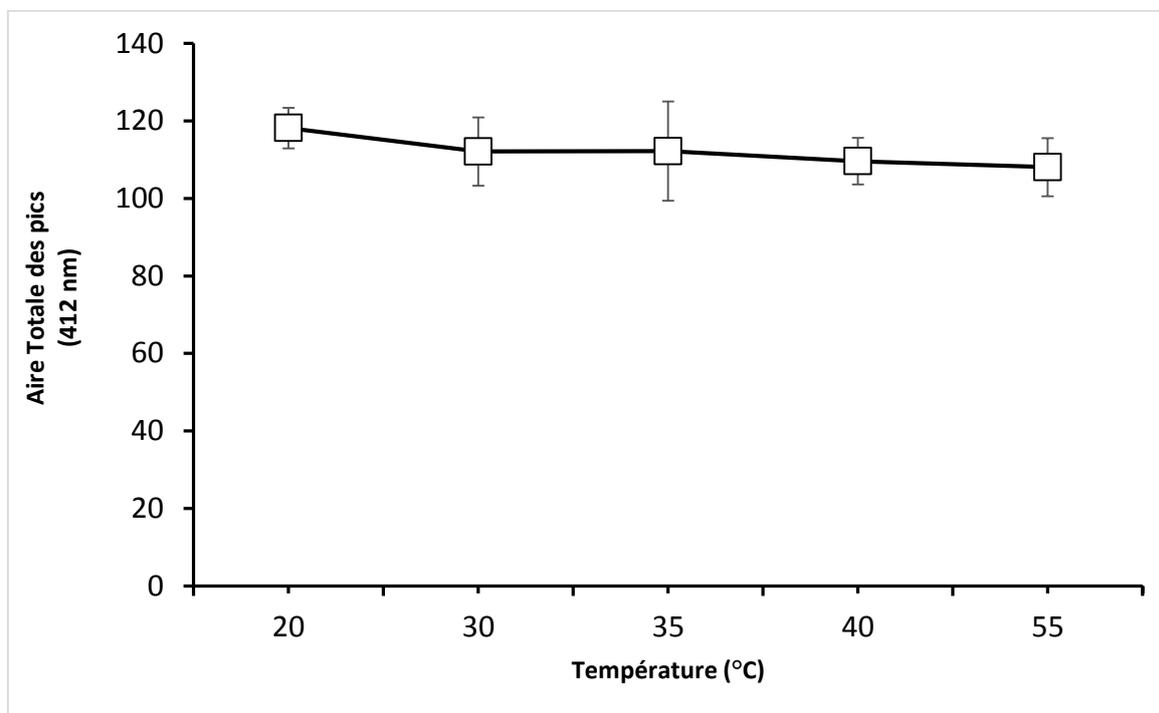
A l'exclusion de l'activité anti-inflammatoire chez ACW, il n'a pas été possible de déceler d'autres activités biologiques (anticancéreuse et antimicrobienne). Dans la mesure où parmi les molécules identifiées chez les deux espèces d'astragales, plusieurs sont connues pour avoir

de telles activités biologiques, ce résultat négatif pourrait être lié à des quantités insuffisantes de molécules bioactives ou à la nature même des essais biologiques. C'est le cas par exemple des alcaloïdes qui sont notoirement connus pour leurs activités antimicrobiennes, anticancéreuse et anti-inflammatoires et qui ont été détectés dans les extraits AE_{Ei}30 et AC_{Ei}50. En effet, le protocole d'extraction retenu dans notre étude est bioguidé par des tests d'activité antioxydante, les autres activités bien que pouvant être en partie due à une activité antioxydante n'ayant pas été directement prises en compte lors du développement de ce protocole. Cela pourrait avoir abouti à des extraits où les molécules non antioxydantes mais qui auraient d'autres activités d'intérêt seraient exclues ou présentes en quantités trop faibles pour être détectées dans des bio-essais.

Pour ce qui concerne les bio-essais utilisés, la nature des lignées cellulaires peut être déterminante dans la mesure où l'activité de certaines molécules peut être souche-dépendante. Cela peut également aboutir à une absence de détection de certaines molécules bioactives. D'autres lignées cellulaires devraient être testées pour confirmer cette absence d'activités anticancéreuse et inflammatoire (chez AEL) notamment.

ANNEXES

Annexe. 1. Effet de la température sur l'activité anti-radicalaire représenté par l'aire totale des pics à 412 nm en CLHP-ABTS^{•+}



Etude des molécules bioactives et de leurs activités chez deux espèces d'astragales utilisées dans la médecine traditionnelle : *Astragalus emarginatus* Labill. et *Astragalus coluteoides* Will.

Résumé - La phytothérapie et le recours aux plantes médicinales pour prévenir ou traiter diverses maladies remontent à l'antiquité. De nos jours, les industries pharmaceutiques et cosmétiques sont constamment à la recherche de molécules bioactives naturelles pour diverses applications. Ce travail de thèse a consisté à rechercher des composés à intérêt thérapeutiques dans les parties aériennes d'*Astragalus emarginatus* Labill. (AEL) et d'*Astragalus coluteoides* Will. (ACW), deux plantes utilisées dans la médecine traditionnelle libanaise. En utilisant les essais TEAC, ORAC et DPPH il a été possible de montrer un pouvoir anti-radicalaire dans divers extraits des deux plantes préparés avec des solvants de polarités différentes (eau, méthanol, éthanol, chloroforme et acétate d'éthyle). Les extraits hydroéthanoliques, EtOH 30% pour AEL (AE_{Et}30) et EtOH 50% pour ACW (AC_{Et}50) ont montré l'activité anti-radicalaire la plus importante. Une analyse CLHP-ABTS^{•+} a déterminé précisément les molécules antioxydantes dans chacun de ces extraits. Ensuite, une analyse CLUHP-DAD-SMHR a mené à l'identification de ces molécules, ainsi que d'autres constituants de ces deux extraits. Ces identifications ont montré d'une part, la présence de deux catégories de composés dans l'extrait AE_{Et}30, les flavonoïdes et les hydroxycinnamates, et d'autre part que les dérivés de l'acide caféique et les dérivés glycosylés de quercétine sont à l'origine de l'action antioxydante. L'extrait AC_{Et}50 a révélé quant à lui une composition chimique différente de celle de l'extrait AE_{Et}30 surtout s'agissant des composés non flavonoïques. La rutine y a été identifiée comme l'antioxydant principal. Ces résultats ont l'intérêt d'AEL et d'ACW comme une source des antioxydants naturels. Des tests cellulaires d'activités anticancéreuse, anti-inflammatoire et antibactérienne n'ont par contre pas permis de mettre en évidence de telles activités à l'exception de l'activité anti-inflammatoire dans l'extrait AC_{Et}50.

Mots clés : *Astragalus emarginatus* Labill., *Astragalus coluteoides* Will., antioxydant, CLUHP-DAD-SMHR

Abstract - The use of medicinal plants to prevent or treat various diseases dates back to ancient times. Nowadays, the pharmaceutical and cosmetic industries are constantly on the lookout for natural bioactive molecules for various applications. This thesis work consisted in investigating compounds of therapeutic interest in the aerial parts of *Astragalus emarginatus* Labill. (AEL) and *Astragalus coluteoides* Will. (ACW), two plants used in traditional Lebanese medicine. Using the TEAC, ORAC and DPPH assays, it was shown that extracts from the two plants using solvents of different polarities (water, methanol, ethanol, chloroform and ethyl acetate) had anti-radical activity. The hydroethanolic extracts, 30% EtOH for AEL (AE_{Et}30) and 50% EtOH for ACW (AC_{Et}50) showed the highest activity. HPLC-ABTS^{•+} analysis was used to isolate the antioxidant molecules in each of these extracts, and subsequent UHPLC-DAD-HRMS analysis was used to identify these molecules as well as other constituents of the extracts. In the AE_{Et}30 extract, it was shown that antioxidants belong to two categories of compounds, the flavonoids and the hydroxycinnamates, and that the derivatives of caffeic acid and the glycosylated derivatives of quercetin are at the origin of the antioxidant activity. The AC_{Et}50 extract revealed a chemical composition different from that of the AE_{Et}30, especially with regard to non-flavonoid compounds. Rutin has been identified as the main antioxidant of AC_{Et}50. These results showed that AEL and ACW may be of interest as sources for natural antioxidants. Cellular tests for anticancer, anti-inflammatory and antibacterial activities, on the other hand, failed to demonstrate such activities with the exception of the anti-inflammatory activity in the AC_{Et}50 extract.

Keywords: *Astragalus emarginatus* Labill., *Astragalus coluteoides* Will., antioxidant, UHPLC-DAD-HRMS