



**HAL**  
open science

# Etude phytochimique des extraits d'*Astragalus hamosus*: évaluation des effets thérapeutiques des saponines sur les maladies neurodégénératives

Khouloud Nafti

► **To cite this version:**

Khouloud Nafti. Etude phytochimique des extraits d'*Astragalus hamosus*: évaluation des effets thérapeutiques des saponines sur les maladies neurodégénératives. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2023. Français. NNT: 2023INPT0040 . tel-04648191

**HAL Id: tel-04648191**

**<https://theses.hal.science/tel-04648191v1>**

Submitted on 15 Jul 2024

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Sciences des Agroressources

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme KHOULOU NAFTI

le vendredi 30 juin 2023

**Titre :**

Etude phytochimique des extraits d'Astragalus hamosus : Evaluation des effets thérapeutiques des saponines sur les maladies neurodégénératives

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

**Directeur(s) de Thèse :**

MME CHRISTINE RAYNAUD

MME SONIA MARGHALI

**Rapporteurs :**

M. CHAKER EL KALAMOUNI, UNIVERSITE DE LA REUNION

M. RIADH KSOURI, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA

**Membres du jury :**

M. NICOLAS FABRE, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. GERALDINE GIACINTI, TOULOUSE INP, Membre

MI. JALLOUL BOUJILA, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Invité

MME CHRISTINE RAYNAUD, TOULOUSE INP, Membre

MME NEILA TRIFI, UNIVERSITE DE TUNIS EL-MANAR, Invitée

MME OLFA MASMOUDI, UNIVERSITE DE TUNIS EL-MANAR, Membre

MME SONIA MARGHALI, UNIVERSITE DE TUNIS EL-MANAR, Membre

## Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatographie

UHPLC : Ultra High Performance Liquide Chromatography

SM : Spectrométrie de masse

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

CI<sub>50</sub> : Concentration correspondant à 50 % d'inhibition de la réaction par l'échantillon à analyser

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl

EtOH : Éthanol

MeOH : Méthanol

EtOAc : Acétate d'éthyle

Mg EAG.g-1 MS : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

TE : Trolox

DO : Densité optique

UV : Ultraviolet

R<sub>f</sub> : Rapport frontal

APP : Precursor protein Amyloïd

βA : β-amyloïde

m/z : Masse sur charge

AChE : Acétylcholinestérase

MA : Maladie d'Alzheimer

5-HT : 5-Hydroxytryptamine/les récepteurs de la sérotonine

AChE : Acétylcholine

AR : récepteur de l'adénosine ;

CB1 : Récepteur cannabinoïde de type 1

CB2 : Récepteur cannabinoïde de type 2

MAO-B : Monoamine oxydase B

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

GABAARs : Récepteurs de l'acide γ-aminobutyrique de type A

NE : Norépinéphrine

OX1R : Récepteur à l'orexine de type 1

OX2R : Récepteur à l'orexine de type 2

ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

SV2A : Glycoprotéine de vésicule synaptique 2A.

Statut : AN : Actif, pas de recrutement

E : Inscription sur invitation

N : Pas encore de recrutement

R : Recrutement

U : Inconnu.

AAV : virus adéno-associé

ABCC1 : ATP Binding Cassette Sous-famille C Membre 1

APOE : Apolipoprotéine E  
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde  
BACE : Enzyme de clivage APP du site bêta  
BHE : Barrière hémato-encéphalique  
LCR : Liquide céphalo-rachidien  
CTGF : Facteur de croissance du tissu conjonctif  
FLNA : Filamine A  
nAChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine.  
BDPP : Préparation diététique de polyphénols bioactifs  
HDAC : Histone désacétylase  
MAPT : Protéine tau associée aux microtubules.  
TH: Tyrosine hydroxylase  
BPA: Bisphénol A  
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale  
SEP : Sclérose en plaque  
MTC : Médecine Traditionnelle Chinoise  
COX-2 : Cyclooxygénase-2  
TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha  
MCP-1 : Protéine chimio-attractrice de monocytes  
PGE2: Prostaglandine E2  
NO: Monoxyde d'azote  
INOS: Inductible NO synthase  
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1  
HSV-1: Herpes simplex virus 1  
TGBR: Transforming Growth Factor Beta Receptor 1-like  
TCF4: Facteur de transcription 4  
IGF2R: Insulin-like growth factor 2 receptor  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
MDA : Malondialdéhyde  
GHz: Gigahertz  
Na2SO4: Sulfate de sodium  
ELL : Extraction liquide-liquide  
SI : Siliana  
BI : Bizerte  
KAI : Kairouan  
ZA : Zaghouan  
P1, P2, P3, P4 : Protocoles 1, 2, 3 et 4  
M1 : Méthode 1



## Introduction générale

La phytothérapie est une pratique millénaire basée sur un savoir transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. A l'époque moderne, la recherche de nouvelles molécules bioactives naturelles d'intérêt thérapeutique et le développement de nouvelles méthodologies de synthèse de ces dernières, constituent à juste titre deux axes majeurs de la recherche scientifique. Ainsi, l'industrie pharmaceutique moderne s'inspire largement des métabolites secondaires issus de plantes, pour la recherche de nouveaux principes actifs pourvus de propriétés pharmacologiques afin de protéger le corps humain contre les maladies. Parmi ces molécules bioactives, les saponines qui présentent de nombreuses activités notamment hémolytiques, molluscicides, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiparasitaires, antitumorales et antivirales, anticancéreuses, et antioxydantes, peuvent également agir comme adjuvant immunologique.

En Tunisie, il existe une diversité d'espèces végétales spontanées présentant plusieurs intérêts écologiques et économiques. En dépit de sa superficie, la Tunisie dispose d'une biodiversité végétale très riche et diversifiée. Parmi ces espèces, plusieurs ont fait l'objet d'études phytochimique et biologique afin de confirmer leurs richesses en molécules bioactives.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à une plante *Astragalus hamosus* L. appartenant à la famille des Astragales en Tunisie dont les effets biologiques sont encore peu connus par rapport à d'autres espèces du même genre telles que *Astragalus gombo*, *Astragalus membranceus* ou *Astragalus Radix*.

Ces dernières années, les espèces du genre *Astragalus* ont fait l'objet d'avancées scientifiques notables en raison de leur teneur en saponines, l'une des classes moléculaires la plus importante dans l'industrie pharmaceutique. Plusieurs études suggèrent que les saponines ont des effets neuroprotecteurs significatifs sur l'atténuation des troubles du système nerveux central, tels que les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Cet effet neuroprotecteur peut être dû à l'inhibition de l'acétylcholinestérase ou à de nombreux autres mécanismes.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une mise en évidence de la présence de saponines dans quatre populations d'*Astragalus hamosus* L. de Tunisie. Une stratégie combinant divers protocoles d'extraction adaptés de la littérature et des méthodes analytiques spécifiques a été mise en place afin de pouvoir étudier dans un second temps, les propriétés biologiques de la plante et notamment l'effet neuroprotecteur.

Cette thèse est la première à évaluer l'intérêt d'*Astragalus hamosus* provenant des régions Tunisiennes pour des applications thérapeutiques.

Dans un **premier** chapitre, un bilan bibliographique des connaissances sur la maladie d'Alzheimer, sur la plante *Astragalus hamosus* L. ainsi que sur les techniques d'extraction des molécules saponines et sur la purification des extraits par HPTLC a été établi. En particulier, nous décrirons dans ce chapitre la maladie d'Alzheimer, sa physiopathologie ainsi que les voies thérapeutiques et la neuroprotection par les plantes. Nous présenterons également l'espèce *Astragalus hamosus*, sa taxonomie, ses molécules d'intérêt et son utilisation médicinale.

Nous nous sommes intéressés à la description des saponines à savoir la chimie de ces molécules d'intérêt, leur classification, leurs effets biologiques. Etant donné la complexité de l'extraction et

la purification des saponines, les techniques d'extraction mentionnées dans la littérature ainsi que les étapes méthodologiques de l'HPTLC ont été détaillées .

Dans le **deuxième** chapitre, nous décrirons le matériel et les méthodes employés pour mener à bien les travaux. Plusieurs protocoles d'extraction des saponines d'*Astragalus hamosus L.* provenant de différentes localisations tunisiennes seront étudiés, des plus simples aux plus complexes dans le but d'aboutir à une méthode permettant d'isoler au mieux ces molécules. Nous détaillerons ensuite les protocoles d'analyse des extraits par HPTLC au moyen de deux développements différents ainsi que les conditions d'analyse par HPLC-SM<sup>2</sup>. Nous allons également représenter les différents protocoles utilisés pour la détermination des taux de polyphénols, de saponines, pour réaliser l'hydrolyse des fractions, ainsi que pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire anti-acétylcholinestérase, cytotoxique et neuroprotectrice.

Nous consacrerons le **troisième** volet au traitement des résultats de l'analyse phytochimique de quatre populations d'*Astragalus hamosus L.* tunisiennes sélectionnées dans le cadre de ces travaux. Ce chapitre est présenté en partie par un article intitulé : « Screening for *Astragalus hamosus L.* Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods: Prior Identification of Azukisaponin Isomers » et publié dans le journal *Molecules*. Nous nous baserons sur les différents profils HPTLC pour évaluer et choisir le protocole d'extraction, le plus efficace vis à vis des molécules ciblées ainsi que la méthode de développement appropriée. Des analyses par couplage HPTLC-SM<sup>2</sup> viendront compléter les travaux afin de valider l'hypothèse d'identification des saponines ciblées dans les extraits d'*Astragalus hamosus*. La présence de polyphénols fait également l'objet d'une évaluation dans ce chapitre chez l'ensemble des quatre populations tunisiennes .

Dans le **quatrième** chapitre, les résultats de l'étude de l'activité biologique seront présentés. Certaines fractions d'*Astragalus hamosus L.* choisies et issues des divers protocoles d'extraction seront évaluées pour leurs activités anti-radicalaire puis anti-acétylcholinestérase par le test d'Ellman, par bioautographie. Finalement nous traiterons les résultats du test MTT sur trois lignées cellulaires différentes pour étudier l'activité neuroprotectrice, puis la cytotoxicité sur deux lignées cancéreuses sera explorée.

Nous terminerons par une conclusion générale et discuterons de quelques perspectives.

## Tables des matières

### Chapitre 1 :

<b>1 Les maladies neurodégénératives .....</b>	<b>23</b>
<b>2 La maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>23</b>
2.1 Historique .....	23
2.2 Physiopathologie.....	24
2.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire.....	25
2.2.2 Les plaques séniles .....	30
2.3 Les facteurs impliqués .....	30
2.3.1 Facteurs environnementaux .....	30
2.3.2 Facteurs génétiques.....	31
2.4 Impact sociaux économique .....	32
2.5 Cascade amyloïde .....	32
2.5.1 Le peptide AB.....	33
2.5.1.1 Origine du peptide AB.....	33
2.5.1.2 Le peptide AB et son acheminement.....	35
2.5.1.3 Peptide AB et synapses.....	36
2.5.1.4 Toxicité du peptide AB.....	37
2.6 Facteurs de risque liés au vieillissement dans la maladie d'Alzheimer .....	41
2.7 Approche thérapeutique.....	41
2.7.1 La thérapie proposée par le marché pharmaceutique .....	41
2.7.1.1 Voie de l'inhibition de l'acétylcholinestérase .....	41
2.7.1.2 Voie de l'inhibition du système glutamatergique .....	42
2.7.2 Les solutions proposées par les chercheurs .....	43
2.8 La neuroprotection par les plantes.....	44
2.8.1 Cas des Astragales .....	45
2.8.2 Cas d' <i>Astragalus hamosus</i> .....	45
2.9 Voix thérapeutiques des maladies neurodégénératives identifiées chez les Astragales .....	46
2.9.1 Modulation des voies de signalisation des neurotransmetteurs et des récepteurs. ....	46
2.9.2 Modulation des canaux ioniques .....	46
2.9.3 Clairance des agrégats de protéines.....	46
2.9.4 Réparation de la gaine de myéline.....	47
<b>3 Cancer colorectal .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Présentation.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du cancer colorectal .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Épidémiologie de la maladie .....</b>	<b>49</b>
<b>3.4 Étiologie .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Cancer colorectal et phytothérapie par des Astragales.....</b>	<b>51</b>
<b>4 <i>Astragalus hamosus</i> .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.1 Présentation du genre <i>Astragalus</i> .....	52
4.2 Classification systématique de l'espèce.....	52
4.3 Description botanique d' <i>Astragalus hamosus</i> .....	52

4.4	Caryologie d’ <i>Astragalus hamosus</i> .....	53
4.5	Métabolites secondaires d’ <i>Astragalus hamosus</i> .....	54
<b>5</b>	<b>Les molécules d’intérêt : Les saponines .....</b>	<b>55</b>
5.1	Généralité : Chimie des saponines.....	55
5.1.1	Les cycloartanes : .....	56
5.1.2	Les Oléananes .....	56
5.1.2.1	Soyasaponine .....	57
5.1.2.1.1	Soyasaponines et cancer : .....	57
5.1.2.1.2	Autres activités des Soyasaponines [118].....	58
5.2	Rôles et activités biologiques des saponines .....	60
5.3	Exemples de techniques d’analyses des saponines.....	61
5.4	Techniques d’extraction des saponines conformément aux objectifs de recherche .....	64
5.4.1	Introduction.....	64
5.4.2	Techniques d'extraction conventionnelles .....	64
5.4.2.1	Extraction par Macération .....	64
5.4.2.2	Extractions à reflux et Soxhlet.....	65
5.4.2.3	Extraction SEBSQUENT.....	65
5.4.3	Technologies d'extraction vertes .....	66
5.4.3.1	L’extraction assistée par ultrasons.....	66
5.4.3.2	Extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	66
5.4.3.3	Extraction accélérée par solvant (ASE).....	66
5.5	Techniques d’extraction des saponines chez des Astragales .....	68
5.6	Méthodes analytiques utilisées pour l’identification des saponines chez les astragales .....	69
<b>6</b>	<b>Évaluation des extraits et criblage des saponines par HPTLC .....</b>	<b>72</b>
6.1	Les étapes d’une HPTLC .....	72
6.1.1	Préparation des échantillons .....	72
6.1.2	Le dépôt .....	73
6.1.3	Le développement chromatographique.....	74
6.1.3.1	Les cuves .....	74
6.1.3.2	Modes de développement .....	76
6.1.4	La détection .....	78
6.1.4.1	Détection sans traitement chimique.....	78
6.1.4.2	Visualisation à UV 254 nm .....	78
6.1.4.3	Visualisation à UV 366 nm .....	79
6.1.4.4	Détection après traitement chimique ou dérivatisation .....	79
6.1.5	La documentation .....	80
6.1.5.1	Imagerie .....	80
6.1.5.2	La densitométrie .....	81
6.1.6	Avantage et inconvénients de HPTLC .....	82
<b>7</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>82</b>

## Chapitre 2:

<b>1 Matériel végétal.....</b>	<b>87</b>
1.1 Coordonnées GPS des lieux de collecte .....	87
1.2 Les spécimens <i>Astragalus hamosus</i> L. des quatre populations collectées.....	88
<b>2 Détermination des taux d'extractibles .....</b>	<b>89</b>
<b>3 Détermination des taux de matière minérale des 4 populations d'<i>Astragalus hamosus</i></b>	<b>89</b>
<b>4 Méthodes d'extractions développées pour l'évaluation de la présence de métabolites secondaires dans la plante. ....</b>	<b>90</b>
4.1 Protocoles d'extraction pour le criblage des saponines :.....	90
4.1.1 Description de la méthode d'extraction méthanolique M1.....	90
4.1.2 Description du protocole d'extraction P1 :.....	91
4.1.3 Description du protocole d'extraction P2 :.....	92
4.1.4 Description du protocole d'extraction P3 :.....	92
4.1.5 Description du Protocole d'extraction P4 :.....	93
4.1.6 Récapitulatif des extraits obtenus par les différent protocoles M1 et P1 à P4 : .....	93
<b>5 Évaluation des extraits obtenus par analyse HPTLC .....</b>	<b>94</b>
5.1 Description des paramètres d'analyses HPTLC appliqués : .....	94
5.2 Séparation des molécules selon leurs polarités et révélation des triterpénoïdes par l'anisaldéhyde sulfurique .....	96
5.2.1 Analyses préliminaires pour la mise au point des conditions opératoires d'HPTLC et pour le criblage des saponines triterpénoïdes .....	96
5.2.1.1 Analyse HPTLC de BI-25-M1 obtenu par la méthode d'extraction M1 .....	96
5.2.1.2 Analyse HPTLC des extraits SI-M1, ZA-M1, KAI-M1, et BI-M1 en UV-vis avant dérivatisation à 366 nm et après dérivatisation à l'anisaldéhyde sulfurique.....	96
5.2.1.3 Évaluation des volumes de dépôt des échantillons pour l'analyse HPTLC des extraits et sélection de standards.....	97
5.3 Révélation des triterpénoïdes et identification de l'Azukisaponine V à l'aide du système de développement multiple 2 (S2) .....	98
5.3.1 Mise en œuvre de l'analyse HPTLC des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3, P4 et M1 avec le système de développement multiple S2.....	98
5.3.2 Optimisation de l'HPTLC de l'extrait ZA obtenu par les différents protocoles d'extraction	98
5.3.3 Identification des saponines dans les extraits BI-P1, SI-P1, ZAI-P1 et KAI-P1 et suivant le système de développement S2.....	99
5.3.4 Identification des saponines dans les extraits BI-P4, SI-P4, ZAI-P4 et KAI-P4 et suivant le système de développement S2.....	99
<b>6 Analyse par spectrométrie de masse trappe d'ions en mode ESI-(SM, SM<sup>2</sup>) .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Analyse par couplage HPTLC-SM/UV-vis .....</b>	<b>100</b>
<b>8 HPTLC préparative pour BI-300 mg -M1.....</b>	<b>101</b>
<b>9 Analyse quantitative des saponines.....</b>	<b>101</b>
9.1 Dosage colorimétrique.....	101
9.1.1 Limite du dosage colorimétrique des saponines.....	101

9.2	Dosage de Soyasapogenol par densitométrie pour ZA-P3 .....	102
<b>10</b>	<b>Criblage des saponines par spectrométrie infrarouge IF .....</b>	<b>102</b>
<b>11</b>	<b>Dosage des polyphénols .....</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>Évaluation de l'activité antiradicalaire.....</b>	<b>104</b>
<b>13</b>	<b>Évaluation de l'effet neurprotecteur des extraits d'<i>Astragalus hamosus</i> .....</b>	<b>105</b>
13.1	Évaluation de l'activité anti- acétylcholinestérase .....	105
13.1.1	Évaluation qualitative par HPTLC-bio autographie de l'activité anti-cholinestérase ...	105
13.1.2	Évaluation quantitative par dosage spectrométrique de l'activité anti-cholinestérase ..	105
13.2	Évaluation de la neuroprotection des extraits d' <i>Astragalus hamosus L.</i> contre la toxicité du peptide AB.....	105
13.2.1	Culture des cellules PC12 :.....	105
13.2.2	Entretien des cellules PC12 .....	106
13.2.3	Préparation de la solution de collagène .....	106
13.2.4	Préparation du peptide AB .....	106
13.2.5	Conditions expérimentales : .....	106
13.2.6	Principe du test de viabilité et de neuroprotection.....	107
13.2.7	Révélation.....	107
<b>14</b>	<b>Évaluation de l'activité anticancéreuse : .....</b>	<b>108</b>
14.1	Culture des cellules HEK293 et CACO-2 .....	108
14.2	Entretien des cellules HEK293 et CACO-2 .....	108
14.3	Conditions expérimentales.....	108
14.4	Principe du test de cytotoxicité.....	108
14.5	Révélation .....	109
<b>Chapitre 3:</b>		
<b>1</b>	<b>Caractérisation de la matière végétale <i>Astragalus hamosus</i>.....</b>	<b>112</b>
1.1	Détermination des taux d'extractibles.....	112
1.2	Détermination des taux de matières minérales des 4 populations d' <i>Astragalus hamosus</i> .	112
<b>2</b>	<b>Criblage des saponines d'<i>Astragalus hamosus</i> .....</b>	<b>113</b>
2.1	Introduction.....	114
2.2	Matériel et Méthodes .....	116
2.2.1	Localisation, collecte et conservation des échantillons de plantes .....	116
2.2.2	Protocoles d'extraction.....	117
2.2.3	Équipement de chromatographie en couche mince à haute performance (HPTLC) et procédure générale .....	119
2.2.4	Hydrolyse des extraits par le chlorure d'acétyle .....	121
2.2.5	Quantification du Soyasapogenol dans les extraits pour densitométrie .....	121
2.2.5.1	Quantification du Sayasapogenol par spectrophotométrie .....	121
2.2.5.2	Quantification du Sayasapogenol pour la densitométrie .....	122
2.3	Resultats et Discussion .....	122
2.3.1	Extraction des composés d' <i>Astragalus hamosus</i> .....	122
2.3.2	Évaluation préliminaire de l'abondance des métabolites secondaires pour le screening des saponines triterpenoides par HPTLC .....	123

2.3.2.1	Optimisation de la purification de la fraction saponine d' <i>Astragalus hamosus</i> .....	124
2.3.3	Optimisation des systèmes d'élution .....	129
2.3.3.1	Mise en évidence des triterpénoïdes et détection préliminaire de la soyasaponine à l'aide du système de développement multiple (S2).....	129
2.3.3.2	Tentative d'identification des saponines triterpénoïdes dans les populations d' <i>A. hamosus</i> de Bizerte, Siliana and Kairouan.....	131
2.3.4	Hydrolyse des extraits de saponine d' <i>A. hamosus</i> .....	132
2.3.5	Quantification du Soyasapogénol.....	133
2.3.5.1	Quantification de l'extrait ZA-P3.....	133
2.3.5.2	Quantification des extraits des 4 populations par spectrophotométrie .....	135
2.4	Conclusion.....	135
<b>3</b>	<b>Analyses des extraits d'<i>Astragalus hamosus L.</i> par spectrométrie de masse.....</b>	<b>136</b>
3.1	Analyse de BI-25-M1 et BI-300-M1 par HPLC-SM <sup>2</sup> .....	137
3.2	Analyse des extraits de Zaghouan par spectromètre de masse en mode ESI <sup>-</sup> .....	137
3.3	Couplage HPTLC - Spectrométrie de masse MS <sup>n</sup> et UPLC Q-TOF MS .....	139
3.4	Evaluation de la teneur en polyphénols totaux .....	147
3.5	Concluions du chapitre: .....	148
<b>Chapitre 4:</b>		
<b>1</b>	<b>Évaluation de l'activité antiradicalaire.....</b>	<b>152</b>
1.1	Cas des fractions ZA-P1, KAI-P1, BI-P1 et KAI-P1 .....	152
1.2	Cas des fractions ZA-P4, KAI-P4, BI-P4 et KAI-P4 .....	153
<b>2</b>	<b>Activité anti-acétylcholinestérase .....</b>	<b>153</b>
2.1	Évaluation de l'activité anti-Ache par HPTLC-Biautographie .....	153
2.2	Évaluation de l'activité anti-Ache par la méthode d'Ellman.....	154
2.2.1	Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la galanthamine.....	154
2.2.2	Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par les 4 Population SI, BI, ZA et KAI 155	
2.2.3	Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la soyasaponine et Soyasapogénol B 155	
<b>3</b>	<b>Évaluation de la Neuroprotection .....</b>	<b>156</b>
3.1	Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sur la viabilité des cellules PC12 : .....	156
3.2	Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 sur la viabilité des cellules PC12.....	157
3.3	Évaluation des extraits obtenus par le protocole P3 d'extraction sur la viabilité des cellules PC12.....	157
3.4	Évaluation des extraits obtenus par le protocole P4 sur la viabilité des cellules PC12.....	158
3.5	Évaluation des extraits obtenus par le protocole M1 sur la viabilité des cellules PC12 ....	159
3.6	Évaluation de l'effet de soyasapogénol sur la viabilité des cellules PC12.....	159
3.7	Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 160	

3.8	Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2	161
3.9	Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P3	161
3.10	Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P4	162
3.11	Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction M1	163
3.12	Évaluation de l'effet neuroprotecteur de l'aglycone Soyasapogénol B.....	163
<b>4</b>	<b>Évaluation de l'effet cytotoxique sur la lignée CACO-2 .....</b>	<b>164</b>
4.1	La lignée CACO-2.....	166
4.2	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur Caco-2.....	166
4.3	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur Caco-2.....	167
4.4	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur Caco-2.....	168
4.5	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur Caco-2.....	168
4.6	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur Caco-2 .....	169
4.7	Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B.....	169
<b>5</b>	<b>Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits sur la lignée HEK293 .....</b>	<b>170</b>
5.1	La lignée HEK293 .....	170
5.2	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur HEK293 .....	170
5.3	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur HEK293 .....	171
5.4	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur HEK293 .....	172
5.5	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur HEK293 .....	172
5.6	Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur HEK293.....	173
5.7	Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B sur HEK293 .....	173
<b>6</b>	<b>Discussion :.....</b>	<b>174</b>
6.1	Évaluation de la neuroprotection.....	174
6.2	Évaluation de la cytotoxicité .....	174
<b>7</b>	<b>Conclusion: .....</b>	<b>176</b>
	Lignée cellulaire.....	177
	Extraits .....	177
<b>4</b>	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>180</b>
	.....	203





## Liste des figures

Figure 1: Observation des lésions anatomopathologiques caractéristiques de la MA [6].....	24
Figure 2: Mise en évidence des deux marqueurs .....	25
Figure 3: Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires.	26
Figure 4: Illustration de l'agrégation d'amyloïde A $\beta$ . Protéines natives incorrectement repliées mènent à la formation de protofibrilles puis finalement à des fibrilles matures qui se retrouvent dans les plaques amyloïdes; Image produite par Sara Licea, , Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de (Perl, 2010); « A $\beta$ » : bêta amyloïde. ....	30
Figure 5: Hypothèse de la cascade amyloïde .....	34
Figure 6: Les deux voies métaboliques principales de APP : la voie amyloïdogénique qui conduit à la production et à la sécrétion du peptide physiologique Abêta, suite à l'action de deux sécrétases (BACE1 et la gamma sécrétase) et la voie non-amyloïdogénique suit suite à une coupure de l'alpha sécrétase au milieu de Abêta. Dans la maladie d'Alzheimer, on observe une agrégation de Abêta sous forme de plaques qui s'accumulent dans la substance grise corticale [36].....	35
Figure 7: Mécanismes sous-jacents aux effets des saponines et de l'AS-IV sur le dysfonctionnement cognitif. Ils atténuent l'agrégation de la protéine $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) et la tauopathie (Tau), modulent les anomalies cholinergiques et autres anomalies des neurotransmetteurs, protègent contre l'apoptose neuronale [82].....	47
Figure 8: Les parties touchées dans le cancer colorectale : Société Française d'Endoscopie Digestive.....	48
Figure 9: Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale saine à l'adénocarcinome invasif. Les interactions étroites ("cross-talk") entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale de l'hôte, contribuent au maintien de l'inflammation chronique au niveau de la zone tumorale et au développement des différentes étapes anatomocliniques de la carcinogénèse du CCR. D'après Brennan et Garrett, 2016 [252]. .....	49
Figure 10: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique[256] .....	50
Figure 11: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire[256].....	51
Figure 12: Astragalus hamosus L. : partie aérienne [92] .....	53
Figure 13 : Microphotographies des chromosomes de A. hamosus : 2n = 44. a ; métaphase somatique ;b, c – ponts chromosomiques de la télophase.....	54
Figure 14: Classification des saponines .....	55
Figure 15: Appareil SOXHLET[176] .....	65
Figure 16: Techniques d'extractions actuelles utilisées pour l'extraction des saponines à partir de matières végétales [157].....	67
Figure 17 : Étapes d'une Analyse HPTLC.....	72
Figure 18: Schémas des différents modes d'application. A : remplissage de la seringue/capillaire et application manuels ; B : remplissage manuel et application automatisée ; C : remplissage de la seringue et application automatisés [232] .....	73
Figure 19: Schéma d'une application par contact (A) ou par vaporisation (B). ....	73
Figure 20: Exemple de dépôt .....	74
Figure 21: Présentation et fonctionnement d'une cuve à fond plat.....	74

Figure 22: Exemples d'utilisation d'une cuve à double fond [232].....	75
Figure 23: Schéma d'une cuve horizontale .....	75
Figure 24: Résultat d'une utilisation des deux côtés d'une cuve horizontale.....	75
Figure 25: Préparation de la phase stationnaire/développement possible avec 6 phases mobiles différentes.....	76
Figure 26: Schéma des différents modes de développement chromatographique. A : linéaire ; B : circulaire (centrifuge); C : circulaire (centripète) [232]......	76
Figure 27: Les développements multiples peuvent être réalisés automatiquement à l'aide d'un instrument spécifique. Dans ce cas, la plaque est développée de façon répétée dans la même direction. Chaque élution utilise un solvant de migration de force éluante plus plusieurs migrations successives avec une phase mobile identique [239].....	77
Figure 28: Fonctionnement du développement multiple automatisé (AMD) .....	77
Figure 29: Schémas des développements multidimensionnels .....	78
Figure 30: Schéma de l'utilisation du mode « sandwich ». A : vue de profil ; B : vue de face.....	78
Figure 31: Exemple des Profil HPTLC pris sous lumière blanche, sous UV à 366 et 254 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche à 366 nm après dérivatisation (successivement).....	81
Figure 32: Carte de la Tunisie .....	87
Figure 33: Spécimens Bizerte (a) et Siliana (b) .....	88
Figure 34: Spécimens Zaghouan (c) et Kairouan (d) .....	88
Figure 35: Système Tecator Fibertec M1017 .....	89
Figure 36: Schéma simplifié de l'extraction méthanolique solide liquide selon la méthode M191	
Figure 37: Schéma simplifié du protocole d'extraction P1 pour les 4 populations, Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan.....	91
Figure 38: Schéma simplifié du protocole d'extraction P2 pour la population Zaghouan .....	92
Figure 39: Schéma simplifié du protocole d'extraction P3 pour la population Zaghouan .....	92
Figure 40: Schéma simplifié du protocole d'extraction P4 pour la population Zaghouan .....	93
Figure 41: Extraits de Bizerte obtenus selon M1 .....	93
Figure 42: Extraits des 4 populations Siliana, Bizerte, Zaghouan et Kairouan, obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4. ....	93
Figure 43: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> de l'extrait de Bizerte (25 mg)(a) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), sénégine (Piste 3), et digitonine (Piste 4) et de l'extrait de Bizerte (300 mg). Système d'élution S1. ....	96
Figure 44: Profil HPTLC des 4 extraits de Zaghouan obtenus selon P1 (piste1), P2 (piste 2), P3 (piste 3)et P4 (piste 4 )en triplicata (4, 6 et 10 µL successivement pour une isocentration de 5 g/L), ainsi que les standards, solanine (piste 5), sénégine (piste 6), digitonine (piste 7), glucose-fructose (piste 8) et l'acide oléanolique (piste 9) avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (b) sous lumière blanche. ....	98
Figure 45: Spectromètre de masse trappe d'ions .....	100
Figure 46: Interface CAMAG pour couplage HPTLC-SM.....	100
Figure 47: Courbe d'étalonnage de Soyasapogénol.....	101
Figure 48 : Courbe d'étalonnage du Soyasapogénol en fonction des aires des pics à 500 nm.....	102

Figure 49: Courbe d'étalonnage d'acide gallique .....	104
Figure 50 : Courbe $CI_{50}$ du TROLOX.....	104
Figure 51: Lignée cellulaire PC12 de la médullo-surrénale de rat après 10 jours d'incubation	106
Figure 52: Mise en place du test de neuroprotection.....	107
Figure 53: Détermination des taux d'extractibles à l'éthanol et à l'eau des 4 populations ....	112
Figure 54: Taux de matière minérale .....	113
Figure 55: Article publié dans Molecules (K. Nafti et al., 2022).....	114
Figure 56: Schémas des protocoles d'extraction de P1 à P4. Une délipidation préliminaire a été réalisée avec de l'hexane dans les protocoles P2 et P4.....	118
Figure 57: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ de l'extrait de Bizerte (25 mg) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), sénégénine (Piste 3), et digitonine (Piste 4). Système d'élution S1. ....	123
Figure 58: Profils HPTLC des 4 extraits des 4 populations obtenus selon la méthode d'extraction M1 ainsi que les standards pris avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ sous lumière blanche (b) selon le système d'élution S1. Piste 1 (Bizerte, Piste 2 (Kairouan), Piste 3 (Zaghouan), Piste 4 (Siliana), Piste 5 (Solanine), Piste 6 (senégénine) et Piste 7 (digitonine), Piste 8 (glucose-fructose), Piste 9 (acide oléanolique). ....	124
Figure 59: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation (a) et après révélation à l'ansaldéhyde- $H_2SO_4$ (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 1), P2(piste 2), P3(piste 3), P4 (Piste 4) et selon le M1 (Piste 5), ainsi que des standards, Piste 6 (Solanine) ), Piste 7 (senégénine) et Piste 8 (digitonine), piste 9 (glucose-fructose), piste 10 (acide oléanolique). ....	125
Figure 60: Densitogramme des extraits de Zaghouan (Pistes 1–5) et les standards (Pistes 6–10): solanine (Piste 6), senegenine (Piste 7), digitonine (Piste 8), glucose-fructose (Piste 9), et acide oléanolique (Piste 10) à 600 nm après visualisation avec l'ansaldéhyde.....	125
Figure 61: Densitogrammes de l'acide oléanolique (A), de la sénégénine (B), de la solanine (C), de la digitonine (D) et du glucose-fructose (E) à 600 nm après visualisation avec l'ansaldéhyde- $H_2SO_4$ .....	127
Figure 62: Densitogrammes des extraits de Zaghouan obtenus avec les protocoles d'extraction P1 (1), P2 (2), P3 (3), P4 (4) et M1 (5) à 600 nm après revelation avec l'ansaldéhyde- $H_2SO_4$ .	128
Figure 63: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7),Sénégénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), aux trois étapes du système d'élution multiple SS1, SS2 et SS3 .....	130
Figure 64: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'ansaldéhyde- $H_2SO_4$ (b) des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Sénégénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), selon le système d'élution S2).....	130
Figure 65: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation sous UV (a) et après révélation à l'ansaldéhyde- $H_2SO_4$ successivement (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste	

3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon la méthode M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et soyasaponine (piste 7), selon le système d'élution S2.....	131
Figure 66:(c) Densitogram de soyasaponine at 600 nm au Rf = 0.2 et (d) densitogramme de soyasapogenol au RF 0,95 suivant le système d'élution S2.....	131
Figure 67: Profil HPTLC obtenu avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b), des 4 populations : Zaghouan (piste 1), Siliana (piste 2), Bizerte (piste 3) et Kairouan (piste 4) selon P1 ainsi que les standards, Soyasaponine (piste 5), et Soyasapgenol (piste 6) selon le système d'élution S2. ....	132
Figure 68: Profil HPTLC obtenu après révélation avec l'anisaldéhyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en utilisant le système SS2. Phases chloroforme du standard de sojasaponine hydrolysé (Piste 1) et de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (Pistes 2 et 3) et de l'extrait de Zaghouan-P3 non non hydrolysé (Piste 4).....	133
Figure 69: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> de Soyasapogenol (piste 1-2 µg),(piste 2-1 µg),(piste 3-0.5 µg),(piste 4-0.25 µg),(piste 5-0.125 µg),(piste 6-0.625 µg),phase chloroforme ZA-P3(piste 7-8),ZA-P3 (piste 9), Soyasaponine (piste 10), Glu-fru (piste 11) selon le système d'élution S2 .....	134
Figure 70: Densitogrammes du soyasapogénol obtenus à 6 concentrations différentes après révélation avec l'anisaldéhyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> et développement SS2, qui ont servi à calculer la courbe d'étalonnage .....	134
Figure 71: histogramme de quantité de saponines dans les extraits SI-P1,ZA-P1,BI-P1 et KAI-P1 .....	135
Figure 72: Formule chimique de la saponine soyasaponine et de son aglycone et soyasapogenol. ....	136
Figure 73: Chromatogramme de l'extrait BI-300 mg-M1. ....	137
Figure 74: Spectre SM <sup>2</sup> (ESI) de l'extrait de ZA-P1.....	138
Figure 75: Spectre SM <sup>2</sup> (ESI) de l'extrait de ZA-P2.....	139
Figure 76: Hypothèse de fragmentation de la saponine azukisaponine dans les extraits de Zaghouan obtenus par le protocole P4 (Spectre SM <sup>2</sup> (ESI). ....	139
Figure 77: Principe du couplage HPTLC-SMn. Transfert direct du spot vers le spectromètre de masse ou bien récupération de la silice suivie d'une extraction méthanolique avant injection HPLC-MS.....	140
Figure 78: Spectres de masse en mode ESI + de Soyasaponine (a), Soyasapogenol (b), ZA-P1 (c), ZA-P2 (d) et ZA-P4 (e). ....	141
Figure 79: Zone chromatographique Rf=0,2 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF). ....	143
Figure 80: Zone chromatographique Rf=0,8 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) (spot d'hydrolyse). ....	144
Figure 81: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (zoom à m/z=459). ....	145
Figure 82: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (m/z =50 à m/z=550).....	145

Figure 83: : Standard Soyasaponine ESI MS NEG (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 5 000.....	145
Figure 84: Standard Soyasaponine ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) comparatif facteurs de dilution 5 000 et 1 000.....	146
Figure 85: Quantité des polyphénols totaux dans les extraits d'Astragalus hamosus L. obtenus selon P1, P4 et M1 en mg EAG.g-1 MS .....	147
Figure 86: Première voix étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par inhibition de l'Ache .....	150
Figure 87: Deuxième voix étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par neutralisation du peptide AB.....	151
Figure 88: Activité anti radicalaire des 4 populations obtenus selon P1, exprimée en CI50 en $\mu\text{g}/\text{m}/\text{L}$ .....	152
Figure 89: Activités anti radicalaires des SI-P4, ZA-P4, BI-P4 et KAI-P4 exprimées en CI50 en $\mu\text{g}/\text{m}/\text{L}$ .....	153
Figure 90: Dépistage de l'inhibition de l'AChE par HPTLC-Biautographie des extraits SI-P1 (piste), BI-P1 (piste 2), ZA-P1(piste 3) et KAI-P1(piste 4), ainsi que la soyasapogénol B (piste 5) et la soya saponine B (piste 6).....	154
Figure 91: Diminution de la CI50 de la galanthamine en fonction du temps .....	154
Figure 92: : Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par les 4 extraits, Siliana, Bizerte Kairouan et Zaghouan selon P1 (bleue) et selon P4 (orange) à 168 secondes de la réaction d'Ellman .....	155
Figure 93: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par la Soyasaponine et le Soyasapogénol.....	156
Figure 94: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des différentes fractions Butanol obtenues par le protocole d'extraction P1 pour les 4 populations à différentes concentrations. ....	157
Figure 95: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des deux fractions ZA-P2 (butanol) et ZA-P2-HEX (hexane), obtenues au cours du procédé d'extraction P2, à différentes concentrations. ....	157
Figure 96: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions butanol de KAI-P3, SI-P3, ZA-P3 et BI-P3 .....	158
Figure 97: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence des Fractions obtenus par P4 .....	159
Figure 98: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions obtenus par M1 .....	159
Figure 99: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B .....	160
Figure 100: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B .....	161
Figure 101: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 et du peptide AB 5 $\mu\text{M}$ . ....	161

Figure 102: Histogramme représentatif des % de viabilité de PC12 en présence des extraits P3 et du peptide AB (5 $\mu$ M) .....	162
Figure 103: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits issus du protocole d'extraction P4 et du peptide AB (5 $\mu$ M) .....	162
Figure 104: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus avec le protocole d'extraction M1 et du peptide AB (5 $\mu$ M) .....	163
Figure 105: Histogramme représentatif des % de viabilité de PC12 en présence du Soyasapogénol B et du peptide AB (5 $\mu$ M) .....	164
Figure 106: Le nombre de saponines tritérpeniques testées en tant qu'agents cytotoxiques et le nombre de rapports publiés dans la période couverte 2009/2021[309]. .....	165
Figure 107: Début de confluence des cellules Caco-2 après 15 jours de culture .....	166
Figure 108: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P1 .....	167
Figure 109: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P1 .....	167
Figure 110: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P3 .....	168
Figure 111: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P4 .....	169
Figure 112: Histogramme de représentation des CI50 des cellules CACO-2 par les extraits M1 .....	169
Figure 113: Histogramme représentant les CI50 des cellules CACO-2 par l'aglycone Soyasapogénol B .....	170
Figure 114: Confluence des cellules HEK293 après une semaine de culture .....	170
Figure 115: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules HEK293 par les extraits P1 .....	171
Figure 116: Histogramme représentant la CI50 des cellules HEK293 par la fraction ZA-P2 et les % d'inhibition de la fraction ZA-P2/HEX .....	171
Figure 117: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P3 .....	172
Figure 118: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P4 .....	173
Figure 119: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions M1 .....	173
Figure 120: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par le Soyasapogénol B .....	174





## Listes des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Agents anti-tau pour le traitement de la MA dans les essais cliniques (mémoire DrABADA,2022) .....	27
<b>Tableau 2 :</b> Agents anti-amyloïdes pour le traitement de la MA dans les essais cliniques....	39
<b>Tableau 3:</b> Classification d'Astragalus hamosus .....	52
<b>Tableau 4:</b> métabolites d'Astragalus hamosus.....	54
<b>Tableau 5:</b> Tableau récapitulatif des effets des soyaaponines sur le cancer.....	58
<b>Tableau 6:</b> Activités biologiques des soyaaponines .....	58
<b>Tableau 7:</b> Techniques analytiques utilisées dans le criblage des saponines.....	62
<b>Tableau 8:</b> Choix de technique d'extraction selon l'objectifs scientifique .....	68
<b>Tableau 9 :</b> Techniques d'extraction des saponines chez les Astragales .....	69
<b>Tableau 10:</b> Exemples de techniques d'analyses utilisées et d'activités biologiques étudiées chez le genre Astragalus .....	70
<b>Tableau 11:</b> Exemple de révélateurs utilisés en HPTLC, leurs composés cibles et leurs colorations obtenues.....	80
<b>Tableau 12:</b> Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de l'utilisation de l'HPTLC82	
<b>Tableau 13:</b> Les extraits obtenus selon la méthode d'extraction M1 et leurs utilisations dans les analyses ultérieures .....	91
<b>Tableau 14:</b> Fractions obtenues aux différentes phases d'extraction des protocoles P1, P2, P3 et P4.....	94
<b>Tableau 15:</b> Résultats du rendement d'extraction par rapport à la matière sèche pour les protocoles M1, P1, P2, P3 et P4.....	122
<b>Tableau 16:</b> Composés détectés dans BI-300mg-M1.....	137
<b>Tableau 17:</b> Analyse des extraits d'Astragalus hamosus L. de la population de Zaghouan par spectrométrie de masse MS <sup>n</sup> en mode ESI négatif.....	137
<b>Tableau 18:</b> Tableau récapitulatif des % d'inhibition des extraits d'Astragalus hamosus L. sur les lignée CACO-2 et HEK293.....	177
<b>Tableau 19:</b> Tableau récapitulatif des % de vaiabilité et de neuroprotection des PC12 .....	178

## Chapitre 1 : Étude Bibliographique

## Introduction

Cette thèse en cotutelle porte sur deux thématiques différentes mais complémentaires, à savoir l'étude des saponines en se basant sur différentes méthodologies de chimie analytique et l'évaluation de l'inhibition des maladies neurodégénératives par ces molécules au moyen d'outils biologiques, d'où la nécessité d'une collaboration entre deux laboratoires impliqués de spécialités différentes.

Ce sujet a donc été mis en place pour aborder ces deux enjeux majeurs :

- 1- Quelles sont les saponines sécrétées par l'espèce *Astragalus hamosus* L. provenant des régions Tunisiennes?
- 2- Ces saponines peuvent-elles inhiber les maladies neurodégénératives, et particulièrement la maladie d'Alzheimer ?

Dans la bibliographie, tous les points relatifs à ces deux enjeux sont évoqués en détail.

Nous commencerons par un bilan général des maladies neurodégénératives, quelques statistiques récentes, puis nous passerons à la démence la plus fréquemment rapportée, à savoir la maladie d'Alzheimer. Nous mentionnerons son histoire, ses facteurs, son impact ainsi que sa physiologie. Le deuxième point à aborder dans la synthèse bibliographique est la plante *Astragalus hamosus*, pour laquelle nous mettons en valeur son aspect botanique par sa description végétale et moléculaire et par la description de ses métabolites. Ensuite, nous soulignerons les molécules d'intérêt, les saponines, et irons directement à l'objectif principal qui est la relation entre ces molécules et le traitement des maladies neurodégénératives.

Nous aborderons également le thème de l'extraction des saponines et évoquerons les différentes techniques utilisées dans la littérature. Nous finirons par une description de l'HPTLC, la technique de base de ce projet.

L'avancement des travaux de thèse nous a permis de travailler sur un autre volet qui n'était pas prévu au début de la thèse, celui d'étudier l'activité cytotoxique des extraits d'*Astragalus hamosus*. L'idée a été discutée après avoir revu les activités biologiques des Sayasaponines B et son aglycone Soyasapogénol B dans la littérature alors nous mettons en valeur dans cette partie de synthèse bibliographique leurs activités anticancéreuses et d'autres effets biologiques.

## **1 Les maladies neurodégénératives**

Les maladies neurodégénératives sont des troubles héréditaires sporadiques et rares du système nerveux central dans lesquels il y a une perte de fonction de populations de neurones spécifiques et de leurs connexions. Les maladies neurodégénératives comprennent : la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et la maladie de Huntington.

Toutes les maladies partagent une évolution progressive avec des changements cliniques et biochimiques caractéristiques. Les caractéristiques des maladies neurodégénératives sont : l'âge d'apparition généralement entre 50 et 70 ans et l'évolution lente et progressive, des handicaps graves et le besoin de soins de longue durée à des degrés divers peuvent en résulter [1]. La mort est principalement causée par des complications secondaires telles que la pneumonie, les infections des voies urinaires principalement, l'embolie de l'artère pulmonaire et les événements cardiovasculaires ou l'insuffisance des fonctions cérébrales [2].

Les données épidémiologiques ont permis aux chercheurs de prédire d'ici 2030 une augmentation d'environ 50 % chez les personnes âgées de 60 à 80 ans et d'environ 200 % chez les plus de 80 ans, ce qui représente un tiers de la population pour les plus de 65 ans et un quart pour les plus de 80 ans [3,4].

## **2 La maladie d'Alzheimer**

### **2.1 Historique**

Dans l'Antiquité, les symptômes de la maladie étaient observés pendant des siècles comme une altération de la raison avec l'âge. Ce n'est qu'en 1906, qu'un neuropathologiste allemand nommé Alois Alzheimer identifie et décrit avec précision les effets provoqués par la maladie. En effet, il suit durant plusieurs années une patiente, Auguste Deter, atteinte de démence (troubles de la mémoire, désorientation, hallucinations...). Le traitement prescrit par le docteur Alzheimer est assez sommaire à savoir "des bains chauds plusieurs fois par jour, des exercices en plein air, de la gymnastique ou encore des massages". Suite à la mort d'Auguste Deter en 1906 à l'âge de 51 ans, le neurologue allemand découvre lors de l'autopsie de son cerveau deux anomalies particulières: une dégénérescence des neurones (la dégénérescence neurofibrillaire) et un dépôt anormal d'une protéine à l'extérieur des neurones (les plaques séniles). Ces observations sont présentées le 4 novembre 1906, lors de la 37<sup>ème</sup> Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, en Allemagne, où Alois Alzheimer décrit pour la première fois la « maladie particulière du cortex cérébral ».

Son étude publiée en 1907 marquera l'identification de la maladie, baptisée trois ans plus tard "maladie d'Alzheimer". Cette pathologie sera cantonnée pendant des dizaines d'années à une série de cas très limitée. La dégénérescence observée par Alois Alzheimer est décrite comme une démence rare affectant des personnes plutôt jeunes. Pour les sujets plus âgés, on préfère parler de démence sénile, une pathologie de type vasculaire. Elle est considérée comme une conséquence naturelle du vieillissement.

Les scientifiques se rendent compte finalement dans les années 1980 que cette distinction entre démences présénile et sénile n'a pas de sens. Les progrès de la médecine permettent d'identifier

une seule et même pathologie : "la maladie d'Alzheimer". Et même si on l'observe plus souvent chez les personnes âgées, elle n'est plus tenue comme la conséquence logique du vieillissement des individus. Elle n'a rien à voir avec de simples troubles de la mémoire qui apparaissent parfois avec l'âge.

À partir de ce moment-là les chercheurs mettent en évidence avec beaucoup plus de précisions les différents mécanismes de la maladie. La protéine à l'origine des plaques séniles est identifiée en 1984 par l'Américain George Glenner.

En 1985, le Belge Jean-Pierre Brion découvre une autre protéine, celle qui provoque la dégénérescence des neurones. Enfin, dans les années 1990, le lien entre maladie d'Alzheimer et les facteurs génétiques est établi [5].

## 2.2 Physiopathologie

D'un point de vue histologique, au niveau macroscopique, la MA se caractérise par une atrophie générale de l'encéphale, des sillons creusés, une dilation ventriculaire et par des gyrus resserrés (Figure 1)

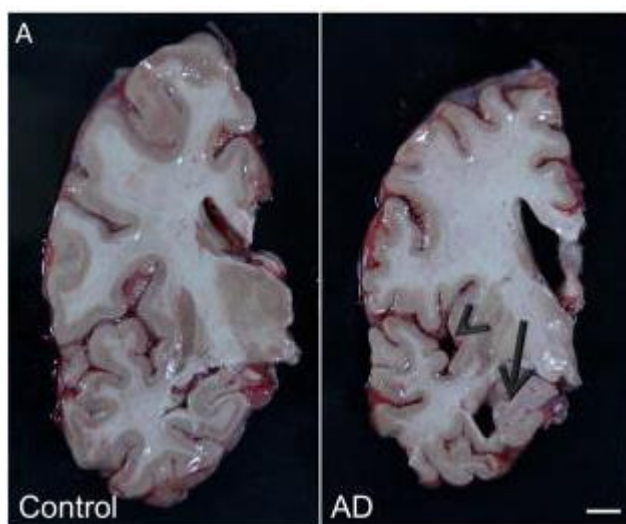


Figure 1: Observation des lésions anatomopathologiques caractéristiques de la MA [6].

Le cerveau de patients atteints de la MA (AD) présente une atrophie générale avec en particulier un amincissement de l'ensemble du cortex (pointe de flèche) et une atrophie prononcée de l'hippocampe (flèche). (« Control » = patient sain).

Au niveau tissulaire, deux lésions histopathologiques caractéristiques de la MA sont : les enchevêtrements neurofibrillaires appelés également dégénérescences neurofibrillaires (DNF), formés par une agrégation intraneuronale d'une protéine hyperphosphorylée associée aux microtubules appelée Tau, et les plaques séniles composées d'agrégats des peptides A $\beta$  selon une conformation en feuillets  $\beta$  antiparallèles insolubles (appelés fibrilles) (Figure 2).

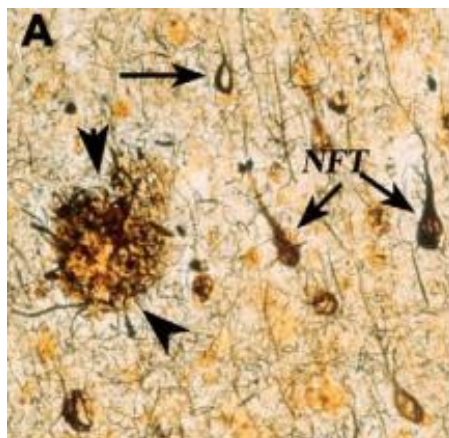


Figure 2: Mise en évidence des deux marqueurs

On observe la présence des enchevêtrements neurofibrillaires (flèches=NFT) et des plaques séniles (pointe de flèches) dans le cerveau de patients atteints de la MA. D'après Nixon, 2007 [7].

### 2.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) résulte des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) représentant une caractéristique histopathologique importante dans les cerveaux atteints (AD) [8]. Les NFT comprennent des filaments hélicoïdaux appariés, assemblés par une protéine associée aux microtubules connue sous le nom de Tau. La protéine Tau assemble la tubuline en microtubules et stabilise les microtubules [9]. La protéine Tau appartient à la famille des MAP (Protéines associées aux Microtubules). Elle est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules dans les neurones [9]; En tant que composants majeurs du cytosquelette du neurone, les microtubules jouent un rôle fondamental dans le développement et la fonction neuronale [10]. Elle se compose de 352 à 441 acides aminés et possède plus de 80 sites potentiels de phosphorylation au travers de ses résidus sérine, thréonine et tyrosine. Leur fonction est en partie régulée par leur état de phosphorylation. Dans la MA, l'accumulation de la protéine Tau anormalement phosphorylée est responsable d'une interruption du flux ou du transport axonal. Les DNF touchent séquentiellement les différentes régions cérébrales selon un ordre précis et invariable, affectant en premier lieu la région hippocampique (région impliquée dans les phénomènes de mise en mémoire et de stockage à long terme). La survenue des symptômes est corrélée à leur densité et à leur extension [11].

À l'état pathologique, une hyper phosphorylation de la protéine est observée entraînant sa dissociation des microtubules [12]. Cela a pour conséquence de compromettre la stabilisation et le fonctionnement de ces derniers. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau conduit également à un changement conformationnel de la protéine, favorisant son agrégation sous forme de paires de filaments hélicoïdaux (PHFs) (Figure 3). L'accumulation de ces PHFs entraîne une perturbation de la stabilité des neurones, ce qui mène à l'altération du système de transport des neurones et donc à la mort des cellules neuronales [13]. En effet, dans certaines conditions pathologiques, la toxicité  $A\beta$ , la neuroinflammation et d'autres conditions de stress conduisent à une phosphorylation anormale de la protéine Tau en particulier, le déséquilibre des activités des enzymes Tau kinase et phosphatase [14]. La protéine Tau hyperphosphorylée est sujet à la dissociation des microtubules et à l'agrégation pour former des NFT [15].

L'existence de NFT et la dissociation des microtubules entraînent alors une altération du transport axonal, un dysfonctionnement mitochondrial et cytosquelettique, une neuroinflammation, un stress oxydatif et une perte de synapses [16]. Messing et al. (2013) ont rapporté que dans la cascade de toxicité Tau, la perte de la colonne vertébrale dendritique a été observée avant l'agrégation et la mort cellulaire à un stade précoce, et l'agrégation de Tau et la mort cellulaire au stade ultérieur se sont avérées accompagnées d'une activation de la caspase 3. Ces auteurs ont également prouvé qu'un inhibiteur de l'agrégation Tau pouvait empêcher la phosphorylation, l'agrégation et la perte de la colonne vertébrale dendritique dans la pathologie Tau. Le domaine de répétition situé dans des filaments hélicoïdaux appariés a montré une affinité de liaison élevée pour la protéine Tau



tronquée et était responsable de la liaison Tau-Tau. Ceux-ci ont conduit à l'étude d'inhibiteurs ciblant ce domaine de répétition pour arrêter l'agrégation de Tau.

Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer. En effet, elles peuvent être observées dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Pick, la démence fronto-temporale avec Parkinsonisme liée au chromosome 17 ou encore le syndrome de Down. Ces maladies sont regroupées sous le terme de « tauopathies » [17].

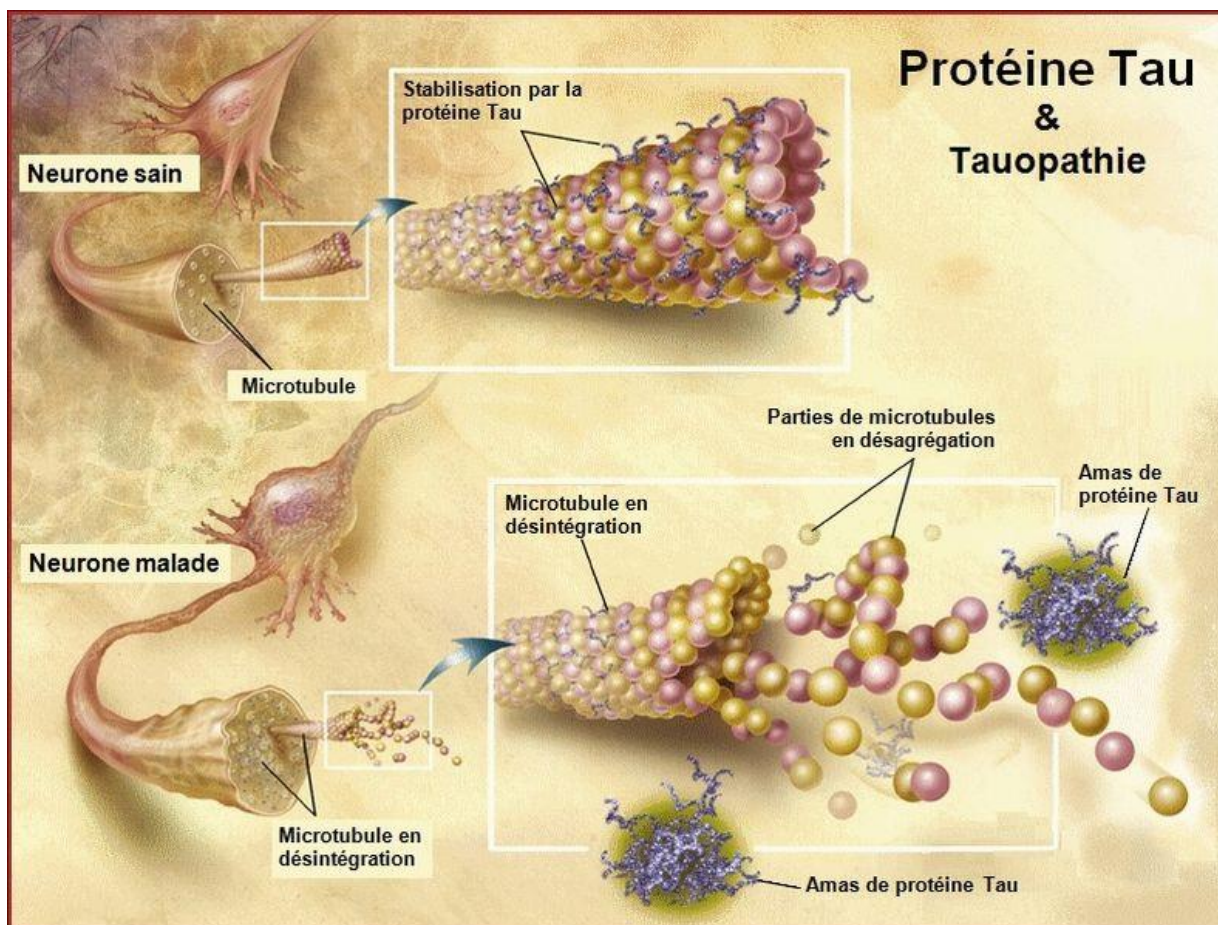


Figure 3: Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

Dans les essais cliniques de développement de médicaments contre la MA, des stratégies ciblant la stabilité des microtubules, l'agrégation des protéines Tau, la production et la clairance de Tau ont été adoptées pour traiter la toxicité de Tau. Le tableau ci-dessous résume les agents pour moduler la tauopathie dans les essais cliniques sur la MA. Parmi ces agents, les thérapies ciblant la clairance de la protéine Tau occupaient la plupart des sièges. Cependant, aucune de ces immunothérapies pour la clairance de la protéine Tau n'est encore entrée dans l'étude de la phase 3. L'inhibiteur de l'agrégation Tau, TRx0237 (LMXT), est le seul agent anti-Tau actuellement en étude de phase 3 pour le traitement de la MA [18].

Tableau 1: Agents anti-tau pour le traitement de la MA dans les essais cliniques (mémoire DrABADA,2022)

Anticorps monoclonal	Description	Essai clinique
<b>Semorinemab (Ro705705)</b>	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine Tau extracellulaire	En janvier 2021 un essai clinique de phase II a conclu à l'absence d'amélioration des symptômes de patients Alzheimer et s'est soldé par un échec. Un nouvel essai clinique est actuellement cours.
<b>BIIB076</b>	Anticorps monoclonal de type IgG1 ciblant le domaine central de Tau	Un essai clinique de phase I a été complété en Mars 2020 pour évaluer sa pharmacocinétique.
<b>Gosuranemab</b>	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la partie N-terminale extracellulaire de Tau dans le liquide interstitiel et le liquide céphalorachidien.	Un essai clinique de phase II a conclu que la neutralisation de la partie N terminale de Tau ne se traduisait pas par une amélioration clinique, ce qui freina la poursuite d'autres essais cliniques.
<b>Tilvonemab (ABBV-8E12)</b>	Anticorps monoclonal ciblant la protéine Tau extracellulaire sous forme agrégée.	Un essai de phase II visant à évaluer son efficacité s'est soldé par un échec.
<b>Bepranemab</b>	Anticorps monoclonal humanisé ciblant la région centrale de Tau.	Un essai de phase II est actuellement en cours pour évaluer son efficacité et son innocuité.
<b>Zagotenemab (LY3303560)</b>	Anticorps monoclonal dirigé contre une conformation pathologique de Tau.	Un essai clinique de phase II sur des patients Alzheimer symptomatiques a échoué aboutissant à l'interruption de son développement.
<b>JNJ-63733657</b>	Anticorps monoclonal humanisé ciblant la région de liaison aux microtubules de Tau	Un essai clinique de phase II est actuellement en cours pour évaluer son efficacité sur le déclin cognitif.
<b>E2814</b>	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'épitope HVPGG de Tau	Essai clinique de Phase II en cours.
<b>LuAF87908</b>	Anticorps monoclonal humanisé ciblant les régions pSer 396 et p Ser 404 de Tau	Un essai clinique de phase I est actuellement en cours.
<b>PNT001</b>	Anticorps monoclonal dirigé contre le Cis-isomère de la protéine Tau phosphorylée au niveau de la thréonine 231.	Un essai clinique de phase I a été complété dont les résultats ne sont pas encore publiés.
<b>RG7345</b>	Anticorps monoclonal dirigé contre le fragment pSer422 de Tau.	L'essai clinique sur des volontaires sains a été arrêté à cause du développement d'une réponse inflammatoire.



<b>ScFv-h3D6</b>	N-Terminale Obtenu à partir d'un anticorps monoclonal (Bapineuzumab).	Il a pu inhiber la cytotoxicité du peptide A $\beta$ et prévenir la formation de fibrilles dans un modèle cellulaire. Des études <i>In Vivo</i> indiquent également des résultats positifs sur les fonctions cognitives et une réduction des taux d'A $\beta$ sans induction de réaction inflammatoire
<b>ScFv-IC16</b>	N-Terminale	Dirigé contre les différentes formes agrégées d'A $\beta$ . Il pourrait être utilisé comme outil moléculaire pour le diagnostic et le traitement de la MA
<b>A8 scFv</b>	N-Terminale	Il prévient l'agrégation d'A $\beta$ <i>in Vitro</i>
<b>HT7</b>	N-Terminale Obtenu d'une librairie d'anticorps humains.	Il cible les oligomères, les protofibrilles et les fibrilles d'A $\beta$ 42 Il permet de désagréger l'A $\beta$ 42 <i>In vitro</i> et d'inhiber sa toxicité dans un modèle cellulaire
<b>B4.4</b>	Centrale	Inhibe la toxicité des oligomères et fibrilles d'A $\beta$ 42 dans un modèle cellulaire
<b>H1v2</b>	Centrale	Inhibe l'agrégation d'A $\beta$ et prévient ses effets toxiques dans un modèle cellulaire
<b>1 E8</b>	Centrale	Diminue la formation de fibrilles d'A $\beta$ dans un modèle cellulaire
<b>ScFv 4.8 et ScFv 3.20</b>	Centrale	Préviennent la toxicité des oligomères d'A $\beta$ 42 dans des cultures cellulaires. Ils identifient et diminuent les dépôts d'A $\beta$ dans un modèle murin.
<b>B6 et D4</b>	Centrale	Restreint l'agrégation d'A $\beta$ 42 et diminue sa toxicité dans un modèle cellulaire.
<b>ScFv 42.2</b>	C-Terminale	Protège contre le déficit de mémoire et la perte neuronale dans un modèle de <i>drosophila</i> Il a une action synergique avec le ScFv 9.
<b>ScFv 17</b>	C-Terminale	Diminue les oligomères d'A $\beta$ dans un modèle murin
<b>W8, W9, W20, WC2</b>	Oligomères	Préviennent la formation de fibrilles d'A $\beta$ dans un modèle cellulaire

<b>A4 ScFv</b>	Oligomères	Restreint l'agrégation d'A $\beta$ et diminue sa toxicité dans un modèle cellulaire et tissulaire de cerveau humains.
<b>C6ScFv, etNuSc1</b>	Oligomères	Ciblent les oligomères d'A $\beta$ dans des tissus de cerveaux humains.
<b>ScFv MO6</b>	Oligomères	Se lie spécifiquement à l'A $\beta$ 42. Il diminue les taux d'oligomères d'A $\beta$ 42 en prévenant leur formation et en favorisant leur désagrégation dans un modèle cellulaire.
<b>ScFv AS</b>	Oligomères/protofibrilles	Il diminue les taux d'oligomères d'A $\beta$ en prévenant leur formation et en favorisant leur désagrégation dans un modèle cellulaire.
<b>ScFv HT6</b>	Oligomères	Se lie à l'A $\beta$ 42. Il permet sa désagrégation et l'inhibition de sa progression et donc la diminution de sa cytotoxicité.

### 2.2.2 Les plaques séniles

Les plaques séniles sont constituées principalement de peptides A $\beta$  assemblés en fibrilles et agrégés dans le milieu extracellulaire. C'est en 1983 que ce peptide a été isolé pour la première fois à partir du cortex préfrontal provenant de cerveaux de patients atteints de la MA [19]. Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer. En effet, des plaques amyloïdes peuvent être également observées pour la maladie à corps de Lewy, la maladie de Huntington ou encore les maladies à Prion. Cependant, les protéines impliquées dans la formation des fibres amyloïdes sont différentes dans les deux derniers cas [20]. Les principaux facteurs responsables de la formation d'A $\beta$  sont la mutation des gènes APP ou PS1 et PS2 ou du gène ApoE. Toutes les mutations associées aux protéines APP et PS peuvent conduire à une augmentation de la production de peptides A $\beta$ , en particulier la forme plus amyloïdogène, A $\beta$ 42 [21].

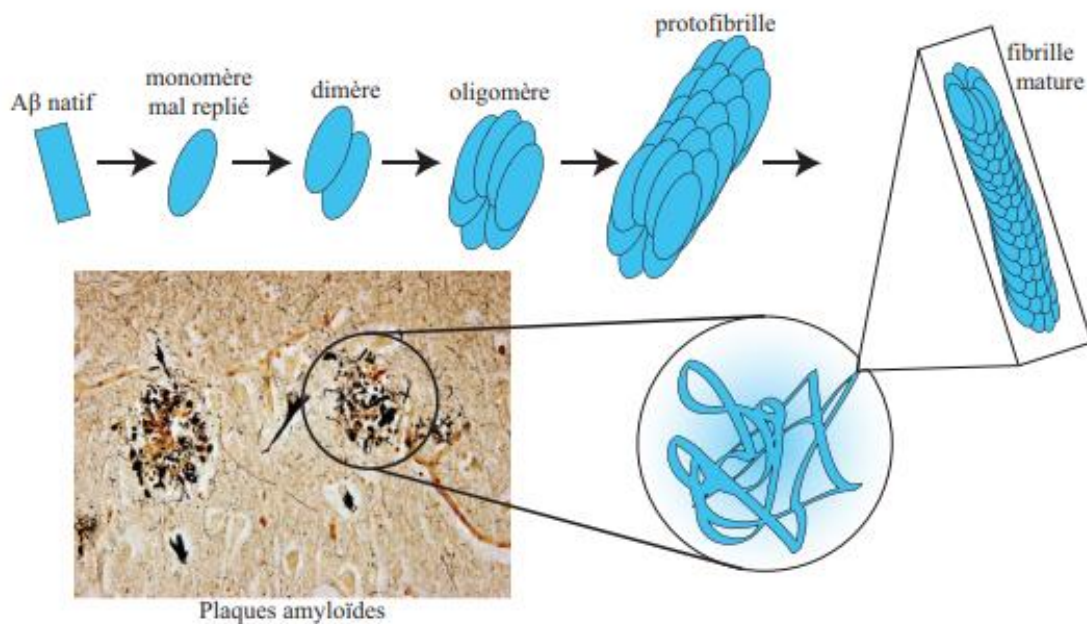


Figure 4: Illustration de l'agrégation d'amyloïde A $\beta$ . Protéines natives incorrectement repliées mènent à la formation de protofibrilles puis finalement à des fibrilles matures qui se retrouvent dans les plaques amyloïdes; Image produite par Sara Licea, , Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de (Perl, 2010); « A $\beta$  » : bêta amyloïde.

## 2.3 Les facteurs impliqués

La maladie d'Alzheimer est une affection dégénérative du cerveau qui associe des troubles de la mémoire, des troubles cognitifs et ou des troubles comportementaux. Cette démence dont l'étiologie n'est pas encore connue est associée à des lésions histologiques qui la définissent : il s'agit des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques séniles. La maladie d'Alzheimer est une affection polyfactorielle qui résulte de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs environnementaux.

### 2.3.1 Facteurs environnementaux

La maladie d'Alzheimer est une **pathologie multifactorielle** dont l'apparition provient de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs de risque. En effet, la présence de ces derniers augmente statistiquement le risque de développer la maladie sans en être principalement la cause.

L'**âge** représente le principal facteur de risque avéré avec une prévalence qui double tous les 5 ans à partir de 65 ans (2% après 65 ans, 15% après 80 ans) [22]. Les femmes sont 1,5 fois plus touchées par cette maladie cognitive que les hommes.

L'**hypertension artérielle** et l'**athérosclérose** peuvent favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la pression artérielle systolique en milieu de vie est associée à un plus faible poids cérébral et à davantage de plaques séniles dans le néocortex et l'hippocampe et une augmentation de la pression artérielle diastolique est associée à un plus grand nombre de dégénérescence neurofibrillaire dans l'hippocampe. De plus, Il a été également signalé que le traitement de l'hypertension artérielle pourrait entraîner une réduction importante de l'incidence de la maladie.

Par ailleurs, des travaux récents évoquent l'association entre le **diabète** et la maladie d'Alzheimer impliquant différents mécanismes. **La nutrition** semble être également un facteur de risque de cette maladie. En effet, de nombreuses études suggèrent que le **stress oxydatif** et l'**accumulation de radicaux libres** sont impliqués dans la physiopathologie de la maladie. Un excès de radicaux libres peut indirectement être responsable d'une accélération de la dégénérescence neuronale [23]. Comme pour l'hypertension artérielle, les niveaux élevés de cholestérol en milieu de vie seraient le plus probablement associés à une augmentation du risque de maladie d'Alzheimer.

**La dépression** est également reconnue comme un facteur de risque mais l'interprétation de ce lien retrouvé pose le problème. En effet, il a été démontré que la démence et la dépression présentent des facteurs de risque communs et que la dépression peut être un syndrome prodromique de la démence et qu'elle est souvent réactionnelle à des troubles cognitifs précoces.

Un certain nombre de recherches ont étudié la relation entre le **traitement hormonal** substitutif et la maladie d'Alzheimer: le risque de la maladie d'Alzheimer est plus faible chez les consommatrices d'estrogènes que chez les non consommatrices.

### 2.3.2 Facteurs génétiques

L'implication des gènes dans la maladie d'Alzheimer est double: d'une part, il existe des formes monogéniques exceptionnelles, caractérisées par un début précoce (< 60 ans) et des formes sporadiques de la maladie, dont le seul facteur de risque impliqué est l'allèle E4 de l'apolipoprotéine [11].

Quatre gènes sont aujourd'hui impliqués dans le développement de la MA.

- Trois d'entre eux semblent favoriser des formes monogéniques (formes autosomiques dominantes) caractérisées par un développement précoce de la maladie chez des sujets de moins de 60 ans. Il s'agit des gènes suivants:
  - Gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) lié au chromosome 21 ;
  - Gène de la préséniline 1 (PS1) lié au chromosome 14
  - Gène de la préséniline 2 (PS2) lié au chromosome 1.

Le gène APP est classiquement associé aux formes précoces de MA avec sept mutations de pénétrance complète rapportées chez une vingtaine de familles.

Les gènes des présénilines sont associés à environ la moitié des formes précoces de MA avec actuellement 54 mutations décrites pour PS1 et seulement trois pour PS2. Environ 70 % des mutations des gènes présénilines semblent génétiquement spécifiques à un individu ou une famille,

ce qui rend irréaliste tout dépistage systématique des formes précoces de MA [11]. En France, on estime à environ 1000 le nombre de cas de MA précoce à transmission dominante autosomique.

- Le quatrième gène, lié au chromosome 19, détermine les trois isoformes E2, E3, E4 de l'apolipoprotéine E (apoE), protéine impliquée dans le métabolisme lipidique, dont l'allèle E4 est associé aux formes tardives de MA. En effet, l'allèle E4 est présent chez 45 à 60 % des individus atteints de la MA contre 20 à 30 % dans la population générale, et la forme homozygote dans 12 à 15 % contre 2 à 3 %, respectivement [24]. Le risque de la MA est plus élevé pour les homozygotes E4E4 et varie pour certains en fonction de l'âge : plus élevé entre 60 et 69 ans qu'avant 60 ans ou après 80 ans. L'apoE4 n'étant ni nécessaire, ni suffisant pour développer la MA, il n'est pas recommandé de l'utiliser à des fins de dépistage diagnostique<sup>9</sup>, bien que le génotypage augmente la sensibilité et la spécificité du diagnostic de la MA chez les patients.

Contrairement aux précédents, le gène de l'apoE4 est considéré comme un facteur de risque majeur de la maladie chez les Caucasiens, indépendamment du sexe, rendant compte d'une agrégation familiale importante. L'allèle E4 pourrait influencer la sévérité des troubles mnésiques, du déficit cholinergique, de l'atrophie hippocampique, ainsi que la rapidité du déclin cognitif [25]. Il pourrait aussi jouer un rôle dans la modulation de l'âge de survenue des formes génétiquement déterminées. L'allèle E2 semble jouer un rôle protecteur quelque soient les groupes ethniques, mais les populations afro-américaines et hispaniques auraient un risque accru de la MA, indépendamment du génotype de l'apoE. Dans la trisomie 21, le sexe mâle et la présence d'un allèle apoE4 favoriseraient un début précoce de la maladie [26]. Par ailleurs, un autre gène de susceptibilité lié au chromosome 12 a été rapporté.

Cette hétérogénéité génétique indique que la MA peut découler d'anomalies génétiques différentes selon les cas, qu'elle peut paraître génétiquement simple ou complexe, qu'elle peut comporter des gènes déterminants et d'autres de susceptibilité ou de protection. On ne peut donc exclure que la MA soit liée à plusieurs gènes, ou que l'expression de ce ou ces gènes et leur pénétrance soient variable [27].

## **2.4 Impact sociaux économique**

À partir des données économiques disponibles répertoriées dans la littérature internationale, le coût total de la maladie d'Alzheimer ou d'une maladie apparente en Europe (UE 27) est estimé à 160,3 milliards d'euros en 2008 (1,3% du produit intérieur brut 2008 de l'UE 27), dont 71,7 milliards en coûts directs (45%) et 88,6 milliards (55%) en coûts indirects. Les coûts annuels par personne atteinte de la maladie d'Alzheimer sont estimés à 22 194 €, dont 9 925 € en coûts directs et 12 270 € en coûts indirects. Pour la zone UE 27, le poids de la maladie est estimé à 2,12 millions d'années de vie ajustées à l'incapacité (441 années de vie ajustées à l'incapacité pour 100 000 personnes). Ce poids est supérieur à celui du diabète [28].

## **2.5 Cascade amyloïde**

On s'accorde généralement sur le fait que la cascade amyloïde est le facteur étiologique central de la maladie d'Alzheimer [29]. Cela a mené à l'élaboration de l'hypothèse dite «de la cascade amyloïde», selon laquelle les agrégats d'A $\beta$ 42 sont à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant à la mort neuronale et à la démence (Figure 5) [30]. Dans des conditions non

pathologiques, le peptide A $\beta$  est dégradé par des enzymes protéolytiques ou évacuée par des mécanismes de transport. Il s'agit d'un déséquilibre entre les mécanismes de production et les mécanismes de dégradation/évacuation de l'A $\beta$  qui serait à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant à la dégénérescence des neurones et à la démence.

La protéine amyloïde bêta s'accumule dans le milieu extracellulaire puis s'agrège avec différentes substances (l'apolipoprotéine E, l'anti-chymotrypsine, l'acétylcholinestérase, la laminine, la fibronectine, ubiquitine, des protéoglycans, l'aluminium, le fer, la protéine Tau ...). L'effet neurotoxique de ces dépôts amyloïdes est complexe, à la fois de manière directe et indirecte. Via la formation de canaux ioniques au niveau des membranes, le peptide A $\beta$  provoque l'altération de l'homéostasie ionique qui se traduit par une entrée excessive de calcium dans les neurones (altération de la membrane cellulaire et stimulation des aminoacides excitateurs comme le glutamate) [31], une hyper phosphorylation de la protéine Tau, un dysfonctionnement neuronal, une perte de synapses, une diminution du nombre de dendrites, une diminution des neurotransmetteurs et la mort cellulaire. Par ailleurs, via des récepteurs couplés à la protéine G, les plaques produisent des effets chimioattractants et activateurs sur les monocytes et les astrocytes qui libèrent des cytokines et initient une cascade inflammatoire. L'A $\beta$  augmente aussi la libération de radicaux libres accroissant le stress oxydatif et favorise des processus métaboliques menant à l'apoptose.

## 2.5.1 Le peptide AB

### 2.5.1.1 Origine du peptide AB

Le peptide A $\beta$ , représentant la sous-unité majeure composée de plaques amyloïdes, est le produit de clivage de l'APP, dont le gène codant est situé sur le chromosome humain 21 [32]. Les caractéristiques anatomiques de type AD, à savoir les plaques séniles et les NFT, ont été formées et distribuées chez les personnes atteintes du syndrome de Down, même à un jeune âge, indiquant l'importance de l'APP dans la pathologie de la MA [33].

Le peptide  $\beta$ -amyloïde résulte de la coupure séquentielle de la  $\beta$ APP par la (ou les)  $\beta$ - puis  $\gamma$ -sécrétase(s) qui libèrent respectivement les extrémités N- et C-terminales du peptide A $\beta$ . Ces enzymes ont été découvertes en 1999 comme les enzymes responsables de la coupure de l'APP en peptide amyloïde b (ou Ab) et elles agissent sur la partie transmembranaire de l'APP [34].

On constatait que dans un cerveau non-malade, l'APP est coupée presque exclusivement par la sécrétase  $\alpha$ , qui donne ainsi naissance à un peptide Ab qui est soluble et qui donc ne donnera pas de plaques amyloïdes.

Par contre, chez les malades, on constate que la sécrétase  $\alpha$  n'est plus la seule à agir (soit parce qu'elle est débordée car il y a augmentation de la synthèse d'APP ou bien diminution de sa synthèse) et qu'interviennent également les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$ , qui donnent naissance au polypeptide de 39 à 43 acides aminés appelé amyloïde b, qui est insoluble de par ses feuillets  $\beta$  et qui va s'agglomérer pour former les plaques séniles [35].

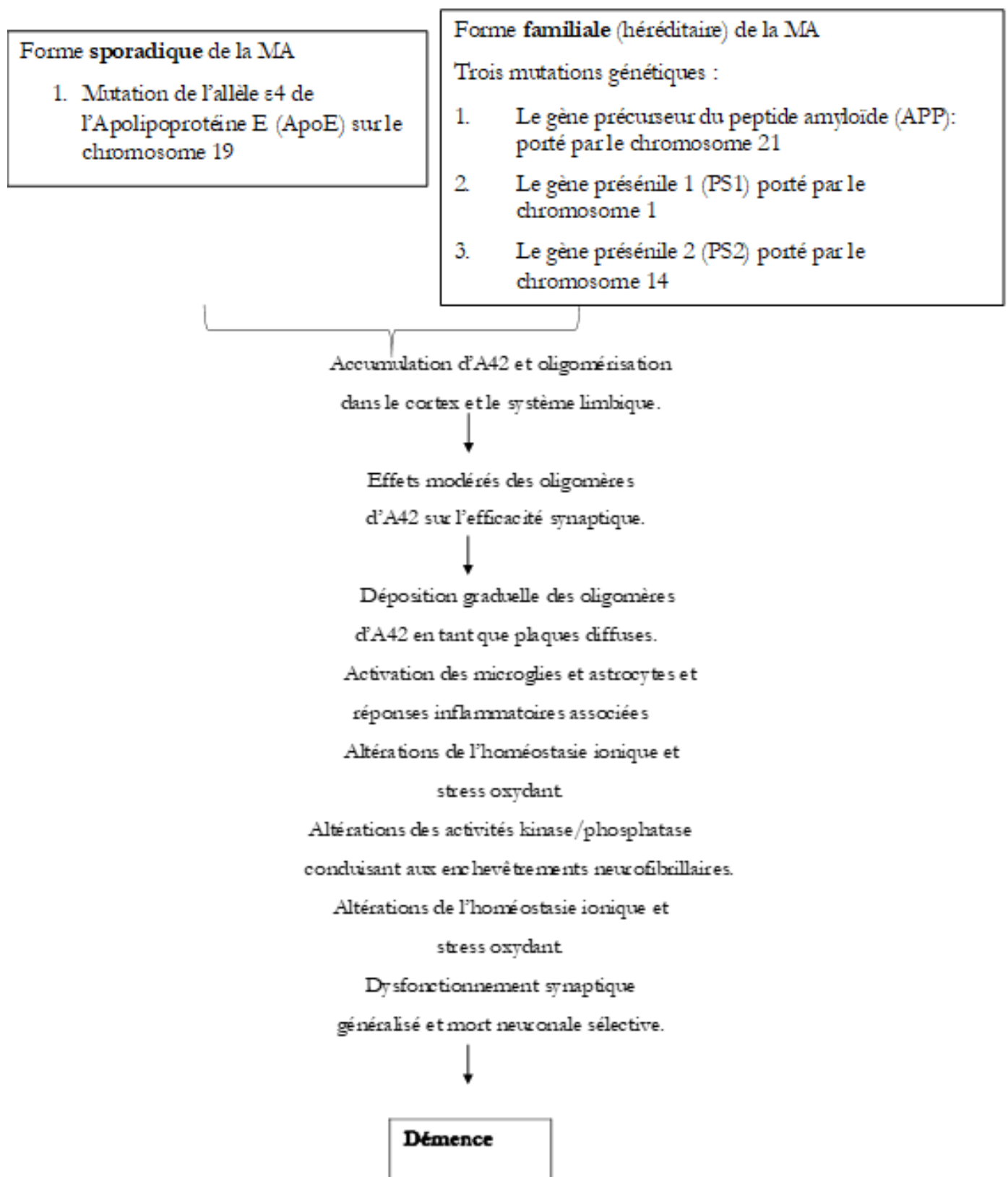


Figure 5: Hypothèse de la cascade amyloïde



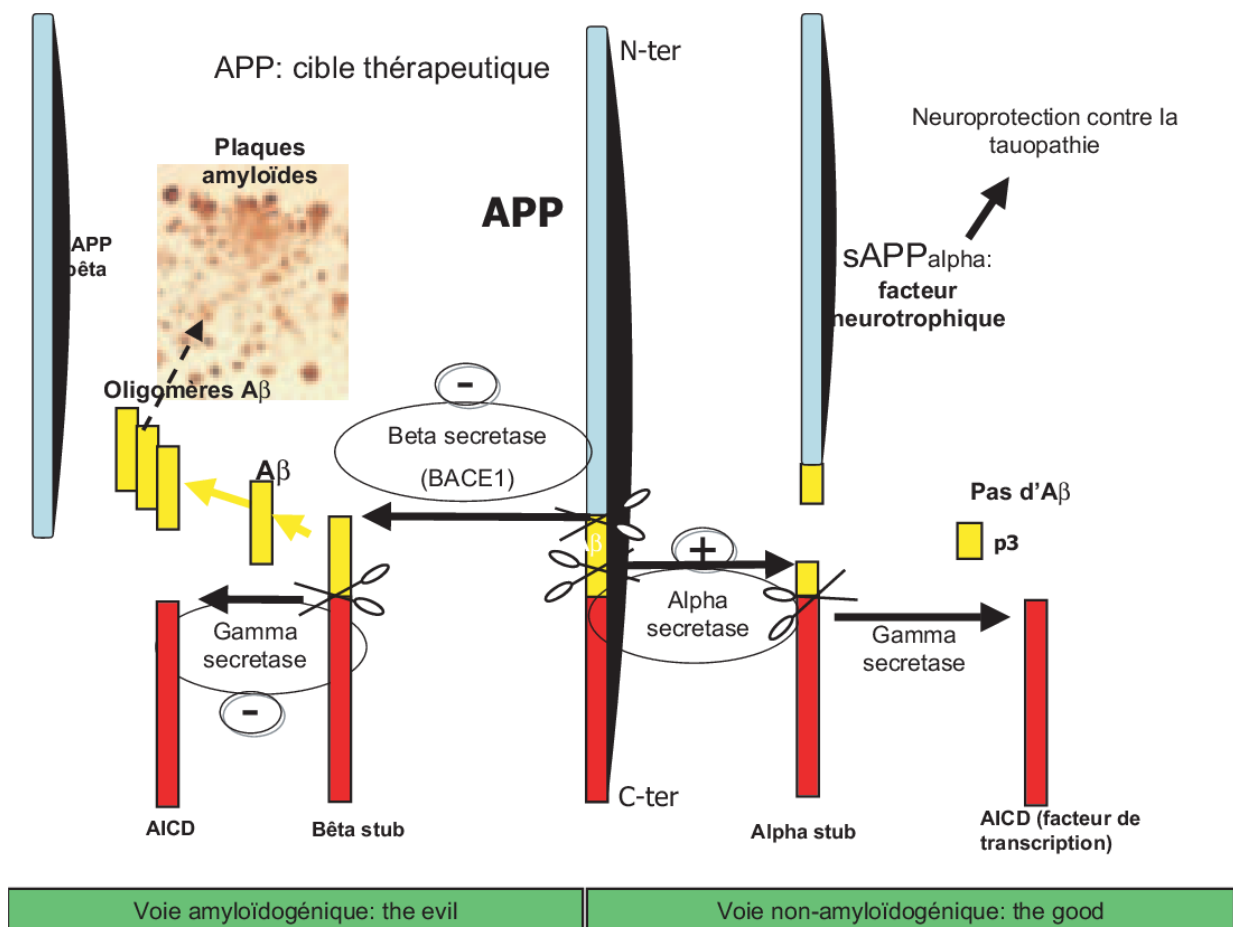


Figure 6: Les deux voies métaboliques principales de APP : la voie amyloïdogénique qui conduit à la production et à la sécrétion du peptide physiologique Ab $\beta$ , suite à l'action de deux sécrétases (BACE1 et la gamma sécrétase) et la voie non-amyloïdogénique suit suite à une coupure de l'alpha sécrétase au milieu de Ab $\beta$ . Dans la maladie d'Alzheimer, on observe une agrégation de Ab $\beta$  sous forme de plaques qui s'accumulent dans la substance grise corticale [36].

### 2.5.1.2 Le peptide AB et son acheminement

Le peptide A $\beta$  d'environ 4 kDa, dérivé de la plus grande APP, a d'abord été isolé en tant que composant principal des dépôts amyloïdes dans le cerveau et le système cérébro-vasculaire des patients atteints de la MA et du syndrome de Down. Bien que la fonction de l'APP elle-même n'ait pas été résolue, des recherches approfondies ont fait progresser nos connaissances sur la façon dont le peptide A $\beta$  est produit et comment il est ensuite dégradé dans le cerveau ou transporté vers la périphérie. La quantité finale d'A $\beta$  qui s'accumule sous forme de dépôts amyloïdes dans le cerveau est déterminée par l'interaction de ces facteurs. Les changements avec la progression de la maladie pourraient contribuer à l'âge d'apparition de la maladie et à sa durée.

Les processus enzymatiques responsables du métabolisme de l'APP en A $\beta$  sont maintenant raisonnablement bien compris. L'APP est séquentiellement clivée par deux activités endoprotéases liées à la membrane, la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -sécrétase. La  $\beta$ -sécrétase clive d'abord l'APP pour libérer un grand dérivé sécrété, la sAPP $\beta$ . Un fragment de 99 acides aminés (CTF $\beta$ , qui commence par le résidu aspartyle N-terminal de A $\beta$ ) reste lié à la membrane et est à son tour rapidement clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour générer A $\beta$ . Le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase est quelque peu imprécis, ce qui entraîne une hétérogénéité C-terminale de la population peptidique résultante. Ainsi, il existe de nombreuses espèces A $\beta$  différentes, mais celles se terminant en position 40 (A $\beta$ 40) sont les plus



abondantes (~80-90%), suivies de 42 (A $\beta$ 42, ~5-10%). Les formes légèrement plus longues d'A $\beta$ , en particulier A $\beta$ 42, sont plus hydrophobes et fibrillogènes.

On pense que l'activité  $\beta$ -sécrétase est l'étape limitante de la voie amyloïdogénique et traite environ 10 % de l'APP cellulaire totale. L'APP restant, proche de 90 %, est constitutivement clivé par la  $\gamma$ -sécrétase (un ensemble d'enzymes métallo protéases), générant la sAPP $\alpha$  et les 83 acides aminés CTF $\alpha$ . Le clivage ultérieur de la  $\gamma$ -sécrétase de CTF $\alpha$  produit le fragment p3 plus bénin au lieu de A $\beta$ . Le clivage de la  $\gamma$ -sécrétase de l'un ou l'autre des CTF liés à la membrane génère également un élément cytosolique, AICD (domaine intracellulaire APP, parfois appelé CTF $\gamma$ ), qui peut jouer un rôle dans la transduction du signal. En raison de leur rôle essentiel dans la génération d'A $\beta$ , la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -sécrétase sont considérées comme des cibles de choix pour le développement de produits pharmaceutiques anti-AD.

La  $\gamma$ -sécrétase est maintenant connue pour être une enzyme à sous-unités multiples composée des protéines APH1, PEN2, nicastrine et préséniline (PS1 ou PS2). Le complexe enzymatique contient probablement une copie de chaque sous-unité, et est responsable du clivage de plusieurs protéines membranaires en plus de l'APP. Bien que les rôles fonctionnels exacts de chaque composant n'aient pas encore été complètement élucidés, on pense que la préséniline forme le site actif de l'aspartyl protéase, et la nicastrine sert probablement de sous-unité d'amarrage au substrat. Les quatre composants sont nécessaires pour que la  $\gamma$ -sécrétase mûrisse et fonctionne correctement. La sécrétase a un mécanisme relativement nouveau en ce sens qu'elle se clive dans la bicouche lipidique et ne peut traiter que les substrats qui sont d'abord clivés par une autre protéase pour éliminer une grande région d'ectodomaine. L'enzyme n'a pas identifié d'exigences de séquence spécifiques pour la reconnaissance du substrat, et le clivage au sein de la membrane est plutôt contrôlé par une variété d'autres facteurs, tels que la longueur du domaine transmembranaire. Bien que la quantité d'activité  $\gamma$ -sécrétase ne semble pas augmenter dans la MA, les altérations de l'activité  $\beta$ -sécrétase conduisant à la production de formes plus longues d'A $\beta$  sont la principale cause génétique de l'apparition précoce de la MA familiale.

### 2.5.1.3 Peptide AB et synapses

De manière un peu schématique, la plasticité synaptique, et plus particulièrement la potentialisation à long terme (PLT) de la transmission synaptique, est considérée comme le corrélat de l'apprentissage et de la mémoire. La PLT peut être induite par une stimulation à haute fréquence des voies afférentes glutamatergiques. L'enregistrement de potentiels de champ synaptiques dans CA1 (une région de l'hippocampe) et dans le gyrus denté a démontré une altération du maintien à long terme de la PLT dans l'hippocampe de souris transgéniques ou après injection intracérébrale d'oligomères de A $\beta$ . Il est probable que l'altération de la fonction synaptique aille au-delà d'une altération de cette forme conventionnelle de plasticité synaptique. Des études plus récentes montrent que des souris possédant une mutation de l'APP et une mutation de la PS1 (PSEN1) présentent une inhibition des courants synaptiques glutamatergiques par un processus d'homéostasie synaptique qui s'accompagne d'une diminution de la densité synaptique des récepteurs AMPA (récepteurs du glutamate). De manière intéressante, cette inhibition de la transmission synaptique pourrait faire intervenir un mécanisme similaire à celui de la dépression

synaptique à long terme (DLT), autre facette de la plasticité synaptique. La DLT s'explique par une diminution de récepteurs de type AMPA dans les synapses, par un mécanisme d'endocytose régulé par les récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I ou les récepteurs NMDA. Les oligomères A $\beta$  affectent aussi l'expression de récepteurs NMDA à la surface des neurones et facilitent la DLT, bien que les données à ce sujet soient contradictoires. Les oligomères A $\beta$  pourraient en fait induire une dépression synaptique en perturbant la recapture de glutamate dans la synapse et en promouvant l'activation de récepteurs NMDA extrasynaptiques. Ces études concernent des effets à relativement court terme d'une augmentation de la concentration de peptide A $\beta$ , et il semble nécessaire de réévaluer cette question dans des conditions d'augmentation chronique du taux de peptide A $\beta$  plus proches de la pathologie.

En conditions physiologiques, la DLT est associée à une contraction ou à une perte des épines dendritiques constituant le compartiment post-synaptique de la majorité des synapses excitatrices. Le remodelage des épines dendritiques et la formation de nouvelles synapses, même chez l'adulte, sont des processus qui dépendent de l'activité neuronale et qui participent à l'encodage d'informations. Une perte ou une altération des épines dendritiques est une caractéristique morphologique du cerveau post-mortem de malades atteints de la MA, et elle survient chez les souris transgéniques modèles de cette maladie bien avant la perte des neurones. L'induction d'une forme de DLT de la transmission synaptique par A $\beta$  et la réduction des épines dendritiques pourraient donc partager la même voie de signalisation, faisant intervenir les récepteurs du glutamate de type NMDA et de type métabotrope.

Les mécanismes moléculaires par lesquels A $\beta$  affecte la transmission synaptique restent très mal connus. Sur des neurones en culture, des oligomères synthétiques de A $\beta$  se lient sur des sites synaptiques et déclenchent un processus pathologique qui se traduit par un changement de morphologie des épines dendritiques et une perte de récepteurs NMDA. Des études biochimiques indiquent une interaction directe de A $\beta$  avec les récepteurs de l'acétylcholine (récepteurs nicotiques  $\alpha 7$ ), et potentiellement les récepteurs du glutamate (NMDA et mGluR). Il apparaît clairement que les oligomères A $\beta$  modifient l'expression synaptique des récepteurs du glutamate, par différents mécanismes directs ou indirects, impliquant par exemple le trafic membranaire ou intracellulaire de ces récepteurs.

En conclusion, un ensemble important de résultats récents montre que, bien avant la dégénérescence neuronale, la structure, la fonction et la plasticité des synapses sont altérées par une surproduction de peptides  $\beta$ -amyloïdes sous forme d'oligomères. Il en découle un dysfonctionnement des régions impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Bien que ce constat soit clairement établi, la compréhension des mécanismes moléculaires et des conséquences des altérations de la fonction synaptique sur l'activité des réseaux neuronaux est encore limitée. Pourtant, connaître ces mécanismes ouvrirait des possibilités thérapeutiques visant au rétablissement [37].

#### 2.5.1.4 Toxicité du peptide AB

Le peptide A $\beta$  est produit par le métabolisme neuronal et peut être détecté dans le plasma ou LCR des personnes non atteintes de la MA [38].

Dans ces conditions, la présence physiologique de ce peptide n'induit pas de processus neurodégénératifs. Des études montrent qu'en conditions physiologiques on retrouve une

production « normale » du peptide A $\beta$  mais la proportion des différentes formes de ces peptides A $\beta$  diffère de celle retrouvée en conditions pathologiques. En particulier, le ratio A $\beta$ 1-40/A $\beta$ 1-42 est modifié en conditions pathologiques. Des études suggèrent que le ratio A $\beta$ 1-40/A $\beta$ 1-42 constitue un facteur déterminant dans la toxicité, la fibrillogénèse et la distribution pathologique d'A $\beta$  et montrent que les peptides A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42 ont des rôles différents. Le peptide A $\beta$ 1-42 promeut l'accumulation et le dépôt de peptides amyloïdes contrairement au peptide A $\beta$ 1-40 [39]. En conditions pathologiques le ratio A $\beta$ 1-40/A $\beta$ 1-42 est réduit. Notamment, un certain nombre d'études montrent que dans la MA, la production du peptide A $\beta$ 1-42 est augmentée due à une suractivation de la voie amyloïdogénique et/ou à des mutations affectant les acteurs de cette synthèse à la fois dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme [40] et/ou à des dysfonctionnements au niveau des mécanismes d'élimination du peptide A $\beta$ . D'autres travaux montrent que la quantité d'A $\beta$  dans le LCR varie selon l'activité synaptique [41] et les cycles [42], notamment l'inhibition de l'activité synaptique décroît la quantité de peptides A $\beta$  sécrétés dans le milieu extracellulaire alors qu'une augmentation de l'activité synaptique ou des dysfonctionnements du cycle circadien provoquent une augmentation de la sécrétion d'A $\beta$  dans le milieu extracellulaire.

Les effets neurotoxiques synergiques sur d'autres pathologies constituent un autre argument solide en faveur du rôle crucial de l'A $\beta$ . Il a été montré que les plaques formées par l'agrégation A $\beta$  activaient la microglie et entraînaient des changements neuronaux progressifs et des neurites dysmorphiques dans des modèles *in vivo* [43]. A $\beta$  est considéré comme une force motrice pour la propagation de Tau. Par exemple, l'injection de A $\beta$  42 dans le cerveau de souris transgéniques Tau mutantes P301L a accéléré la formation des symptômes de la MA [44]. Cela a été confirmé par le test de croisement de souris transgéniques rTgTauEC avec des souris APP/PS1, dans lequel le dépôt d'amyloïde a considérablement augmenté la propagation et la propagation de Tau, ainsi que la perte de neurones induite par tau [45].

La cascade amyloïde était également supposée être une force motrice de l'hyperexcitation neuronale dans la MA. Une étude récente a révélé que l'A $\beta$  induisait une hyperexcitation dans les neurones sensibles et entretenait le cercle vicieux de l'hyper activation neuronale [46]. Une autre étude a révélé que l'APP sécrétée (sAPP) se liait spécifiquement à GABABR1a et supprimait la libération synaptique. L'interaction pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie des circuits neuronaux [47].

L'hypothèse de la cascade amyloïde a obtenu un soutien continu pendant près de 30 ans. De plus, le ciblage du transport amyloïde, de l'enzyme APP sécrétase et de l'agrégation et de la clairance amyloïde a été suggéré comme stratégie thérapeutique viable [48]. Les thérapies ciblant A $\beta$  ont été étudiées de manière extensive et intensive. Les essais cliniques anti-amyloïdes en cours sont résumés dans le tableau 2. Dans ces stratégies anti-amyloïdes, le ciblage de la clairance amyloïde semble plutôt reconnu. Il existe 10 immunothérapies dans 18 essais cliniques visant à éliminer les monomères A $\beta$ , les oligomères et les plaques. Parmi elles, 4 immunothérapies font actuellement l'objet de 10 études de phase 3 [18].

Tableau 2: Agents anti-amyloïdes pour le traitement de la MA dans les essais cliniques

Vaccin/ anticorps	Description	Essai clinique
CAD106 ou Amilomotide	Il est obtenu à partir de fragments du peptide A $\beta$ de façon à produire des anticorps spécifiques sans provoquer de réactions inflammatoires.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les études indiquent une réponse positive contre les plaques amyloïdes sans effets indésirables majeurs.</li> <li>- En 2021, l'étude « Alzheimer's prevention initiative generation study » a testé le CAD 106 sur des malades d'Alzheimer homozygotes pour le gène APOE (<math>\epsilon</math>4), et affirme que c'est la première immunothérapie active à pouvoir freiner le dépôt d'A<math>\beta</math> chez l'humain avec une balance bénéfice/risque positive.</li> </ul>
ACI-24	Il repose sur l'utilisation du peptide A $\beta$ 1-15 entouré d'un liposome et d'adjuvant pour permettre l'obtention d'une forte réponse sans activer les lymphocytes T.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une étude datant de Février 2022 a exploré l'optimisation de l'ACI-24 pour générer des anticorps anti-pyroglutamate A<math>\beta</math> qui est une forme très neurotoxique d'A<math>\beta</math> et a obtenu des résultats positifs.</li> </ul>
UB311	Il comprend deux peptides A $\beta$ 1-14 fusionnés à des peptides de lymphocytes T.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Il a également prouvé pouvoir générer une forte réponse immunitaire sans induire de cytotoxicité.</li> <li>- Une étude clinique de phase II de l'UB311 rapporte une efficacité à réduire les plaques amyloïdes et une amélioration de la connectivité neuronale chez des patients atteints d'Alzheimer de forme légère à modérée.</li> </ul>
Lu AF20513	C'est un trimère du fragment A $\beta$ 1- 12 séparé par des séquences d'épitopes de toxines tétanique. Cet assemblage permet d'activer une réponse spécifique des lymphocytes T à la toxine tétanique grâce à une immunisation préexistante par le vaccin antitétanique et ainsi aboutir à une production spécifique d'anticorps anti A $\beta$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bien qu'il soit bien toléré, les titres de ce vaccin étaient plus réduits chez l'homme comparé au modèle animal ce qui a freiné la poursuite des essais cliniques.</li> </ul>
Vaccin à ADN Codant pour A $\beta$ 42	L'injection cutanée d'ADN codant pour un trimère d'A $\beta$ 42, permet son expression in vivo et stimule une réponse immune au niveau des nœuds lymphatiques, ce qui aboutit à l'obtention de divers anticorps contre différents épitopes sans générer d'inflammation cytotoxique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'étude de Rosenberg et al réalisée en 2018 affirme que ce vaccin permet non seulement de réduire la pathologie A<math>\beta</math> mais agirait aussi sur la réduction de la pathologie Tau.</li> </ul>

Donanemab (LY3002813)	Anticorps monoclonal humanisé qui se lie spécifiquement à l'épitope N Terminal pyroglutamate des dépôts d'Aβ.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un essai clinique de phase II (TRAILBLAZER- ALZ) a indiqué une réduction des plaques amyloïdes et une amélioration consécutive de la cognition des patients.</li> <li>- Une étude de Phase III (TRAILBLAZER-ALZ2) est en cours avec 1800 participants pour évaluer sa capacité à prévenir la maladie chez des patients à un stade débutant.</li> <li>- Une 2ème étude de phase III avec 3300 participants Alzheimer visera également à déterminer son efficacité.</li> </ul>
Lecane mab (BAN2401)	Anticorps monoclonal humanisé qui se lie préférentiellement aux formes agrégées d'Aβ (oligomères, protofibrilles et fibrilles)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un essai clinique de phase II (BAN2401-GOOO- 201) indique une réduction d'Aβ et du déclin cognitif après 18 mois de traitement.</li> <li>-Ainsi un essai clinique de Phase III (Clarity AD) est en cours pour évaluer son efficacité</li> </ul>
Solanezumab (LY2062430)	Anticorps monoclonal humanisé ciblant le domaine Aβ13-28.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Divers essais cliniques de phase III se sont soldés par un échec et n'ont pu démontrer l'efficacité du Solanezumab sur des patients atteint d'Alzheimer léger à modéré.</li> <li>- Un nouvel essai clinique de phase III (A4) est en cours pour évaluer son efficacité sur des patients asymptomatiques ou à un stade débutant d'Alzheimer</li> </ul>
Crenezumab (RG7412)	Anticorps monoclonal humanisé ciblant de multiples formes d'Aβ (monomères compris) avec une plus haute affinité pour les oligomères.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Divers essais cliniques de phase III ont été arrêtés avant leur fin, due aux résultats d'analyses intermédiaires qui prédisaient leur échec.</li> <li>- Actuellement une étude de phase II est en cours pour évaluer son efficacité sur des patients atteints d'Alzheimer de forme génétique (mutation du gène PSEN1).</li> </ul>
Gantenerumab (RO4909832)	Anticorps monoclonal humanisé se liant aux formes agrégées d'Aβ avec une haute affinité et permet leur clearance par phagocytose.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un essai clinique de phase II DIAN-TU-001 effectué chez des patients Alzheimer de la forme familiale (ayant des mutations génétiques) a démontré une diminution des plaques amyloïdes mais sans effets sur la cognition des patients.</li> <li>- Actuellement deux essais cliniques de phase III (GRADUATE 1 et 2) étudient son efficacité chez des patients dont la forme d'Alzheimer n'est pas due à des mutations génétiques.</li> </ul>

## 2.6 Facteurs de risque liés au vieillissement dans la maladie d'Alzheimer

Le vieillissement facilite et accélère les troubles cognitifs et constitue le facteur de risque le plus prédominant pour les maladies neurodégénératives, y compris la MA [49]. Dans la population âgée, il existe des dérégulations du système immunitaire et une diminution des niveaux de métabolisme avec un risque plus élevé de neuroinflammation, de stress oxydatif et de maladies vasculaires ainsi que de diabète [50], [51]. Ces facteurs de risque liés au vieillissement seraient impliqués dans les pathologies de la MA.

Plusieurs études ont montré qu'il y avait des cytokines et des chimiokines inflammatoires élevées et une microglie activée accumulée dans la région endommagée des cerveaux atteints de MA [52]. Ces dernières années, des études d'association à l'échelle du génome ont identifié plusieurs polymorphismes mononucléotidiques à risque de maladie d'Alzheimer associés ou liés à la fonction microgliale, notamment TREM2, CD33, CR1, CLU, CD2AP, EPHA1, ABCA7 et INPP5D. Spangenberg et Green, 2017 [53], indiquant que la microglie a joué un rôle essentiel dans le développement de la MA. Une méta-analyse mise à jour de la cohorte de l'année 1995 à 2016 a démontré que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens était significativement associée à la réduction du risque de MA [54].

## 2.7 Approche thérapeutique

### 2.7.1 La thérapie proposée par le marché pharmaceutique

Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, il existe de façon conjointe un déficit en acétylcholine et un excès de glutamate au niveau ses synapses. Les recherches thérapeutiques ont pris en compte ces données afin de développer les molécules qui agissent sur les signes cliniques de l'affection [55].

#### 2.7.1.1 Voie de l'inhibition de l'acétylcholinestérase

Il n'existe pas encore de traitement cible sur les mécanismes cellulaires de la MA, à savoir la production du peptide amyloïde par protéolyse du précurseur APP et les protéines Tau pathologiques. L'observation d'un déficit de la transmission cholinergique dans la MA a conduit au développement des premiers agents approuvés pour traiter les symptômes de démence et les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. En effet, l'hypothèse cholinergique propose un rôle central du déficit d'acétylcholine dans les symptômes cognitifs, fonctionnels et comportementaux observés dans la MA. Il apparaît que les noyaux cholinergiques sont altérés ainsi que les indices biochimiques de la fonction cholinergique et que cette altération est corrélée avec la sévérité de la démence. Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase qui tendent à préserver les niveaux endogènes d'acétylcholine, sont donc les médicaments les plus fréquemment utilisés dans la MA. Les plus connus sont la tacrine, le donepezil, la rivastigmine et la galanthamine. Les essais cliniques ont démontré les avantages des inhibiteurs de la cholinestérase pour le traitement de la maladie d'intensité légère à modérée d'Alzheimer. On ne connaît pas les bienfaits du traitement après la progression du stade modère à sévère de la maladie. Les patients affectés acceptant de continuer le donepezil, par rapport à ceux affectés et ayant interrompu le donepezil, avaient un score sur le Mini Mental State Examination (MMSE) qui était plus élevé en moyenne de 1,9 point (intervalle

de confiance à 95 % [IC], 1,3 à 2,5) et une note sur les Basic Activities of Daily Living (BADLS) qui était inférieure (indiquant moins la dépréciation) de 3,0 points (IC 95 %, 1,8 à 4,3) ( $p < 0,001$  pour les deux comparaisons). Les patients affectés acceptant de recevoir la memantine, par rapport à ceux affectés ayant reçu un placebo memantine, avaient un score sur le MMSE qui était en moyenne de 1,2 point plus élevé (95 % CI, 0,6 à 1,8 ;  $p < 0,001$ ) et un score sur les BADLS qui était inférieur de 1,5 point (95 % CI, 0,3 à 2,8 ;  $p = 0,02$ ). L'efficacité du donepezil et de la memantine n'a pas différé par la présence ou l'absence de l'autre. Il n'y avait aucune différence significative avantageuse de la combinaison de donepezil et memantine par rapport au donepezil. La poursuite du traitement par le donepezil chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer modérée à sévère a été associée à des avantages cognitifs qui dépassent le minimum et avec des avantages fonctionnels au cours de 12 mois. La combinaison de donepezil et memantine a montré des bénéfices additionnels. Il existe un travail intéressant qui pourrait être considéré comme innovant, directement lié à l'approche décrite ci-dessus. En effet, Fu et al. (2005) ont inhibé par une approche d'ARN anti-sens, l'expression du gène codant pour l'acétylcholinestérase. Ces auteurs ont montré que cette approche améliorait les performances cognitives chez l'animal transgénique. Ces résultats sont intéressants, mais sont pour l'instant restreints aux modèles animaux [11].

#### 2.7.1.2 Voie de l'inhibition du système glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Le glutamate peut être produit à partir de la glutamine par la glutaminase et est le précurseur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur. Le L-Glutamate est l'acide aminé libre le plus abondant dans le cerveau et le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés. La neurotransmission glutamatergique joue un rôle important dans la LTP, qui est considérée comme extrêmement importante pour l'apprentissage et la formation de la mémoire [56]. Les récepteurs du glutamate sont classés en deux familles : les récepteurs métabotropiques du glutamate couplés aux protéines G (mGluR) et les récepteurs ionotropiques du glutamate ligand-dépendants (iGluR) [57]. La liaison du glutamate aux mGluR conduit à la production de phosphate d'inositol et à la signalisation d'un second message, affectant plusieurs voies de signalisation dans les cellules. La liaison du glutamate aux iGluR [qui comprennent trois sous-familles : les récepteurs AMPA, les récepteurs kaïnate et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA)] produit des courants excitateurs rapides. Les récepteurs AMPA et les récepteurs kaïnate sont des récepteurs extrêmement rapides à des concentrations élevées de glutamate. Les récepteurs AMPA sont perméables au  $\text{Na}^+$  et les récepteurs  $\text{Ca}^{2+}$  et kaïnate sont principalement perméables à  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Les récepteurs NMDA présentent une activation plus lente et une perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  plus élevée que les récepteurs AMPA et kaïnate. Le glutamate, associé au co-agoniste du récepteur (glycine ou D-sérine) se liant aux récepteurs NMDA, combiné à une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique pour libérer les ions magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) bloquent les canaux récepteurs. Les récepteurs NMDA ouverts permettent le flux de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule conduisant à un courant post-synaptique excitateur.

Des pertes de synapses et des dysfonctionnements glutamatergiques avec une régulation négative des récepteurs AMPA et des récepteurs NMDA dans l'hippocampe ont été observés chez des



patients atteints de MA [58]. Cependant, le développement de médicaments contre la MA ciblant la neurotransmission glutamatergique s'est principalement concentré sur la réduction de la neurotransmission glutamatergique. L'activation inappropriée de la signalisation glutamatergique (principalement par l'activation des récepteurs NMDA) entraîne une excitotoxicité. Le dépôt d'amyloïde a augmenté l'activation de Fyn pour phosphoryler la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (NMDAR), et par la suite pour renforcer l'activité des NMDAR, par lesquels des niveaux excessifs nocifs d'ions calcium ont afflué dans les neurones post-synaptiques et altéré les fonctions synaptiques [59]. Sur la base de cette théorie, la mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA a été développé et approuvé pour le traitement de la MA modérée à sévère en clinique. Il existe des agents dans les essais cliniques pour le développement de médicaments contre la MA pour exercer un effet neuroprotecteur via la réduction de la libération de glutamate.

### 2.7.2 Les solutions proposées par les chercheurs

Entre 2002 et 2012, 244 traitements sont entrés en phase clinique pour le traitement de la MA. Cependant, seulement 1 molécule fut acceptée par l'agence de régulation des médicaments Américaine, la Food and Drug Administration (FDA). De nombreux espoirs reposaient sur l'utilisation d'inhibiteurs des  $\beta$ -sécrétase et  $\gamma$ -sécrétase pour empêcher la progression de la maladie. Ce fut la stratégie employée par la société Eli Lilly en association avec AstraZeneca en 2014 avec le développement d'un inhibiteur de  $\beta$ -sécrétase avec une prévision de mise sur le marché en 2019 et un revenu estimé à 10 milliards de dollars américains en cas de succès. L'essai clinique de phase 3 comparant 1 057 patients traités par la molécule et 1 072 patients traités avec un placebo n'a montré en 2018 aucune amélioration significative due au traitement. Cet échec notoire met à mal le développement de nouvelles molécules contre la MA en général et le développement d'inhibiteurs des  $\beta$ -sécrétase en particulier. Ainsi, des acteurs majeurs de la pharmacologie tels que Pfizer, Sanofi, Eli Lilly et Johnson & Johnson ont fermé leur développement de molécules contre l'Alzheimer. D'autres compagnies pharmaceutiques ont misé sur le développement d'anticorps reconnaissant l'A $\beta$  ou Tau pour réduire les taux de protéines agrégées. Certaines stratégies consistent à cibler la protéine p38 MAPK (mitogenactivated serine/threonine protein kinase) afin de réduire la neuroinflammation et la perte synaptique. Malgré l'augmentation constante de cas de la MA, le développement de thérapies innovantes peine à croître. Ce manque de perspective peut s'expliquer par une mauvaise compréhension de l'origine même de la maladie et également d'un manque de modèles adéquats.

Des données récentes en 2022 suggèrent un rôle du microbiote intestinal dans l'humeur et la fonction cognitive, bien que les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Dans ce contexte, les chercheurs explorent l'impact de la composition du microbiote intestinal sur la progression de la MA. Dans un modèle murin transgénique de la MA, ils montrent une altération de la composition bactérienne intestinale et un changement de la signature bactérienne cérébrale des souris MA par rapport aux congénères saines. Ils ont effectué une série d'expériences visant à restaurer la composition du microbiote intestinal via des modulateurs microbiens, des interventions diététiques, une transplantation de microbiote fécal et des agents pharmacologiques. Collectivement, les résultats suggèrent que la dysbiose intestinale peut influencer la progression



de la maladie d'Alzheimer, ouvrant de nouvelles voies pour l'identification de biomarqueurs et le développement de traitements basés sur une modulation du microbiote intestinal [60].

## 2.8 La neuroprotection par les plantes

En raison de différentes situations environnementales contraignantes et pathologiques ainsi que certaines habitudes comportementales, un excès de radicaux libres peut s'accumuler pouvant entraîner un désordre dans les structures cellulaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques et ainsi provoquant un dysfonctionnement du métabolisme des cellules conduisant à la mort cellulaire [61]. Ainsi, il est reconnu que plusieurs maladies sont associées au stress oxydatif et par conséquent à l'accumulation des radicaux libres. Ces derniers ont été identifiés comme des médiateurs contribuant au vieillissement cellulaire, à la mutagenèse, à la carcinogenèse, aux maladies coronariennes, aux pathologies cardio-vasculaires, au diabète, à la dystrophie musculaire et à la neurodégénérescence comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [62]. La neuroprotection se réfère aux stratégies et aux mécanismes relatifs capables de lutter au niveau du système nerveux central contre les dommages neuronaux causés par divers troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, l'anxiété, les troubles cérébro-vasculaires, les convulsions, la maladie de Parkinson, etc... Les maladies neurodégénératives sont considérées la deuxième cause la plus fréquente de décès chez les personnes âgées en 2040 [63]. Parmi les stratégies de neuroprotection, les produits naturels issus de plantes médicinales peuvent représenter un remède précieux dans la prévention contre ces maladies neurodégénératives [64]. De nombreuses catégories d'agents neuroprotecteurs naturels et synthétiques ont été proposées sur le marché, cependant, les agents neuroprotecteurs synthétiques sont soupçonnés d'avoir certains effets secondaires tels que la sécheresse de la bouche, la fatigue, la somnolence, l'anxiété ou l'hyperexcitabilité, etc... [64].

La phytothérapie constitue une méthode complémentaire et alternative à la médecine moderne, se référant à l'utilisation des composants végétaux (feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits et graines) pour leurs propriétés essentiellement préventives et curatives. En général, les produits à base de plantes contiennent une variété de composés phytochimiques bioactifs, y compris les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les saponines et les composés phénoliques. Dans la lutte contre les maladies neurodégénératives, le monde scientifique est à la recherche de principes actifs, à partir de certaines plantes médicinales. Les antioxydants naturels peuvent avoir un rôle neuroprotecteur en réduisant ou en inversant les dommages cellulaires et en ralentissant la progression de la dégénérescence des cellules neuronales [65]. Par exemple, les plantes médicinales comme *Bacopa monnieri*, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Nardostachys jatamansi*, *Valeriana officinalis* et *Withania somnifera* ont été utilisés intensivement dans divers systèmes traditionnels de traitement en raison de leurs propriétés neuroprotectrices [64]. En effet, de nombreux composés naturels se sont révélés exercer une action neuroprotectrice sur des cellules isolées et des modèles animaux. Les polyphénols, les isoprénoïdes, les alcaloïdes et les acides gras sont des composants actifs trouvés dans de nombreuses plantes médicinales et qui ont la capacité de réguler une variété d'enzymes, ainsi que des récepteurs cellulaires. Notamment, la galanthamine appartenant à la classe des alcaloïdes, obtenue de *Narcissus tazetta*, *Galanthus nivalis* et *Leucojum aestivum*, est capable de stimuler les récepteurs nicotiques, d'inhiber l'activité du cholinestérase et d'améliorer

la cognition et la mémoire [66]. Les oméga 3 et 6 comme acides gras trouvés dans les noix, sont connus pour avoir une activité neuroprotectrice [64].

### 2.8.1 Cas des Astragales

L'extrait de *Radix Astragali* (20 et 40 mg kg<sup>-1</sup>) a montré un effet protecteur chez des souris mâles de 12 mois sur les troubles de l'apprentissage et de la mémoire et l'apoptose des neurones similaires aux symptômes de la maladie d'Alzheimer [67]. L'astragaloside IV (40 mg L<sup>-1</sup>) a inhibé la transmission synaptique spontanée et a supprimé efficacement l'excitabilités neuronales. Cette modulation de l'activité neuronale indique que la saponine peut agir comme un neuroprotecteur [68]. Des effets neuroprotecteurs de l'astragaloside IV (100 µM) dans des cultures de cellules nigrales primaires traitées à la 6-hydroxydopamine ont été signalés.

Luo et al (2004) ont fourni pour la première fois la preuve d'un effet neuroprotecteur à partir d'un extrait purifié d'*Astragalus membranaceus*, contenant de l'astragaloside IV, dans un modèle in vivo de lésion cérébrale ischémique. L'utilisation de cette saponine (40 mg.kg-1) a réduit l'infarctus en diminuant les niveaux de malondialdéhyde et en augmentant les niveaux d'enzymes antioxydantes [69].

Les effets de la rhamnocitrine 4-β-D-galacto pyranoside (RGP), isolée d'*Astragalus hamosus L.* ont été évalués sur des synaptosomes de cerveau de rat isolés, préparés par le réactif de Percoll, isolés par perfusion de collagénase en deux étapes. Dans les synaptosomes, le RGP a eu un effet protecteur statistiquement significatif, similaire à celui de la silymarine, sur le stress oxydatif induit par la 6-hydroxy (OH)-dopamine [70].

L'extrait d'*A. kahiricus* présente une activité considérable contre le cholinestérase et le stress oxydatif, qui jouent tous deux un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MA. L'extrait d'*A. kahiricus* peut être un agent prometteur pour le traitement de la MA et pourrait même retarder sa progression [71].

### 2.8.2 Cas d'*Astragalus hamosus L.*

L'espèce *Astragalus hamosus L.* est communément utilisée en médecine traditionnelle iranienne comme thérapie pour une démence présentant des caractéristiques et des symptômes similaires à ceux de la maladie d'Alzheimer (MA). Dans une nouvelle étude, les effets de cette plante sur la neuro-inflammation et la mémoire ont été évalués en tant que nouvelles thérapies dans le modèle de trouble de la mémoire induit par le bêta-amyloïde (Aβ). Des groupes séparés de rats ont été nourris avec un extrait d'*Astragalus hamosus*. Les effets de l'administration orale des extraits sur la mémoire et la neuro-inflammation ont été évalués chez les rats injectés Aβ. Les résultats de cette étude ont montré que l'administration orale d'*A. hamosus* améliorait la mémoire, ceci a été examiné en utilisant un test de labyrinthe en Y et un appareil à navette. De plus, l'analyse Western blot de la cyclooxygénase-2, de l'interleukine-1β et du facteur de nécrose tumorale-α a montré que cette plante a des effets améliorants contre la neuro-inflammation causée par Aβ.

Ces résultats suggèrent que l'utilisation des extraits d'*Astragalus hamosus L.* en phytothérapie peut être envisagé pour diminuer les symptômes liés à la MA et le traitement d'autres troubles neurodégénératifs [72].

## 2.9 Voix thérapeutiques des maladies neurodégénératives identifiées chez les Astragales

### 2.9.1 Modulation des voies de signalisation des neurotransmetteurs et des récepteurs.

Il a été signalé que les modifications de la neurotransmission causées par la variation des niveaux de neurotransmetteurs et de récepteurs apparentés jouent un rôle clé dans la neurodégénérescence et la neuroprotection. Les actions neuroprotectrices des saponines peuvent être obtenues en régulant les neurotransmetteurs. En effet, les saponines, par exemple, protègent le système nerveux en régulant les neurotransmetteurs amines biogènes et en modulant les récepteurs N-méthylD-aspartate (NMDA), adénosine ou acide aminobutyrique (GABA), qui sont tous liés à une neurogenèse améliorée [73]. Les niveaux de DA et de 5-HT dans le PFC, l'hippocampe et le striatum sont restaurés après une supplémentation quotidienne en saponine d'*A. spinosus* ou en AS-IV en association avec du BPA. Ainsi, l'expression de la TH est activée, ce qui inhibe potentiellement l'apoptose induite par les mitochondries et favorise la croissance des neurites.

Les saponines aident également à restaurer les déficiences en neurotransmetteurs en modifiant les niveaux de neurotransmetteurs, les récepteurs des neurotransmetteurs et les voies de signalisation du second messenger. En conséquence, les saponines ont diverses bioactivités [70, 71]. Essawy et al. (2021) ont découvert que la co-administration de saponines extraites de *A. spinosus* ou AS-IV a inversé la surproduction de NO et de glutamate et a augmenté les concentrations de glutamine induites par le BPA dans le PFC, l'hippocampe et le striatum, suivies d'une excitabilité du glutamate, d'une diminution de l'influx de  $Ca^{2+}$ .

De plus, les animaux ayant reçu AS-IV ou *A. spinosus* présentaient des niveaux d'expression plus faibles des sous-unités des récepteurs ionotropes NMDA (NR2A et NR2B) dans les zones cérébrales touchées par le BPA. Ce changement pourrait être dû au blocage des récepteurs NMDA par l'ASIV et à une diminution de l'excitabilité neuronale du glutamate [76]. Les saponines, d'autre part, ont amélioré la fonction des récepteurs NMDA par une interaction compétitive directe avec le site de liaison du récepteur à la glycine et ont exercé un puissant effet inhibiteur sur les dommages excitotoxiques en bloquant l'interaction des récepteurs NMDA avec le glutamate pour prévenir la toxicité du glutamate [77].

### 2.9.2 Modulation des canaux ioniques

La détérioration de la signalisation extrasynaptique du glutamate est un puissant contributeur à diverses conditions physiopathologiques telles que l'hyperexcitabilité, l'excitotoxicité, la neuroinflammation, la neurodégénérescence et la démyélinisation [78]. Dans les neurones hippocampiques en culture, l'AS-IV supprime l'excitabilité neuronale. Une explication des effets inhibiteurs de l'AS-IV sur l'excitabilité globale de la membrane est que la transmission synaptique est réduite, les courants  $Na^+$  et  $K^+$  voltage-dépendants sont supprimés et les courants  $Ca^{2+}$  sont inhibés aux bornes présynaptiques, ce qui entraîne une réduction du transmetteur excitateur dépendant du  $Ca^{2+}$ . Ce type de modulation de l'activité neuronale pourrait apporter une nouvelle preuve des propriétés neuroprotectrices de l'AS-IV [76].

### 2.9.3 Clairance des agrégats de protéines

La thérapie AST améliore l'apprentissage et la mémoire, diminue l'expression de l'APP, de la  $\beta$ -sécrétase et de l'ARNm  $A\beta_{1-40}$  dans la région CA1 de l'hippocampe et protège contre les dommages en réponse à l'exposition à la dexaméthasone +  $A\beta_{25-35}$  [79]. L'AS-IV, en particulier,



### 3 Cancer colorectal

#### 3.1 Présentation

Le côlon est la partie de l'intestin faisant suite à l'intestin grêle et allant du caecum au rectum. La paroi intérieure du côlon et du rectum est tapissée d'une muqueuse pouvant développer des excroissances nommées polypes.

Ces tumeurs bénignes sont fréquentes et sans gravité. Mais certaines d'entre elles, les adénomes, peuvent se développer et se transformer en cancer. Cette transformation est lente, en moyenne plus de 10 ans. Environ 60 % des cancers colorectaux touchent le côlon et 40 % le rectum avec pour localisation principale : le sigmoïde (dernière partie du côlon ) [86] (Figure 8).

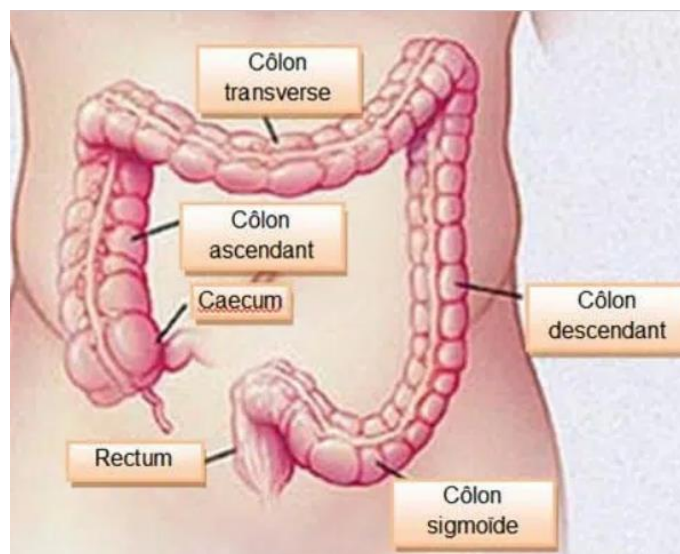


Figure 8: Les parties touchées dans le cancer colorectal : Société Française d'Endoscopie Digestive

#### 3.2 Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du cancer colorectal

Le côlon est un endroit vulnérable à l'apparition de tumeurs et il abrite la majorité des bactéries qui composent le microbiote intestinal.

Des études ont révélé que les communautés bactériennes présentes chez les personnes atteintes d'un cancer du côlon sont différentes de celles des personnes en bonne santé, ce qui peut causer une dysbiose. Ces études se sont accordées aux bactéries présentes sur la muqueuse du côlon et dans les selles des patients. La composition du microbiote chez les patients cancéreux est également différente sur et autour de la tumeur.

Plusieurs études ont montré une augmentation globale des espèces de *Fusobacterium* et de *Campylobacter*, associées à la muqueuse tumorale, par rapport aux tissus non tumoraux chez les mêmes patients. Ces espèces sont également plus abondantes chez les patients cancéreux que chez les patients sains.

Les recherches ont identifié plusieurs bactéries susceptibles d'être impliquées dans le développement du cancer colorectal. Par exemple, *Streptococcus gallolyticus*, dont l'ADN a été détecté dans 20 à 50% des tissus cancéreux, pourrait favoriser la croissance tumorale chez certaines personnes. Mais elle pourrait également être une bactérie opportuniste qui prolifère facilement dans l'environnement tumoral. *Escherichia coli* se trouve en plus grande quantité dans les tissus tumoraux et pourrait contribuer à la cancérogenèse du côlon. *Fusobacterium nucleatum* pourrait également jouer un rôle dans l'initiation de la maladie en modulant l'inflammation.



Cependant, il est probable que la communauté bactérienne entière, ainsi que les composés qu'elle produit, joue un rôle dans la carcinogénèse plutôt qu'une seule bactérie responsable (Figure 9) [87].

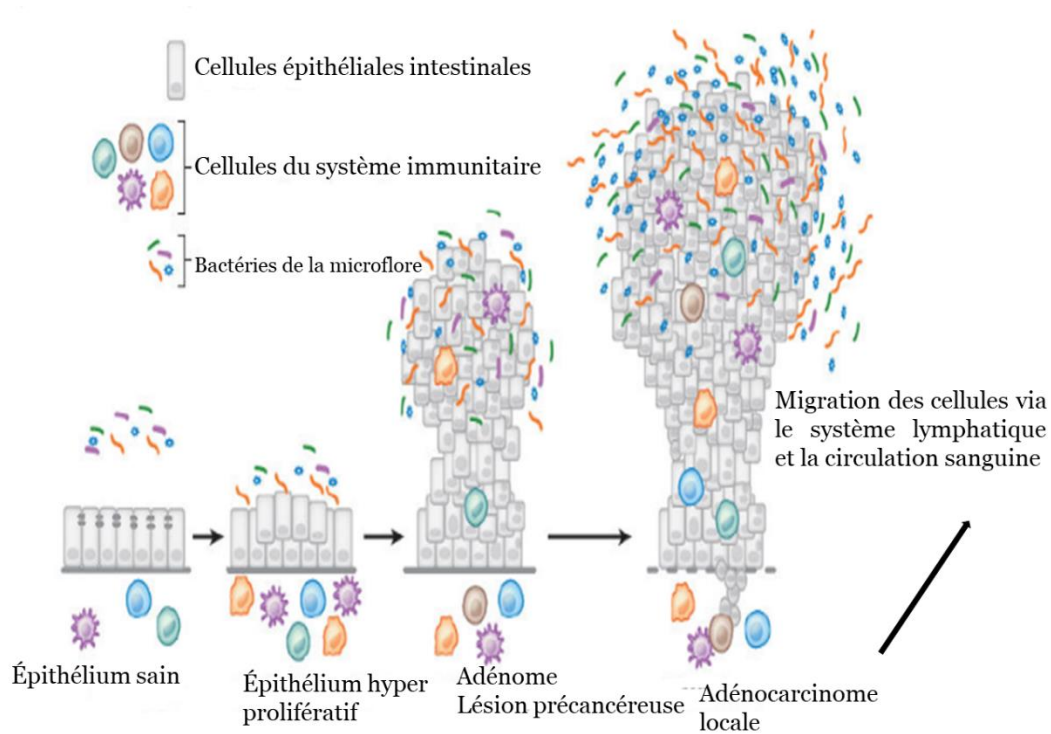


Figure 9: Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale saine à l'adénocarcinome invasif. Les interactions étroites ("cross-talk") entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale de l'hôte, contribuent au maintien de l'inflammation chronique au niveau de la zone tumorale et au développement des différentes étapes anatomocliniques de la carcinogénèse du CCR. D'après Brennan et Garrett, 2016 [88].

### 3.3 Épidémiologie de la maladie

Le cancer du côlon (CC) est la troisième cause de décès lié au cancer chez les patients adultes aux États-Unis. On estime que 106 180 nouveaux cas de CC et 52 580 décès sont attendus en 2022. Bien que les nouveaux traitements aient amélioré les résultats, la survie relative à cinq ans reste médiocre à seulement 64,7 %. Les chances sont plus faibles pour les patients atteints d'une maladie métastatique puisque leur taux de survie à cinq ans est inférieur à 20 % [89].

Le cancer colorectal se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi interne du côlon ou du rectum. Le plus souvent, ces tumeurs malignes proviennent d'une tumeur bénigne, appelée polype adénomateux, qui évolue lentement et finit par devenir cancéreuse [90].

### 3.4 Étiologie

Des mutations dans des gènes spécifiques peuvent entraîner l'apparition d'un cancer colorectal, comme cela se produit dans d'autres types de cancer. Ces mutations peuvent apparaître dans les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes liés aux mécanismes de réparation de l'ADN. Selon l'origine de la mutation, les carcinomes colorectaux peuvent être classés comme sporadiques, héréditaires et familiaux.

Les mutations ponctuelles, qui apparaissent au cours de la vie, ne sont pas associées à des syndromes héréditaires et n'affectent que les cellules individuelles et leurs descendants. Les cancers dérivés de mutations ponctuelles sont appelés cancers sporadiques et représentent 70 % de tous les cancers colorectaux. La pathogenèse moléculaire du cancer sporadique est hétérogène car les mutations peuvent cibler différents gènes. Cependant, environ 70% des cas de CCR suivent une succession spécifique de mutations qui est ensuite traduite en une séquence morphologique spécifique, commençant par la formation d'un adénome et se terminant à l'état de carcinome. La première mutation se produit dans la polypose adénomateuse du coli (APC), un gène suppresseur de tumeur, déclenchant la formation d'adénomes non malins, également appelés polypes. On s'attend à ce qu'environ 15 % de ces adénomes soient promus à l'état de carcinome dans un délai de dix ans. Cette mutation APC est suivie de mutations dans KRAS , TP53 et, enfin, DCC (Figure 10) [91].

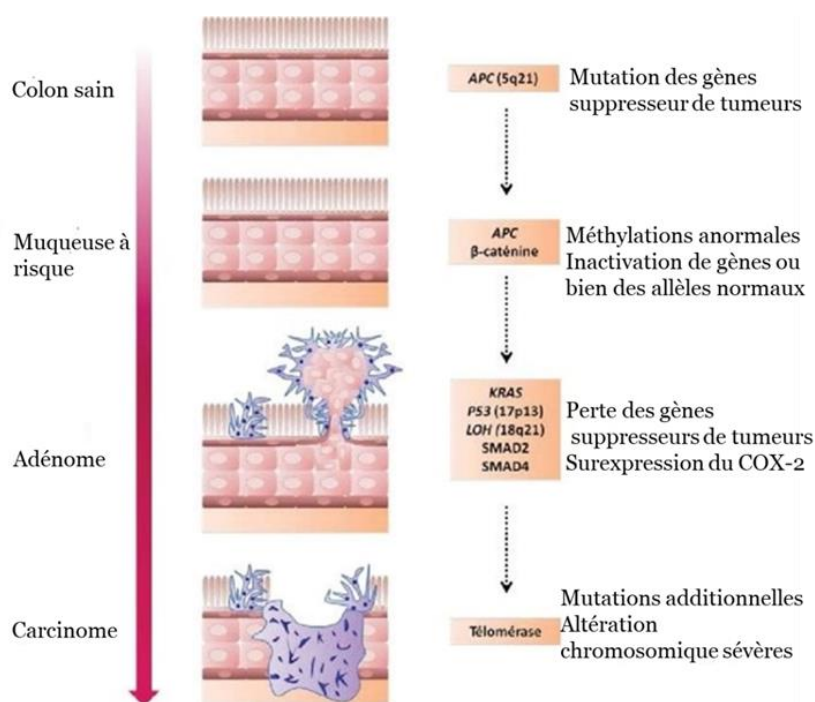


Figure 10: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique[92]

Les cancers héréditaires ne représentent que 5 % de tous les cas de CCR. Ces cancers sont causés par des mutations héréditaires qui affectent l'un des allèles du gène muté, ce qui signifie qu'une mutation ponctuelle dans l'autre allèle déclenche l'apparition de la cellule tumorale et, par la suite, du carcinome. Afin de générer une classification plus précise des cancers héréditaires, deux groupes, à savoir les formes polyposiques et non polyposiques, ont été établis. La variante de la polypose implique principalement la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Figure 11) [91].

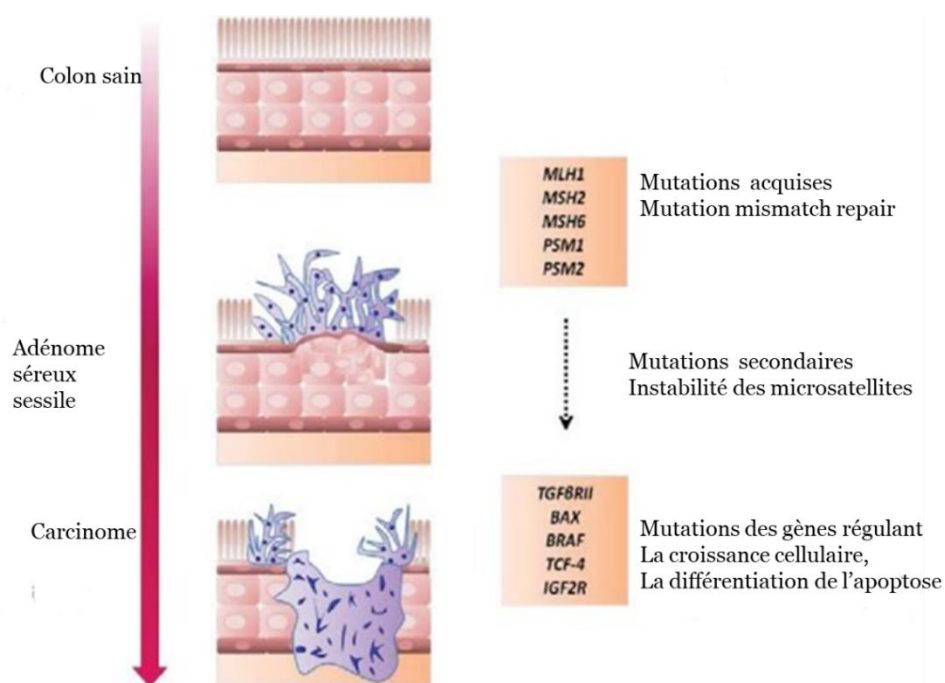


Figure 11: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire[92]

### 3.5 Cancer colorectal et phytothérapie par des Astragales

Les racines séchées d'*Astragalus membranaceus* (Fischer) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao (AM) sont couramment utilisées dans le traitement du rhume, de la diarrhée, de la fatigue et de l'anorexie grâce à ses constituants actifs qui comprennent les saponines, les flavonoïdes et les polysaccharides. Elles ont été évaluées comme actives sur la lignée HCT116 du cancer colorectal [245] [246]. Zaho et al, 2019 ont montré que les APS ont significativement inhibé la prolifération des cellules HT-29/DDP de manière dose –dépendante [247].

Dans une étude réalisée par Mandy et al, 2007, les effets anti-cancérigènes de l'extrait de saponine d'astragale ont été évalués dans des cellules cancéreuses du côlon humain HT-29 et des xénogreffes tumorales. Ces chercheurs ont montré que les saponines des astragales (AST) inhibent la prolifération cellulaire par accumulation en phase S et arrêt G2/M, avec suppression concomitante de l'expression de p21 et inhibition de l'activité kinase cycline-dépendante. En outre, les AST favorisent l'apoptose dans les cellules HT-29 par l'activation de la caspase 3 et le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase, ce qui est indiqué par la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine nucléaire. Les auteurs démontrent également les effets anti-tumorigènes des AST in vivo, dont la réduction du volume tumoral ainsi que les effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs dans la xénogreffe de souris nude HT-29 sont comparables à ceux produits par le médicament chimio thérapeutique conventionnel le 5-fluorouracile (5-FU). De plus, les effets secondaires (baisse de poids corporel et mortalité) associés à l'association médicamenteuse 5-FU et oxaliplatine ne sont pas induits par les AST. Ces résultats indiquent que les AST pourraient être des agents chimio thérapeutiques efficaces dans le traitement du cancer du côlon, qui pourraient également être utilisées comme adjuvant en combinaison avec d'autres médicaments chimiothérapeutiques pour réduire les effets secondaires de ces derniers composés [248].



## 4 *Astragalus hamosus* L.

### 4.1 Présentation du genre *Astragalus*

Les plantes sont une source précieuse d'un large éventail de métabolites secondaires, qui sont utilisés comme produits pharmaceutiques, agrochimiques, arômes, parfums, colorants, bio pesticides et additifs alimentaires. Au début du XIXe siècle, de nombreux ingrédients sensibles ont été isolés et introduits dans la pratique médicale. *Astragalus* L., est l'un des plus grands genres de plantes à fleurs de la famille des légumineuses. En tant qu'herbes annuelles ou vivaces, sous-arbustes ou arbustes, les plantes d'*Astragalus* L. sont largement réparties dans les régions tempérées et arides. Le genre *Astragalus* est le plus grand de la famille des Fabacées, comprenant plus de 2 200 espèces réparties sur le globe [93],[94].

Le genre *Astragalus*, décrit pour la première fois par LINNE en 1753, est classé dans la sous famille des papilionacées et appartient à l'embranchement des spermatophytes, sous embranchement des angiospermes, classe des dicotylédones, sous classe des dialypétales [95].

### 4.2 Classification systématique de l'espèce

*Astragalus hamosus* L. appartient au règne des planteae, sous règne de viridiplantea, à l'ordre des Fabales, famille des Fabaceae, à la sous-famille de Papillonadeae, et au genre *Astragalus*.

Tableau 3: Classification d'*Astragalus hamosus*

Règne	Plantea
Sous-règne	Viridiplantea
Division	Les Trachiophyta
Classe	Les Magnoliopsida
Orde	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Papillonadeae
Genre	<i>Astragalus</i>
Espèce	<i>Astragalus hamosus</i>

### 4.3 Description botanique d'*Astragalus hamosus* L.

*Astragalus hamosus* L. appelée communément astragale à gousses en hameçons [96] ou encore Bousennara [97], a été signalée par Zouari (1987) en Tunisie et définie comme étant une plante liée aux sols bruns calcaires, aux marnes profondes ou superficielles de texture moyenne à fine, aux sols sablo-limoneux à limoneux profonds, aux alluvions de texture fine et de bonne structure à alcalis dans les étages de végétation subhumide à semi-aride à variante tempérée, douce et chaude [97].

*Astragalus hamosus*, est une plante annuelle d'un vert blanchâtre ramifiée à la base, couvertes de poils blancs symétriquement à légèrement asymétriquement bifurqués, à branches inférieures très courtes. Les tiges de 5–80 cm de long sont prostrées à ascendantes, densément ou rarement clairsemées de poils appliqués de 0,4 à 1 mm de long portant des feuilles de 3 à 16 cm de long avec un pétiole de 0,5–3 cm de long. Les folioles sont regroupées en 7–13 paires, étroitement ovales à étroitement obovales, plus rarement ovales à obovales, arrondies, tronquées ou émargées au sommet, glabrescentes en dessus et velues en dessous, partant toutes de la base de la plante. Les stipules sont blanchâtres membraneuses à verdâtres, d'une longueur de 3,5–9 mm, à base large

et longuement acuminée, exemptes de pétiole, situées nettement derrière la tige, souvent jusqu'au milieu, vaginées-connées, sur les bords et souvent couvertes de poils apprimés. Les fleurs sont d'un blanc jaunâtre, de 7 à 9 mm de long, groupées par 9-12 en grappes longuement pédonculées, d'abord serrées puis lâches, plus courtes que la feuille axillante. Les gousses sont cylindriques de 1-3 cm, à la fois glabrescentes, à sillon superficiel fortement arqué, à bec droit, portées sur un pédicelle réfléchi. Le calice est tubulaire, de 4-7 mm de long, librement à densément recouvert de poils courts apprimés noirs ou noirs et blancs ou parfois seulement blancs; dents étroitement triangulaires, 2-4 mm de long. L'ovaire est sessile, peu velu et le tube d'étamine est coupé obliquement à l'embouchure. La floraison se déroule entre avril et mai comme la majorité des plantes fourragères [98].

D'après Pottier-Alapetite, l'espèce *Astragalus hamosus* L. L. présente deux variétés botaniques :

- la variété *genuinus* Rouy., à gousses longues et recourbées en hameçons et à branches distales plus longues; elle est rencontrée dans toute la Tunisie quoique rare dans le Sud.
- la variété *brachycères* Ledeb., à gousses plus courtes, recourbées en demi-cercle et à branches subégales; Cette variété semble particulière et spécifique à la Tunisie centrale (Thyna).



Figure 12: *Astragalus hamosus* L. : partie aérienne [99]

#### 4.4 Caryologie d'*Astragalus hamosus* L.

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer le nombre de chromosomes des espèces d'*Astragalus*. Il s'avère que toutes les espèces d'*Astragalus* qui poussent en Amérique présentent des nombres de chromosomes aneuploïdes tandis que les espèces d'*Astragalus* qui poussent en Europe sont généralement des groupes euploïdes. Une étude plus récente a permis de déterminer le nombre de chromosomes chez des spécimens d'*Astragalus hamosus* L. comme étant de  $2n = 2x = 44$ . D'autres données ont permis de mettre en évidence un nombre de chromosomes différent ( $2n = 40, 42, 44, 46, 48$ ) rapporté chez des populations bulgares. L'ensemble de ces résultats indiquent clairement qu'*Astragalus hamosus* L. est une espèce aneuploïde et que de probables irrégularités mitotiques en sont la cause [100].

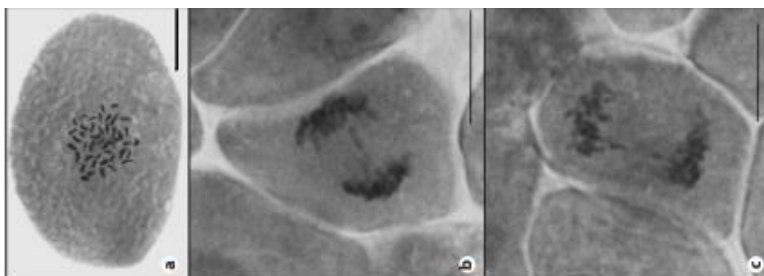


Figure 13 : Microphotographies des chromosomes de *A. hamosus* :  $2n = 44$ . a ; métaphase somatique ; b, c – ponts chromosomiques de la télophase.

#### 4.5 Métabolites secondaires d'*Astragalus hamosus* L.

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. Chez *Astragalus hamosus*, plusieurs types de métabolites secondaires sont extraits en fonction des organes tels que des saponines et des stérols au niveau des racines, de l'acide 3 nitropropionique au niveau des feuilles [101]. On trouve également au niveau de la plante des flavonols, notamment de l'hyperoside, de l'isoquercitrine, de l'astragaline et de la rhamnocitrine, 4'-beta-D-galactopyranoside, le glycoside 7-O-méthyl-kaempférol 4'-bêta-Dgalactopyranoside (rhamnocitrin 4'-bêta-D galactopyranoside), l'isoquercitrine et l'astragaline [102].

Tableau 4: métabolites d'*Astragalus hamosus*

Métabolites secondaires	Activités
4-O-D-galactopyranoside [102]	Hépatoprotecteur, Antioxydant Un effet antiprolifératif qui empêche le processus de carcinogénèse dans le foie Activité cytotoxique [103].
Astragaline (kaempferol-3-O-glucoside) [102]'	-
Isoquercitrin [102]	-
Hyperoside (quercetin-3-O galactoside [102]	-
Rutin	-
Falcosid C	-
Muritianin	-
Propinosid complanatosid	-
Rhamnocitrin (7-methylkaempferol)	Activité antioxydante Activité cytotoxique sur les tumeurs cérébrales et lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire [104].
Rhamnetin 3-O- glucoside	-
Quercetin-3- Robinobioside	-
Peregrinoside I + Azukisaponine V	Activités cytotoxiques sur plusieurs lignées cellulaires du cancer du sang : HL-60 (IC <sub>50</sub> =63,4 µg/mL), HL-60/Dox (IC <sub>50</sub> =25,3 µg/mL), SKW-3 (IC <sub>50</sub> = 84,2 µg/mL ), OPM-2(IC <sub>50</sub> = 116,5 µg/mL), U-266 (IC <sub>50</sub> =119,8 µg/mL) [104]
Extrait d' <i>Astragalus hamosus</i>	Activité cytotoxique sur la lignée MCF-7 du cancer du sein (IC <sub>50</sub> =253,2 µg/mL) [105]
Extrait d' <i>Astragalus hamosus</i>	Effet anti-angiogéniques sur les cellules HUVEC [106]. Les extraits d' <i>Astragalus hamosus</i> L. ont arrêté le cycle cellulaire des cellules HUVEC en phase G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>

## 5 Les molécules d'intérêt : Les saponines

### 5.1 Généralité : Chimie des saponines

Le nom « saponine » est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie « savon », car les molécules de saponine forment des mousses semblables à du savon lorsqu'elles sont mélangées avec de l'eau [107].

Les saponines sont largement distribuées dans les espèces végétales, étant signalées dans près de 100 familles. Ce sont des glycosides naturels que l'on trouve principalement, mais pas exclusivement dans le règne végétal. Ils sont constitués d'une unité non-glycosylée appelée aglycone, couplée à des chaînes glycosylées ou Glycone [108].

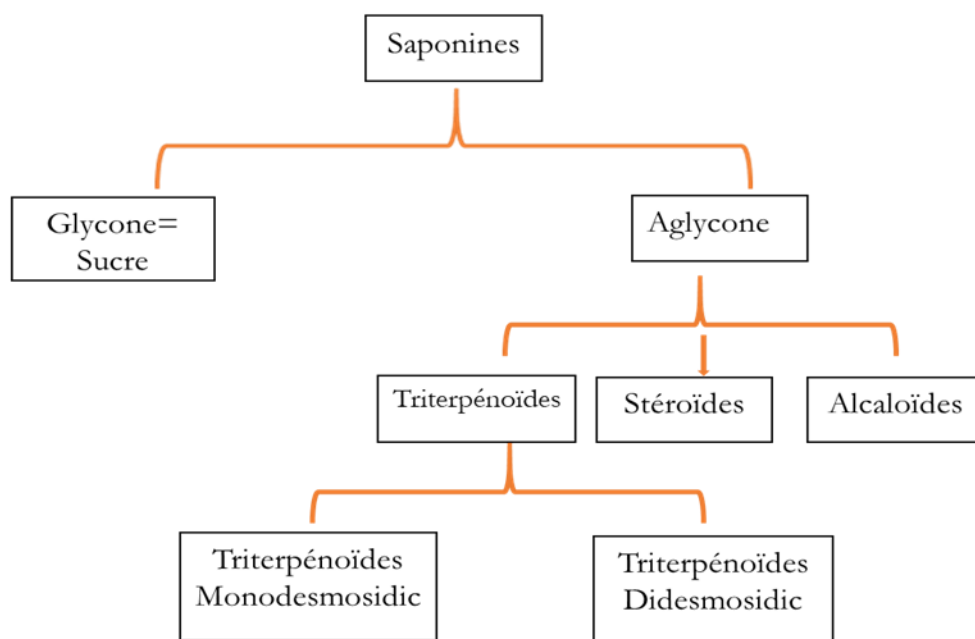


Figure 14: Classification des saponines

Les composés aglycones ou génine peuvent être divisés en plusieurs types triterpénoïdes ou stéroïdiens selon les différences de sapogénine : La sapogénine de la saponine triterpénoïde est un triterpène, alors que pour la saponine stéroïdienne c'est le spirostane [109].

Certains auteurs incluent également dans les saponines des glycoalcaloïdes stéroïdiens. Toutes les classes d'aglycones peuvent avoir un certain nombre de groupes fonctionnels (-OH, -COOH, -CH<sub>3</sub>) provoquant une grande diversité naturelle due uniquement à la structure aglycone. Plus de 100 stéroïdiens et probablement encore plus de sapogénines triterpéniques ont été identifiés [110]. Cette diversité peut être encore multipliée par la composition des chaînes de sucre, le nombre de sucres, les modèles de ramification et le type de substitution. Cette diversité structurelle et la large gamme de polarités qui en résulte rendent la détermination des saponines individuelles très difficile.

Les astragalosides I, II et IV, ainsi que les isoastragalosides I et II, représentent environ 80 % du total des saponines présentes chez l'astragale [111].

L'Astragaloside IV (AS-IV; C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>), une saponine à petite molécule isolée à partir des plantes d'*Astragalus* sp., exerce différents effets thérapeutiques sur la prévention des maladies neurodégénératives en raison de ses activités anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-apoptotiques [112].

Les espèces d'astragale sont une source de saponines de type cycloartane, dérivées du cycloarténol par oxydation en C-6, C-16, C-20, C-23, C-24, suivie d'éventuelles cyclisations avec formation d'un 20,24- époxyde (cycloastragénol ou cyclogalegénine) ou un 20,25-époxyde, ou un 16,24-20,24-diépoxyde (cycloalpigénine), ou un 16,23-16,24-diépoxyde (cycloorbigénine B). Environ 100 saponines principalement des dérivés de la forme 20(R), 24(S) du cycloastragénol [3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,25-tétrahydroxy-20(R),24(S)-époxy-9,19-cyclolanostane], (astragalosides ou astraversianines), et plus rarement des 20(S), 24(R) (cyclogalegénine), ont été isolées. Certaines espèces contiennent également des saponines de de type trihydroxyléan-12-ène. [113].

Les constituants biologiquement actifs connus des racines d'astragale représentent deux grandes classes de composés chimiques : les polysaccharides et les saponines [114]. Les polysaccharides d'astragale sont connus pour avoir des propriétés anticancéreuses et immunitaires dans des expériences in vitro et in vivo [115].

Des études chimiques sur les saponines d'astragale ont rapporté la présence de glycosides triterpénoïdes de type cycloartane qui se sont révélés exercer des activités biologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, diurétique, hypotenseur et sédatif [116].

### 5.1.1 Les cycloartanes :

À ce jour, plus de 140 saponines de type cycloartane provenant de différentes espèces d'astragale ont été identifiées. Les cycloartanes sont constitués de 9 $\beta$ ,19-cyclolanost-24-ène-3-ole substitué par des groupes hydroxyliques à différentes positions. Tous sont des dérivés cycloarténoliques oxydés à des positions distinctes (principalement C-6, C-16, C-20, C-23, C24) et cyclisés en 20,24-époxyde (cycloastragénol, cyclogalegénine) ou en 20,25 -époxyde (Polat et al., 2010) [116]. En plus de ces squelettes, des sapogénines rares ont également été rapportées, comme le 16,24, 20,24-diépoxyde (cycloalpigénine) (Bian et al., 2006) [117] et le 16,23-/16,24-diépoxyde (cycloorbigénine B), 1 (Mamedova et Isaev, 2004) [118]. Les principaux fragments de sucre substitués sont le  $\beta$ -D-glucopyranosyle, le  $\beta$ -D-xylopyranosyle, l' $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle et l' $\alpha$ -L-arabinopyranosyle. De plus, les fragments  $\beta$ -D-fucopyranosyl,  $\beta$ -D-glucuronopyranosyl et  $\beta$ -D-apiofuranosyl sont également présents dans les glycosides de cycloartane isolés du genre *Astragalus* (Li et al., 2014) [119].

L'un des principaux constituants bioactifs de l'astragale est l'astragaloside (AST), qui se distingue par la présence de fractions de glucose couplées en 3, 6 et/ou 25 avec une formule moléculaire C<sub>14</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>.

De plus, une variété de composants structurellement uniques (par exemple, AST I-IV) a été identifié dans les saponines totales d'*A. membranaceus*, qui ont longtemps été largement utilisées dans la MTC, et l'ASIV est considéré comme le principal constituant actif (Lee et al. , 2013 [120]). Parmi les types de triterpénoïdes cycloartanes, 5 saponines majeures constituent plus de 80 % de la teneur totale en saponines, notamment les astragalosides I, II et IV et les isoastragalosides I et II (Liu et al., 2017b) [121] .

### 5.1.2 Les Oléananes

Bien que plusieurs centaines de triterpénoïdes de cycloartane aient été identifiées, un nombre limité de saponines oléananes a également été extrait d'astragale sp. Quatre principales sapogénines ont été caractérisées sur la base du squelette aglycone : le soyasapogénol B (le plus courant), l'azukisapogénol, l'épikudzusapogénol et la camplogénine. Les caractérisations

structurales de ces saponines ont montré qu'elles étaient remplacées par un groupe  $\beta$ -hydroxyméthyle au lieu d'un groupe méthyle en position C-23. Les squelettes aglycones ont un site de glycosylation en C-3, qui est constitué d'acide glucuronique et se lie fréquemment à un trisaccharide comme le rhamnose et les pentoses (arabinose ou xylose). Cependant, le deuxième site de glycosylation dans la saponine bidesmosidique est plus visible en C-22 et parfois en C-29. Zhang et al. 2016 [122] ont rapporté que six saponines oléananes caractérisées par une oxydation en C-29 et une cétone en C-22 ont été extraites d'*A. membranaceus*. De plus, quatre saponines oléananes non décrites auparavant, les astraisoolesaponines A1, A2, A3 et B ont été purifiées à partir du système de pousses d'*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [123].

#### 5.1.2.1 Soyasaponine

Les saponines de soja se trouvent dans le soja (*Glycine max*) et d'autres légumineuses, comme les lentilles (*Lens culinaris*) et les pois verts (*Pisum sativum* L). Les soyasaponines sont des glycosides triterpénoïdes oléananes amphiphiles avec des chaînes de sucre polaires conjuguées à un cycle pentacyclique non polaire [124] et sont généralement classés en quatre principaux groupes selon leurs aglycones (soyasapogénols) : groupes A, B, E et DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-méthyl-4H pyran-4-one). Les saponines de soja du groupe A sont caractérisées comme ayant un groupe hydroxyle en C-21 et deux fractions de sucre fixé séparément aux positions C-3 et C-22 de soyasapogénol A, avec un composé exceptionnel, A, qui contient une fraction de sucre à C-3. En plus d'un départ résidu glucoronyle, la chaîne latérale C-3 a un ou deux autres résidus de sucre, et le fragment sucre C-22 contient deux sucres résidus : un arabinosyle de départ et un xylosyle ou glycosyle.

Les saponines de soja du groupe A peuvent être regroupées en formes acétylées et désacétylées. Les saponines de soja du groupe B diffèrent de ceux du groupe A par la présence d'un atome d'hydrogène en C-21 et un seul sucre en position C-3 de soyasapogénol B, à l'exception de trois soyasaponines qui, en plus de la chaîne de sucre C-3, contiennent une fraction de sucre à C-22.5. Les soyasapogénols A, B et E ne sont pas présents naturellement mais peuvent être formés par une hydrolyse acide ou bien alcaline des saponines de soja et peuvent donc exister dans des produits à base de soja. Les soyasapogénols C et D peuvent résulter de l'hydrolyse acide du soyasapogénol B et ne sont pas de véritables aglycones des saponines de soyasapogénol B [125].

Généralement, les plantes stockent les saponines sous forme de glycosides, généralement sous forme bidesmosidique, qui peuvent être hydrolysées en formes monodesmosidiques et il a été rapporté que ce changement de bidesmosidique à monodesmosidique améliore la bioactivité des saponines [126].

##### 5.1.2.1.1 Soyasaponines et cancer :

Les rôles des soyasaponines dans l'inhibition du cancer sont présentés de manière synthétique dans le tableau ci-dessous :



Tableau 5: Tableau récapitulatif des effets des soyasaponines sur le cancer

Lignée cancéreuse	Saponines	Observations/Mécanismes d'inhibition de la prolifération des cellules malignes / CI50	Références Bibliographiques
MCF-7(cancer du sein)	Soyasaponin I		[127]
HCT-15(cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Formation de vésicules cytoplasmiques et déformation du plasma et de la membrane nucléaire. Inconnu, peut-être dû à l'interaction membrane cellulaire et les saponines.	[128] [129]
HCT-15(cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Supprime la prolifération dose-dépendante et provoque la macroautophagie induite à 100 µg/mL après 24 h. Cellules retardées en phase S du cycle cellulaire.	[130]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Suppression de l'activité PKC et induction de la différenciation.	[131]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponine du groupe B	Régulation à la baisse de l'expression de la COX-2 et de la PKC.	[132]
HT-29 (cancer du côlon)	Soyasaponin I Saponine III Soyasapogénol B	Soyasaponin I n'est pas actif sur la lignée HT-29. Saponine III supprime la croissance à 50 µg/mL après 72 h. Le sapogénol B montre une suppression dose-dépendante de 6 à 50 µg/mL après 72 h. La suppression de la croissance cellulaire est intensifiée avec l'augmentation de lipophilie. (Sapogénol B > Saponine III > Saponine I).	[133]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélange Groupe-B soja saponine	Diminution de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante, suppression de l'activité PKC.	[134]
HT-29	Soyasapogénol A et Soyasapogenol B	Suppression de la prolifération de la lignée HT-29.	[133]
Caco-2	Soyasaponin I Soyasapogénol B	La soyasaponine I n'a eu aucun effet sur la viabilité cellulaire Le soyasapogénol B a significativement réduit la viabilité cellulaire à 230 et 1375 µg/mL après 4 h.	[135]
Caco-2	Mélanges des Soyasaponine du groupe B Soyasapogénol B	Les saponines de soja du groupe B n'ont eu aucun effet sur La croissance cellulaire. Le soyasapogenol B a considérablement réduit la croissance cellulaire à 25, 50 et 100 µg/mL.	[136]
HCT-116 (cancer du côlon)	Soyasaponine I	CI50=161,4 µM Les résultats ont indiqué que l'effet de la soyasaponine I sur HCT116 pourrait être exercé en influençant le métabolisme des acides aminés et la voie de signalisation des œstrogènes.	[137]
Héla	Soyasaponine II	le SS-II pouvait inhiber efficacement la prolifération des cellules Hela et présentait des manières évidentes dépendantes de la concentration et du temps à des concentrations de 100 à 800 µg/mL.	[138]
Hela	Extrait totale de sojasaponine	CI50= 0,6 µg/mL L'extrait totale de sojasaponine a réduit la croissance cellulaire par l'induction de l'apoptose.	[138]
Hep-G2 (carcinome hépatocellulaire)	Soyasapogénol A et Soyasapogénol B	Déclenchent la mort cellulaire apoptotique. Les CI50 ont été déterminées comme étant de 0,05 ± 0,01 µg/mL pour le soyasapogenol A et de 0,13 ± 0,01 µg/mL pour le soyasapogenol B.	[139]

#### 5.1.2.1.2 Autres activités des Soyasaponines [125]

Les activités biologiques des soyasaponines sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6: Activités biologiques des soyasaponines

Soyasaponines	Effet biologique	Mécanismes
Soyasaponines totales	anti-inflammatoire	Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ , MCP-1, PGE2, NO, COX-2 et iNOS.
	antimutagène	Inhibition de la mutagénicité induite par l'aflatoxine B <sub>1</sub> en éliminant les électrophiles.
		Inhibition la formation d'adduits à l'ADN induits par l'aflatoxine B <sub>1</sub> .
	hépatoprotecteur	Diminution de la peroxydation des lipides dans le foie.
Protéger l'intégrité de la membrane plasmique ; augmenter la capacité de régénération du foie; Activer le système. Antioxydant hépatique; prévenir la nécrose, l'inflammation.		
Diminuer les teneurs sériques en NO et ROS.		
Soyasaponine Ac	anti-inflammatoire	Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ , PGE2, NO et IL-1 $\beta$ , et la liaison du LPS au TLR4.
		Inhibition le raccourcissement du côlon, l'activité de la myéloperoxydase, l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS et TLR4.
Soyasaponine A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	anti-inflammatoire	Diminution TNF- $\alpha$ , NO. et d' iNOS
	Hépatoprotecteur	Diminution la peroxydation des lipides dans le foie.
	adjuvant	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1
Soya saponines A <sub>3</sub>	anti-inflammatoire	inhiber l'expression induite par le TNF- $\alpha$ d'ICAM-1.
	hépatoprotecteur	Protection contre la cytotoxicité induite par l'aflatoxine B <sub>1</sub> .
		Réduire le nombre de cellules inflammatoires infiltrantes dans le foie et les corps apoptotiques .
	antiviral	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponine B + E + DDMP	antimutagène	Inhibition des dommages à l'ADN induits par l'interception de molécules réactives.
	protecteur cardiovasculaire	Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase.
		Augmenter l'excrétion fécale des acides biliaires totaux et des stérols neutres.
Soyasaponine I	anti-inflammatoire	Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2, NO, COX-2 et iNOS .
		Activité anti complémentaire
		Inhiber le raccourcissement du côlon, l'activité de la myéloperoxydase, l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, PGE2 et IL-6
	hépatoprotecteur	Protection contre les lésions hépatiques immunologiques.
		Diminution la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	protecteur cardiovasculaire	Inhibition de l'activité de la rénine.
		Réduction de la pression artérielle.
	antimicrobien	Inhibition de la croissance.
	antioxydant	Piégeage des radicaux DPPH ; inhiber la peroxydation des lipides dans les liposomes.
adjuvant	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1.	
protecteur des reins	Réduire le poids des reins, la teneur en eau et les taux plasmatiques de créatinine et d'urée ; Entraver l'élargissement des reins et la croissance des kystes.	



Soyasaponine II	hépatoprotecteur	Diminuer la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	protecteur cardiovasculaire	Inhiber l'activité de la rénine.
	antiviral	Activité anti-HSV-1.
	adjuvant	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1.
Soyasaponine III		
	hépatoprotecteur	Diminuer la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	adjuvant	Stimuler les réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1.
Soyasapogénol B	anti-inflammatoire	Inhiber l'expression induite par le TNF- $\alpha$ d'ICAM-1.
	antimutagène	Inhiber les dommages à l'ADN induits par en interceptant les molécules réactives.
		Inhiber la prolifération.
	hépatoprotecteur	Protéger contre la cytotoxicité induite par l'aflatoxine B <sub>1</sub> . Augmenter le MLR (rapport lymphocyte/monocyte).
	antiviral	Activité anti-HSV-1.
sojasapogénol C	anti-inflammatoire	Inhiber l'expression induite par le TNF- $\alpha$ d'ICAM-1.
	antiviral	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponines E	protecteur cardiovasculaire	Inhiber l' $\alpha$ -glucosidase.
Sojasapogénol E	antiviral	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponine $\beta$ g	antioxydant	Piéger les radicaux O <sub>2</sub> <sup>-</sup> et DPPH.

## 5.2 Rôles et activités biologiques des saponines

La saponine est le principal type de constituant chimique du genre *Astragalus* [140]. L'utilisation principale de ce genre dans la médecine traditionnelle est due à son contenu et à sa teneur en saponine [94]. En effet, les saponines de type cycloartane et oléane qui en sont extraites ont montré des propriétés biologiques intéressantes. Comparés aux cycloartanes, les oléanes sont relativement rarement distribués au sein du genre [94], et les saponines de type oléane présentes dans les espèces d'astragale sont basées essentiellement sur le sojasapogénol B comme aglycone [94].

Elles agissent comme une barrière chimique ou un bouclier dans le système de défense des plantes contre les agents pathogènes et les herbivores [141].

La découverte des activités biologiques des saponines ne se limite pas seulement aux utilisations traditionnelles, mais plus récemment, également dans les applications pharmaceutiques [142]. Ces molécules ont des activités hémolytiques [131, 132] molluscicides, anti-inflammatoires, antifongiques ou anti-levures, antibactériennes ou antimicrobiennes, antiparasitaires, anti tumorales et antivirales [145], anticancéreuses [134, 135, 136], antioxydante [137, 138, 139] et comme adjuvant immunologique aussi [152].

Le ginsénoside Rg1 pourrait également améliorer les déficits de mémoire induits par la scopolamine en inhibant l'activité AChE [153].

Les kalopanaxsaponines A et B améliorent en partie les déficits de mémoire en inhibant l'activité AChE [154]. L'administration orale de soja-I a montré des effets significatifs d'amélioration de la mémoire dans les tests d'évitement passif, de labyrinthe en Y et de labyrinthe aquatique de Morris [155].

Chez *Astragalus glycyphyllos*, une nouvelle saponine a permis de bloquer l'expression de l'enzyme impliquée dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [156].

Chez *Astragalus glycyphylloides*, l'administration de saponines a montré un effet neuroprotecteur significatif dans un modèle de stress oxydatif [157].

La saponine triterpénoïde de type oléanane de *Momordica cymbalaria* a montré également une activité neuroprotectrice [158].

Les saponines totales de *Dipsacus asperoides* (tSDA) exerçaient une action neuroprotectrice et ces molécules tSDA protégeaient les neurones contre la toxicité de A bêta, très probablement en soulageant le stress oxydatif ou en inhibant le processus de A bêta, induisant la génération de radicaux libres [159].

Plusieurs études ont rapporté les potentiels neuroprotecteurs des saponines. Récemment, la sarsasapogénine isolée d'*Asparagus racemosus* a été signalée comme inhibant les cholinestérases (AChE IC 50 9,9  $\mu$ M, BChE IC 50 5,4  $\mu$ M), l'enzyme de clivage bêta-amyloïde 1 (BACE1) et les enzymes monoamineoxydase-B (MAO-B) de manière dose-dépendante.

Cette saponine a inhibé la fibrillation de l'amyloïde bêta (A $\beta$  42) jusqu'à 68 % à une concentration de 40  $\mu$ M [160]. Il a été constaté que la théasaponine E1 inhibait l'hyperphosphorylation de tau et diminuait les niveaux d'A $\beta$  [161].

Chez *Astragalus hamosus*, un mélange de deux saponines, a montré une activité antinéoplasique aux seins de deux lignées cellulaires de carcinome (récepteur des œstrogènes MCF-7 (RE) positif et MDA-MB 231 - ER négatif) [104],[162].

Deux saponines de type oléanane, le Peregrinozide I et l'Azukisaponine V d'*Astragalus hamosus* L. ont montré une modulation dose-dépendante de la prolifération lymphocytaire dans 3 types de cancer, BC1 (cancer du sein humain), Lu1 (cancer humain cancer du poumon), Col2 (cancer du côlon humain) et LNCaP (cancer de la prostate humaine) [163].

L'importance des propriétés pharmacologiques des saponines, en particulier dans la lutte contre le cancer, a provoqué l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour faire face à la demande croissante [164].

### 5.3 Exemples de techniques d'analyses des saponines

Tableau 7: Techniques analytiques utilisées dans le criblage des saponines

Saponine	Formules brutes	m/z possible en SM	Précision sur SM	Référence
Sojasaponine Ab	C67H104O33	1436	UPLC-PDA-ESI/MS	Chang et al. (2010) [165] and Decroos et al. (2005) [166].
Sojasaponine ba	C48H78O19	958		Decroos et al. (2005) [166]
Sojasaponine bb (i)	C48H78O18	942		Decroos et al. (2005) [166]
Sojasaponine bc	C47H76O17	912		Decroos et al. (2005) [166]
Sojasaponine bd	C48H76O19	956		Decroos et al. (2005) [166]
Sojasaponine $\alpha$ g	C54H84O22	1084		Decroos et al (2005) [166], et Hu et al (2002) [167]
Sojasaponine $\beta$ g	C54H84O21	1068		Decroos et al. (2005) [166], et Hu et al (2002) [167]
Sojasaponine $\beta$ a	C53H82O20	1038		Decroos et al (2005) [166], et Hu et al (2002) [167]
Soyasaponine $\gamma$ g	C48H74O17	922		Decroos et al (2005) [166]
Soyasaponine $\gamma$ a	C47H72O16	892		Decroos et al (2005) [166]
Azukisaponine VI	C54H86O25	1134		Kinjo et al (1998) [168]
Azukisaponine IV	C48H76O20	972		Kitagawa et al (1983)
Azukisaponine II	C42H68O14	796		Kinjo et al (1998) [168] and Kitagawa et al. (1983) [169]
Azii	C54H82O23	1098		Iida et al (1999) [170]
Aziv	C54H84O22	1084		Iida et al. (1999) [170]
(Peregrinoside II)=cycloastragaoside d				Pistelli et al [171] Verotta et al [163]
Astragaloside I		869,4820 [M + H] +	HR-ESI-MS	Zhan et al, 2021 [172]
Astragaloside II		827,4715 [M + H] +	HR-ESI-MS	
Astragaloside III		785,4609 [M + H] +	HR-ESI-MS	

<b>Astragaloside IV</b>		785,4609 [M + H] +	HR-ESI-MS	
<b>Acétylastragaloside I</b>		911,4926 [M + H] +	HR-ESI-MS	
<b>Isoastragaloside I</b>		869,4820 [M + H] +	HR-ESI-MS	
<b>Isoastragaloside II</b>		827,4715 [M + H]	HR-ESI-MS	
<b>Astramembranine II</b>		623,4081 [M + H] +	HR-ESI-MS	
<b>Cyclosieversigénine</b>		491,3658 [M + H] +	HR-ESI-MS	
<b>17( R ),20( R )-3 β ,6 α ,16 β - trihydroxycycloartanyl-23-acide carboxylique 16-lactone 3-O- β -D- glucopyranoside</b>	C32H50O9	[M + H] + (à m/z = 579,3526, [M + Na] + (à m/z = 601,3341, [M + HCOO] - (à m/z = 623,3441,	HR-ESI-MS	Chkondrov et al 2020 [156]
<b>16β-acétyloxy-3- O - β - d - glucopyranosyloxy-cycloartan- 11α,24ξ,25-triol</b>	C 38 H 64 O 11	(M + H) + à m/z 697,4526 m/z 637,4315 correspond à la formule C36H61O9 suggérant la perte de la molécule CH3COOH . m/z 475,3787 (C 30 H 51 O 4475.3789) indique la perte d'acide acétique et d'hexose m/z 695 [M - H] -. 635 [M - H - CH 3 COOH] - correspond à la perte de l'acide acétique. m/z 473 [M - H - CH 3 COOH - 162] - correspond a la perte de l'acide acétique et l'hexose.	HR-ESI-Q-TOF-MS	Ahmad et al 2018 [173]

## 5.4 Techniques d'extraction des saponines conformément aux objectifs de recherche

### 5.4.1 Introduction

Les progrès récents dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matériel végétal ont été examinés de manière approfondie [174], [175] et cela pourrait être dû à la sensibilisation accrue du public aux soins de santé préventifs qui pourraient être promus par le biais de la consommation d'extrait de matière végétale. En général, les techniques d'extractions employées dans l'extraction des saponines peuvent être classées en deux catégories, **les technologies conventionnelles** et **les technologies vertes**. Les techniques d'extraction conventionnelles sont la macération, et l'extraction par reflux dont par soxhlet, et les technologies vertes sont l'extraction assistée par ultrasons, assistée par micro-ondes et accélérée par solvant vert (ASE) [176]. L'extraction conventionnelle repose sur la solubilité du soluté des matières végétales dans le solvant. Par conséquent, souvent un grand volume de solvant est utilisé pour extraire le soluté souhaité ainsi qu'une température élevée par chauffage ou bien une agitation mécanique, sont des paramètres qui favorisent l'extraction. D'autre part, les techniques d'extraction verte impliquent des produits chimiques plus responsables [174]. La conception des technologies d'extraction verte est régie par ces mesures. Par conséquent, l'eau est utilisée comme solvant d'extraction en manipulant la pression et la température du système d'extraction, comme dans l'extraction liquide sous pression. L'importance des saponines en tant que propriétés pharmacologiques, en particulier dans la lutte contre le cancer, a provoqué l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour faire face à la demande croissante. La figure 16 montre clairement que les chercheurs sont plus enclins à sélectionner les techniques d'extraction conventionnelles (70%), par rapport aux technologies vertes (30%), même si les techniques vertes utilisent un minimum de solvant. La sélection de ces méthodes est généralement régie par l'objectif de recherche des études menées. Pour analyser plus en détail les sélections de différentes techniques d'extraction faites par les chercheurs, le tableau 8 présente un aperçu des techniques d'extractions conformément à leurs objectifs de recherche. Pour l'isolement de nouvelles saponines et les études de propriétés pharmacologiques, les chercheurs utilisent les méthodes d'extractions conventionnelles. Cependant, dans les travaux axés sur les études de quantification et d'optimisation, les chercheurs visent des technologies d'extraction verte. Il convient également de noter que l'extraction assistée par ultrasons est la technologie d'extraction verte la plus sélectionnée dans les études de quantification, ce qui a donné une implication de sa capacité et de son efficacité à obtenir des rendements significatifs en saponine.

### 5.4.2 Techniques d'extraction conventionnelles

#### 5.4.2.1 Extraction par Macération

L'extraction par macération est une extraction solide-liquide où le composé bioactif (soluté) à l'intérieur du matériel végétal est extrait en trempant le matériel végétal dans un solvant spécifique pendant une période de temps [177]. L'efficacité du processus de macération est déterminée par deux facteurs principaux, la solubilité et la diffusion efficace. La solubilité est régie par la règle de base du « comme se dissout comme » qui indique que les composés polaires se dissolvent dans les solvants polaires et que les composés non polaires se dissolvent dans les solvants non polaires

[178]. Le taux de dissolution d'un soluté dans le solvant d'extraction est déterminé par le taux de transfert de masse d'un soluté de la matière végétale au solvant [177]. En raison du gradient de concentration à l'interface solide-liquide, le transfert du soluté à l'intérieur du matériel végétal se produit montrant qu'une diffusion efficace a lieu [177]. Aucun ustensile et équipement compliqués ne sont nécessaires pour la mise en place d'un système d'extraction par macération qui en a fait un outil de choix pour les chercheurs. Le seul facteur primordial auquel il faut prêter attention pour améliorer l'extractabilité est la connaissance de la similitude de l'intérêt des composés bioactifs pour le solvant et de sa polarité. L'éthanol et le méthanol étaient les solvants d'extraction utilisés pour extraire les saponines du matériel végétal, et l'éthanol préféré probablement en raison d'un souci de respect de l'environnement. La durée du temps d'extraction est longue, par conséquent, l'extraction par macération est souvent aidée par une agitation mécanique [161, 162], ou agitation magnétique pour raccourcir le temps d'extraction [181].

#### 5.4.2.2 Extractions à reflux et Soxhlet

En raison du principe de fonctionnement similaire des extractions Soxhlet et reflux, la discussion est menée sous le même sous-titre. La seule différence entre le reflux et le Soxhlet est que l'appareil Soxhlet comporte une cartouche permettant de loger le matériel végétal. L'extraction par reflux et Soxhlet implique un processus de distillation largement utilisé dans l'industrie et les laboratoires alimentaires et non alimentaires. Le processus consiste à chauffer une solution à ébullition, puis à renvoyer les vapeurs condensées dans le ballon d'origine [182]. L'éthanol est généralement le solvant le plus utilisé dans l'extraction par reflux.

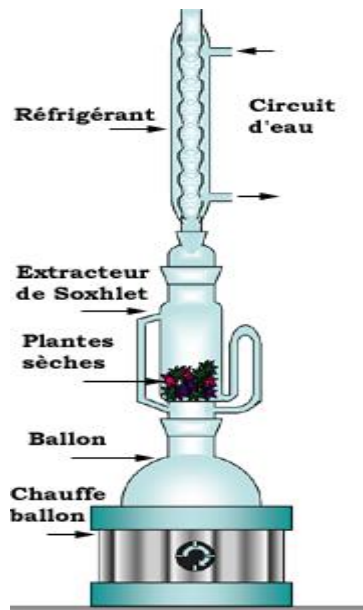


Figure 15: Appareil SOXHLET [183]

#### 5.4.2.3 Extraction SEBSQUENT

De nombreuses études ont été menées sur l'extraction des saponines à l'aide de deux méthodes d'extraction successives. Le but de l'utilisation de deux méthodes d'extraction consécutives est de permettre une purification de l'extrait avant de le soumettre à une analyse HPLC pour l'isolement et l'identification d'une saponine à partir du matériel végétal. Pour la méthode subséquente au Soxhlet et au reflux, l'extraction au Soxhlet est d'abord effectuée pour éliminer les lipides du matériel végétal à l'aide d'un solvant tel que le chloroforme [166, 167] et l'hexane [186].

### 5.4.3 Technologies d'extraction vertes

#### 5.4.3.1 L'extraction assistée par ultrasons

Le phénomène des ultrasons en créant des bulles de cavitation dans le solvant en agissant comme un micro-jet pour dénaturer la paroi cellulaire de la plante entraîne un rendement d'extraction plus important des composés bioactifs. Peu de chercheurs ont examiné l'effet des ultrasons sur les propriétés technologiques et la bioactivité des aliments [187] et les applications de l'extraction assistée par ultrasons sur les principes bioactifs des herbes [188] de l'industrie alimentaire et de la transformation [189]. Bien que l'extraction assistée par ultrasons soit couramment utilisée pour de nombreuses extractions de composés bioactifs [172, 173], seuls quelques-uns font état de l'extraction de saponine .

#### 5.4.3.2 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes avec une gamme de fréquences de 0,3 à 300 GHz [158, 159]. Récemment, le MAE a attiré l'attention sur l'extraction de composés bioactifs à partir de matériel végétal en raison du temps d'extraction court, de l'utilisation minimale de solvant et de son mécanisme de chauffage spécial [176]. Les applications récentes du MAE de métabolites secondaires végétaux tels que les flavonoïdes, les quinones, les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les saponines ont été examinées [192]. Les micro-ondes sont capables de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec des molécules polaires telles que l'eau à l'intérieur des matériaux. La profondeur de pénétration des micro-ondes dans la matrice végétale dépend de la constante diélectrique, de la teneur en humidité, de la température et de la fréquence du champ électrique [193]. L'eau contenue dans une matière végétale est responsable de l'absorption de l'énergie micro-ondes qui a entraîné un surchauffe interne et une perturbation de la structure cellulaire, et par conséquent, facilite la diffusion de composés bioactifs à partir de la matrice végétale [177]. L'efficacité du MAE repose sur l'effet des micro-ondes sur le solvant d'extraction et la structure cellulaire de la matrice végétale [177].

Bien que l'application potentielle de l'extraction par micro-ondes pour les flavonoïdes ait été examinée de manière approfondie [194], seuls quelques travaux d'extraction de saponine utilisant le MAE ont été mentionnés dans la littérature [175, 176] .

#### 5.4.3.3 Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'extraction accélérée par solvant a été considérée comme une technique verte dans la préparation d'échantillons de matériel végétal avant l'analyse chromatographique [156, 158]. Cette technique a été introduite par Dionex Corporation en 1995. Elle est également connue sous le nom d'extraction liquide sous pression, d'extraction de solvant sous pression et d'extraction de solvant améliorée. Parfois, on parle d'extraction d'eau chaude sous pression, d'extraction d'eau sub-critique ou d'extraction d'eau surchauffée, lorsque l'eau est utilisée comme solvant [197]. Il s'agit d'une technique d'extraction rapide automatisée qui utilise un minimum de solvant à température et pression élevées. Le mérite de l'utilisation d'une température accrue est d'améliorer la solubilité et le transfert de masse du soluté au solvant, et une pression élevée maintient le solvant en dessous de son point d'ébullition, permettant une extraction rapide, sûre et efficace des analytes cibles des

matières végétales dans le solvant d'extraction [198]. Un processus d'extraction est généralement terminé en 15 à 25 minutes en utilisant seulement 15 à 45 mL de solvant. Par conséquent, elle a été largement appliquée dans les domaines de la recherche environnementale, alimentaire, polymère et pharmaceutique.

L'ASE comprend deux configurations principales, à savoir les instruments statiques et dynamiques [197]. La configuration statique est le remplacement du solvant entre les cycles si le processus d'extraction consiste en un ou plusieurs cycles d'extraction. Une pompe haute pression est nécessaire pour pomper le solvant d'extraction à travers le récipient d'échantillon en continu dans la configuration dynamique. Les paramètres affectant l'efficacité de l'ASE sont la température, la pression, le type et la composition des solvants, des modificateurs et des additifs, la composition de la matrice et le mode d'extraction [199]. La température et la pression de fonctionnement les plus couramment appliquées pour l'ASE sont de 100 °C à 1500 psi [198]. Bien que l'ASE soit une technologie verte dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matières végétales, l'application dans l'extraction de saponine est encore rare. Worth a noté que cette méthode est principalement utilisée pour extraire le ginsénoside du ginseng [180, 181, 182, 179] et cela pourrait être dû à la valeur précieuse du produit.

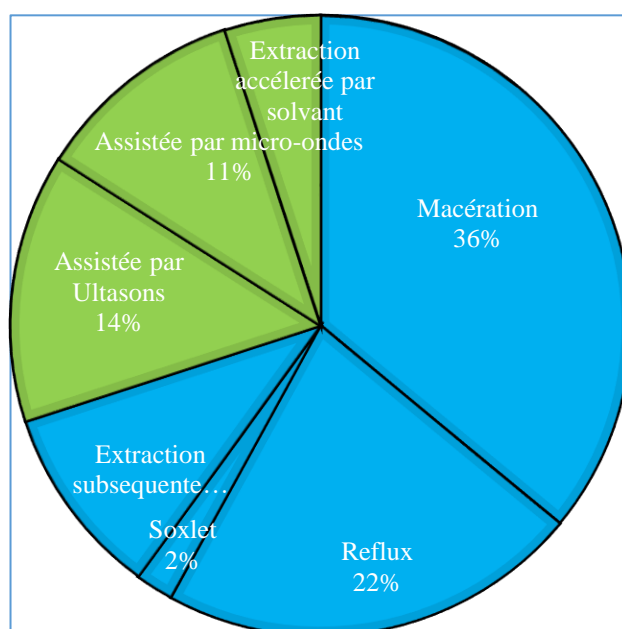


Figure 16: Techniques d'extractions actuelles utilisées pour l'extraction des saponines à partir de matières végétales [164]



Tableau 8: Choix de technique d'extraction selon l'objectifs scientifique

Plante	Techniques d'extractions des saponines	Solvant	Objectifs d'extraction des saponines	Références
<i>Caulophyllum thalictroides</i>	Sonication.	MeOH	Comparer les performances chromatographiques de la HPLC et de l'UPLC dans la détermination des saponines des racines.	B. Avula et al [203]
<i>Chiococca alba</i>	Extraction assistée par Ultrason	EtOH	Isoler cinq saponines triterpénoïdes des racines. Étudier leurs activités inflammatoire in vitro	R. M. Borges et al [204]
<i>Bacopa monnier</i>	Sonication (10 min).	MeOH	Séparer et isoler les saponines triterpénoïdes	M. Ganzera et al [205]
<i>Platycodi Radix</i>	Sonication (10 min).	H <sub>2</sub> O MeOH	Déterminer et quantifier dix saponines majeures	Y. W. Ha et al [206]
<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	Extraction assistée par Ultrason	MeOH	Déterminer le contenu en saponines	X.-Y. Lian et al [207]
<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> , <i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	Sonication (30 min).	MeOH	Isoler et quantifier les saponines stéroïdiennes.	T. Zhang et al [208]
<i>Panax notoginseng</i>	Extraction assistée ultrasons pendant 20 min	MeOH	Analyser les saponines dans <i>P. notoginseng</i> cru et cuit à la vapeur	A.-J. Lau et al [209]
<i>Genista ulicina</i> Spach	Macération	MeOH	Caractériser les saponines de neuf espèces différentes de Légumineuses à l'aide de l'UPLC	N. Boutaghane et al [210]
<i>Panax notoginseng</i>	Macération	EtOH	Étudier les mécanismes des effets anti-hyper glycémiques et anti-obésité des saponines de <i>Panax notoginseng</i> (PNS) chez les souris KK-Ay.	C. Yang et al [211]
<i>Entada phaseoloides</i> L	Macération	EtOH	Évaluer les effets thérapeutiques potentiels des saponines totales d' <i>Entada phaseoloides</i> contre le diabète de type 2.	Zhang et al [192]
Espèces légumineuses	Macération	MeOH	Caractériser les saponines de neuf espèces différentes de Légumineuses à l'aide de l'UPLC	T. J. Ha et al [212]
Guar meal	Extraction par reflux	MeOH	Isoler l'extrait riche en saponine. Pour évaluer ses fractions pour les activités hémolytiques et antibactériennes contre deux bactéries à Gram positif.	S. M. Hassan et al [143]
<i>Panax japonicus</i>	Extraction par reflux	EtOH	Étudier les effets cardioprotecteurs des saponines.	He et al [213]
<i>Momordica charantia</i>	Extraction par reflux	EtOH	Étudier leur activité anti-VIH in vitro Étudier deux classes de saponines, à savoir les triterpénoïdes de type cucurbitane et oléanane, pour le potentiel de réduire la viabilité des pré adipocytes, l'accumulation de lipides et l'expression de l'adiponectine dans les cellules 3T3-L1	Chen et al [214]
<i>Aralia taibaiensis</i>	Extraction par reflux	EtOH	Isoler quatre nouvelles saponines triterpénoïdes. Étudier leurs activités anti oxydantes et antiglycation.	Bi et al [215]
<i>Medicago sativa</i> var. Boja	Extraction par reflux	MeOH	Déterminer la présence de saponines individuelles	Oleszek et al [216]

## 5.5 Techniques d'extraction des saponines chez des Astragales

Le tableau ci-dessous recense différentes techniques d'extraction utilisées pour l'identification des saponines chez les astragales.

Tableau 9 :Techniques d'extraction des saponines chez les Astragales

Plante	Partie utilisée	Solvant	Saponines identifiées	Nature chimique	Technique d'extraction	Références
<i>Astragalus Hareftae</i>	Plante entière	Hexane MeOH	5 (Hareftoside A-E)	Triterpénoïde (4 cycloartane et 1 oleanane)	Extraction par reflux	Haro et al [217]
<i>Astragalus Glycyphyllo</i>	Racine 160 g	éther de pétrole, MeOH H <sub>2</sub> O	(Askendoside C) (Askendoside F)	Triterpène glycoside	Percolation	Linnek et al [218]
<i>Astragalus sempervire</i>	Racine (320 g)	MeOH / H <sub>2</sub> O	3-O- $\alpha$ -L- (Trojanoside H)	Cycloartane	Macération	Linnek et al [218]
<i>Astragalus gombo</i>	P.A 1 kg	EtOH/ H <sub>2</sub> O	Gombosides A–F.	Cycloartane : triterpène glycosides	Macération	Maamria et al [219]
<i>Astragalus tephrosioides-</i>	P.A (20 kg)	MeOH	1 saponine 6 $\beta$ -acétyloxy-3-O- $\beta$ -d-glucopyranosyloxy-cycloartan-11 $\alpha$ , 24 $\xi$ , 25-triol	Cycloartane glycoside	Sans précision	Ahmad et al [220]
<i>Astragalus Membranaceu</i>	Racine (549 g)	MeOH BuOH	5 saponines Agroastragaloside I et 4 astragalosides connus, l'astragaloside I, II, III et IV (identifiées aussi chez <i>A. mongholicus</i> )	Cycloartane glycoside : triterpénoïde	Extraction par à reflux	M.Hirotani et al [221]
<i>Astragalus caspicus</i>	Racine	MeOH BuOH	2 nouvelles saponines: Caspicuside I Caspicuside II 2 connues Cycloastragénol Astragaloside IV	Glycoside triterpénique: cycloartane	Macération	F.Fathiazad et al [222]
<i>Astragalus verrucosus Moris</i>	P.A (1100 g)	CHCl <sub>3</sub> MeOH EtOAc BuOH	1 nouvelle saponine- astraverrucine VII cycloaraloside D (peregrinoside II)	Triterpène glycoside de type cycloartane	Soxhlet	I.Pistelli et al [171]
<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> et <i>A. membranaceus</i>	Racine(150 g)	MeOH HCOOH	Nouvelles Astragalosides	tritérpenique	Sonication	Li et al [223]

## 5.6 Méthodes analytiques utilisées pour l'identification des saponines chez les astragales

Diverses techniques analytiques utilisées pour l'identification des saponines chez les astragales sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10: Exemples de techniques d'analyses utilisées et d'activités biologiques étudiées chez le genre *Astragalus*

Techniques analytiques	Saponines identifiées	Activités biologiques	Test Biologique	Références
Couplage HPLC/QTOF-MS TLC et HPLC	Astragalosides de I à V. Astragalosides I et IV	1 Protection du système cardiovasculaire 2 Antitumorales 3 Hépatoprotectrices	1 in vivo : modèle souris In vitro : Test histopathologique 2 in vivo : modèle murin. in vitro : test de cytotoxicité	C. Chu et al [224], Ma et al [225] Zhang et al [226], Kathy K et al [227]
HPTLC et RP-HPLC	Hareftosides A–D	Non mentionnées		Haro et al [228]
UHPLC-MS	Cycloartane : Askendoside C et oléanane : Soyasapogenol B et 3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,24-trihydroxyolean-12-ene-19-one	Antihypertenseur, diurétique, anti-inflammatoire, anti-tumoral, laxatif, expectorant, etc. antineoplasique		A.Shkondrov et al [229]
MPLC	Askendoside C (Askendoside F)	Non mentionnées		Linnek et al [134]
MPLC	Trojanoside H	Activité cytotoxique contre HCT 116 et HT-29 cancer du côlon humain		Linnek et al [218]
HPLC semi-préparative	6 nouveaux glycosides triterpéniques de type cycloartane :Gombosides A–F.	Non mentionnées		Maamria et al [219]
CCM HPLC	Un nouveau lacéioside glycoside de cycloartane	Non mentionnées		Ahmad et al [220]
HPLC-MS HPLC/ESI-MS/MS	Acétylstragaloside I, l'astragaloside I, l'astragaloside III et l'astragaloside IV, Mongholicoside A, Mongholicoside B	Non mentionnées		M.Hirotani et al [221], Yu et al [230]
LC – MS Chromatographie liquide sous vide (VLC)	Deux nouveaux glycosides de type cycloartane, le caspicoside I et le caspicoside II	<i>A. caspicus</i> Bieb est un remède contre un large éventail de maladies telles que la néphrite, le diabète, l'hypertension, la cirrhose, la leucémie et le cancer de l'utérus+activités		E. Graf et al [231]

Chromatographie préparative sur couche mince (PTLC)	+ deux saponines connues, le cycloastragénol et l'astragaloside IV.	antimicrobiens, anti-transpirants, anti-inflammatoires, diurétiques et toniques.		
TLC-MS	Un nouveau glycoside triterpénique de type cycloartane : astraverrucine VII. été +le cycloaraloside D (peregrinoside II) et le cycloaraloside C (astrailienine A).			Pistelli et al [171]
TLC Spectroscopie infrarouge HPLC RMN	Un nouveau triterpénoïde de type cycloartane, le 3β-acétoxy-9β,19-cyclolanost-24 E -ène-1α,16β-diol-27- O -β- d -glucopyranoside ( 1 )  Et 3 cycloartanes déjà identifiés (2-4)	Activité antifongique contre <i>Alternaria solani</i>		Guo et al [232]
TLC HPLC	Nouvelles saponines triterpéniques de type oléanane : 3β- O -[ O -4-oxo-pentopyranosyl-(1 → 2)-β l'acide -d-glucopyranosyl]-21α-hydroxy-yoléan-12-ène-28-oïque; acide 21α-hydroxyoléan-12-ène-28-oïque 3β-4-oxo-pentopyranoside et 19α-hydroxy-yoléan-12-ène-28, 21β-olide 3-β-d-xylopyranoside .	Non mentionnées		Mitcheva et al [233]
HPTLC	Azukisaponin v/Soyasapogenol B  Perigrinosid II	Modulation de la prolifération des lymphocytes [163].		Inkova et al [94], Nafti et al [234]  L. Verotta et al [163]

## 6 Évaluation des extraits et criblage des saponines par HPTLC

### 6.1 Les étapes d'une HPTLC

L'HPTLC est une technique séquentielle qui peut être entièrement automatisée. Elle implique plusieurs étapes (Figure 17). Les étapes clés sont la préparation de l'échantillon, l'application, le développement chromatographique et l'interprétation des résultats (identification/quantification). Des étapes optionnelles sont possibles : le choix et le nettoyage de la phase stationnaire, le pré conditionnement et la révélation pré/post chromatographique, et la documentation. [235].

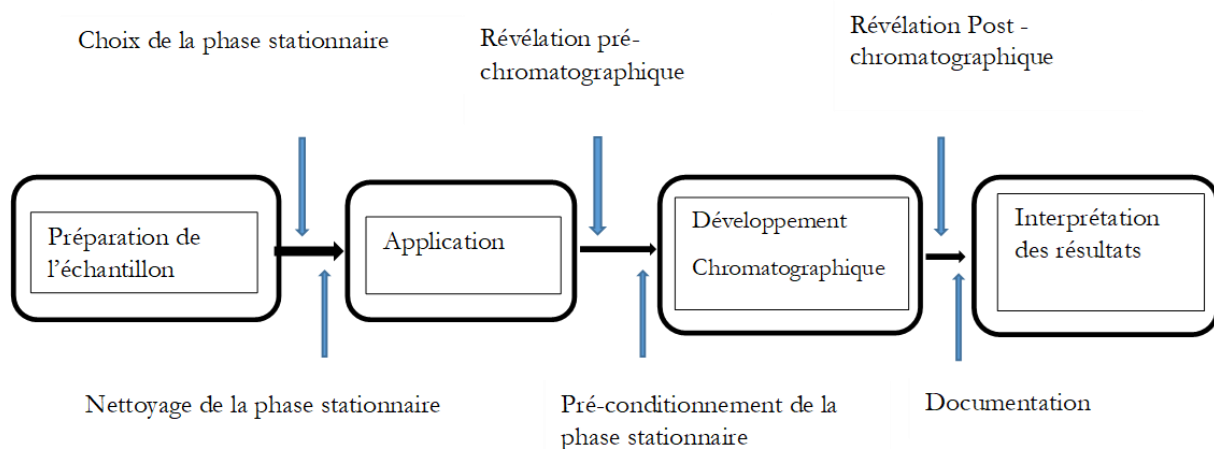


Figure 17 : Étapes d'une Analyse HPTLC

#### 6.1.1 Préparation des échantillons

L'échantillon collecté et considéré comme représentatif de l'objet de l'étude, est conservé de manière à en conserver les caractéristiques physiques et chimiques avant l'analyse. La plupart des échantillons ne sont pas directement applicables sur la plaque HPTLC et nécessitent donc une étape de préparation. Malgré tout, un des avantages de l'HPTLC est la robustesse de la phase stationnaire qui permet d'y appliquer des échantillons n'ayant subi que des préparations non chronophages comme par exemple : dilution, solubilisation, filtration, centrifugation ...

Dans certains cas, suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'analyse, un traitement préliminaire est utile afin de séparer la matrice de l'analyte lorsque sa présence risque d'interférer avec la détection. Cette étape peut être réalisée de différentes manières suivant la nature liquide ou solide de l'échantillon. De plus, une étape de concentration est nécessaire lorsque l'analyte recherché est dilué, notamment lorsqu'un large volume de solvant est utilisé pour l'extraction. Suivant la quantité d'échantillon et le type de composés désirés, la technique de concentration sera choisie : évaporateur rotatif, concentrateur de type Kuderna-Danish (concentrateur permettant une évaporation du solvant sans conduire à la perte de la majeure partie des composés volatils), évaporation sous flux d'azote... Les techniques d'extraction et d'isolement communément employées lors de la préparation d'échantillon sont détaillées dans le chapitre suivant : L'HPTLC et l'étape de la préparation d'échantillon [236]. Dans tous les cas la procédure idéale doit être rapide, simple, répétable et reproductible, et sans conduire à la perte d'analyte(s). Le solvant choisi ne doit pas contenir ou former d'artefact, avoir une faible toxicité, être économique et facilement évaporable.

### 6.1.2 Le dépôt

L'application est une étape déterminante pour la qualité du résultat chromatographique et nécessite donc de la rigueur et des conditions opératoires bien définies. Elle peut se faire manuellement ou automatiquement [237]. Lors d'une application manuelle, il est recommandé d'utiliser une micro-seringue, ou un capillaire de 1-2  $\mu\text{L}$  qui donnera un dépôt de 3-4 mm (Figure 18, A). Pour un meilleur résultat, il est important de ne pas endommager la phase stationnaire, si possible en évitant tout contact. Pour éviter toute dégradation, l'application peut être automatisée ou semi-automatisée : le remplissage de la micro-seringue s'effectue manuellement (Figure 18, B) ou automatiquement (Figure 18, C), puis est suivi par une application automatisée réalisée par vaporisation ou par contact (Figure 19) [238].

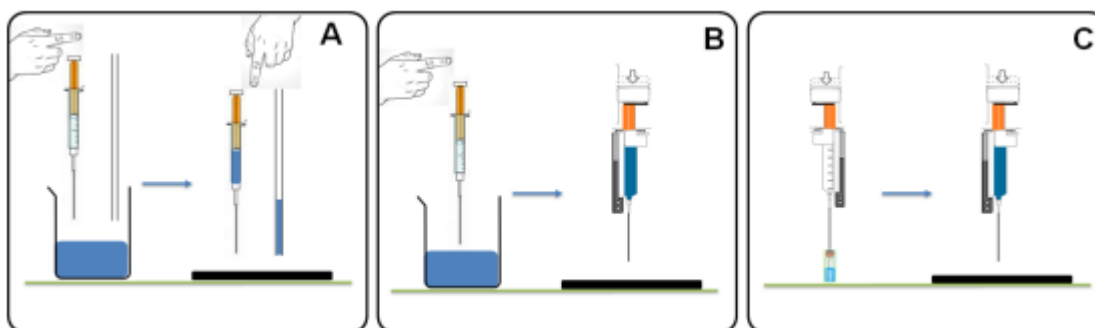


Figure 18: Schémas des différents modes d'application. A : remplissage de la seringue/capillaire et application manuels ; B : remplissage manuel et application automatisée ; C : remplissage de la seringue et application automatisés [239]

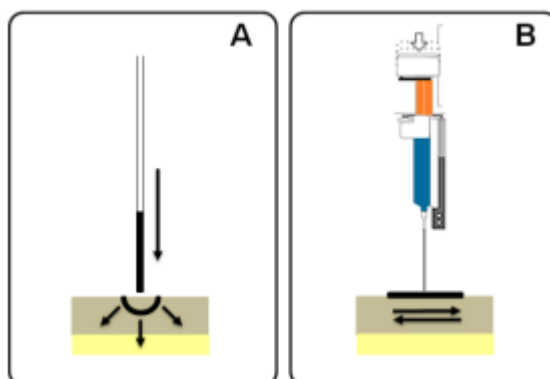


Figure 19: Schéma d'une application par contact (A) ou par vaporisation (B).

Lors de cette étape, trois paramètres sont déterminants : le volume d'application, l'état de la phase stationnaire et la zone d'application [240]:

- Le volume d'application doit être optimisé pour éviter un phénomène de saturation pouvant altérer le profil chromatographique
- La phase stationnaire ne doit pas être endommagée, ce qui induit l'utilisation préférentielle d'une application par vaporisation plutôt que par contact
- L'échantillon doit être appliqué de façon que la zone soit la plus fine possible afin d'éviter le phénomène de diffusion directement à la zone d'application. Pour une analyse qualitative, aucune séquence d'application n'est recommandée, mais pour l'analyse quantitative, il est recommandé d'appliquer deux fois toutes les solutions séparées par la moitié de la longueur de la plaque (Figure 20) [241]

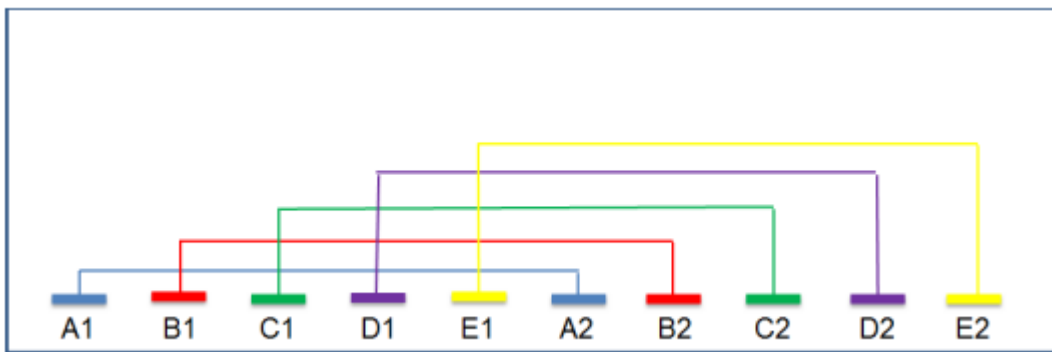


Figure 20: Exemple de dépôt

### 6.1.3 Le développement chromatographique

Cette étape consiste en la progression d'un solvant ou mélange de solvants (phase mobile) le long de la phase stationnaire. La migration du solvant entraîne la migration des substances appliquées [238]. Il existe une multitude de cuves conçues pour contrôler les paramètres influençant le développement chromatographique.

#### 6.1.3.1 Les cuves

Les cuves à fond plat (Figure 21) sont les chambres les plus simples. Elles sont utilisées avec ou sans saturation. Une fois la phase mobile versée au fond de la cuve, celle-ci est recouverte. Dès lors, la phase gazeuse se sature progressivement avec les vapeurs de la phase mobile. Au bout de quelques minutes, la partie inférieure de la cuve est complètement saturée, la partie médiane à 75 % et la partie supérieure beaucoup moins. Lorsque la plaque est placée à l'intérieur de la cuve, la phase stationnaire est directement mise en contact avec la phase gazeuse saturée et s'en imprègne. Simultanément, la phase mobile migre par capillarité le long de la phase stationnaire [235].

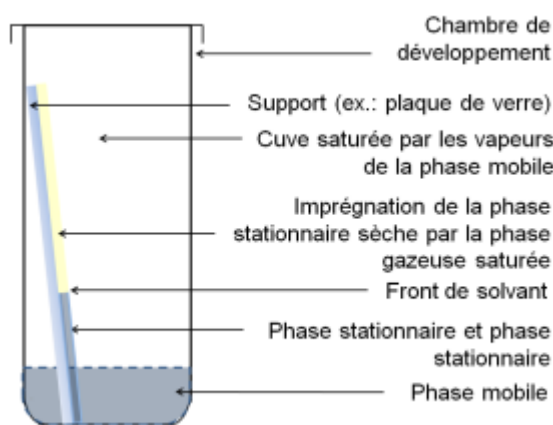


Figure 21: Présentation et fonctionnement d'une cuve à fond plat.

Il existe également des cuves à double fonds qui dérivent des cuves à fond plat par la création de deux espaces distincts. Cette modification permet d'utiliser la cuve de la même façon qu'une cuve à fond plat (Figure 22, A), mais permet également d'imprégner la phase stationnaire de vapeur de solvant (pré-conditionnement) (Figure 22, B), ou bien d'effectuer la migration dans une phase saturée de vapeur de solvant (Figure 22, C). En mode pré-conditionnement, le solvant est introduit dans un bac alors que la plaque est placée dans l'autre. La phase stationnaire est ainsi mise en contact pendant un temps défini avec les vapeurs [238]. L'utilisation d'une cuve à double fond dans les modes saturation et pré-conditionnement permet de rendre l'analyse plus reproductible.

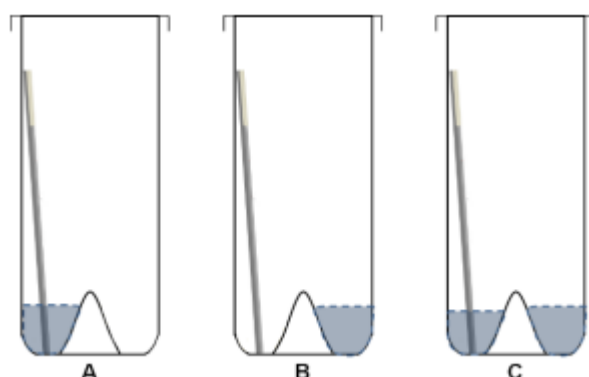


Figure 22: Exemples d'utilisation d'une cuve à double fond [239]

Les cuves horizontales, comme les deux cuves précédentes, peuvent s'utiliser avec ou sans saturation suivant l'utilisation d'une contre-plaque et d'un solvant placé dans le réservoir central (c.f. le mode « sandwich »). La phase stationnaire est placée face en bas, et la phase mobile est introduite dans les réservoirs. La lamelle est ensuite poussée avec la vis jusqu'à former un film capillaire le long de celle-ci. Ce film capillaire est par la suite transféré sur la couche (Figure 23). L'utilisation de cette cuve permet d'utiliser les deux cotés simultanément et ainsi doubler le nombre de dépôts (Figure 14)



Figure 23: Schéma d'une cuve horizontale

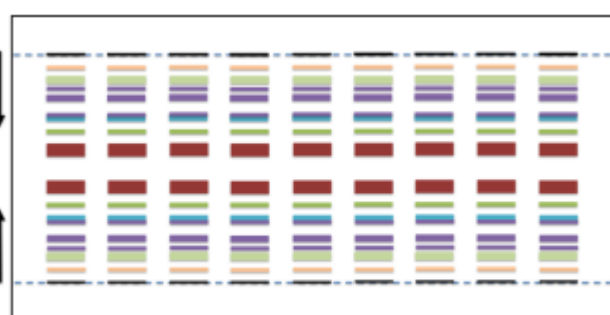


Figure 24: Résultat d'une utilisation des deux côtés d'une cuve horizontale

Dans la lignée des cuves horizontales, il existe les cuves Vario conçues pour la recherche de phase mobile. Ces cuves contiennent six compartiments indépendants permettant le test simultané de six phases mobiles différentes. Si une phase de conditionnement est requise, le réservoir prévu à cet effet est alors rempli. Ensuite, la phase stationnaire est préparée pour obtenir six canaux. Le développement a lieu avec le même principe de fonctionnement que les cuves horizontales classiques [238],[242].





Enfin, il existe les cuves automatiques permettant de rendre plus répétable/reproductible le développement. Dans ce cas, le niveau de migration est suivi à l'aide d'un capteur, qui lorsque la migration atteint la distance souhaitée, relève la plaque et commence le séchage. Parmi les cuves automatiques, il existe les cuves à flux forcé (over-pressurized liquid chromatography OPLC) avec lesquelles la phase stationnaire est placée dans une enceinte fermée sous pression. La phase mobile est ensuite introduite par flux forcé dans la phase stationnaire. L'influence de la phase gazeuse est donc ignorée [243]

En fonction du type de cuve utilisée, différents modes de développement sont possibles.

### 6.1.3.2 Modes de développement

Il existe différents modes de développement : linéaire, circulaire ou anti-circulaire (Figure 26). En ce qui concerne le développement linéaire, la migration peut s'effectuer verticalement ou horizontalement suivant le type de chambre utilisée. Lors d'une migration verticale, l'échantillon est appliqué en bas de la plaque (Figure 22, A), alors que lors d'une migration horizontale l'échantillon est appliqué des deux côtés de la plaque. La majorité des analyses utilisent le développement linéaire avec une migration verticale. Après l'application, la plaque est immergée sur quelques millimètres, puis par capillarité, la phase mobile migre jusqu'à la distance de migration souhaitée. Les développements circulaires utilisent les forces centrifuges ou centripètes pour éluer la phase mobile à travers la phase stationnaire en faisant tourner la plaque autour d'un axe central. Les développements circulaires induisent souvent des RF plus élevés que des développements linéaires (Figure 22, B : centrifuge, C : centripète) [241]

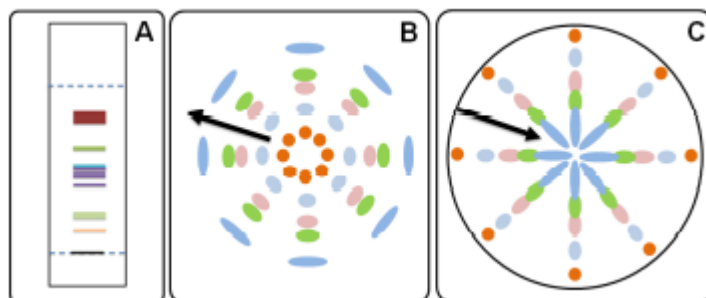


Figure 26: Schéma des différents modes de développement chromatographique. A : linéaire ; B : circulaire (centrifuge); C : circulaire (centripète) [239].

A ces développements s'ajoutent les développements multiples et les développements multidimensionnels. Les développements multiples consistent à faire subir à la phase stationnaire des développements successifs. Pour cela, une première migration est opérée jusqu'à une distance de migration définie. La plaque est ensuite retirée et séchée, puis elle subit un deuxième développement utilisant une phase mobile identique ou différente, sur une distance de migration identique au premier développement ou différente. La Figure 27 donne des exemples d'utilisation des développements multiples. Le cas (A) est utilisé lorsque des composés apolaires doivent être séparés. Pour cela, ils sont élués en haut de plaque à l'aide d'une première migration. Lors du deuxième développement, la distance de migration est plus courte. Dans le cas où les composés

polaires doivent être éliminés (B), une première migration est opérée sur une courte distance avec un solvant très polaire. Puis une seconde migration est réalisée avec une phase mobile moins polaire. De cette façon, les composés polaires sont retenus en bas de plaque. Le cas (C), est par exemple utilisé pour augmenter la résolution entre des composés. Ce type de développement a été utilisé pour séparer les propyl-, éthyl-, et méthylparaben. Pour cela, la plaque est développée 3 fois avec la même phase mobile sur une même distance de migration [244]. Le même procédé a été utilisé pour la séparation de l'hexose et du déoxyhexose à l'aide de trois développements consécutifs avec le même solvant de développement [245].

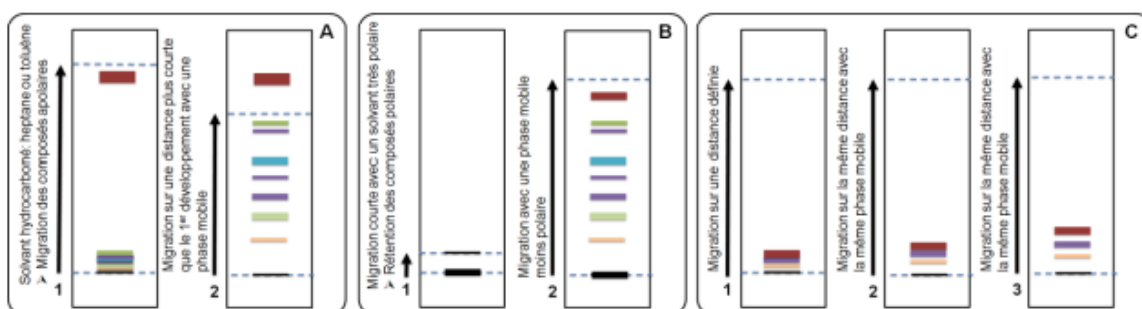


Figure 27: Les développements multiples peuvent être réalisés automatiquement à l'aide d'un instrument spécifique. Dans ce cas, la plaque est développée de façon répétée dans la même direction. Chaque élution utilise un solvant de migration de force éluante plus plusieurs migrations successives avec une phase mobile identique [246].



Figure 28: Fonctionnement du développement multiple automatisé (AMD)

De façon générale, lors des développements multidimensionnels, l'échantillon est appliqué sous forme d'une tache sur la phase stationnaire dans un coin inférieur de la plaque (Figure 29, A1). La phase stationnaire est ensuite développée dans une première dimension (Figure 29, A2). Ensuite, après séchage, elle est tournée de 90° et développée dans une deuxième dimension avec une deuxième phase mobile (Figure 29, A3). Le cas B de la Figure 29, un développement multidimensionnel est utilisé pour l'analyse des aflatoxines, mais cette fois en faisant pivoter la phase stationnaire de 180°, c'est-à-dire en inversant le sens de l'élution [247].

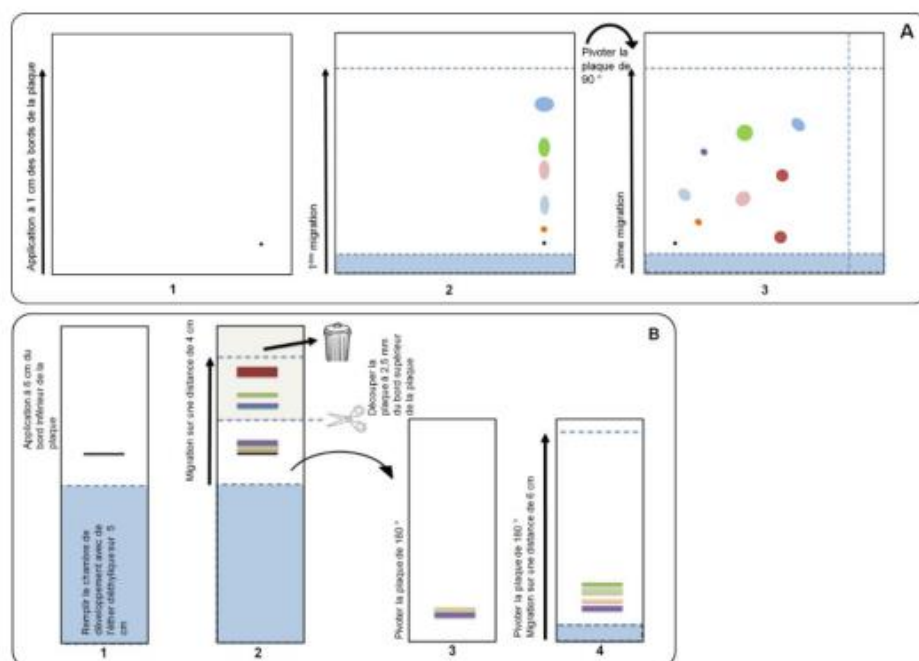


Figure 29: Schémas des développements multidimensionnels

Le développement en mode « sandwich » est réalisé en recouvrant la phase stationnaire d'une contre plaque en verre maintenue par des pinces. De cette façon, la phase gazeuse est occultée (Figure 30) ce qui permet de ne pas tenir compte du phénomène de saturation en vapeurs de solvant dans la cuve de développement. Le mode « sandwich » peut être adapté aux cuves à fond plat, aux cuves à double fond, et aux cuves horizontales [243].



Figure 30: Schéma de l'utilisation du mode « sandwich ». A : vue de profil ; B : vue de face

## 6.1.4 La détection

### 6.1.4.1 Détection sans traitement chimique

La détection de composés séparés sur les couches absorbantes est améliorée par l'extinction de la fluorescence due à la lumière UV (varie normalement à 200-400 nm). Ce processus est communément appelé trempe de fluorescence.

### 6.1.4.2 Visualisation à UV 254 nm

F254 doit être décrit comme une extinction de phosphorescence. Dans ce cas, la fluorescence reste pendant une courte période après la suppression de la source d'excitation. C'est très court, mais plus de 10 secondes [248]. L'indicateur fluorescent F254 est excité avec une longueur d'onde UV à 254 nm et émet une fluorescence verte [249]. Les composés absorbant le rayonnement à 254 nm

réduisent cette émission sur la couche, et une tache violet foncé sur fond vert est observée là où se situent les zones composées [250],[251]. Cette extinction est causée par tous les composés avec des doubles liaisons conjuguées. Anthraglycosides, coumarines, flavonoïdes, propylphénols dans les huiles essentielles, certains types d'alcaloïdes tels que l'indole, les alcaloïdes d'isoquinoléine et de quinoléine, etc. devraient être détecté sous 254 nm [252],[253].

#### 6.1.4.3 Visualisation à UV 366 nm

F 366 doit être décrit comme trempe de fluorescence. Dans ce cas, la fluorescence ne reste pas après la source d'excitation et est supprimée[248]. Cette trempe est montrée par tous les anthraglycosides, coumarines, flavonoïdes, Acides phénolcarboxyliques, certains types d'alcaloïdes (Rauwolfia, alcaloïdes Ipecacuanha) [252].

#### 6.1.4.4 Détection après traitement chimique ou dérivatisation

La dérivatisation peut être définie comme une technique qui modifie principalement la fonctionnalité d'un analyte afin de permettre sa séparation chromatographique et son identification. La dérivatisation peut être réalisée soit par immersion des plaques soit par pulvérisation des plaques avec un réactif approprié (tableau 11) [254],[248],[255]. Pour une meilleure reproductibilité, l'immersion est privilégiée comme technique de dérivatisation.

Tableau 11: Exemple de révélateurs utilisés en HPTLC, leurs composés cibles et leurs colorations obtenues

Révélateur	Composé chimique	Couleur
Réactif de Dragendorff Il forme une réaction complexe avec certains composés contenant de l'azote	Les alcaloïdes	Zone rouge-brun
Produits naturels Réactif polyéthylène glycol, c'est-à-dire que l'ester -2-aminoéthylrique de l'acide diphénylborique forme des complexes avec les 3-hydroxyflavones par réaction de condensation	Flavonoïdes	Jaune intense, orange et vert Zones fluorescentes en UV 366 nm
Acide vanilline sulfurique Où Acide sulfurique, anisaldéhyde	principe amère	Zone brun-rouge, brun-jaune, vert foncé
	saponines	Zone coloré
	Huiles essentiels	Zones bleues, brunes ou rouges
10 % KOH éthanolique	Anthraquinones (Émodin, Rhein)	Zones rouges (vis) Fluorescence rouge (UV 366 nm)
	Anthrones (Aloïne, Cascariosides)	Zones jaunes (vis) Fluorescence jaune (UV 366 nm)
	Coumarines, Scopolétine, Ombelliférone	Zone fluorescente bleu vif (UV 366 nm)
Réactif ninhydrine	Acides aminés, peptides, amines et sucres aminés	Jaune, marron à rose et violet
Iode	Indole, quinoléine Dérivé, thiols et tous composés organiques	Zone sombre (UV 254)

## 6.1.5 La documentation

### 6.1.5.1 Imagerie

L'imagerie consiste à illuminer la plaque sous lumière blanche, ou sous UV à 254 ou 366 nm puis à sauvegarder électroniquement l'image qui en résulte (Figure 31). De cette façon, le chromatogramme HPTLC peut être facilement archivé, édité et retraité [239].

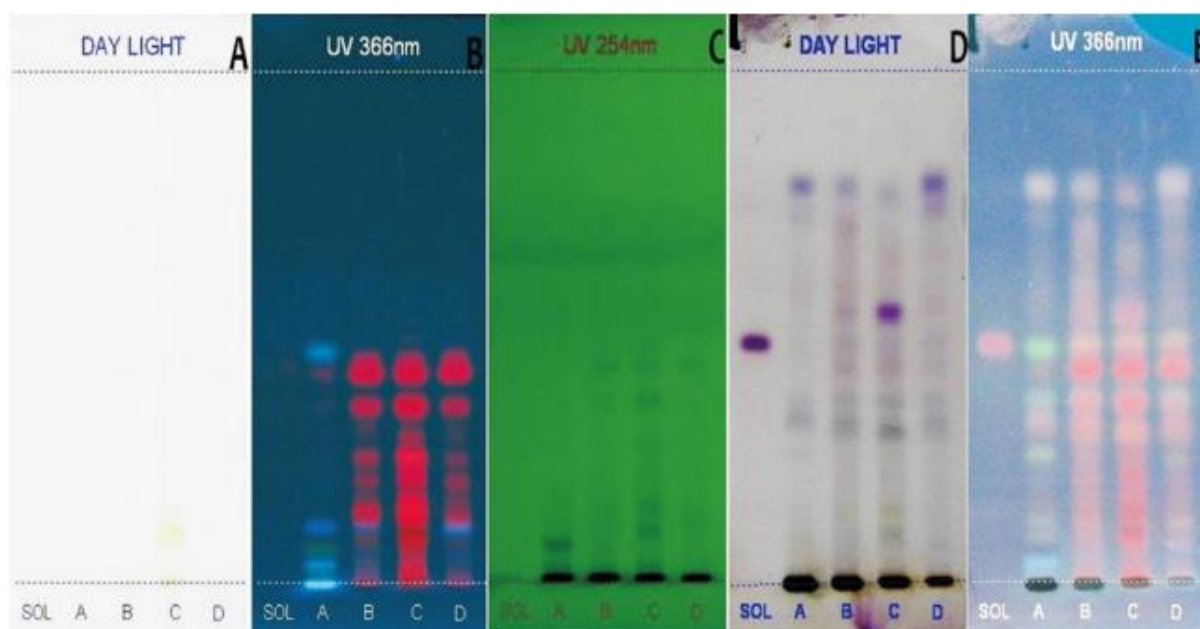


Figure 31: Exemple des Profil HPTLC pris sous lumière blanche, sous UV à 366 et 254 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche à 366 nm après dérivatisation (successivement)

#### 6.1.5.2 La densitométrie

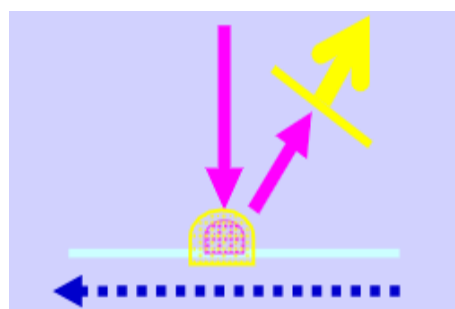
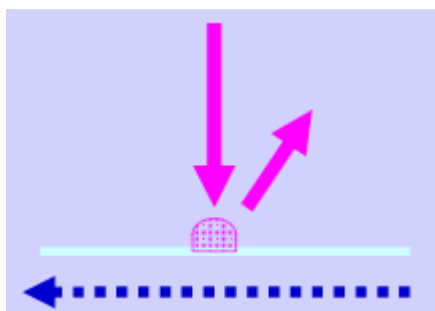
La chromatographie instrumentale en couche mince doit être capable de recourir à la fois à la densitométrie classique et à l'acquisition électronique d'images. La densitométrie utilise une lumière monochromatique et une fente de longueur et de largeur sélectionnables pour balayer les pistes d'un chromatogramme, mesurant la lumière réfléchi de manière diffuse.

Le scanner TLC utilise toute la gamme spectrale de 190 à 900 nm avec une sélectivité spectrale élevée pour l'acquisition de données.

Les spectres d'absorption pour l'identification des substances et pour la sélection de la longueur d'onde de mesure la plus appropriée peuvent être enregistrés dans cette plage.

Les points forts de la densitométrie classique sont les résolutions de la source lumineuse et reproductibilité plus élevée de déterminations quantitatives [254].

La densitométrie peut être effectuée en deux modes : absorbance ou fluorescence. En mesure d'absorbance, la lumière réfléchi de manière diffuse à partir de la plaque représente la ligne de base qui est réduite lorsque le faisceau lumineux frappe une zone d'absorption. La mesure de la fluorescence nécessite un filtre pour éliminer efficacement la lumière utilisée pour l'excitation. La lumière fluorescente peut, elle, passer le filtre et atteindre le détecteur [256].



En absorbance la mesure est négative, et donc ne peut pas être linéaire sauf dans les faibles concentrations de molécule sur la plaque. Il est conseillé d'utiliser des courbes de Michaelis-Menten  $Y=ax+b$

En fluorescence, on ne mesure que la lumière réémise au-delà de la longueur d'onde du filtre. La mesure est positive, et donc est linéaire sauf dans les cas de 'quenching' (saturation). La sensibilité est très importante (pas de bruit de fond)

### 6.1.6 Avantage et inconvénients de HPTLC

Tableau 12: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de l'utilisation de l'HPTLC

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Technique visuelle</li> <li>• Analyse simultanée de plusieurs échantillons</li> <li>• Consommation de solvant faible</li> <li>• Chaque étape peut être manuelle ou automatisée</li> <li>• Chaque étape est indépendante des autres (off-line)</li> <li>• La préparation de l'échantillon n'est pas contraignante</li> <li>• La phase stationnaire est un consommable</li> <li>• Trois types d'applications possibles</li> <li>• Large gamme de volume d'injection possible (0,5 à 500 µL)</li> <li>• Grand nombre de phases stationnaires commercialisées</li> <li>• Le processus chromatographique est visible et peut être arrêté par l'opérateur en temps réel</li> <li>• La totalité de l'échantillon appliqué sur la plaque est analysée (pas de rétention, la zone d'application est prise en compte)</li> <li>• Plusieurs détecteurs possibles (transformation chimique, réaction microbiologique, couplage analytique ...) permettant de détecter des composés non visibles (sous UV ou en lumière visible, ou encore d'accroître la détection de certains)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chacune des étapes a une influence sur la suivante</li> <li>• L'application d'un trop grand volume peut entraîner un début de séparation pendant le dépôt</li> <li>• Application peut prendre du temps</li> <li>• Le profil chromatographique est difficile à décrire et à prédire</li> <li>• Résolution</li> <li>• Limite de détection</li> <li>• Nombre de fournisseurs limité, prix des équipements élevé</li> </ul>

## 7 Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de faire un bilan général des maladies neurodégénératives, et de présenter quelques données sur la maladie d'Alzheimer dont notamment ses mécanismes, ses facteurs et impacts sur la physiologie cellulaire. Les voies thérapeutiques et la neuroprotection par les plantes décrites dans la littérature ont permis d'aboutir à la famille des Astragales. La plante *Astragalus hamosus L.* a été largement présentée par ses aspects botaniques, la description de ses métabolites et son utilisation en médecine traditionnelle. Cependant cet état de l'art a montré qu'il existe peu de données concernant l'extraction et la caractérisation des Astragales *Astragalus hamosus L.* comparativement à d'autres genres d'Astragales. Le rôle des saponines dans le traitement des maladies neurodégénératives ainsi que dans le traitement du cancer colorectal a également été abordé. Le thème de l'extraction des saponines a été étudié et un bilan des différentes techniques utilisées dans la littérature a été présenté. Étant donné la complexité de l'extraction et de la purification des saponines, les techniques d'extraction mentionnées dans la littérature ainsi

que les étapes méthodologiques de l'HPTLC ont été détaillées. L'HPTLC sera la technique de base pour le screening de molécules dans ce projet de thèse.

L'objectif de la thèse sera dans un premier temps d'essayer de déterminer les conditions optimales d'extraction et d'analyse des composés d'intérêt que sont les saponines dans diverses populations d'*Astragalus hamosus* L. endémiques de la Tunisie. Les travaux se focaliseront ensuite sur la détermination de propriétés biologiques de différentes fractions issues de la plante dont notamment leurs activités neuroprotectrices et cytotoxiques. Les analyses chimiques seront menées principalement par la technique d'HPTLC couplée à la spectrométrie de masse SM<sup>n</sup> tandis que la détermination des effets biologiques feront intervenir différentes méthodologies basées notamment sur la culture cellulaire comme le décrit la littérature.





## Chapitre 2 : Matériel et méthode



## Introduction :

Dans ce chapitre, le matériel et les méthodes utilisés pour résoudre les problématiques du projet sont décrits. Toutes les techniques mises en œuvre sont détaillées en commençant par l'extraction jusqu'à l'identification et l'évaluation des activités biologiques des extraits

### 1 Matériel végétal

4 populations ont été choisies, provenant de 4 localisations géographiques différentes en Tunisie (Figure 32):

- Bizerte située dans le nord de la Tunisie, entre la mer Méditerranée et le lac de Bizerte.
- Zaghouan, une ville du nord de la Tunisie, établie sur le versant du djebel Zaghouan.
- Kairouan, une ville plus au sud, située à 150 kilomètres au sud-ouest de Tunis.
- Siliana, une ville du Nord-Ouest de la Tunisie, située à 127 kilomètres de Tunis, sur l'oued Siliana.



Figure 32: Carte de la Tunisie

La collecte a été réalisée en mars 2019. Les plantes ont été séchées à l'air libre et broyées en une poudre fine à l'aide d'un mixeur, le broyat a alors été stocké dans un contenant hermétique à l'abri de la lumière et à température ambiante.

#### 1.1 Coordonnées GPS des lieux de collecte

Ville	Region	GPS coordonnées
Zaghouan	FAHS (491m altitude)	Latitude 36,3632487, Longitude 9,8998366
	Bir mcherga (142 m altitude)	Latitude 36,5039417, Longitude 9,9617271
	Jabbes, El Ghrifet, (303 m altitude)	Latitude 36,4421951 Longitude 9,9256994
Bizerte	Sidi Ahmed (65 m altitude)	Latitude 37,2529341, Longitude 9,7477197
Siliana	Bou Arada (246 m altitude)	Latitude 36,3510552, Longitude 9,6241481
	Bargou (572 m altitude)	Latitude 36,0914446, Longitude 9,5667337
Kairouan	Oueslatia (471 m altitude)	Latitude 35,8476563, Longitude 9,5932661
	El mrazig (47 m altitude)	Latitude 35.6926367, Longitude 10.2002739

## 1.2 Les spécimens *Astragalus hamosus* L. des quatre populations collectées



Figure 33: Spécimens Bizerte (a) et Siliana (b)

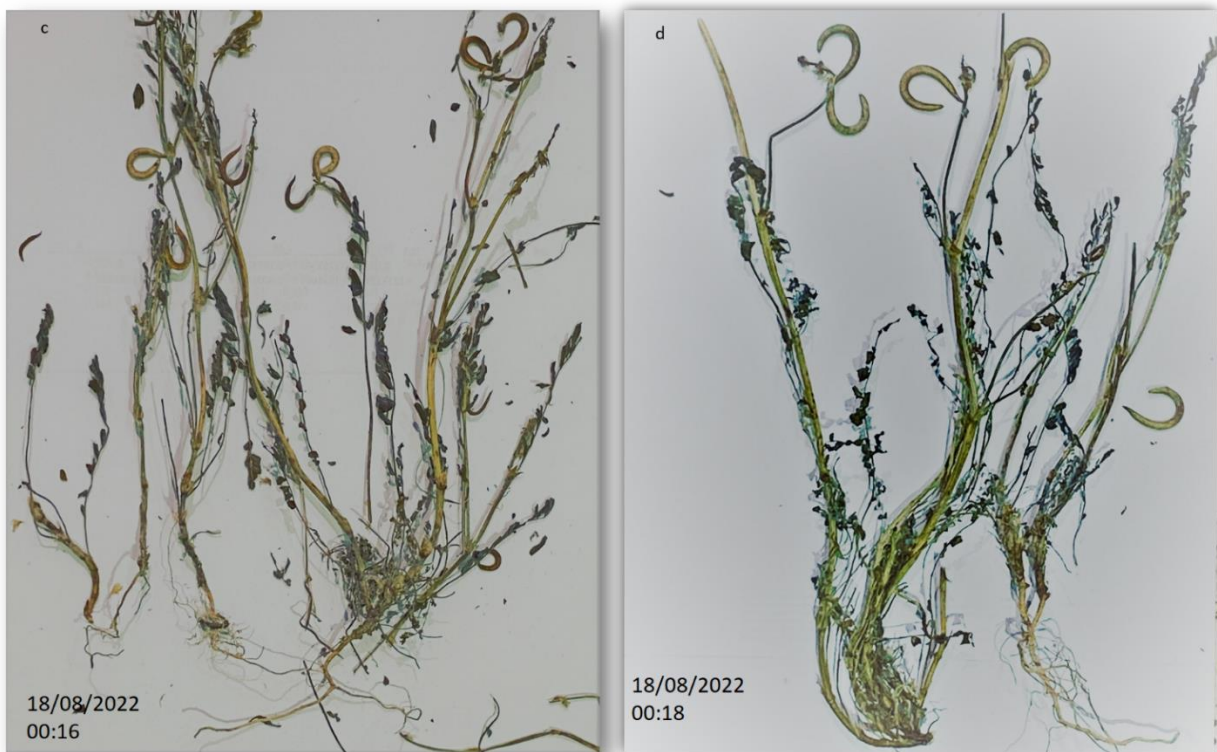


Figure 34: Spécimens Zaghouan (c) et Kairouan (d)

*Astragalus hamosus* L. a été identifiée par le Pr. A. Zoghlami (Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Tunis, Tunisie), un spécimen de chaque population (22101, 22102, 22103 et 22104) a été déposé au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA, Université de Toulouse, INRAe, Toulouse, France).

## 2 Détermination des taux d'extractibles

La détermination du potentiel en composés extractibles est réalisée selon une méthode gravimétrique au moyen du Système Fibertec Tecator M1017- Hot extractor (Figure 35).

Les solvants choisis sont l'eau et l'éthanol, les extractions sont réalisées en triplicata

1g de matière première a été pesée dans chacun des frittés de porosité 2 et introduite dans le Fibertec. 100 mL de solvant ont été ajoutés et l'extraction a été effectuée à la température d'ébullition du solvant pendant une heure. Au bout d'une heure, l'extrait est aspiré à l'aide d'une trompe à vide et filtré, puis la matière résiduelle est rincée. L'extrait (et le rinçage) est collecté et mesuré. Les frittés sont mis à sécher à l'étuve 103°C pendant 24h. La différence de masse des frittés avant/après extraction et après séchage permet la détermination de la quantité de matière solubilisée. Le pourcentage en extractibles à l'eau ou à l'éthanol calculé sels la formule suivante :

$$\% \text{ Extractibles}_{\text{liquide}} = (m_f - m_i / m_i - m_t) / (m_{\text{prise d'essai}} \times \% \text{MS}) \times 100$$

Avec

$m_i$  = masse du fritté et son contenu (en g) avant extraction

$m_f$  = masse du fritté et son contenu (en g) après extraction

$m_t$  = masse du fritté vide (en g)

$m_{\text{prise d'essai}}$  = masse de la prise d'essai (en g)

MS = matière sèche



Figure 35: Système Tecator Fibertec M1017

## 3 Détermination des taux de matière minérale des 4 populations d'*Astragalus hamosus*

La teneur en matière minérale (%MM) a été déterminée selon une méthode gravimétrique et selon la norme NF V 03\_322. L'échantillon est préalablement séché à 103°C puis pesé, il subit alors une calcination dans un four à 550°C pendant 5h. Après refroidissement dans un dessiccateur, les creusets ont été pesés à nouveau. Le résidu calciné obtenu est une poudre grise, claire et légère qui n'est composée que de minéraux. La différence pondérale entre la masse de matière sèche et la



masse de matière minérale correspond à la masse de matière organique. La teneur en matière minérale est exprimée en pourcentage en masse et calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ MM} = 100 * (\text{M2} - \text{M1}) / (\text{M1} - \text{M0})$$

Avec

M0 = masse du creuset vide (en g)

M1 = masse du creuset et son contenu avant calcination (en g)

M2 = masse du creuset et son contenu après calcination (en g)

#### **4 Méthodes d'extractions développées pour l'évaluation de la présence de métabolites secondaires dans la plante.**

##### **4.1 Protocoles d'extraction pour le criblage des saponines :**

Cinq protocoles d'extraction ont été sélectionnés d'après la littérature et adaptés pour l'extraction de saponines d'*Astragalus hamosus L.* allant d'un protocole simple en une seule étape (M1) à des protocoles plus complexes multi-étapes (P1, P2, P3 et P4).

Le protocole M1 a été appliqué pour les 4 populations et la population de Zaghouan a été choisie pour appliquer les 4 protocoles P1 à P4.

##### **4.1.1 Description de la méthode d'extraction méthanolique M1**

Une méthode M1 d'extraction solide liquide simple a été mise en œuvre selon la méthode de *Khakimov et al 2016 [257]* avec quelques modifications, pour les 4 populations, Bizerte, Siliana, Kairouan et Zaghouan (Figure 36).

Différentes quantités de matière première ont été évaluées pour la population de Bizerte : 25, 50, 100, 150, 200, 250, et 300 mg de matière sèche broyée en poudre fine. La poudre végétale a été mélangée avec 1,5 mL de MeOH 85% dans des tubes Eppendorf et ensuite chauffée à 100°C et agitée dans un Vortex en alternance pendant 5 minutes. Il faut signaler que cette étape a été choisie pour remplacer l'utilisation de thermo mixeur par rapport à l'article d'origine [257]. Cette étape a été suivie d'une centrifugation à 15000 g pendant 3 minutes. Ensuite les surnagants récupérés ont été analysés par HPTLC. Cette population a été choisie dans un premier temps pour l'étude préliminaire de mise au point des paramètres analytiques (quantité de matière et concentration des extraits).

Les résultats obtenus par HPTLC ont permis de choisir la quantité de matière première à extraire de 25 mg pour la suite des expérimentations, celle-ci étant adéquate pour pouvoir détecter les métabolites en HPTLC. Le tableau 13 récapitule les extraits obtenus par la méthode M1 et leurs utilisations dans les analyses ultérieures.

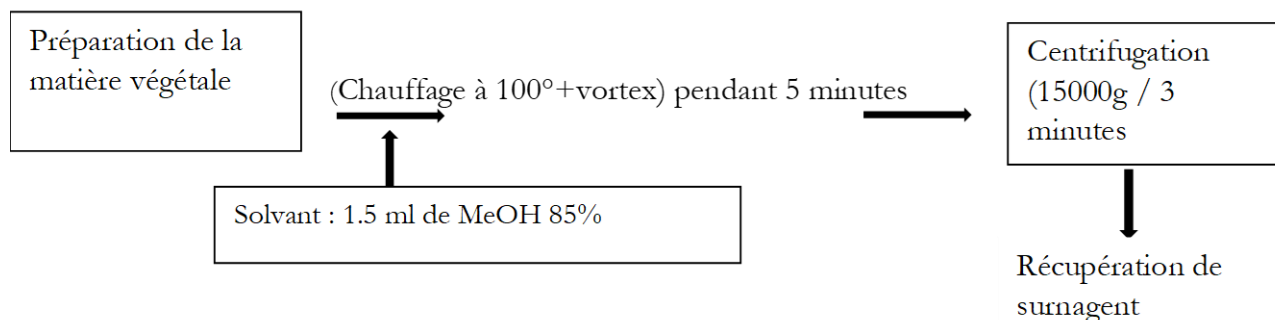


Figure 36: Schéma simplifié de l'extraction méthanolique solide liquide selon la méthode M1

Tableau 13: Les extraits obtenus selon la méthode d'extraction M1 et leurs utilisations dans les analyses ultérieures

Population	Extraits dans 1,5 mL de MeOH 85%	Code échantillon	Analyse
Bizerte	25 mg 50 mg 100 mg 150 mg 200 mg 250 mg 300 mg	BI-25 mg - M1 BI-50 mg - M1 BI-100 mg - M1 BI-150 mg - M1 BI-200 mg - M1 BI-250 mg - M1 BI- 300 mg - M1	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPTLC</li> <li>Test d'ELLMAN</li> <li>Extraits BI à 25 et 300 mg : HPLC-SM<sup>2</sup></li> <li>Extrait BI-300 mg : HPTLC Semi Préparative couplée HPLC-SM<sup>2</sup></li> </ul>
Siliana	25 mg	SI- 25 mg- M1	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPTLC</li> <li>Ellman</li> <li>Activité cytotoxique</li> <li>Activité neuroprotectrice</li> <li>Activité antiradicalaire</li> </ul>
Kairouan	25 mg	KAI- 25 mg- M1	
Zaghouan	25 mg	ZA-25mg- M1	

#### 4.1.2 Description du protocole d'extraction P1 :

Le protocole d'extraction P1 a été adapté des travaux de Ma et al, 2002 [225].

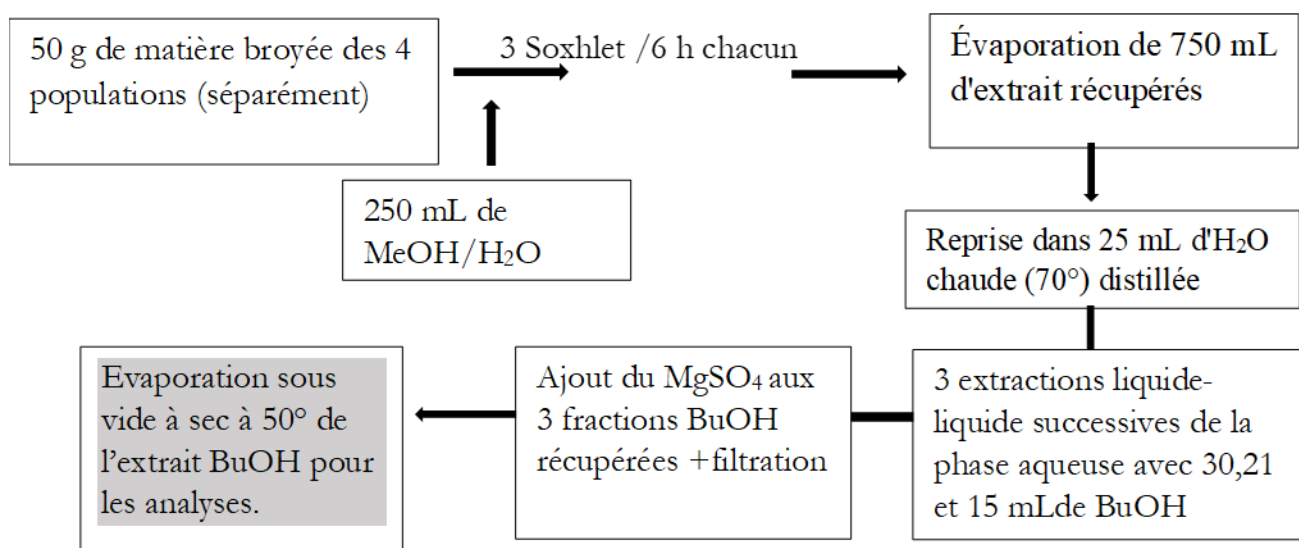


Figure 37: Schéma simplifié du protocole d'extraction P1 pour les 4 populations, Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan



#### 4.1.3 Description du protocole d'extraction P2 :

Le protocole d'extraction P2 est celui de Kambouche et al, 2011 [258].

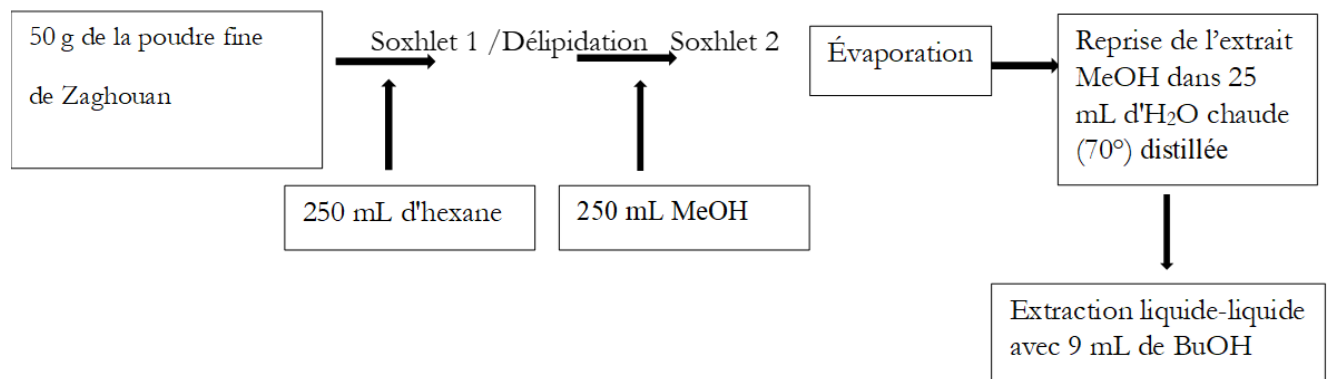


Figure 38: Schéma simplifié du protocole d'extraction P2 pour la population Zaghouan

#### 4.1.4 Description du protocole d'extraction P3 :

Le protocole d'extraction P3 est celui de Maamria et al, 2015 [219].

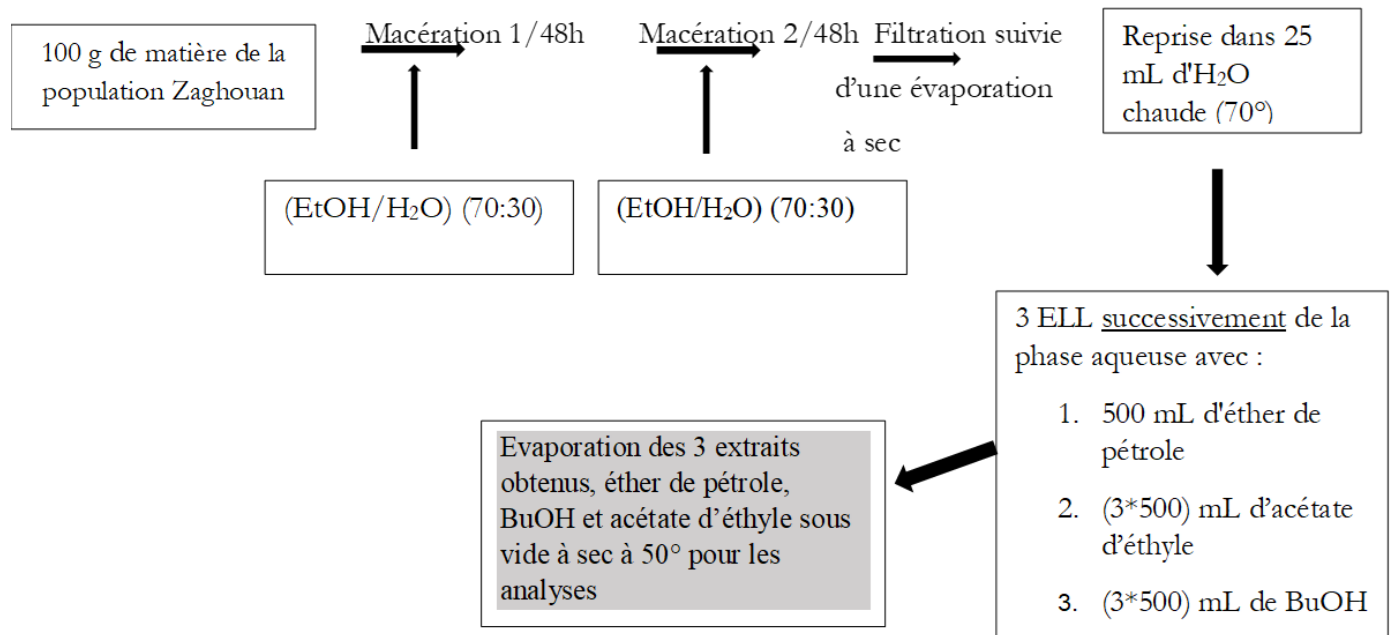


Figure 39: Schéma simplifié du protocole d'extraction P3 pour la population Zaghouan

#### 4.1.5 Description du Protocole d'extraction P4 :

Le protocole d'extraction P4 est celui de Pistelli et al, 2003 [171].

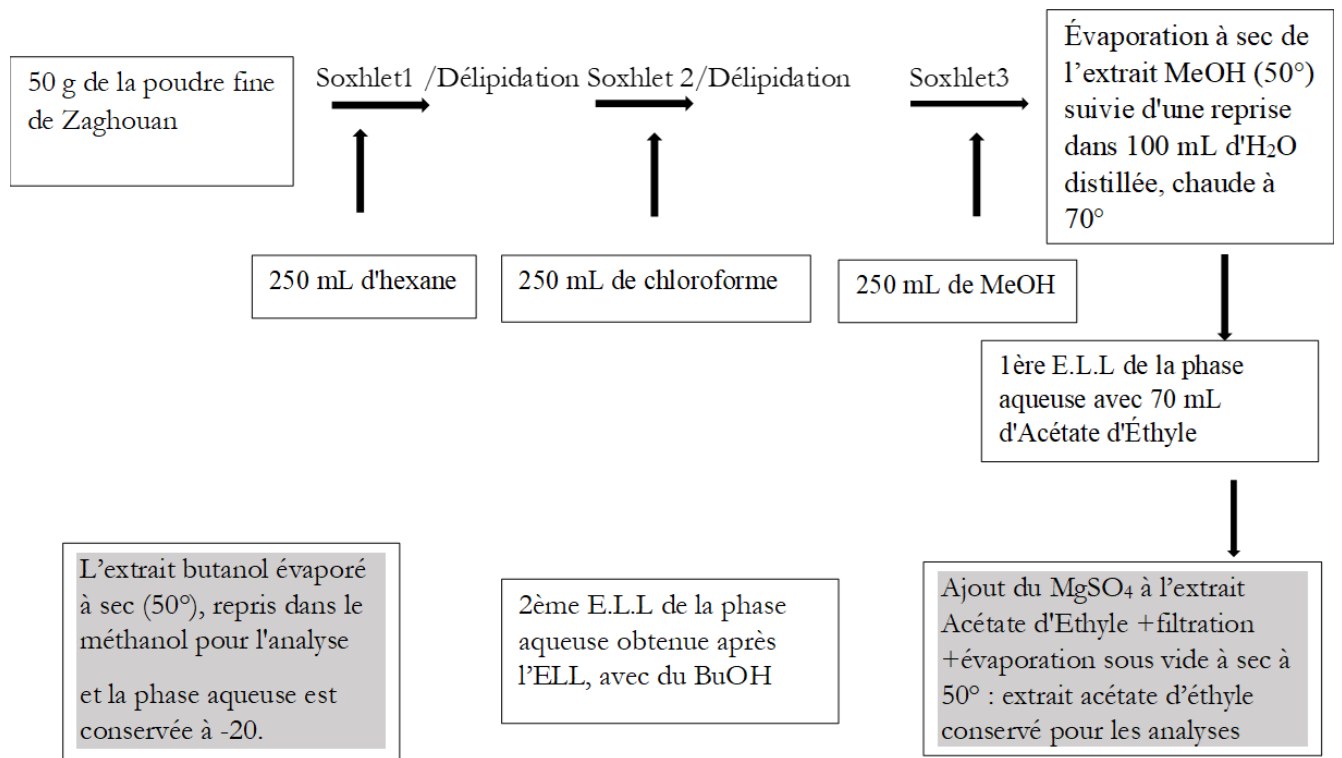


Figure 40: Schéma simplifié du protocole d'extraction P4 pour la population Zaghouan

#### 4.1.6 Récapitulatif des extraits obtenus par les différent protocoles M1 et P1 à P4 :

Les différents protocoles mis en œuvre ont fourni au total 26 fractions qui sont visualisées par les figures 41 et 42 et récapitulées dans le tableau 14.



Figure 41: Extraits de Bizerte obtenus selon M1



Figure 42: Extraits des 4 populations Siliana, Bizerte, Zaghouan et Kairouan, obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4.

Les extraits obtenus par P1, P2, P3 et P4 pour analyse sont récapitulés dans le tableau (14).

Tableau 14: Fractions obtenues aux différentes phases d'extraction des protocoles P1, P2, P3 et P4.

Protocoles	Population	Code échantillon	% MS	Extrait	Solvant d'extraction	Solvant pour analyse	Volume solvant repris pour analyse (mL)	Masse finale de la matière extraite (g)	Concentration en g/L	Rendement (m/m%)
<b>P1</b>	ZA	ZA <sub>1</sub> M	90,46	MeOH/H <sub>2</sub> O (750 mL)	3 soxhlets MeOH/H <sub>2</sub> O (4/1) + 3 ELL BuOH/H <sub>2</sub> O					
	SI	SI <sub>1</sub> M	89,92	MeOH/H <sub>2</sub> O (750 mL)						
	BI	BI <sub>1</sub> M	89,28	MeOH/H <sub>2</sub> O (750 mL)						
	KAI	KAI <sub>1</sub> M	90,25	MeOH/H <sub>2</sub> O (750 mL)						
	ZA	<b>ZA-P1</b>		BuOH		MeOH	5	2,86	572	6,3
	SI	<b>SI-P1</b>		BuOH		MeOH	12	3,69	307	8,1
	BI	<b>BI-P1</b>		BuOH		MeOH	10	3,6	369	8
	KAI	<b>KA-P1</b>		BuOH		MeOH	200	2,83	70	6,3
<b>P2</b>	ZA	ZA <sub>2</sub> M	90,46	MeOH	Soxhlet hexane + soxhlet MeOH/ + ELL BuOH					
		<b>ZA-P2-HEX</b>		Hexane		Hexane	5	2,04	203	4,45
		<b>ZA-P2</b>		BuOH		MeOH	5	2,08	416	4,53
<b>P3</b>	ZA	ZA <sub>3</sub> E	90,46	EtOH/H <sub>2</sub> O	2 macérations successives EtOH/H <sub>2</sub> O + ELL éther de pétrole + ELL Acétate d'éthyle + ELL BuOH					
		ZA <sub>3</sub> EP		EP						
		ZA <sub>3</sub> AE		AE						
		<b>ZA-P3</b>		BuOH		MeOH	5	4,47	890	4,84
	SI	<b>SI-P3</b>		BuOH		MeOH	5	3,32	664	
	KAI	<b>KAI-P3</b>		BuOH		MeOH	6	4,11	685	
	BI	<b>BI-P3</b>		BuOH		MeOH	5	3,89	778	
<b>P4</b>	ZA	ZA <sub>4</sub> M		MeOH	3 soxhlets successifs : hexane, chloroforme et MeOH +2 ELL successives AE + ELL butanol					
		ZA <sub>4</sub> H		Hexane		Hexane	5	2,15	430	4,71
		ZA <sub>4</sub> Ch		Chloroforme		Chloroforme	10	2,1	201	4,6
		ZA <sub>4</sub> AE		AE		MeOH	5	3,52	704	7,72
	<b>ZA-P4</b>		BuOH	MeOH		5	2,04	408	4,47	
	SI	<b>SI-P4</b>		BuOH		MeOH	6	0,5	83,3	1,09
	BI	<b>BI-P4</b>		BuOH		MeOH	10	0,86	86	1,88
	KAI	<b>KAI-P4</b>		BuOH		MeOH	5	0,58	116	1,28

## 5 Évaluation des extraits obtenus par analyse HPTLC

### 5.1 Description des paramètres d'analyses HPTLC appliqués :

Les échantillons ont été déposés sur des plaques de silice de 20\*10 cm ou bien 10\*10 cm avec le passeur d'échantillons ATS3 CAMAG (Muttenez, Suisse).

Deux systèmes de développement différents ont été choisis :

- Système de développement S1 : (30 mL de chloroforme/15 mL d'hexane/5 mL de méthanol)
- Système de développement S2 : 3 systèmes de solvants.

Les systèmes de solvants sont (en volume) :

- ❖ SS1 –Dichlorométhane et MeOH (92:8) jusqu'à 26 mm pour les méthylxanthines (ou 2 min de développement);
- ❖ SS2 - EtOAc, toluène, acide formique et H<sub>2</sub>O (8,7:1,3:1,7:0,4) jusqu'à 70 mm pour les composés phénoliques.
- ❖ SS3 - EtOAc, toluène, acide formique et H<sub>2</sub>O (9:1:2,5:1) jusqu'à 70 mm pour les saponines.

Pour les deux Systèmes 1 et 2 :

Les développements ont été effectués dans une chambre de développement à doubles fonds. Le mélange de solvant est déposé dans les deux fonds (20 mL coté plaque et 10 mL coté solvant) pour saturer la chambre en gaz de solvant pendant deux heures avant de commencer l'élution. Pré dosage volume 1000 nL, volume excédentaire 5000 nL, volume de rétraction 100 nL, vitesse de livraison 150 nL.s<sup>-1</sup>, vitesse de remplissage 500 nL.s<sup>-1</sup>, temps de rinçage 10 s, volume de compression 300 nL, compression temps 10 s, volume de décompression 240 nL. La première position d'application X a été fixée à 15 mm et la position d'application Y à 10 mm. La distance entre les pistes a été calculée automatiquement à partir du nombre de dépôts. Le mode d'application par pulvérisation a été utilisé, avec une bande vitesse de 5 mm.s<sup>-1</sup> et une temporisation de démarrage de 50 ms. La longueur de la bande a été fixée à 4 mm. Les photos des plaques non dérivatisées ont été prises à 254 et 366 nm en utilisant le Visualizer (CAMAG, Muttenz, La Suisse) et les photos de plaques dérivatisées ont été prises sous de la lumière blanche.

Les évaluations (pendant le développement des systèmes de solvants) ont été effectuées visuellement, en vérifiant et en comparant les couleurs et les R<sub>f</sub>s des taches qui étaient visibles sur les photos prises sous les différentes longueurs d'ondes.

Un TLC Scanner 4 (CAMAG, Muttenz, Suisse) a été utilisé pour obtenir les spectres des spots et générer les chromatogrammes des pistes.

Toutes les évaluations des photos et des scans ont été effectuées avec visionCATS (CAMAG, Muttenz, Suisse).

Pour la dérivatisation, les plaques ont été plongées dans une solution d'anisaldéhyde sulfurique (anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) avec un TLC Immersion Device III CAMAG (Muttenz, Suisse), à une vitesse d'immersion de 2 cm.s<sup>-1</sup>, avec un temps d'immersion de 2 s. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve à 100 °C pendant 8 min à 10 min.

Les plaques ont été balayées à des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 500 nm avant dérivatisation, et à 500 et 600 nm après dérivatisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique, dans le TLC Scanner 3 SC3 CAMAG, avec lampes au deutérium et au tungstène (Muttenz, Suisse). La dimension de la fente était réglée sur 4 × 0,1 mm micro, la vitesse de balayage sur 5 mm.s<sup>-1</sup>. La rémission et l'absorption ont été sélectionnées pour le type et le mode de mesure, respectivement. Un filtre optique de second ordre a été utilisé, et le mode et la sensibilité du détecteur étaient automatiques. Les valeurs du facteur de retard R<sub>F</sub> ont été évaluées en tant que position de la substance par rapport à la position du front de solvant mesurée à partir de la position de l'application de l'échantillon.

L'échantillonneur automatique et le scanner HPTLC, l'acquisition et le traitement des données ont été contrôlés avec WinCats 1.4.6.2002 Planar Chromatography Manager de CAMAG.

## 5.2 Séparation des molécules selon leurs polarités et révélation des triterpénoïdes par l'anisaldéhyde sulfurique

### 5.2.1 Analyses préliminaires pour la mise au point des conditions opératoires d'HPTLC et pour le criblage des saponines triterpénoïdes

#### 5.2.1.1 Analyse HPTLC de BI-25-M1 obtenu par la méthode d'extraction M1

Différents essais de dépôts HPTLC à des concentrations allant de 25 à 300 mg ont été réalisés. Seuls les dépôts à 25 mg (Figure 43-a) et 300 mg (Figure 43-b) sont présentés.

Les dépôts à 25 mg sont présentés La plaque utilisée est en gel de silice. L'élution a été réalisée selon le premier système de développement S1 et la détection est faite par révélation à l'anisaldéhyde sulfurique sous lumière blanche. 10  $\mu$ L d'extrait ont été déposés en duplica, et 5  $\mu$ L pour les standards solanine, senégnine et digitonine dont la concentration est 1 g/L (0,005 mg de matières)

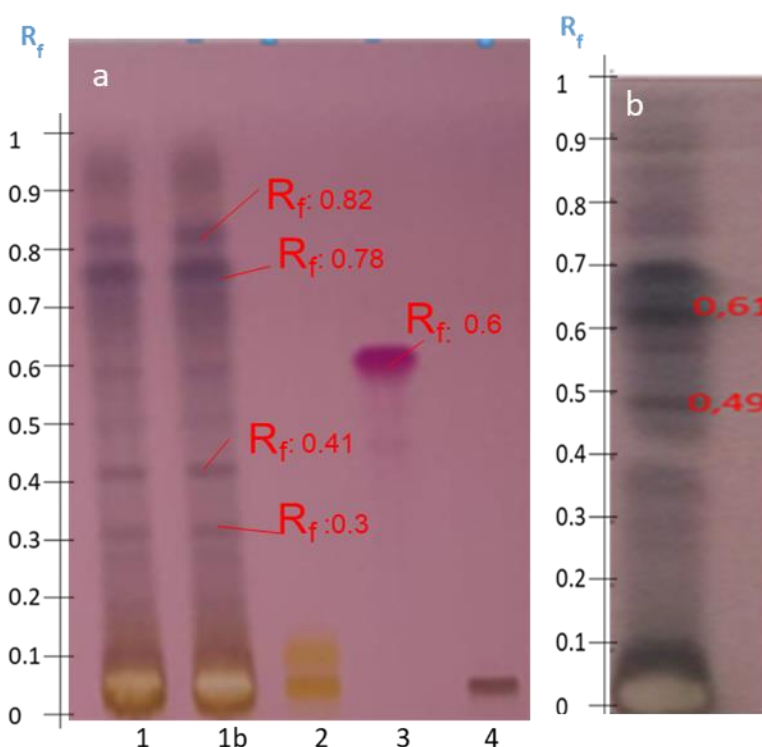


Figure 43: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de l'extrait de Bizerte (25 mg)(a) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), senégnine (Piste 3), et digitonine (Piste 4) et de l'extrait de Bizerte (300 mg). Système d'élution S1.

La plaque réalisée avec l'extrait BI-300-M1 étant saturée la majorité des analyses HPTLC ont été réalisées à des concentrations de 25 mg.

#### 5.2.1.2 Analyse HPTLC des extraits SI-M1, ZA-M1, KAI-M1, et BI-M1 en UV-vis avant dérivatisation à 366 nm et après dérivatisation à l'anisaldéhyde sulfurique

Les extraits obtenus selon M1, des 4 populations sont analysés conjointement sur une même plaque BI-25-M1, SI-25-M1, ZAI-25-M1 et KAI-25-M1. 10  $\mu$ L d'extrait et 5  $\mu$ L des standards senégnine, digitonine et solanine dont la concentration est 1g/L (0,005 mg de matière pour 5  $\mu$ L de dépôt).

La plaque utilisée est en gel de silice 20\*10 cm. L'élution a été réalisée selon le premier système de développement S1. L'interprétation des résultats a été faite par la visualisation de la plaque à

366 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche après la dérivatisation par l'anisaldéhyde sulfurique et par densitométrie de 200 à 500 nm avant la dérivatisation et à 500 et 600 nm après la dérivatisation.

#### 5.2.1.3 Évaluation des volumes de dépôt des échantillons pour l'analyse HPTLC des extraits et sélection de standards

Pour cette étude, les extraits de la population de Zaghouan obtenus par les différents protocoles P1, P2, P3 et P4 sont utilisés à isoccentration de 5 g/L. Trois volumes différents 4, 6 et 10 µL pour chaque extrait ont été déposés, ils correspondent successivement aux dépôts de 0,02, 0,03 et 0,05 mg de matière. La solanine, la sénégine et la digitonine ont été déposées deux fois, à 6 et 10 µL (0,006 mg et 0,01 mg de matière). Un 4<sup>ème</sup> standard a été ajouté, l'acide oléanolique qui est l'aglycone d'une saponine stéroïdienne dont la concentration est 1,02 g/L. 6 et 10 µL ont été déposés (0,006 et 0,01 mg successivement). En plus des standards de type saponine, un standard de sucre a également été ajouté, un mélange de glucose/fructose dont la concentration est de 0,5 g/L, a été déposé deux fois à 6 et 10 µL (0,003 et 0,005 mg successivement). La plaque utilisée est en gel de silice 20\*10 cm. L'élution a été réalisée selon le premier système de développement S1.

La plaque de silice a été visualisée sous lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique et sous UV à 366 nm avant dérivatisation (Figure 44). Après l'étude de cette HPLC et d'autres complémentaires mais non montrées dans le manuscrit, il a été décidé que 10 µL seraient déposés préférentiellement pour le screening des saponines d'*Astragalus hamosus L.* pour les extraits issus des protocoles M1, P1, P2 et P4 correspondant à 0,05 mg de matière. Cependant, pour les extraits issus du protocole d'extraction P3, 25 µL seraient déposés correspondant à 0,125 mg de matière, tout en gardant une solution mère de concentration à 5 g/L. 10 µL des standards solanine, sénégine, digitonine, acide oléanolique et glucose-fructose, seront déposés pour les analyses HPTLC.



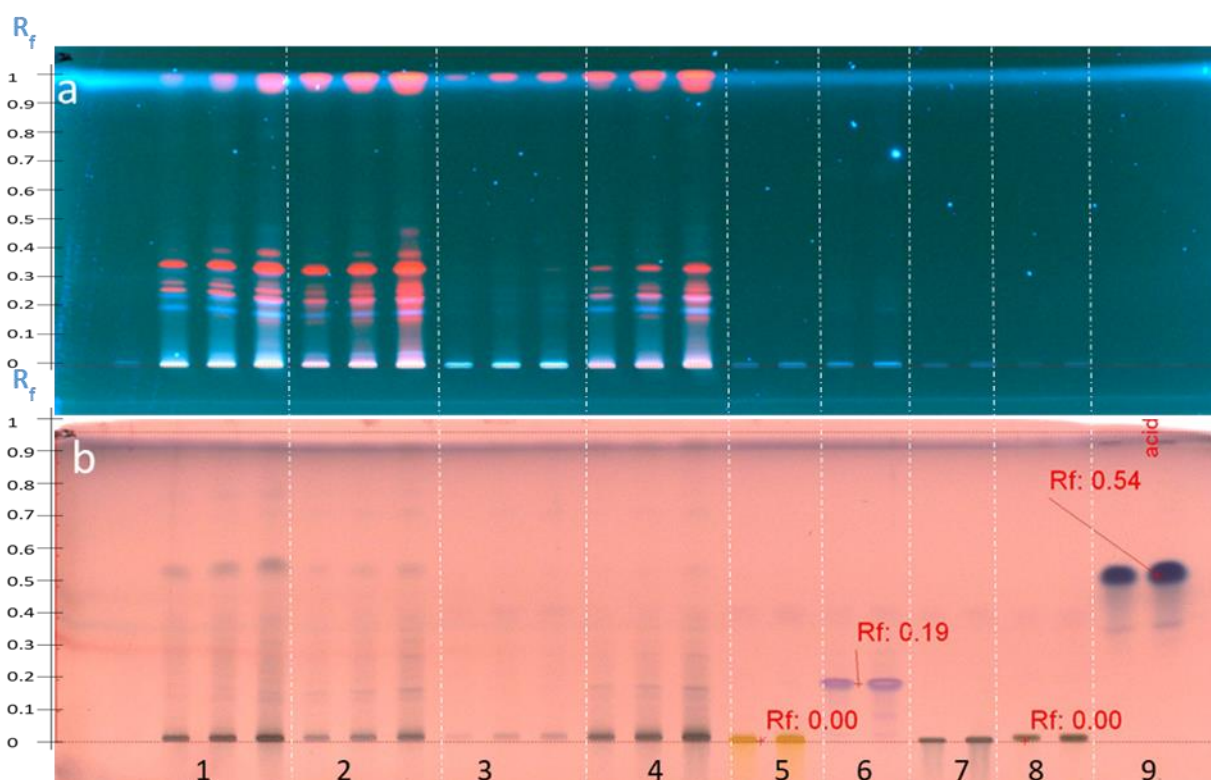


Figure 44: Profil HPTLC des 4 extraits de Zaghouan obtenus selon P1 (piste 1), P2 (piste 2), P3 (piste 3) et P4 (piste 4) en triplicata (4, 6 et 10  $\mu\text{L}$  successivement pour une isocentration de 5 g/L), ainsi que les standards, solanine (piste 5), sénégenine (piste 6), digitonine (piste 7), glucose-fructose (piste 8) et l'acide oléanolique (piste 9) avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (b) sous lumière blanche.

### 5.3 Révélation des triterpénoïdes et identification de l'Azukisaponine V à l'aide du système de développement multiple 2 (S2)

#### 5.3.1 Mise en œuvre de l'analyse HPTLC des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3, P4 et M1 avec le système de développement multiple S2

La mise en œuvre de l'HPTLC selon le système de développement S2 a été réalisée sur les extraits de Zaghouan, obtenus selon la méthode d'extraction, M1 et les différents protocoles P1, P2, P3 et P4.

10  $\mu\text{L}$  des extraits de Zaghouan obtenu selon P1, P2, P3 et P4 et selon M1 (0,05 mg de matière) ont été déposés sur une plaque de silice. Ont été déposés 10  $\mu\text{L}$  de soyasaponine B dont la concentration est de 1 g/L (0,01 mg de matière), 5  $\mu\text{L}$  de Soyasapogénol dont la concentration est de 1,86 g/L (0,0093 mg de matière), 5  $\mu\text{L}$  pour les standards solanine, sénégenine et digitonine dont la concentration est de 1 g/L (0,005 mg de matière) et finalement 10  $\mu\text{L}$  d'acide oléanolique dont la concentration est de 1,02 g/L (0,01 mg de matière). Le système de développement est S2 et la détection a été mise en œuvre par la dérivation à l'anisaldéhyde et avant dérivation sous UV à 366 nm.

Tous les échantillons ont été analysés en duplicata.

#### 5.3.2 Optimisation de l'HPTLC de l'extrait ZA obtenu par les différents protocoles d'extraction

Les mêmes extraits cités précédemment ont été analysés une deuxième fois en gardant les mêmes paramètres HPTLC mais en augmentant le volume de dépôt pour ZA-P3 (25  $\mu\text{L}$ ).

Une plaque 10\*10 cm a été utilisée. Seuls la soyasaponine, le soyasapogénol et l'acide oléanolique ont été déposés comme standards sur cette plaque. 10 µL de soyasaponine B dont la concentration est de 1 g/L (0,01 mg de matière), 5 µL de Soyasapogénol dont la concentration est de 1,86 g/L (0,0093 mg de matière) et 10 µL d'acide oléanolique dont la concentration est de 1,02 g/L (0,01 mg de matière).

### **5.3.3 Identification des saponines dans les extraits BI-P1, SI-P1, ZAI-P1 et KAI-P1 et suivant le système de développement S2**

Les 4 extraits des 4 populations obtenus selon le protocole P1 ont été analysés suivant S2. 10 µL des extraits à isoconcentration (5 g/L) de Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan ont été déposés (0,05 mg de matière). Pour les standards 10 µl de Soyasapogénol (1 g/L de concentration /0.01 mg de matière) et 5 µL de Soyasaponine (1.86 g/L de concentration/0.0093 mg de matière) ont été déposés.

### **5.3.4 Identification des saponines dans les extraits BI-P4, SI-P4, ZAI-P4 et KAI-P4 et suivant le système de développement S2**

10 µL de chaque extrait BI-P4, SI-P4, ZA-P4 et KAI-P4 ont été déposés à isocentration de 5 g/L sur la plaque de silice. Les extraits P1 ont été déposés en conservant la même concentration d'extrait (5 g/L) et le même volume de dépôt (10 µL) que précédemment. Les mêmes standards soyasaponine (1.73 g/L) et soyasapogénol (1 g/L) ont été déposés. Le système de développement S2 a été utilisé pour l'élution des extraits.

## **6 Analyse par spectrométrie de masse trappe d'ions en mode ESI-(SM, SM<sup>2</sup>)**

Les extraits ZA-P1, ZA-P2, ZA-P3, ZA-P4 et ZA-M1 (1 g/L) ont été analysés directement par spectrométrie de masse trappe d'ions en mode ESI- (SM, SM2) et BI-25 mg-M1 ainsi que BI-300 mg-M1, en mode ESI+ (SM, SM2) ainsi que les standards Soyasaponine (1g/L) et soyasapogénol (1,86 (g/L). Le détecteur de masse est un piège à ions Amazon SL L. Le débit de la seringue est de 5 µL/min. L'enregistrement des spectres de masse a été établi avec un temps d'accumulation de 50 µs, et une alternance de polarité pour deux gammes de masses de 50 à 1000 m/z et 1000 et 2000 m/z.

La tension du capillaire de source ESI est ajustée à 4,5 kV. La pression du nébuliseur est fixée à 7,3 psi d'azote, la température de désolvatation est de 180°C et la désolvatation a un débit de 4 L/min.





Figure 45: Spectromètre de masse trappe d'ions

## 7 Analyse par couplage HPTLC-SM/UV-vis

Pour le couplage HPTLC-SM, les spots localisés à  $R_F = 0,2$  pour ZA-P1, ZA-P2, ZA-P3 et ZA-P4 ont été adsorbés directement de la plaque grâce à l'interface CAMAG (Figure 46).

Les échantillons de plaque ont été prélevés sur une chaîne Ultimate 3000 (ThermoFisher, France) équipée d'une pompe binaire et d'un injecteur automatique montés en série avec l'interface de prélèvement et le détecteur de masse. Le solvant utilisé est le méthanol de qualité HPLC à un débit de 0,3 mL/min. La durée de chaque échantillon est fixée à 20 secondes.

L'enregistrement des spectres de masse a été établi avec un temps d'accumulation de 50  $\mu$ s, et une alternance de polarité pour deux gammes de masses de 50 à 1000 m/z et 1000 et 2000 m/z.

Le détecteur de masse est un piège à ions Amazon SL avec une interface d'ionisation par électrospray. La tension du capillaire source ESI est ajustée à 4,5 kV. La pression du nébuliseur est fixée à 40 psi d'azote, la température de désolvatation est de 200°C et la désolvatation à un débit de 9 L/min.

Tous les échantillons ont été analysés en continu.

Le traitement des données est opéré par le logiciel Hystar.



Figure 46: Interface CAMAG pour couplage HPTLC-SM

## 8 HPTLC préparative pour BI-300 mg -M1

L'extrait BI-300 mg obtenu par la méthode d'extraction M1a été analysé, purifié par HPTLC, selon les conditions décrites dans la partie 5.2.1.1. Après élution et séchage, le spot correspondant au  $R_f = 0,6$  a été désorbé par grattage manuel de la plaque de silice puis extrait avec 1 mL de MeOH. L'extrait obtenu a été analysé par UPLC.

## 9 Analyse quantitative des saponines

### 9.1 Dosage colorimétrique

La détermination quantitative des saponines des extraits des 4 populations obtenus par le protocole d'extraction P1 (B1-P1, ZA-P1, KAI-P1 et SI-P1), ainsi que l'extrait ZA-P3 a été réalisée suivant la méthode de Ncube et al (2011) modifiée [186]. En microplaque 96 puits, 25  $\mu$ L d'échantillon ou bien le standard soyasapogénol à différentes concentrations : 10, 25, 50,80 et 100 mg sont introduits, puis 25  $\mu$ L de la vanilline (8%) et 250  $\mu$ L d'acide sulfurique à 72%. L'ensemble est mis à incuber à 45°C pendant 15 minutes. Après refroidissement la lecture se fait à 544 nm.

La quantité des saponines pour chaque population est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de soyasapogénol (Figure 47) suivante :

$$y = 0,0056x + 0.1075$$

L'appareil utilisé est un BMG-Labtech Spectrostar-Nano.

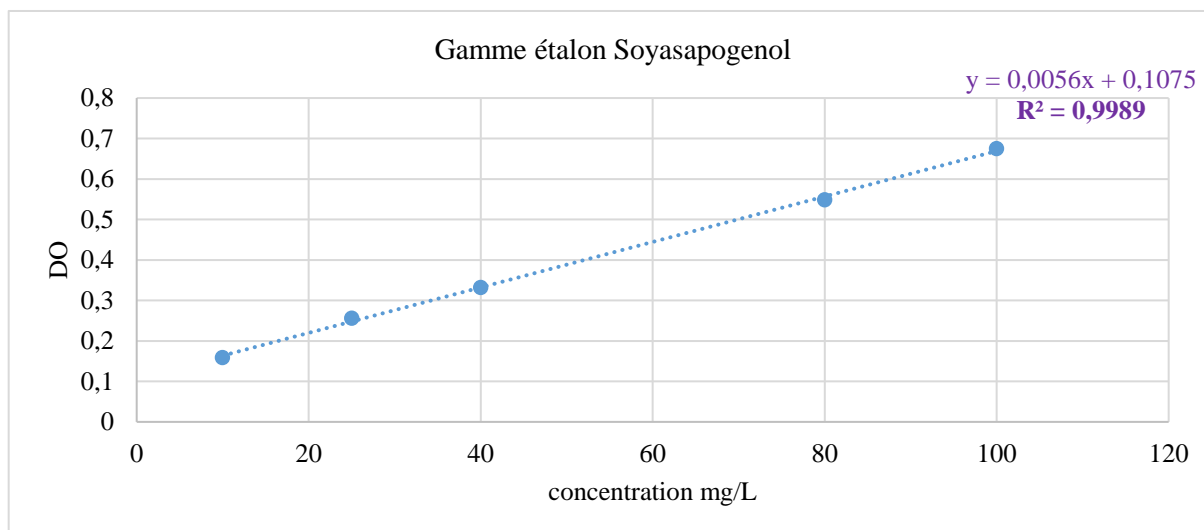


Figure 47: Courbe d'étalonnage de Soyasapogénol

#### 9.1.1 Limite du dosage colorimétrique des saponines

Le dosage des saponines par la réaction de la vanilline et de l'acide sulfurique a été utilisé selon la procédure rapportée par Hiai et al. (1976) [259].

0,5 mL de solution d'échantillon aqueux, 0,5 mL de solution de vanilline à 8 % (p/v) et enfin 5,0 mL d'acide sulfurique à 72 % (p/v) ont été ajoutés et mélangés dans un bain d'eau glacée. Ensuite le mélange a été réchauffé dans un bain à 60°C pendant 10 minutes puis refroidi dans de l'eau glacée. Comme étalon de saponine, la sénégénine a été utilisée. La courbe d'étalonnage a été obtenue pour les valeurs d'absorbance mesurées à 527 nm.

Plusieurs composés ont été testés en parallèle pour valider leurs réactions croisées avec l'acide sulfurique et la vanilline : rutine (0,1 g/L), quercétine (0,5 g/L), lutéoline (2,3 g/L), acide coumarique (2,9 g/L), acide galacturonique (2 g/L), lutéoline glucoside (0,45 g/L), apigénine (13 g/L), acide. Chlorogénique (0,5 g/L), acide. Tannique (1,1 g/L), catéchine, glucose-fructose, quercétine (0,5 g/L), acide caféique (0,5 g/L), saccharose (0,25 g/L).

## 9.2 Dosage de Soyasapogenol par densitométrie pour ZA-P3

2  $\mu$ L d'une gamme de concentrations de soyasapogenol : 1 g/L, 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,125 g/L, 0,0652 g/L et 0,0312 g/L correspondant aux dépôts de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 et 0,0625  $\mu$ g, ont été déposés sur une plaque de silice 10  $\times$  10 cm. De même, deux répliqués de la phase chloroforme de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (15  $\mu$ L) et de l'extrait de Zaghouan-P3 avant et après hydrolyse (25  $\mu$ L) et le standard de la saponine de soja (5  $\mu$ L d'un 1,73 g/L) ont été déposés. Après élution SS2 et révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique, la courbe d'étalonnage a été calculée à partir des aires des pics des 6 concentrations différentes du soyasapogenol de référence. Le coefficient de corrélation  $R^2$  était de 0,9929 et l'équation utilisée est la suivante :  $y = 2156,6x + 200,45$  (Figure 48).

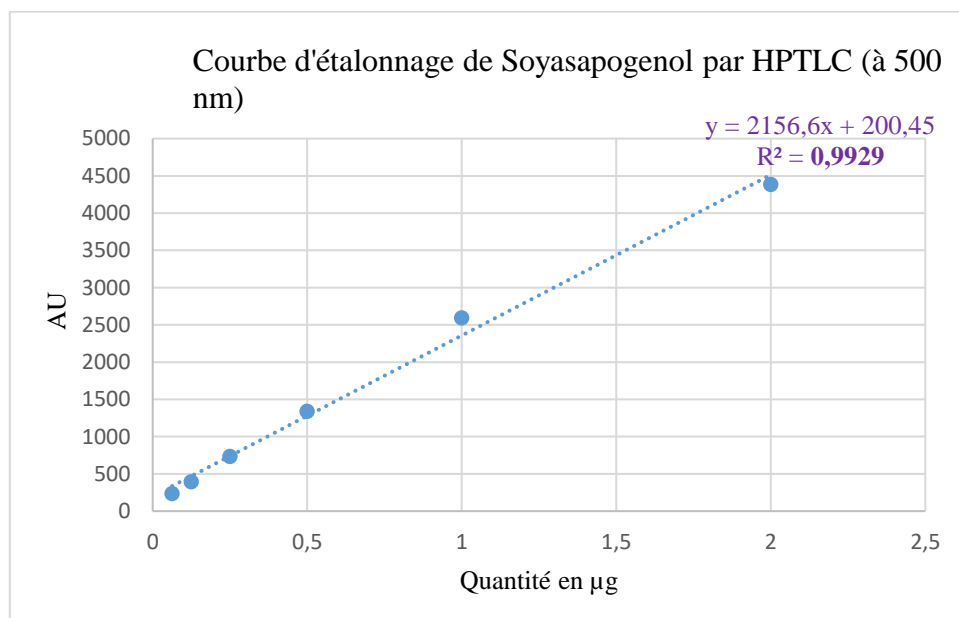


Figure 48 : Courbe d'étalonnage du Soyasapogenol en fonction des aires des pics à 500 nm

## 10 Criblage des saponines par spectrométrie infrarouge IF

### a. Principe

L'identification qualitative effectuée par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est faite en mode réflexion totale atténuée (ATR), alors que l'échantillon est déposé sur un cristal de réflexion.

Les spectres sont enregistrés entre 4000 et 200  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 1  $\text{cm}^{-1}$ .

Pour le blanc, le KBr est utilisé. Pour l'analyse de l'échantillon, 3 mg des échantillons sont utilisés avec 250 mg de kbr.

### b. Appareillage

- Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (domaine spectral minimal : 4000  $\text{cm}^{-1}$  - 200  $\text{cm}^{-1}$ ).

- Un logiciel d'acquisition et de traitement des spectres infrarouge permettant de déterminer les surfaces des bandes d'absorption.
- Un accessoire permettant de réaliser des analyses infrarouges par Réflexion Totale Atténuée (ATR) muni d'un cristal dont le domaine spectral minimal est compris entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  et 200  $\text{cm}^{-1}$ .
- Une lamelle transparente aux rayons infrarouges dans le domaine spectral de l'étude (iodure de bromure de potassium (KBr)).
- Une cuve scellée avec fenêtre en KBr de 0,1 cm de trajet optique pour la spectrométrie infrarouge.
- Seringues de remplissage des cuves infrarouges.

## 11 Dosage des polyphénols

La concentration des polyphénols totaux est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (AOAC SMPR 2015.009).

En microplaque de 96 puits, utilisant comme blanc l'eau distillée, une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique comme standard à des concentrations croissantes (0, 10, 25, 50 et 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) est établie à l'aide d'un lecteur de plaques BMG-Labtech Spectrostar-Nano.

Chaque échantillon de tous les extraits obtenus selon P1, P4 et M1, a été préalablement dilué pour que sa concentration finale en polyphénols totaux soit dans la gamme de concentrations de la courbe d'étalonnage.

Pour effectuer la mesure, dans chaque puits, sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  d'étalon de concentration initiale comprise entre 10 et 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 20% d'échantillon, 10  $\mu\text{L}$  de réactif de Folin (VWR). L'ensemble est agité pendant 20 secondes puis 170  $\mu\text{L}$  de base  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2,36% sont ajoutés et le tout est agité pendant 10 secondes. Chaque échantillon est analysé dans 8 puits distincts et la lecture d'absorbance est réalisée à 700 nm et 45°C pour un temps de réactions de 45 minutes.

Après analyse, l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 49) suivante est obtenue :  $x_1 = y - b/m$

où  $x_1$  est la concentration (mg équivalent Acide Gallique (EAG)),  $y$  est l'absorbance,  $b$  est l'interception avec l'ordonnée et  $m$  est la pente de la droite.

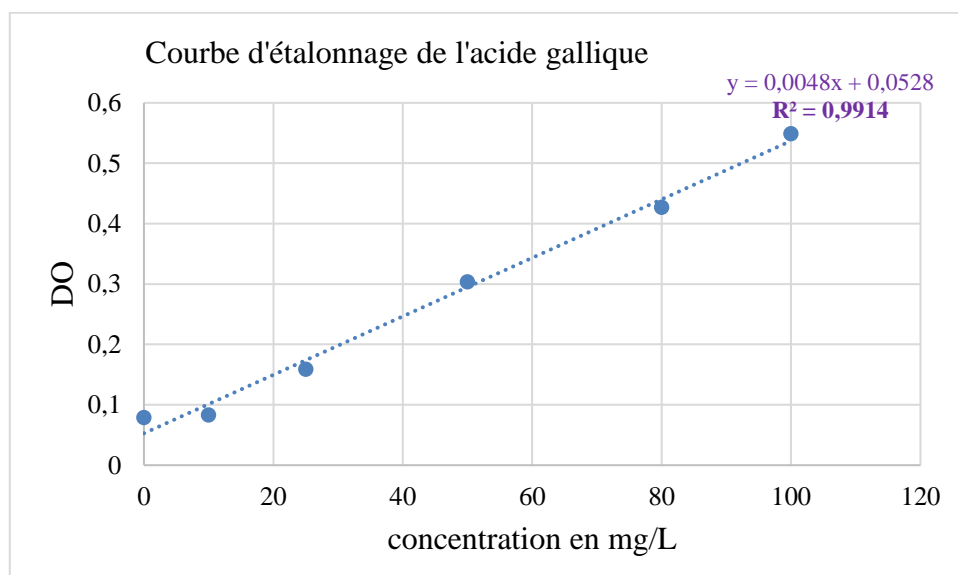


Figure 49: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

## 12 Évaluation de l'activité antiradicalaire

### Description du protocole

L'activité antioxydant des extraits des 4 populations obtenus par les protocoles optimisés numéro 1 et 4, est déterminée avec la méthode au radical 2.2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Brandwilliams et al, 1995) [260].

Avant d'analyser les échantillons, une solution de DPPH (sigma ALDRICH) dans le méthanol a été préparée pour obtenir une absorbance comprise entre 0,9 et 1 à 516 nm.

Pour effectuer la mesure : en microplaque en quartz de 96 puits, utilisant le méthanol comme blanc et comme standard un mélange de 150 µL de solution de DPPH et 150 µL d'échantillon plus le méthanol pour arriver à un volume de 300 µL par puit.

Le contrôle positif c'est le Trolox (Figure 50).

Pour chaque extrait 7 concentrations ont été réalisées et pour la même dilution d'extrait 5 reliquats sont analysés et la lecture d'absorbance est réalisée à 516 nm pour un temps de 45 minutes par un lecteur de plaques BMG-Labtech Spectrostar-Nao.

Le standard de référence utilisé est le Trolox.

L'activité antiradicalaire est déduite d'une courbe réponse tracée selon la fonction suivante :

$$F(MSi)=1-A/A0$$

où MSi est la concentration de chaque solution d'extrait en g/L, A est l'absorbance du mélange réactionnel et A0 est l'absorbance de DPPH.

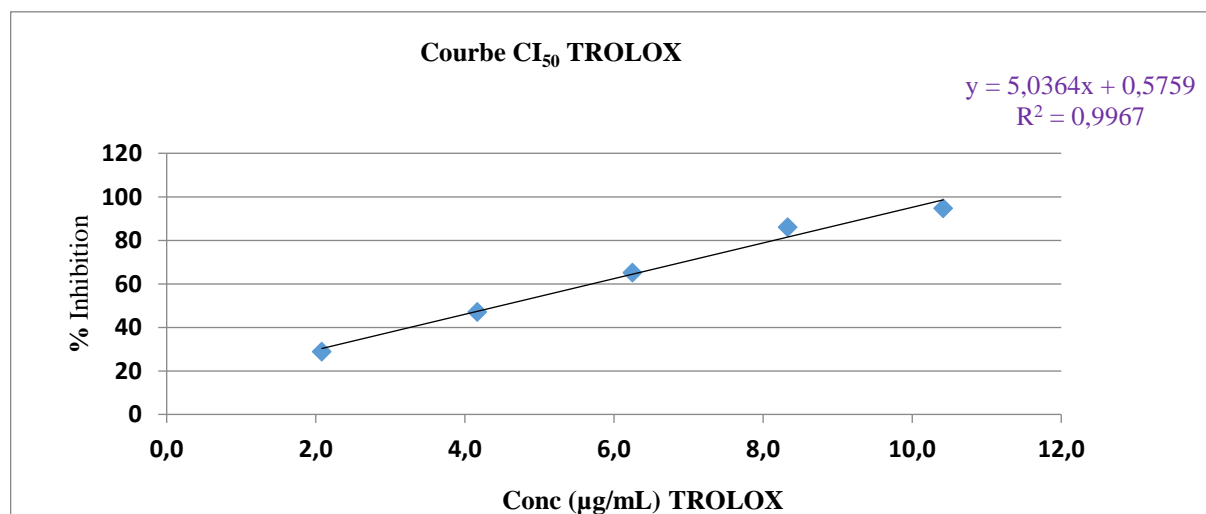


Figure 50 : Courbe CI<sub>50</sub> du TROLOX

## 13 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits d'*Astragalus hamosus L.*

### 13.1 Évaluation de l'activité anti- acétylcholinestérase

#### 13.1.1 Évaluation qualitative par HPTLC-bio autographie de l'activité anti-cholinestérase

10 µL de chaque extraits ZA-P1, BI-P1, SI-P1 et KAI-P1 à isoccentration de 5 g/L, ainsi que 5 µL des deux standards soyasaponine (1 g/L) et soyasapogenol B (1,86 g/L) ont été déposés sur une plaque TLC de gel de silice 10\*10 et développée avec S2.

Après séchage à l'air libre la plaque a été pulvérisée avec le réactif DTNB/ATCI (DTNB 1 mM et ATCI 1 mM dans le tampon A (Tris HCL 0,005 M, PH8, 0,1 % de BSA)) jusqu'à ce que la silice soit saturée avec le solvant, mais sans que les taches s'écoulent. La plaque a été laissée sécher à nouveau pendant 3 à 5 min, puis 3 U/mL de solution enzymatique acétylcholinestérase ont été pulvérisées. Un fond jaune est apparu, avec des taches blanches pour les composés inhibiteurs qui deviennent visibles après environ 5 min. Ceux-ci ont été observés et enregistrés dans les 15 minutes car ils disparaissent en 20 à 30 minutes [261].

#### 13.1.2 Évaluation quantitative par dosage spectrométrique de l'activité anti-cholinestérase

L'activité anti-cholinestérase AChE a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits basé sur la méthode d'Ellman. L'enzyme hydrolyse le substrat acétylthiocholine, en acide acétique et thiocholine, qui réagit avec le réactif d'Ellman (DTNB) pour produire du 2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine et du 5-thio-2-nitrobenzoate qui peuvent être détectés à 405 nm. Avant de commencer, deux tampons ont été préparés, le tampon A (Tris HCL 0,005 M, PH8, 0,1 % de BSA) et le tampon B (Tris HCL 0,05 M, PH8, contenant 0,1 M NaCL, 0,02 MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O). Dans les plaques à 96 puits, 25 µL d'ATCI (15 mM dans l'eau), 125 µL de DTNB (3 mM dans le tampon B), 50 µL de tampon B, 25 µL d'échantillon ont été ajoutés, (les extraits ZA-P1, SI-P1, BI-P1, KAI-P1, ZA-P4, SI-P4, BI-P4 et KAI-P4 ont été évaporés, repris dans du DMSO et dilués dans le tampon A pour obtenir les concentrations suivantes : 1, 0,5, 0,5, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015, 0,0078 et 0,0039 g/L.

L'absorbance a été mesurée premièrement à 405 nm. Cette première absorbance correspond au blanc d'extrait. Après l'ajout de 25 µL de 0,22 U/mL d'enzyme, l'absorbance a été à nouveau lue toutes les 42 s pendant 5 fois.

Le blanc contient tous les réactifs sans l'acétylcholinestérase.

Le contrôle contient tous les réactifs sauf l'extrait.

Le témoin positif est la galanthamine.

**Le résultat est exprimé en pourcentage d'inhibition I selon la formule suivante :**

$$I (\%) = 100 - (A \text{ échantillon} / A \text{ contrôle}) * 100$$

### 13.2 Évaluation de la neuroprotection des extraits d'*Astragalus hamosus L.* contre la toxicité du peptide AB

#### 13.2.1 Culture des cellules PC12 :

Les cellules PC12 ont été achetées chez Sigma Aldrich. Toutes les manipulations ont été faites en conditions stériles. Les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> et cultivées dans un milieu contenant 85% de "Roswell Park Memorial Institute medium" (RPMI). Ce milieu est



complémenté de 10% de sérum fœtal de veau FBS et de 5 % de glutamine et aucun antibiotique a été ajouté au milieu. Les cellules sont incubées à 37°C à 5% de saturation en CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Le milieu est renouvelé toutes les 48 à 72 h.



Figure 51: Lignée cellulaire PC12 de la médullo-surrénale de rat après 10 jours d'incubation

### 13.2.2 Entretien des cellules PC12

Les cellules PC12 adhèrent très mal au plastique elles sont alors récupérées par centrifugation. Le culot contient les cellules mortes et le peu de cellules qui s'adhèrent au plastique ont été traitées par trypsinisation. 2 mL de trypsine ont été ajoutées dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup>, on incube de 3 à 4 minutes à l'étuve. La trypsine se neutralise en ajoutant le milieu de culture. Ensuite les cellules ont été lavées avec du DPBS avant de remplir les puits.

### 13.2.3 Préparation de la solution de collagène

Le Collagène de type IV (Sigma C5533) a été utilisé dans les manipulations. Il a été préparé dans l'acide acétique 0,1 M pour obtenir une solution de collagène 0,01 %. 4 µL de cette solution ont été ajoutés dans tous les puits des plaques utilisées. Après 24h d'incubation, l'excès de collagène a été éliminé par un lavage avec du DPBS.

### 13.2.4 Préparation du peptide AB

Le peptide Aβ 25–35 a été acheté chez Sigma-Aldrich et a été préparé dans de l'eau ultra pure à 1% d'acide acétique. Une solution mère à 1 M a été préparée. Le flacon a été incubé à 37 °C pendant 7 jours pour induire l'agrégation et les concentrations souhaitées de 25 µM, 15 et 5 µM ont été préparées immédiatement dans le RPMI avant leur utilisation dans les expériences [262].

### 13.2.5 Conditions expérimentales :

Pour le besoin des expériences, les cellules PC12 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits induites par le collagène IV à raison de 30\*10<sup>3</sup> par puits. À 100 µL de la suspension cellulaire, 100 µL de milieu RPMI sont ajoutés. Après 24 heures d'incubation à 37°, les puits sont vidés et les cellules sont mises en présence des extraits/fractions riches en saponines à différentes concentrations pour le test de viabilité et en présence des fractions et du peptide β-amyloïde (βA) à 5 µM dilué dans le milieu de culture RPMI pour le test de neuroprotection. Le βA utilisé est le

peptide  $\beta$ A25-35 contenant la séquence 25-35, séquence minimale nécessaire pour induire la mort cellulaire in vitro [263]. Après la mise en contact avec l'extrait et le peptide, les plaques sont incubées 48 H à 37°C.

Les plaques ont été préparées comme suit :

**Contrôle (a) :** Correspond à 100% de viabilité des cellules PC12). Dans 6 puits de chaque plaque seules les cellules PC12 sont introduites avec le milieu de culture RPMI.

**Témoin Négatif (b) :** Dans la moitié des plaques, la viabilité des cellules a été testée en présence des extraits seulement.

**Témoin positif (c) :** Dans toutes les plaques, seul le peptide  $\beta$ A est introduit à différentes concentrations (3 répétitions pour chaque concentration : 25, 15 et 5  $\mu$ M).

**Expérience (d 1-4) :** C'est le test de neuroprotection : Dans la moitié des plaques, les extraits à tester sont ajoutés (3 répétitions pour chaque extrait) avec le peptide AB à 5  $\mu$ L dans tous les puits.

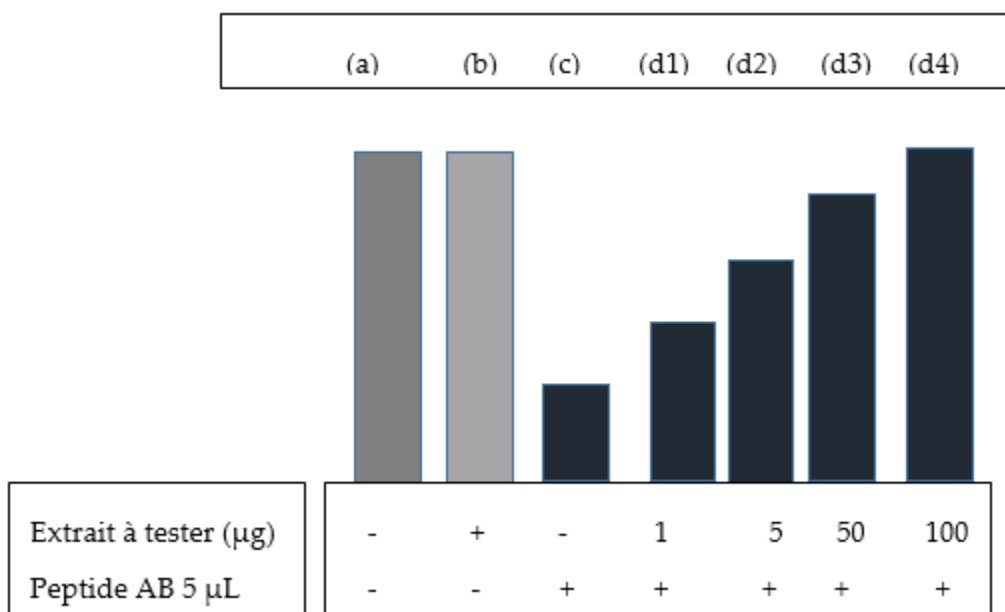


Figure 52: Mise en place du test de neuroprotection

### 13.2.6 Principe du test de viabilité et de neuroprotection

Le principe est basé sur la réduction du 3-(4,5-diméthylethiazol-2-yl)-2,5- diphényltétrazolium bromide (MTT) par une succinate déshydrogénase au niveau de la mitochondrie de la cellule. Seules les cellules vivantes qui sont métaboliquement actives pourront transformer le MTT hydrosoluble de couleur jaune, en des cristaux de formazan, insolubles et violets. Les cristaux sont ensuite dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance obtenue par une lecture spectrophotométrique, sera proportionnelle à la concentration de cellules vivantes.

### 13.2.7 Révélation

Après 48 h de mise en contact, tous les puits sont vidés puis la solution MTT à 0,5 mg/mL est préparée. 100  $\mu$ L de la solution MTT ont été ajoutés dans tous les puits. Les plaques ont été incubées pendant 3 h à 37°C. La solution de MTT est alors remplacée par 100  $\mu$ L de DMSO, à



l'abri de la lumière et à la température ambiante, pendant 30 minutes. Puis, une lecture spectrophotométrique est effectuée à 595 nm.

Les % de viabilité ont été évalués comme suit :

$$\% \text{ de viabilité} = (\text{Abs Éch} / \text{Abs Contrôle}) * 100$$

#### **14 Évaluation de l'activité anticancéreuse :**

Les mêmes fractions évaluées pour le test de neuroprotection ont été testées pour leurs activités anticancéreuses. Deux lignées cellulaires ont été évaluées :

##### **14.1 Culture des cellules HEK293 et CACO-2**

Les deux lignées ont été achetées auprès de Thermo Fisher. Les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> et cultivées dans un milieu contenant 82.5% de " Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM). Ce milieu est complétement de 10% de sérum foetal de veau FBS et de 5 % d'acides aminées et 2,5 % d'un mélange pénicilline-streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C à 5% de saturation en CO<sub>2</sub> en atmosphère humide jusqu'à atteindre au moins 85 % de confluence cellulaire.

##### **14.2 Entretien des cellules HEK293 et CACO-2**

Après le retrait du milieu de culture, les cellules ont été lavées avec 3,3 mL de DPBS. Les deux lignées sont adhérentes alors l'entretien se fait par l'ajout de 2 mL de trypsine qui permet la rupture des liaisons entre les cellules et le support de culture lors des passages. On incube les flasques de 3 à 4 minutes. La trypsine est neutralisée par l'ajout de 6 mL de DMEM.

Une centrifugation 400 tours/10 minutes permet de récupérer les cellules vivantes et les cellules mortes seront jetées avec le surnageant.

##### **14.3 Conditions expérimentales**

Pour le besoin des expériences, les cellules HEK293 et CACO-2 sontensemencées dans des plaques de 96 puits à raison de 12\*10<sup>3</sup> par puits. Le volume total dans chaque puit est de 200 µL, 100 µL de la suspension cellulaire et 100 µL de DMEM. Après 24 heures, d'incubation à 37°C, les cellules sont mises en contact avec les fractions à tester. Le témoin positif utilisé est le Tamoxifène à 100, 10 et 1 µmoL. Les plaques ont été incubées 48 h à 37 °C.

##### **14.4 Principe du test de cytotoxicité**

Le sel de tétrazolium a été utilisé pour développer un test colorimétrique quantitatif pour la survie et la prolifération des cellules de mammifères. Le test détecte les cellules vivantes, mais pas les cellules mortes.

Le sel de tétrazolium MTT contient un anneau de tétrazolium qui est réduit en formazan de couleur violette en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

L'intensité de la couleur est alors proportionnelle à l'activité de la succinate déshydrogénase et donc de cellules vivantes [264].

### **14.5 Révélation**

Après 48 h d'incubation, la solution MTT à 1 g/L est préparée. Les puits vidés sont remplis par 50 µL de la solution MTT et mises en culture 40 minutes. Ensuite la solution est remplacée par 50 µL de DMSO qui permet de solubiliser les cristaux de formazan formés. La lecture d'absorbance se fait à 605 nm, précédée de 10 secondes d'agitation.

Le résultat est exprimé en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - ((\text{Abs Éch} / \text{Abs Contrôle}) * 100)$$

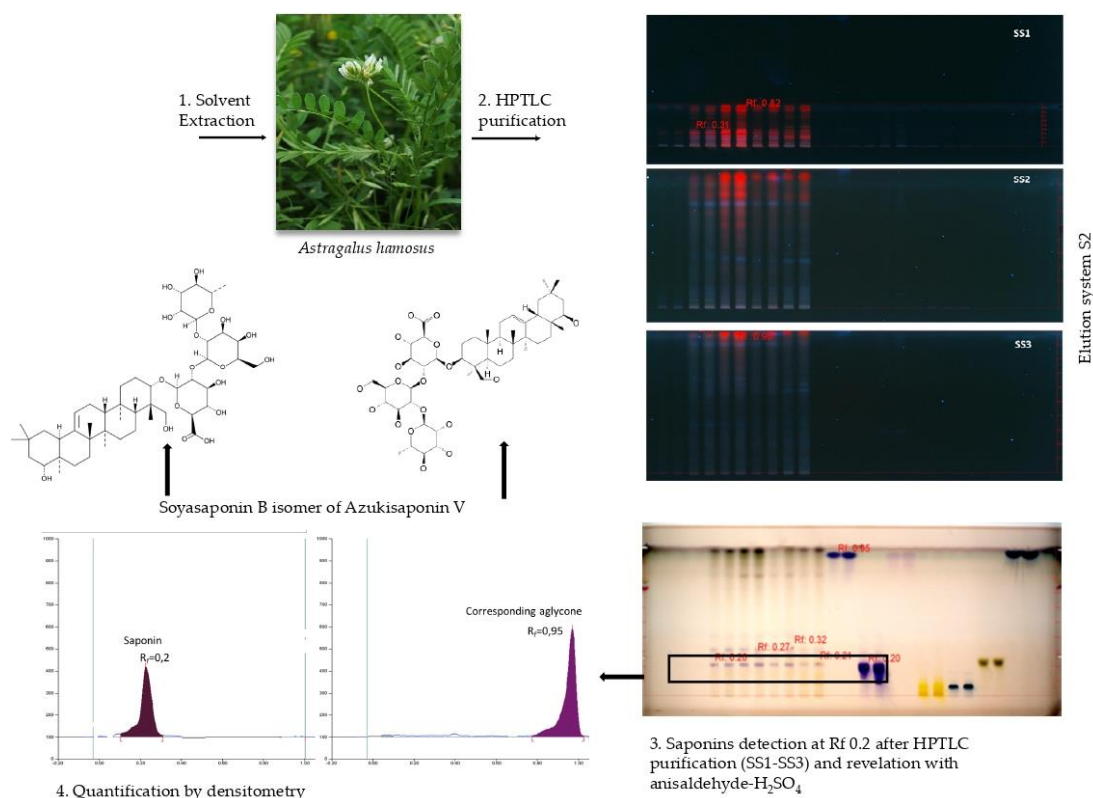
Chapitre 3 : Extraction et Caractérisation de quatre populations tunisiennes d'*Astragalus hamosus* L. – Hypothèse d'identification des saponines triterpenoïdes.

## Introduction :

En raison de leurs caractéristiques chimiques et structurales particulières, l'extraction et l'isolement des saponines des plantes représentent un sérieux défi. Ce chapitre 3 présente les protocoles d'extraction spécifiques qui ont été développés et mis en œuvre pour extraire les métabolites secondaires et, plus précisément, les saponines d'*Astragalus hamosus* L. issus de quatre populations tunisiennes provenant des localités de Bizerte, Zaghouan, Kairouan et Siliana. La purification ultérieure des extraits et la caractérisation des fractions a été basée sur une seule technique chromatographique, la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC), en appliquant différents systèmes de développement.

Finalement, une tentative d'identification par couplages HPTLC/UV-Vis/Spectrométrie de masse des saponines triterpénoïdes présentes dans les extraits natifs ou purifiés d'*Astragalus hamosus* L. est exposée dans ce chapitre.

Une partie des travaux a fait l'objet d'un article intitulée : « Screening for *Astragalus hamosus* L. Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods : Prior Identification of Azukisaponin Isomers » et publié dans le journal *Molecules* (K.Nafti et al., 2022). Cet article rapporte l'investigation menée sur *Astragalus hamosus* L. et décrit la stratégie menée pour isoler les saponines, ce qui est rendu difficile en raison notamment de leurs propriétés amphiphiles. Différents protocoles d'extraction adaptés de la littérature ont été étudiés pour cibler les fractions de saponines, et les phases mobiles de polarité HPTLC ont été développées et optimisées pour améliorer l'isolement des molécules. Les difficultés de détection des saponines d'*Astragalus hamosus* L. rencontrées lors de l'extraction et de la purification des extraits ont été mises en évidence et la stratégie mise en œuvre pour isoler les saponines a été discutée.



# 1 Caractérisation de la matière végétale *Astragalus hamosus*

## 1.1 Détermination des taux d'extractibles

Les taux d'extractibles à l'eau et à l'éthanol ont été déterminés selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Les taux d'hydrosolubles sont plus élevés que ceux des extractibles à l'éthanol. Ceci note une plus grande présence de molécules polaires dans les extractibles. Siliana exhibe les valeurs en extractibles les plus faibles (Figure 53).

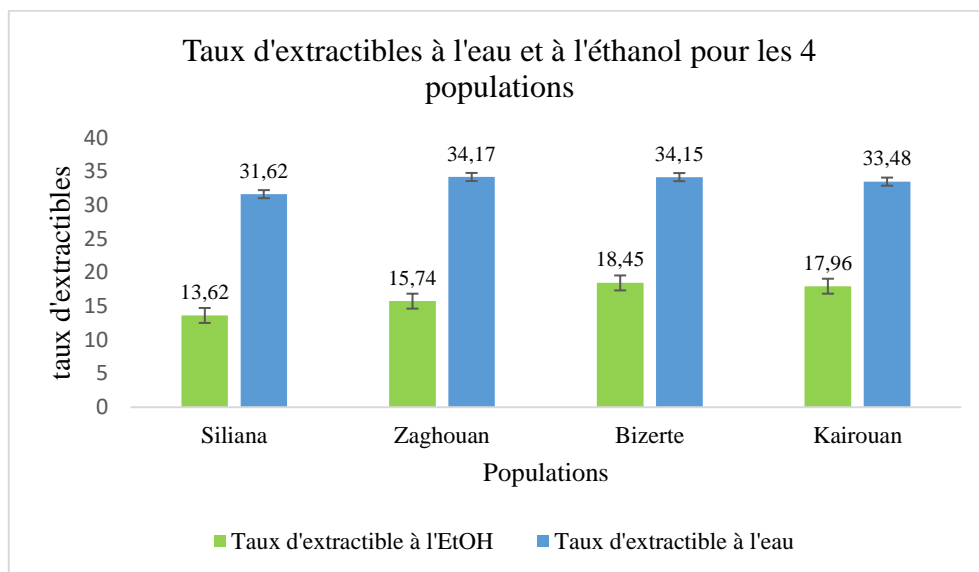


Figure 53: Détermination des taux d'extractibles à l'éthanol et à l'eau des 4 populations

## 1.2 Détermination des taux de matières minérales des 4 populations d'*Astragalus hamosus*

*L.*

Les taux de matière minérale ont été déterminés selon le protocole opératoire décrit dans le chapitre 2. Ces taux varient de 14 à 20% pour les 4 populations (Figure 54), Siliana et Zaghouan étant les plus riches en minéraux. Bizerte et Kairouan quant à elles ont une teneur proche et plus faibles.

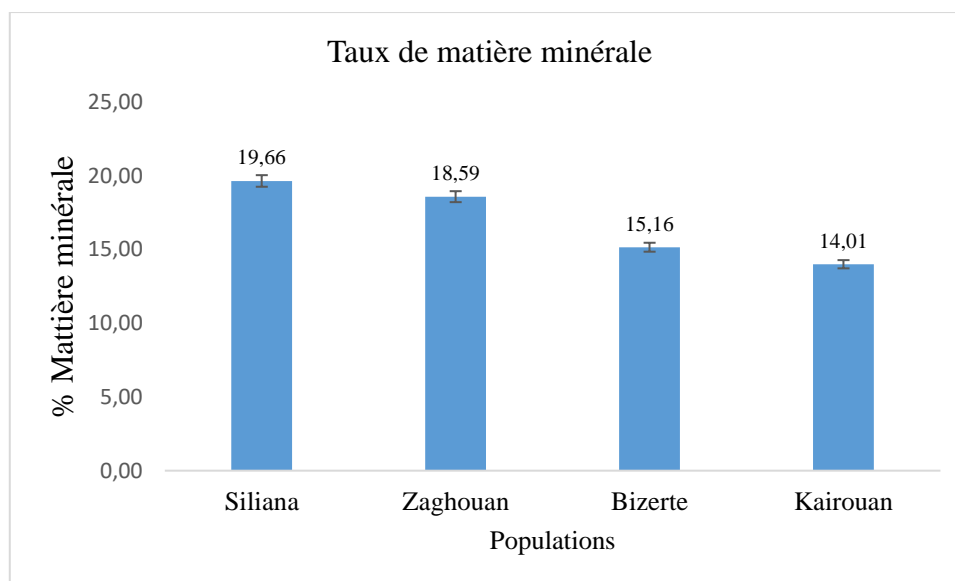


Figure 54: Taux de matière minérale

## 2 Criblage des saponines d'*Astragalus hamosus*

Différents protocoles adaptés de la littérature ont été mis en œuvre pour tenter d'isoler les saponines d'*Astragalus hamosus*. Les extraits obtenus ont alors été purifiés et analysés par HPTLC après optimisation des systèmes de développement et de révélation. La stratégie mise en place afin d'isoler les saponines d'*Astragalus hamosus L.* a fait l'objet d'une publication intitulée « Screening for *Astragalus hamosus L.* Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods : Prior Identification of Azukisaponin Isomers » dans le journal *Molecules* (K. Nafti et al., 2022). (Figure 55).

Article

## Screening for *Astragalus hamosus* Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods: Prior Identification of Azukisaponin Isomers

Khouloud Nafti <sup>1,2,\*</sup>, Geraldine Giacinti <sup>1,3</sup>, Sonia Marghali <sup>2</sup>  and Christine Delgado Raynaud <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Ago-Industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRAE, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis 1068, Tunisia

<sup>3</sup> Centre d'Application et de Traitement des Agro-Ressources (CATAR), Toulouse-INP, ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France

\* Correspondence: khouloud.nafti@toulouse-inp.fr (K.N.); christine.raynaud@toulouse-inp.fr (C.D.R.)

**Abstract:** Due to their particular structural characteristics, the extraction and isolation of saponins from plants present a serious challenge. In this study, specific extraction protocols were first implemented to extract the secondary metabolites from *Astragalus hamosus* and, more precisely, the saponins. Subsequent purification of the extracts was based on a single chromatographic technique, high-performance thin-layer chromatography, applying two development systems: a one-step system that separated molecules according to their polarity and a multiple development system that made it possible to detect the triterpenoid saponins, azukisaponin or soyasapogenol at a retarded R<sub>f</sub> of 0.2. The difficulties of detecting the *Astragalus hamosus* saponins encountered during the extraction and purification of the extracts have been highlighted and the strategy carried out to isolate the saponins has been discussed.

**Keywords:** *Astragalus hamosus*; HPTLC; triterpenoid saponin; soyasaponin; azukisaponin



**Citation:** Nafti, K.; Giacinti, G.; Marghali, S.; Raynaud, C.D. Screening for *Astragalus hamosus* Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods: Prior Identification of Azukisaponin Isomers. *Molecules* **2022**, *27*, 5376. <https://doi.org/10.3390/molecules27175376>

Academic Editor: Roberto Mandrioli

Received: 22 July 2022

Accepted: 21 August 2022

Published: 23 August 2022

Figure 55: Article publié dans *Molecules* (K. Nafti et al., 2022).

### 2.1 Introduction

Les plantes sont une source précieuse d'une large gamme de métabolites secondaires utilisés comme produits pharmaceutiques, produits agrochimiques, arômes, parfums, colorants, biopesticides et additifs alimentaires. Au début du 19<sup>e</sup> siècle, de nombreux ingrédients sensibles ont été isolés et introduits dans la pratique médicale. *Astragalus* L. est l'un des plus grands genres de plantes à fleurs de la famille des Fabaceae. En tant qu'herbes annuelles ou pérennes, les plantes d'*Astragalus* L. sont largement répandues dans les régions tempérées et arides. Jusqu'à présent, on estime que le genre contient de 2000 à 3000 espèces et plus de 250 sections taxonomiques dans le monde entier [82].

*Astragalus hamosus* L. est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, prostrée ou ascendante, répandue dans le sud de l'Europe, la Méditerranée, le Caucase, l'Asie centrale et l'Asie du sud-ouest. Cette plante se présente sous la forme d'une herbe, avec des feuilles paripennées ou imparipennées. Son inflorescence est racémisée, les ombelles sont en forme d'épi ou solitaires, et les pédoncules sont généralement axillaires. Ses fleurs sont bractéolées ; des bractéoles sont présentes. Les étamines sont diadelphes, sans étamines vexillaires, et les anthères sont uniformes. L'ovaire est sessile ou pédonculé. Ses fruits sont sessiles avec deux valves uniloculaires ou partiellement ou totalement biloculaires par une membrane intrusive. Ses graines sont souvent réniformes [265]

*Astragalus hamosus* L. est l'une des plantes appartenant au genre *Astragalus* qui a été utilisée dans la phytothérapie et la médecine traditionnelle indienne et iranienne. Hachim et al. et Shojaii et al. ont démontré l'activité anti-inflammatoire significative des extraits alcooliques de gousses d'*Astragalus hamosus* L. sur des modèles animaux [266], [267]. En outre, l'analyse par Western blot de la cyclooxygénase-2, de l'interleukine-1 et du facteur de nécrose tumorale a montré que l'*A. hamosus* avait des effets renforcés contre la neuroinflammation causée par l'A $\beta$  dans un modèle de rat de la maladie d'Alzheimer [72]. Les travaux récents de Mahmoodi et al. ont mis en évidence les effets anti-prolifératifs de l'extrait d'*Astragalus hamosus* L. sur les cellules cancéreuses du sein [105].

Ces dernières années, la recherche sur les espèces d'astragale a progressé en raison de leur teneur en polyphénols [268],[269] et en saponines. Les espèces d'astragale contiennent à la fois des saponines cycloartane et oléane, des structures basées sur l'aglycone B de sapogénol [94].

Les saponines sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Elles agissent comme une barrière chimique ou un bouclier dans le système de défense des plantes contre les pathogènes et les herbivores [141]. Les saponines constituent un vaste groupe de glycosides largement répandus dans les plantes supérieures. Ce sont leurs propriétés tensioactives qui distinguent ces composés des autres glycosides. Elles se dissolvent dans l'eau pour former des solutions colloïdales qui moussent lorsqu'on les agite [270]. Les saponines sont des molécules polaires constituées d'un aglycone triterpénique ou stéroïdien avec une ou plusieurs chaînes de sucre. Elles constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés de produits végétaux naturels [271]. Les saponines sont incomplètement solubles dans deux solvants différents, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe [272].

La découverte des activités biologiques des saponines ne s'est pas limitée aux utilisations traditionnelles, mais aussi, plus récemment, à des applications pharmaceutiques [195]. Ces molécules ont des activités hémolytiques [143], [144], molluscicides, anti-inflammatoires, antifongiques ou anti-levures, antibactériennes ou antimicrobiennes, antiparasitaires, antitumorales et antivirales [145], anticancéreuses [135], [136], [161], et antioxydantes [149]–[151], et peuvent également agir comme adjuvant immunologique [273].

Dans l'*Astragalus hamosus*, un mélange de deux saponines a montré une activité antinéoplasique contre deux lignées cellulaires de carcinome mammaire (récepteurs d'œstrogènes MCF-7 (ER) positifs et MDA-MB 231-ER négatifs) [162], [163]. Deux saponines de type oléane, Peregrinozide I et Azukisaponin V d'*A. hamosus*, ont montré une modulation dose-dépendante de la prolifération des lymphocytes dans quatre types de cancer : BC1 (cancer du sein humain), Lu1 (cancer du poumon humain), Col2 (cancer du côlon humain) et LNCaP (cancer de la prostate humaine) [163]. L'importance des saponines en tant qu'agents pharmaceutiques, en particulier dans la lutte contre le cancer, a conduit à l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour répondre à la demande croissante [164]. Étant donné que les saponines sont généralement présentes dans les plantes sous la forme d'un mélange de formes structurellement apparentées avec des polarités très similaires, leur séparation reste un défi [274]. C'est pourquoi il est généralement nécessaire de combiner plusieurs techniques (par exemple, CCM, chromatographie sur colonne, chromatographie flash, chromatographie Sephadex et CLHP) afin d'obtenir des composés purs pour la détermination de la structure et de l'activité biologique [274],



[275]. En outre, l'absence de chromophore empêche leur confirmation et leur quantification par UV [276].

Un autre problème qui peut également être souligné est que la teneur en saponines est facilement affectée par la situation géographique, la méthode de culture, les phases de récolte et de nombreux autres facteurs, qui conduisent tous à une qualité non qualifiée, à une activité biologique réduite et à des applications cliniques limitées. Compte tenu des difficultés liées à la détermination des saponines, les chercheurs du monde entier ont proposé différentes méthodes d'analyse des saponines [223].

Très peu d'études phytochimiques ont été réalisées sur l'*Astragalus hamosus* L. et, à ce jour, une seule a été publiée sur l'*Astragalus hamosus* L. tunisien, mais elle n'a pris en compte que la morphologie [253].

La méthode de criblage HPTLC présente les avantages d'une analyse multi-échantillons avec une grande capacité de charge et une multiplicité de phases mobiles, ce qui en fait une technologie de séparation simple, rapide, efficace et stable [223]. En outre, l'HPTLC est devenue l'une des principales méthodes de détermination des saponines dans les médicaments et préparations naturels [277] et donne des résultats comparables à ceux de l'HPLC [278].

Environ 70 % des études réalisées sur l'extraction des saponines sont basées sur des technologies conventionnelles telles que la macération, l'extraction Soxhlet et l'extraction à reflux, et seulement 30 % sont basées sur des technologies vertes. Dans cette étude, des méthodes conventionnelles ont été appliquées, des plus simples aux plus complexes, afin de cribler les métabolites totaux d'*Astragalus hamosus* L. et d'identifier les saponines de cette plante [164], [279]. Les extraits obtenus ont été purifiés et analysés par HPTLC selon un système de développement simple qui séparait les métabolites en fonction de leur polarité et un système de développement multiple qui permettait la détection des saponines triterpéniques.

Cette étude rapporte l'investigation menée sur *Astragalus hamosus* L. et décrit la stratégie mise en œuvre pour isoler les saponines, ce qui est extrêmement difficile en raison de leurs propriétés amphiphiles. Différents protocoles d'extraction adaptés de la littérature ont été étudiés pour cibler les fractions de saponines, et les phases mobiles de polarité HPTLC ont été développées et optimisées pour améliorer l'isolement des molécules. C'est la première fois qu'un criblage chimique des saponines d'*Astragalus hamosus* L. de Tunisie est rapporté.

## 2.2 Matériel et Méthodes

### 2.2.1 Localisation, collecte et conservation des échantillons de plantes

Tous les réactifs et produits chimiques utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique.

La plante a été récoltée en mars 2019 en Tunisie dans quatre lieux géographiques différents du nord du pays : Zaghouan (36,3632487° N, 9,8998366° W), Siliana (36,0914446° N, 9,5667337° W), Bizerte (37,2529341° N, 9,7477197° O), et Kairouan (35,8476563° N, 9,5932661° O) (Figure 32). *Astragalus hamosus* a été identifié par le Pr. A. Zoghlami (Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Tunis, Tunisie), un spécimen de chaque population (22101, 22102, 22103 et 22104) a été déposé au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA, Université de Toulouse, INRAE, Toulouse, France), et un échantillon est disponible sur demande. Tout le

matériel végétal a été séché à l'air libre puis broyé en une poudre fine dans un mélangeur à glissière. La poudre fine de chaque population a été conservée dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à température ambiante.

### **2.2.2 Protocoles d'extraction**

Cinq protocoles d'extraction ont été choisis dans la littérature et adaptés pour extraire les saponines d'*Astragalus hamosus*, allant d'un simple protocole en une étape (M1) à des protocoles plus complexes en plusieurs étapes (P1, P2, P3 et P4) (Figure 56)

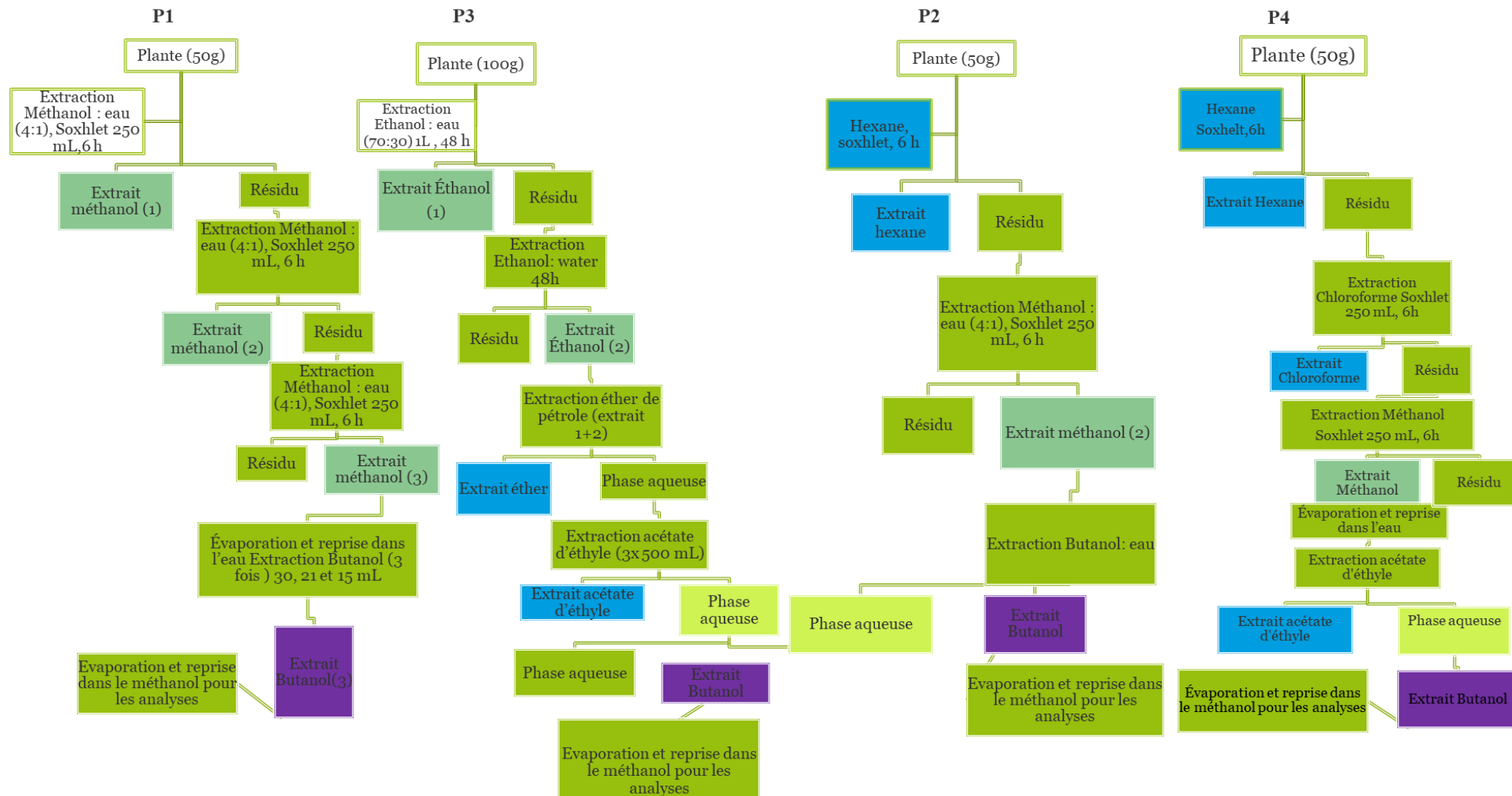


Figure 56: Schémas des protocoles d'extraction de P1 à P4. Une délipidation préliminaire a été réalisée avec de l'hexane dans les protocoles P2 et P4

La première méthode d'extraction liquide-solide adaptée de Khakimov et al [257] été mis en œuvre pour les 4 populations d'*Astragalus hamosus L.* des 4 lieux géographiques : Bizerte, Siliana, Kairouan et Zaghouan.

Pour ce processus, 25 mg de poudre de chaque population ont été mélangés avec 1,5 mL de MeOH à 85 % dans un tube Eppendorf, puis chauffés à 100 °C et agités dans un vortex en alternance pendant 5 minutes. Cette étape a été suivie d'une centrifugation à 15 000 x g pendant 3 min. Le surnageant a été récupéré et conservé à -20 °C avant analyse.

Le protocole d'extraction P1 a été adapté des travaux de Ma et al [280]. Pour cela, 50 g de poudre de chaque population ont été extraits et ont subi 3 cycles d'extraction Soxhlet pendant 6 h avec 250 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1). Les 3 extraits obtenus ont été réunis et évaporés à sec puis ajoutés à 25 mL d'eau distillée chaude à 70°C. Ensuite, 3 extractions liquide-liquide de la phase aqueuse avec 30, 21 et 15 mL successivement ont été réalisées. Les 3 fractions obtenues sont réunies, filtrées et évaporées à sec à 50°C.

Pour les autres protocoles d'extraction mis en place (P2-P4), seule la population de Zaghouan a été utilisée. Le protocole d'extraction P2 est celui de Kambouche et al. [258]: 50 g de poudre ont été extraits successivement avec 250 mL d'hexane, puis avec 250 mL de MeOH. Après élimination du solvant sous vide, le résidu de méthanol a été dissous dans de l'eau et réextrait avec 9 mL de n-BuOH.

Le protocole d'extraction P3 est celui de Maamria et al. [219] Cent grammes de la population de Zaghouan ont été macérés deux fois pendant 48 h dans 1 L d'EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30). Les 2 L récupérés ont été filtrés, séchés sous évaporation et placés dans 25 mL d'eau chaude distillée. Ensuite, 3 extractions liquide-liquide successives ont eu lieu avec 500 mL d'éther de pétrole, 500 mL d'acétate d'éthyle 3 fois, puis 500 mL de BuOH 3 fois. L'extrait butanolique a été conservé pour analyse. Le protocole d'extraction P4 est celui de Pistelli et al. [171]. Cinquante grammes de la population de Zaghouan ont été extraits 3 fois dans un appareil Soxhlet avec 250 mL de n-hexane, 250 mL de CHCl<sub>3</sub> et 250 mL de MeOH successivement. Le n-hexane et extraits de CHCl<sub>3</sub> ont été conservés et congelés. L'extrait méthanolique a été filtré et évaporé, puis placé dans 100 mL d'eau distillée. Par la suite, une extraction liquide-liquide de cette phase aqueuse a été réalisée avec 70 mL d'acétate d'éthyle. L'extrait d'acétate d'éthyle résultant a été stocké et congelé et l'extrait aqueux a été extrait à nouveau avec du n-butanol. L'extrait butanolique obtenu a été conservé au froid pour analyse.

### **2.2.3 Équipement de chromatographie en couche mince à haute performance (HPTLC) et procédure générale**

Un système CAMAG HPTLC (CAMAG, Muttenz, Suisse) composé d'un applicateur d'échantillon d'un scanner TLC et d'un visualiseur a été utilisé pour les analyses. Tous les instruments ont été contrôlés via la plate-forme logicielle WinCats 1.4.6.2002 Planar Chromatography Manager (CAMAG). Des plaques de gel de silice (HPTLC 60 W F254, 10 × 10 cm et HPTLC 60 W F254, 20 × 10 cm; Merck, Darmstadt, Allemagne) ont été utilisées et développées dans un CAMAG horizontal à double chambre de 20 × 10 cm.

Les échantillons ont été appliqués sur des plaques de silice avec l'échantillonneur automatique ATS3 CAMAG (Muttentz, Suisse). Deux systèmes de développement différents ont été choisis : (i) Système S1 (30 ml de chloroforme, 15 mL d'hexane et 5 ml de méthanol) [281] et (ii) Système S2 (SS1, SS2 et SS3) [282]:

- SS1 : Dichlorométhane et MeOH (92 : 8) jusqu'à 26 mm pour les méthylxanthines
- SS2 : EtOAc, toluène, acide formique et H<sub>2</sub>O (8,7 : 1,3 : 1,7 : 0,4) jusqu'à 70 mm pour les composés phénoliques
- SS3 : EtOAc, toluène, acide formique et H<sub>2</sub>O (9 : 1 : 2,5 : 1) jusqu'à 70 mm pour les saponines.

Pour les Systèmes S1 et S2, les développements ont été réalisés dans des cuves à doubles fonds : volume de pré-dosage, 1000 nL ; volume excédentaire, 5000 nL ; volume de rétraction, 100 nL ; vitesse de livraison, 150 nL s<sup>-1</sup> ; vitesse de remplissage, 500 nL s<sup>-1</sup> ; temps de rinçage, 10 s ; volume de compression, 300 nL ; temps de compression, 10 s ; volume de décompression, 240 nL. La première position d'application, X, a été fixée à 15 mm et la position d'application Y a été fixée à 10 mm. La distance entre les pistes a été calculée automatiquement à partir du nombre de dépôts. Le mode d'application par pulvérisation a été utilisé avec une vitesse de bande de 5 mm s<sup>-1</sup> et un délai de démarrage de 50 ms. La longueur du ruban a été fixée à 4 mm. Des photos de plaques non dérivées ont été prises à 366 nm à l'aide d'un visualiseur (CAMAG, Muttentz, Suisse). Les photos des plaques dérivées ont été prises sous lumière blanche. Les évaluations (pendant le développement des systèmes de solvants) ont été effectuées visuellement, en vérifiant et en comparant les couleurs et les valeurs du facteur de retardement (R<sub>f</sub>) des taches visibles sur les photos prises à différentes longueurs d'onde. Des scans ont été effectués à l'aide du TLC Scanner 4 (CAMAG, Muttentz, Suisse) pour obtenir les spectres ponctuels et générer les chromatogrammes de piste. Toutes les évaluations des photos et des scans ont été réalisées avec visionCATS (CAMAG, Muttentz, Suisse).

Pour la dérivatisation, les plaques ont été immergées dans une solution d'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avec un CAMAG TLC Immersion Device III (Muttentz, Suisse) à une vitesse d'immersion de 2 cm s<sup>-1</sup> pendant 2 s. Ensuite, les plaques ont été séchées dans une étuve à 100 °C pendant 8 min ou 10 min.

Les plaques ont été scannées à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 500 nm avant dérivatisation, et à 500 et 600 nm après dérivatisation avec de l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans un TLC Scanner 3 SC3 CAMAG, avec des lampes au deutérium et au tungstène (Muttentz, Suisse). La taille de la fente a été fixée à 4 × 0,1 mm, la vitesse de balayage à 5 mm.s<sup>-1</sup>. La rémission et l'absorption ont été sélectionnées comme type et mode de mesure, respectivement. Un filtre optique de second ordre a été utilisé et le mode et la sensibilité du détecteur étaient automatiques. Les valeurs du facteur de retardement R<sub>f</sub> ont été évaluées comme la position de la substance par rapport à la position du front de solvant mesurée à partir de la position d'application de l'échantillon. L'échantillonneur automatique et le scanner HPTLC, ainsi que l'acquisition et le traitement des données ont été contrôlés avec le WinCats 1.4.6. 2002 Responsable Chromatographie Planaire de CAMAG.

Les 4 extraits des 4 populations (Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan) obtenus selon M1 ont été analysés en déposant 10 µL de chacun et 10 µL des solutions étalons à 1 g/L de solanine, sénégine et digitonine. Les éluions ont été réalisées par S1 ( Figure 57 et 58) et également par

S2 pour l'extrait de Zaghouan ( Figure 64, 65 ). Les plaques ont été scannées à 366 nm sous UV avant dérivatisation chimique et après dérivatisation chimique sous lumière blanche avec de l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ .

Ensuite, 10  $\mu$ L des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3, et P4, et M1 ont été déposés deux fois sur une plaque de couverture, correspondant à des dépôts de 0,05 mg du matériau, et 10  $\mu$ L de solanine, sénégénine et digitonine a été déposé deux fois (0,01 mg du matériau). En plus des standards de saponine, l'acide oléanolique triterpénoïde a été ajouté, à une concentration de 1,02 g/L ; 10  $\mu$ L ont été déposés (0,01 mg). Un mélange de glucose-fructose à une concentration de 0,5 g/L a été ajouté et 10  $\mu$ L (0,005 mg) ont été déposés deux fois ( figure 59 ). La plaque utilisée était un gel de silice de 20 x 10 cm. L'élution a été effectuée selon le système de développement S1 et la détection s'est faite par visualisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique.

Puis, 10  $\mu$ L des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3 et P4 (0,05 mg de matériel) et 25  $\mu$ L de l'extrait de Zaghouan-P3 ont été déposés pour analyse (Figure 64 et Figure 65 ). Pour les étalons : 10  $\mu$ L de Soyasaponine B à une concentration de 1 g/L (0,01 mg de matière) ; 5  $\mu$ L de soyasapogénol à une concentration de 1,86 g/L (0,0093 mg de matière) ; 10  $\mu$ L de sénégénine, solanine, digitonine ou un mélange glucose-fructose (1 g/L) ; et enfin 10  $\mu$ L d'acide oléanolique à une concentration de 1,02 g/L (0,01 mg de matière) ont été déposés. L'élution a été réalisée selon le système de développement S2. La détection a été réalisée après dérivatisation à l'anisaldéhyde sulfurique sous lumière blanche et avant dérivatisation sous UV à 366 nm.

Pour finir, les extraits de toutes les populations (Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan) obtenus par le protocole P1 ont été déposés en utilisant le système de développement S2. Pour cela, 10  $\mu$ L (5 g/L, 0,05 mg de matière) de chaque extrait ont été prélevés. Pour les standards, 10  $\mu$ L de soyasapogénol (1 g/L, 0,01 mg de matière) et 5  $\mu$ L de soyasaponine (1,86 g/L, 0,0093 mg de matière) ont été ajoutés. La détection a été réalisée par visualisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique sous lumière blanche et sous UV à 366 nm avant dérivatisation ( Figure 67 ).

#### **2.2.4 Hydrolyse des extraits par le chlorure d'acétyle**

Un millilitre de l'extrait de Zaghouan (15 g/L) obtenu selon le protocole 3 a été placé dans un tube Eppendorf avec 50  $\mu$ L de chlorure d'acétyle. Le mélange est incubé 1h à 100°C puis évaporé à sec sous azote. Après évaporation, 1 mL d'eau et 500  $\mu$ L de chloroforme ont été ajoutés et vortexés. Après décantation, la phase chloroformique a été analysée par HPTLC. La même procédure a été appliquée à une solution standard de soyasaponine (1,86 g/L) pour laquelle 15  $\mu$ L de la phase chloroformique ont été déposés pour chaque échantillon hydrolysé sur une plaque de silicate en plus de l'extrait de Zaghouan-P3 non hydrolysé (20  $\mu$ L). L'élution a été effectuée après SS1 et SS2 uniquement (Figure 68 ).

#### **2.2.5 Quantification du Soyasapogénol dans les extraits pour densitométrie**

##### **2.2.5.1 Quantification du Soyasapogénol par spectrophotométrie**

Le dosage quantitatif du soyasapogénol de l'extrait de Zaghouan-P3 avant et après hydrolyse a été réalisé selon la méthode de Ncube et al. [186] modifié pour une microplaque 96 puits : 25  $\mu$ L de l'échantillon ou une solution de soyasapogénol à différentes concentrations, 25  $\mu$ L de vanilline (8%) et 250  $\mu$ L d'acide sulfurique (72%) ont été ajoutés. La plaque a été incubée à 45°C pendant

10 min et laissée refroidir et la lecture a été prise à 544 nm. L'appareil utilisé était BMG-Labtech Spectrostar-Nano. La quantité de saponines a été calculée selon l'équation d'étalonnage DO en fonction de la concentration (Voir § 9.1).

### 2.2.5.2 Quantification du Sayasapogenol pour la densitométrie

Une gamme de différentes concentrations de soyasapogenol (2 µL (1 g/L, 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,125 g/L, 0,0652 g/L et 0,0312 g/L)) ont été déposées sur une silice 10 × 10 plaque de gel ainsi que deux répliqués de la phase chloroformique de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (15 µL) et de l'extrait de Zaghouan-P3 avant hydrolyse (25 µL) et le standard de la saponine de soja (5 µL d'un 1,73 g/L). Après élution SS2 et révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique, la courbe d'étalonnage a été calculée à partir des aires des pics des 6 concentrations différentes du soyasapogenol de référence (Figure 70). Le coefficient de corrélation  $R^2$  était de 0,9929 et l'équation utilisée était  $y = 2156,6x + 200,45$  (Voir § 9.2).

## 2.3 Resultats et Discussion

### 2.3.1 Extraction des composés d'*Astragalus hamosus*

Comme attendu, le rendement en extractible diffère en fonction du protocole d'extraction utilisé (Tableau 15). La plus grande différence est observée entre l'extraction au méthanol et les autres protocoles mis en œuvre afin d'essayer d'être plus sélectif dans la récupération des saponines. Le rendement d'extraction a diminué entre l'extrait de méthanol (M1) et les protocoles P1 à P4, démontrant ainsi la sélectivité initiale des composés par le choix du protocole d'extraction. Le protocole M1 éest une simple extraction méthanolique du matériel végétal broyé et séché, alors que les protocoles P1 à P2 utilisent plusieurs solvants organiques de polarités différentes en plus de l'eau :  $-0,77 < \log P < 3,5$ .

Tableau 15: Résultats du rendement d'extraction par rapport à la matière sèche pour les protocoles M1, P1, P2, P3 et P4.

Protocole d'extraction	Population <i>A. Hamosus</i>	Rendement Extraction (MS/MS %)
M1	Zaghouan	11,5 ± 0,7
	Siliana	7,2
	Bizerte	9,3
	Kairouan	9,4
P1	Zaghouan	6,3
	Siliana	8,1
	Bizerte	8,0
	Kairouan	6,3
P2	Zaghouan	4,5
P3	Zaghouan	4,8
P4	Zaghouan	4,5

En raison de leurs propriétés amphiphiles, les saponosides sont généralement extraits à l'eau ou à l'alcool en utilisant différentes techniques [164], [283]. Il a été démontré que le butanol et le méthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction des saponines triterpénoïdes des graines de gac [37]. Le butanol a également été signalé comme étant le solvant de choix pour l'extraction des saponines de la coque des graines de *Chenopodium quinoa* [283], tandis que le méthanol a été



largement utilisé pour extraire les saponines d'une gamme étendue de matrices végétales [164], [195]. Le méthanol ( $\log P = -0,77$ ) utilisé à 85% est le plus polaire des solvants organiques sélectionnés dans ce travail et il a permis d'extraire non seulement les saponines mais aussi toutes les molécules ayant des caractéristiques hydrophiles [284]. Cependant, si les saponines représentent les molécules bioactives qui semblent être les plus intéressantes dans le genre *Astragalus*, elles n'y sont pas abondantes. Le protocole P1 était basé uniquement sur l'extraction [méthanol ( $\log P = -0,77$ ) - butanol ( $\log P = 0,84$ )], alors que les protocoles P2 à P4 utilisent d'abord des solvants organiques tels que l'hexane ( $\log P = 3,9$ ), le chloroforme ( $\log P = 2$ ), l'éther de pétrole ( $\log P = 0,84$ ), ou l'éthylacétate ( $\log P = 0,73$ ) pour éliminer les molécules lipophiles avant le fractionnement final avec le butanol, comme dans le protocole P1 [285]–[287]. Comme la plante de la population de Zaghouan présentait le rendement d'extraction méthanolique le plus élevé, tous les protocoles d'extraction ont d'abord été évalués avec cette matière première.

### 2.3.2 Évaluation préliminaire de l'abondance des métabolites secondaires pour le screening des saponines triterpénoïdes par HPTLC

L'analyse HPTLC préliminaire a fourni des informations initiales sur l'abondance des métabolites secondaires présents dans l'extrait méthanolique et sur le pouvoir de séparation et de détection du premier système de développement sélectionné, S1. Huit taches ont pu être observées et ont été retardées à différentes valeurs  $R_f$  (0-0,85) sur la première plaque (Figure 57). Cette analyse a été comparée à des standards pour les trois familles de saponines, à savoir un saponoside stéroïdien, la digitonine, une saponine glycoalcaloïde, la solanine, et une saponine aglycone triterpénoïde, la sénégénine. La solanine et la digitonine, qui sont glycosylées, sont restées à  $R_f = 0$ , tandis que l'aglycone sénégénine a migré à  $R_f = 0,6$  en raison de sa polarité plus faible et de son affinité plus élevée avec le solvant d'élution. Les saponines sont très polaires, pareillement à la silice. Les solvant constituants S1 ne permettent probablement pas de les éluer.

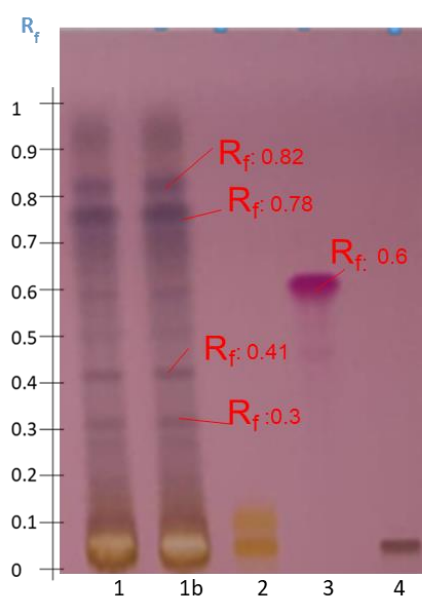


Figure 57: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$  de l'extrait de Bizerte (25 mg) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), sénégénine (Piste 3), et digitonine (Piste 4). Système d'élution S1.



La méthode d'extraction M1 a ensuite été comparée entre les quatre populations d'*Astragalus hamosus* L. sélectionnées (Figure 58). (Voir conditions analytiques HPTLC § 5.2.1.2). L'extrait de la population de la région de Siliana semble être enrichi en certains composés extractibles au méthanol. Quatre taches plus intenses sont apparues à 366 nm aux Rf de 0,47 ; 0,65 ; 0,69 et 0,78 puis, après visualisation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, parmi celles-ci seules celles retardées à des valeurs de Rf 0,47 ; 0,65 et 0,78 sont observées. Les étalons glycosylés, la solanine, la digitonine et les sucres de glucose-fructose sont restés au point de dépôt (Rf = 0), mais les étalons de type aglycone tels que la sénégénine et l'acide oléanolique, un triterpénoïde, ont migré. Comme tous les étalons sélectionnés n'étaient détectables qu'après visualisation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sous lumière blanche et non sous UV à 366 nm, les taches avant et après dérivatisation ne peuvent pas être associées à des molécules de saponine. Seule l'étape de dérivatisation a pu mettre en évidence des molécules de la famille des saponines qui n'absorbent pas l'UV à 366 nm. A l'inverse, certains spots détectables sous UV à 366 nm n'apparaissent plus après dérivatisation, à savoir les spots à Rf = 0,72 et Rf = 0,8. Ces résultats montrent que les molécules de saponine des extraits sont probablement restées au niveau du dépôt de l'échantillon sur la plaque HPTLC et que si des aglycones étaient présentes dans l'extrait de méthanol, elles ont coéluées avec d'autres molécules. Les molécules semblent être coéluées au même Rf de 0,66 que l'acide oléanolique dans tous les extraits.

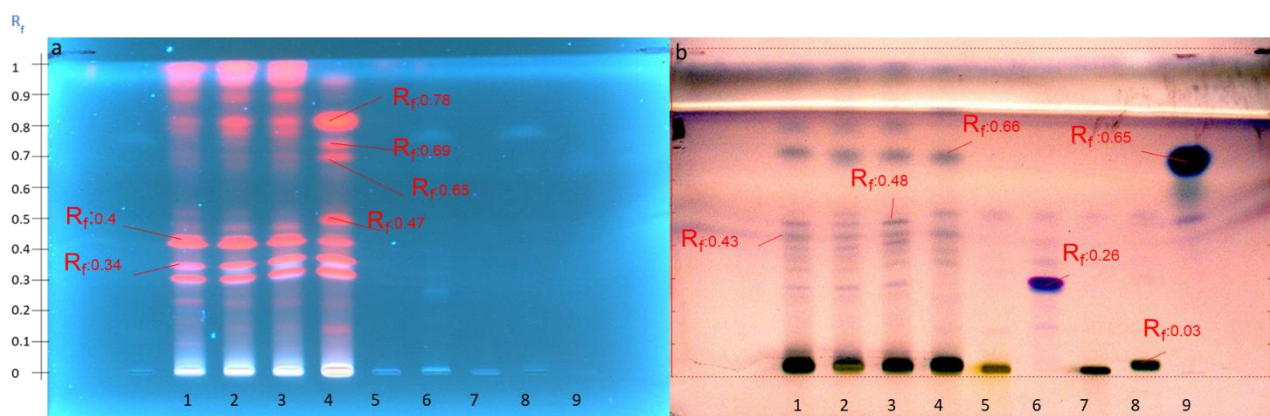


Figure 58: Profils HPTLC des 4 extraits des 4 populations obtenus selon la méthode d'extraction M1 ainsi que les standards pris avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sous lumière blanche (b) selon le système d'éluion S1. Piste 1 (Bizerte), Piste 2 (Kairouan), Piste 3 (Zaghouan), Piste 4 (Siliana), Piste 5 (Solanine), Piste 6 (senégénine) et Piste 7 (digitonine), Piste 8 (glucose-fructose), Piste 9 (acide oléanolique).

Les spots présents avant et après la dérivatisation ne doivent en théorie pas correspondre aux molécules de saponine. Seule l'étape de dérivatisation permet de mettre en évidence des molécules de la famille des saponines qui n'absorbent pas les UV à 366 nm.

Les résultats des analyses HPTLC des extraits obtenus selon la méthode d'extraction M1 montrent que l'extraction méthanolique n'isole donc pas suffisamment la fraction saponine ciblée. Les 4 nouveaux protocoles mis en œuvre sont alors évalués sur les extraits de la population Zaghouan.

### 2.3.2.1 Optimisation de la purification de la fraction saponine d'*Astragalus hamosus*

Le fractionnement méthanolique en une seule étape ayant révélé la présence de nombreuses molécules dans l'analyse HPTLC, d'autres protocoles de purification ont été explorés, comme le

montre le tableau 14. La population de Zaghouan présentant le rendement le plus important en méthanol extractible, cette plante a été choisie comme matrice modèle pour le criblage des protocoles d'extraction en plusieurs étapes (Figures 59 à 62).

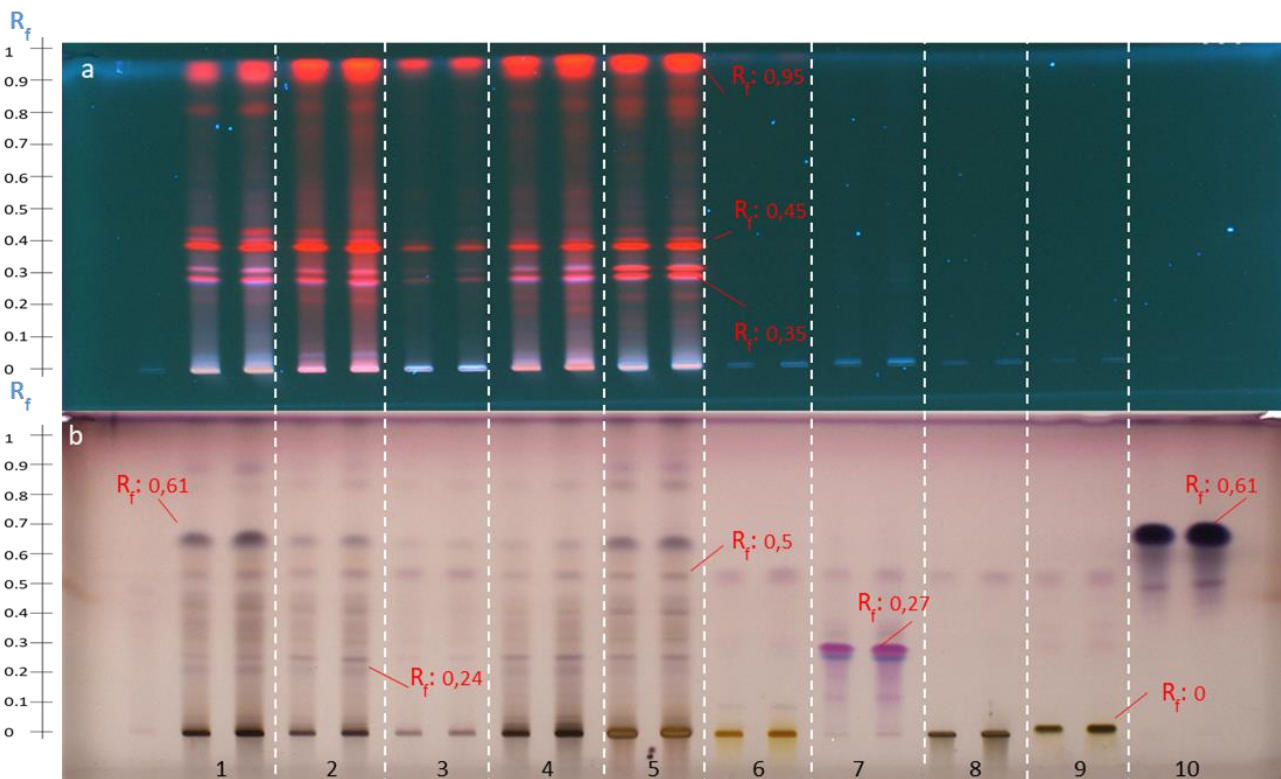


Figure 59: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation (a) et après révélation à l'anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 1), P2(piste 2), P3(piste 3), P4 (Piste 4) et selon le M1 (Piste 5), ainsi que des standards, Piste 6 (Solanine ), Piste 7 (senégnine) et Piste 8 (digitonine), piste 9 (glucose-fructose), piste 10 (acide oléanolique).

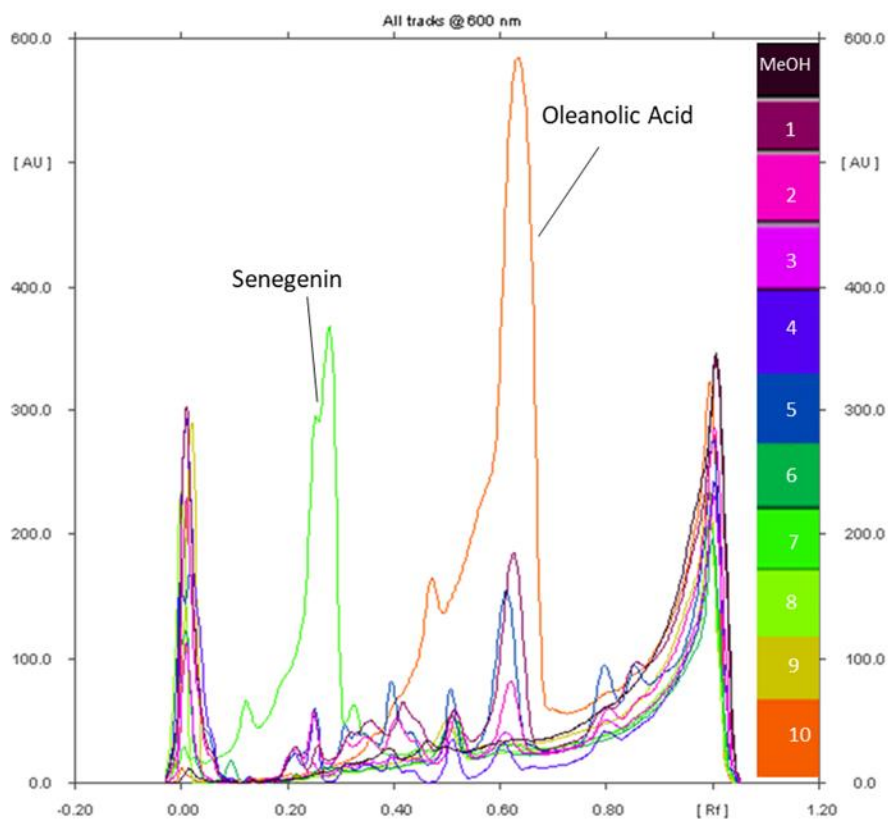


Figure 60: Densitogramme des extraits de Zaghouan (Pistes 1–5) et les standards (Pistes 6–10): solanine (Piste 6), senegenine (Piste 7), digitonine (Piste 8), glucose-fructose (Piste 9), et acide oléanolique (Piste 10) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldehyde

La délipidation préalable à l'hexane avant l'extraction méthanolique a été réalisée par le protocole d'extraction P2 qui a permis d'augmenter la concentration en certains métabolites et donc d'améliorer leur détection à 366 nm ( $R_f = 0,31$  ;  $R_f = 0,40$  ; et  $R_f = 0,95$ ) (Figure 59). Cependant, ces molécules, tout en étant également détectables après visualisation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , sont restées en faible quantité et ont disparu dans l'extrait P3.

En revanche, comme prévu, le protocole de fractionnement P3 semble être plus sélectif que les autres. Le densitogramme 3 de la figure 6 montre l'élimination des pics par rapport aux autres densitogrammes. Le protocole P3 est basé sur l'élimination successive des fractions avec des solvants organiques de polarité croissante ( $\log P(\text{hexane}) = 3,5 < \log P(\text{chloroforme}) = 2,0 < \log P(\text{éthylacétate}) = 0,8$ ). Deux hypothèses peuvent être proposées : soit la fraction finale avait une concentration plus faible en composés chimiques et le seuil de détection de ces molécules a été atteint, soit elle était effectivement plus sélective et les composés coélués ont été éliminés.

Le protocole P4 a également utilisé des solvants organiques de polarité plus faible que l'éthanol ou le méthanol qui ont été utilisés après l'extraction initiale à l'éthanol, ce qui a permis l'élimination de certains composés par rapport à P1 ou M1 comme le montrent les figures 59 et 62. Après visualisation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , les quatre extraits ont présenté des bandes HPTLC similaires, avec des densitogrammes d'intensités différentes à  $R_f = 0,24$ ,  $R_f = 0,40$ ,  $R_f = 0,50$ , et  $R_f = 0,61$ . Les composés élués à  $R_f = 0,61$  ont été quantitativement réduits dans les extraits P2, P3 et P4, alors que les composés retardés à  $R_f = 0,4$  semblent avoir été éliminés par le protocole de purification P3. Les saponines triterpénoïdes, telles que l'acide oléanolique, ont été apparemment détectées à  $R_f = 0,66$  dans tous les extraits et doivent être confirmées.

Pour conclure, le système d'élution ne permet pas une séparation satisfaisante des molécules compte tenu de leur polarité, aussi un autre système de développement multiple S2 a été mis en œuvre afin d'optimiser la purification des extraits par HPTLC.

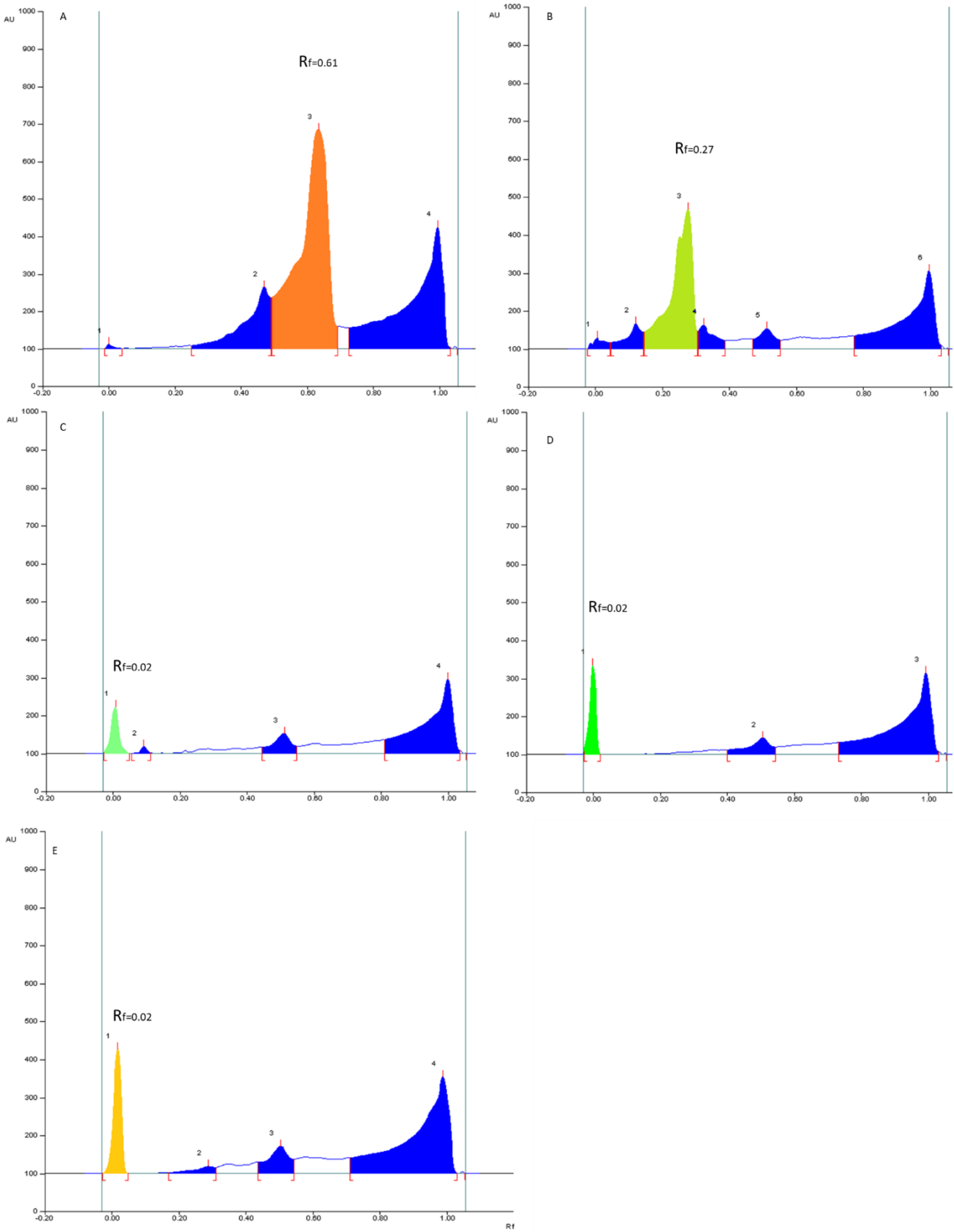


Figure 61: Densitogrammes de l'acide oléanolique (A), de la sénégénine (B), de la solanine (C), de la digitonine (D) et du glucose-fructose (E) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

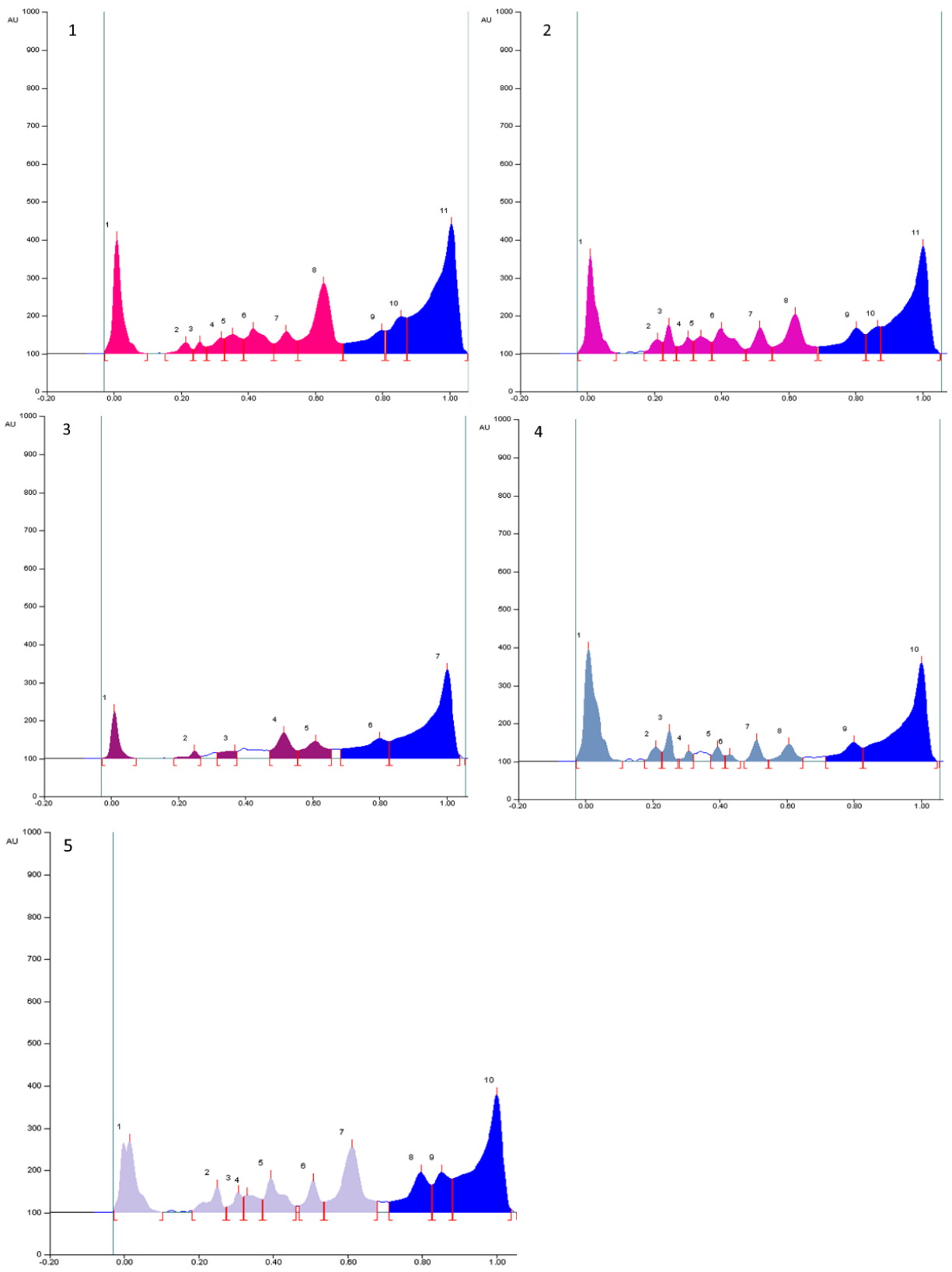


Figure 62: Densitogrammes des extraits de Zaghouan obtenus avec les protocoles d'extraction P1 (1), P2 (2), P3 (3), P4 (4) et M1 (5) à 600 nm après revelation avec l'ansaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 2.3.3 Optimisation des systèmes d'élution

#### 2.3.3.1 Mise en évidence des triterpénoïdes et détection préliminaire de la soyasaponine à l'aide du système de développement multiple (S2)

L'utilisation de plusieurs systèmes d'élution a permis de séparer successivement les molécules en fonction de leur affinité pour des éluants de polarité croissante. Les premiers résultats ont montré que le système S1 ne permettait pas d'éluer les saponines qui restaient à une valeur de Rf d'environ 0. Les saponines sont des molécules polaires et la phase stationnaire, la silice, est également polaire [288].

Une seconde élution avec un système plus polaire (S2) que le précédent a permis de mettre en évidence de nouveaux spots détectables à une longueur d'onde d'absorption de 366 nm suite à la purification de certaines bandes qui étaient déjà détectables à cette longueur d'onde (Figures 64 et 65). Douze spots ont été détectés de Rf = 0 à Rf = 0,9. Toutes les molécules révélées par des taches rouges et qui étaient nombreuses dans les analyses HPTLC précédentes avec le système S1 semblent avoir migré vers le front du solvant. Par conséquent, le nouveau système d'élution a permis la migration des molécules polaires qui étaient restées sur la ligne de dépôt dans les analyses précédentes. L'augmentation de la force d'élution dans le système S2 de SS1 à SS3 (Figure 63) a permis au système d'éluer les molécules moins polaires jusqu'au front du solvant et a retardé les molécules les plus polaires à une valeur Rf de 0,2, comme observé après visualisation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figure 65-b).

L'analyse HPTLC des extraits de Zaghouan (P1-P4, M1) a ensuite été comparée aux standards de saponine spécifiques d'*Astragalus*, c'est-à-dire la soyasaponine, un isomère de l'azukisaponinal déjà identifié dans *Astragalus hamosus L.* [151], [268] et son aglycone, le soyasapogénol, en plus des standards précédents (solanine, sénégénine et digitonine) utilisés spécifiquement pour développer la méthode d'extraction par solvant organique (Figure 65). La soyasaponine a été détectée à Rf = 0,2 avec une tache violette intense, tandis que l'acide oléanolique, le soyasapogénol et la sénégénine ont été détectés par deux taches violettes intenses à Rf = 0,95. Comme attendu, les standards de saponine ne sont pas détectables à 366 nm.

La présence d'une tache retardée à la valeur Rf de 0,2 avec la même valeur Rf que la soyasaponine après visualisation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a suggéré la présence des saponines, cependant certaines molécules ont également été détectées à 366 nm à cette même valeur Rf retardée pour tous les extraits, à l'exception de l'extrait P3 Zaghouan (Figure 65-b). L'augmentation de la force éluante du système d'élution a permis de séparer d'autres métabolites.



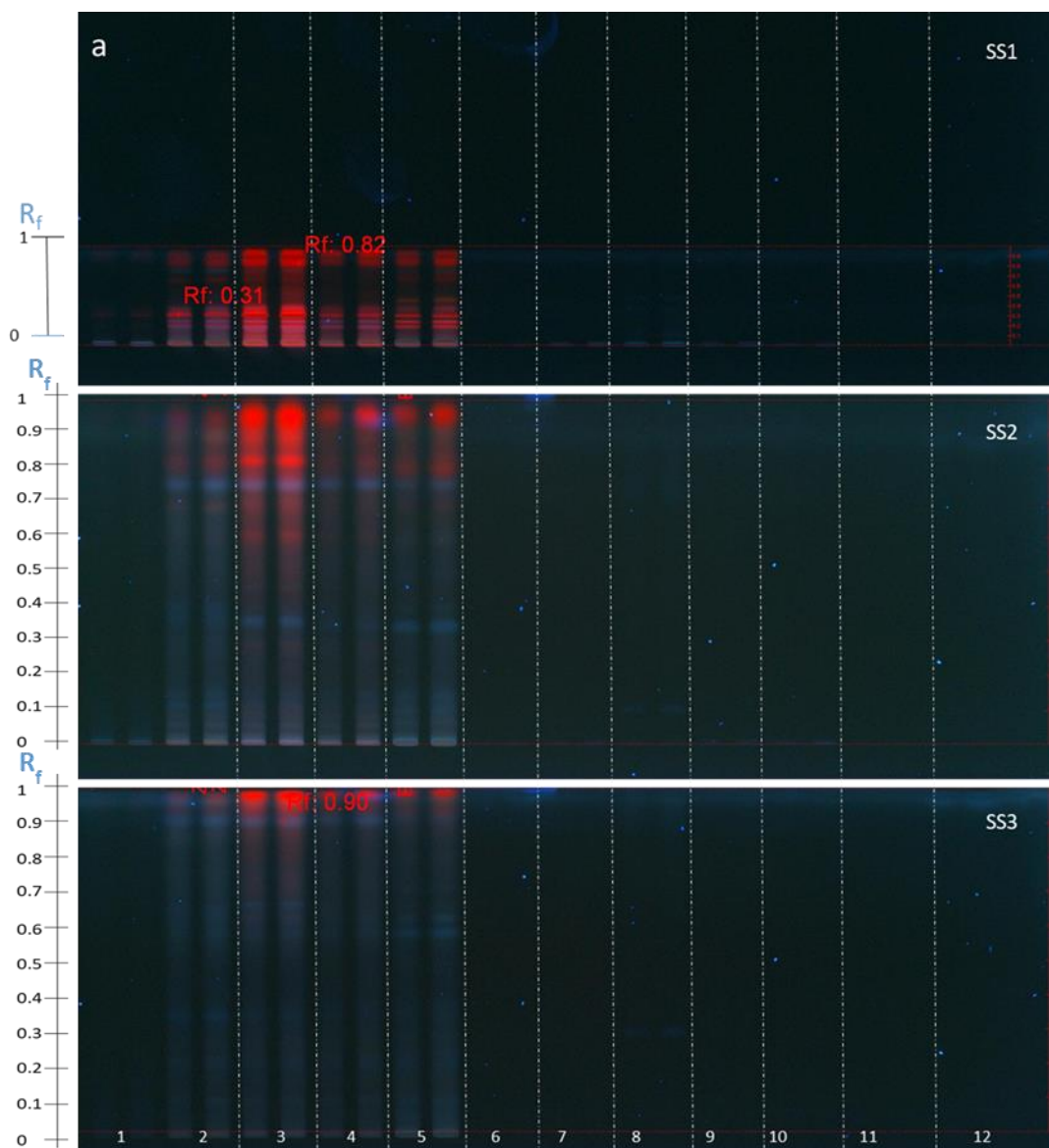


Figure 63: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Senégénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11), et acide oléanolique (piste 12), aux trois étapes du système d'éluion multiple SS1, SS2 et SS3.

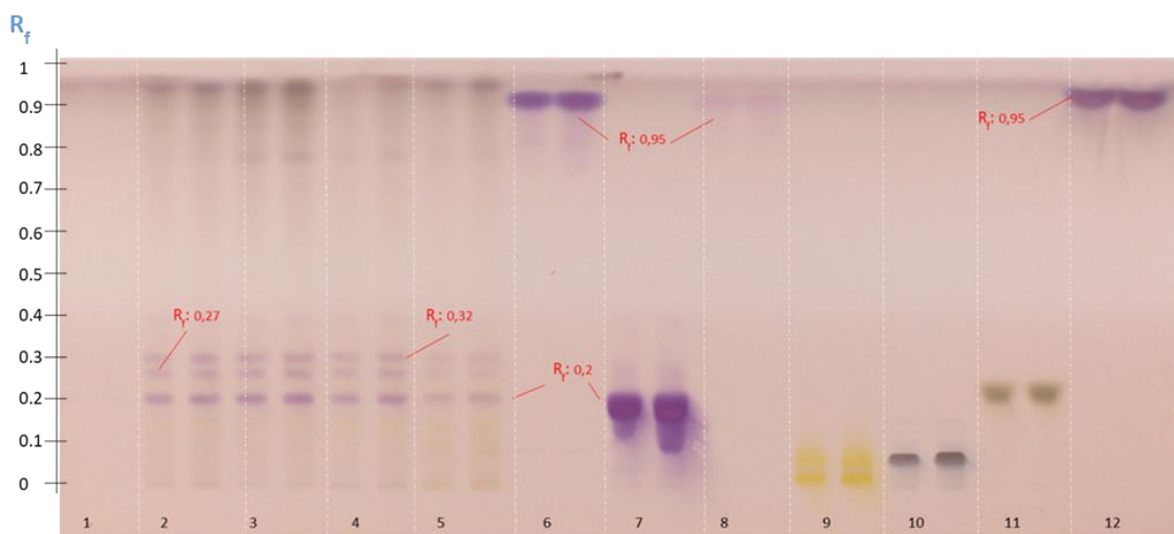


Figure 64: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Sénagénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11), et acide oléanolique (piste 12), selon le système d'éluion S2)

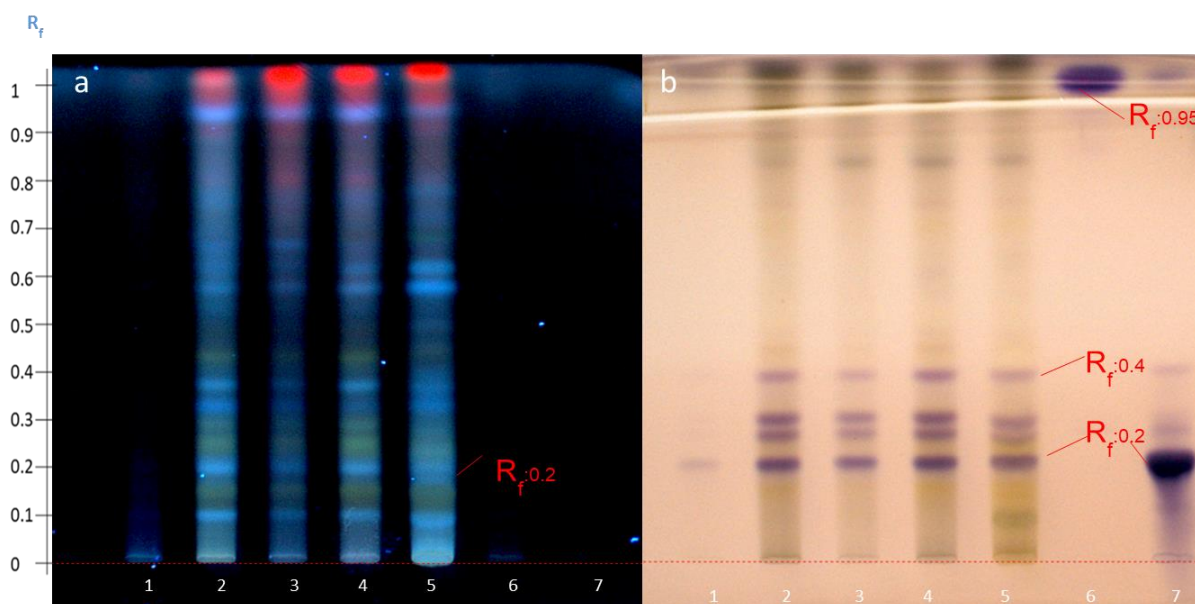


Figure 65: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation sous UV (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> successivement (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon la méthode M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapgenol (piste 6), et soyasaponine (piste 7), selon le système d'élution S2

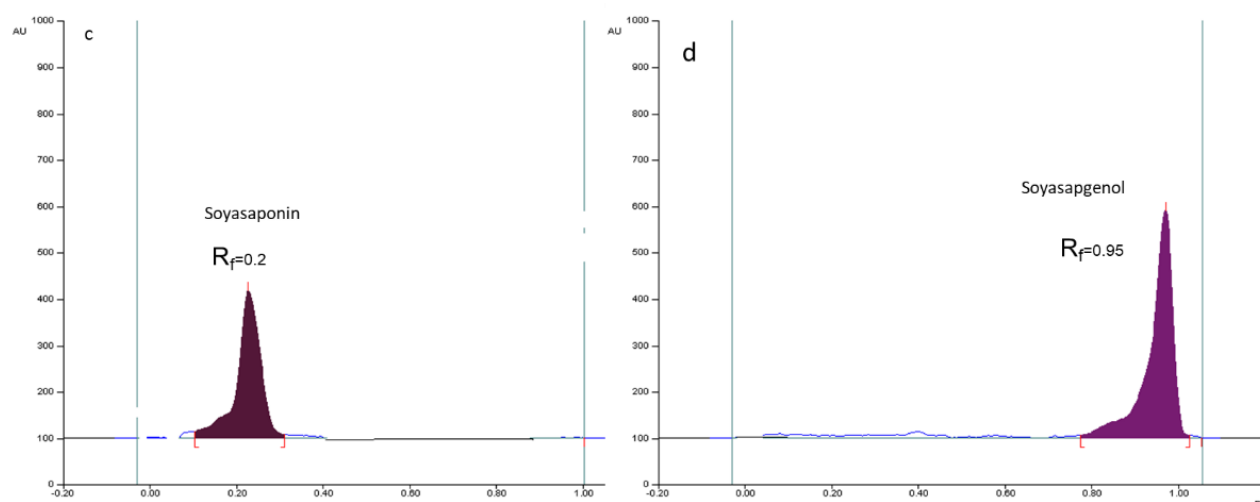


Figure 66:(c) Densitogram de soyasaponine at 600 nm au  $R_f = 0.2$  et (d) densitogramme de soyasapogenol au  $R_f 0,95$  suivant le système d'élution S2

Le profil de l'extrait de Zaghouan obtenu selon P3 n'a montré aucun spot après le dépôt de 10  $\mu$ L (Piste 1, Figure 64) mais après l'augmentation du volume à 25  $\mu$ L (Piste 1, Figure 65), une seule tache violette à  $R_f = 0,2$  a été détectée après développement et seule une seule tache bleue à  $R_f = 0$  (Figure 65-a) a été observée à 366 nm. Ce protocole d'extraction semble finalement être le protocole le plus sélectif pour la purification des saponines.

### 2.3.3.2 Tentative d'identification des saponines triterpénoïdes dans les populations d'*A. hamosus* de Bizerte, Siliana and Kairouan

Les profils HPTLC des populations de Bizerte, Siliana et Kairouan obtenus selon P1 après visualisation avec un réactif anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont similaires (Figure 67). En fait, trois spots violets majeurs ont été détectés : le premier au même  $R_f$  que la soyasaponine ( $R_f = 0,2$ ), un deuxième à  $R_f = 0,28$ , et une troisième à  $R_f = 0,32$ . Le spot retardé à une valeur  $R_f$  de 0,4 dans



l'extrait de Zaghouan observé dans la figure 63 était beaucoup moins intense dans cette analyse. Le soyasapogénol a été détecté comme d'habitude à  $R_f = 0,95$ . Les saponines ne contiennent pas de doubles liaisons conjuguées pouvant former des chromophores, et sont donc difficilement détectables sous UV[289], [290]. L'utilisation d'un révélateur tel que l'anisaldehyde sulfurique [291], permet aux saponines de prendre des couleurs bleues, jaunes, vertes ou violettes [87], [88].

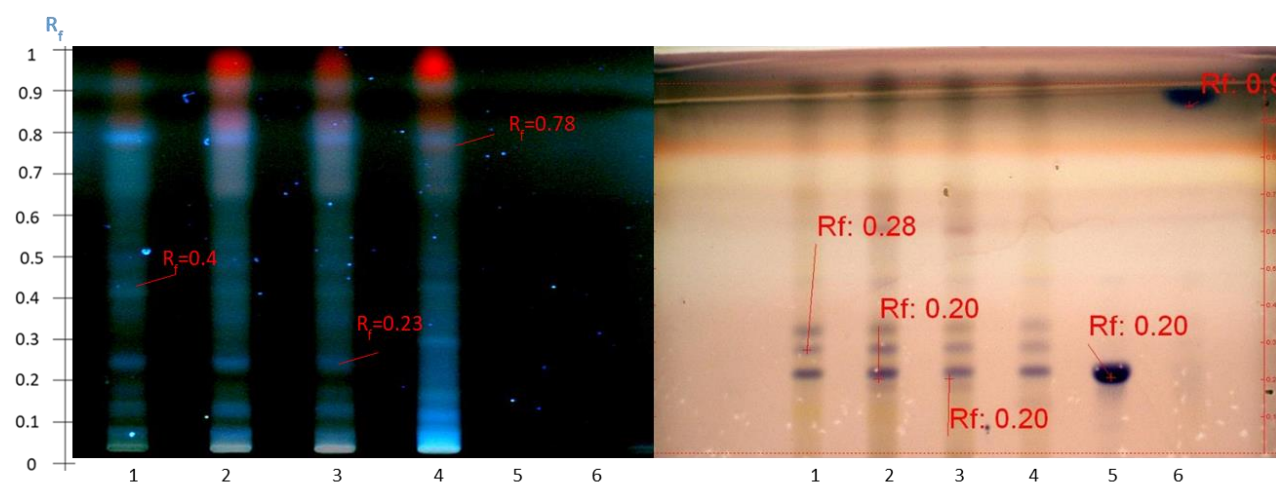


Figure 67: Profil HPTLC obtenu avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$  (b), des 4 populations : Zaghouan (piste 1), Siliana (piste 2), Bizerte (piste 3) et Kairouan (piste 4) selon P1 ainsi que les standards, Soyasaponine (piste 5), et Soyasapgenol (piste 6) selon le système d'éluion S2.

En conclusion, à cette étape, les saponines triterpénoïdes sont plus susceptibles d'être détectées au même  $R_f$  que la soyasaponine après visualisation avec le réactif d'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , avec une intensité sensiblement plus élevée dans la population de Siliana que dans les autres populations.

### 2.3.4 Hydrolyse des extraits de saponine d'*A. hamosus*

Comme démontré, le protocole P3 semble être le plus sélectif pour extraire les saponines triterpénoïdes d'*Astragalus hamosus*. Des extraits P3 de la population de Zaghouan ont été hydrolysés en même temps que le standard de la soyasaponine.

Le spot à  $R_f = 0,2$  de la soyasaponine observé (Figure 65-b) est absent dans cette analyse, suggérant une hydrolyse totale de la soyasaponine libérant la partie aglycone de la molécule. Le profil HPTLC obtenu après hydrolyse a confirmé la présence de la saponine (Figure 68). Dans les pistes 1 et 2, un seul spot a été retardé à une valeur  $R_F$  de 0,80 comme on le voit pour le standard hydrolysé sur la piste 3. Le système SS2 a été utilisé plutôt que SS3 afin de stopper la migration de l'aglycone après hydrolyse avant le front de solvant.

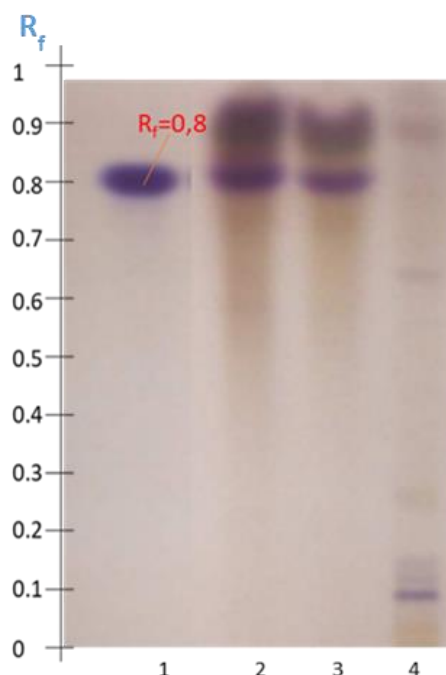


Figure 68: Profil HPTLC obtenu après révélation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en utilisant le système SS2. Phases chloroforme du standard de sojasaponine hydrolysé (Piste 1) et de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (Pistes 2 et 3) et de l'extrait de Zaghouan-P3 non hydrolysé (Piste 4).

Ces résultats suggèrent la présence de soyasaponine ou de son isomère azukisaponine, voire des deux, dans l'extrait de Zaghouan-P3.

Le couplage HPTLC-MS<sup>2</sup> permettra de confirmer l'identification de ces saponines dans les populations d'*Astragalus hamosus* L. de Zaghouan, Bizerte, Siliana, et Kairouan.

### 2.3.5 Quantification du Soyasapogénol

#### 2.3.5.1 Quantification de l'extrait ZA-P3

Le dosage des saponines est évalué selon deux voies : par HPTLC, en se basant sur les densitogramme (voir § 9.2) et par un dosage spectrophotométrique (voir § 9.1) en plaque multipuits. Cette quantification a été réalisée essentiellement pour l'extrait ZA-P3 (Figures 69 et 70).

La quantification des saponines réalisée par HPTLC a été comparée aux résultats obtenus par spectrophotométrie.

La quantification des saponines par HPTLC a été basée sur l'analyse de la teneur en soyasapogénol après hydrolyse de l'extrait et isolement de la molécule après migration sur plaque de silice. L'extrait hydrolysé de Zaghouan-P3 présente 33 mg/g de saponine en équivalent soyasapogénol contre 56 mg/g équivalent soyasapogénol obtenu par spectrophotométrie. La méthode HPTLC a permis de focaliser la quantification sur la saponine ciblée, alors que d'autres molécules ont pu être associées à la quantification par spectrophotométrie (voir § 9.1.1). Environ 59 % de la soyasaponine (équivalent soyasapogénol) pourrait représenter la fraction saponine de l'extrait hydrolysé de Zaghouan-P3.

ZA-P3 non hydrolysé présente 40,89 mg/g MS d'extrait en se basant sur le dosage par spectrophotomètre.

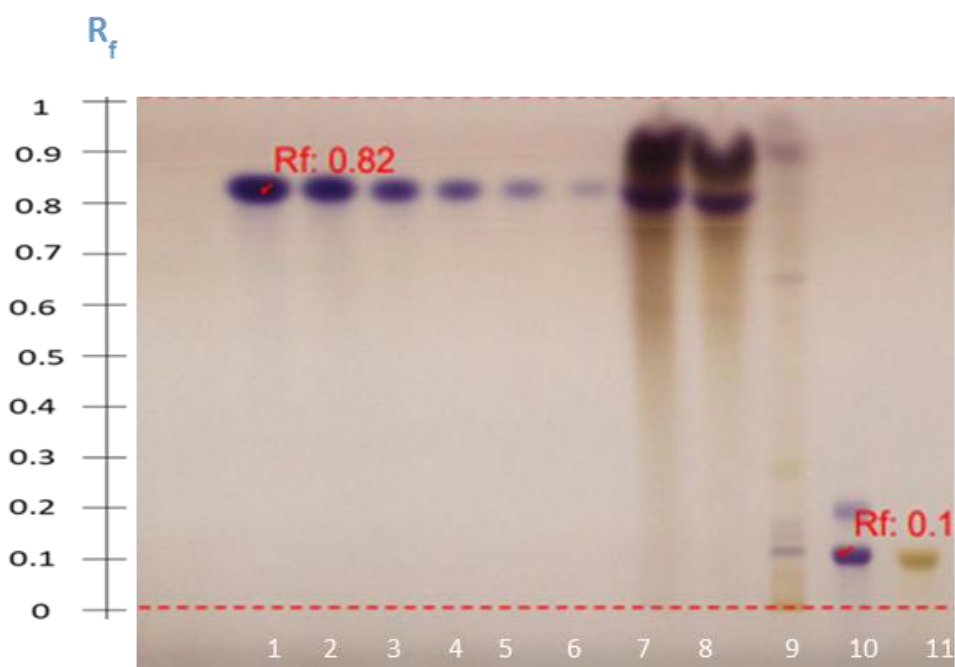


Figure 69: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de Soyasapogénol (piste 1-2 µg),(piste 2-1 µg),(piste 3-0.5 µg),(piste 4-0.25 µg),(piste 5-0.125 µg),(piste 6-0.625 µg),phase chloroforme ZA-P3(piste 7-8),ZA-P3 (piste 9), Soyasaponine (piste 10), Glu-fru (piste 11) selon le système d'éluion S2

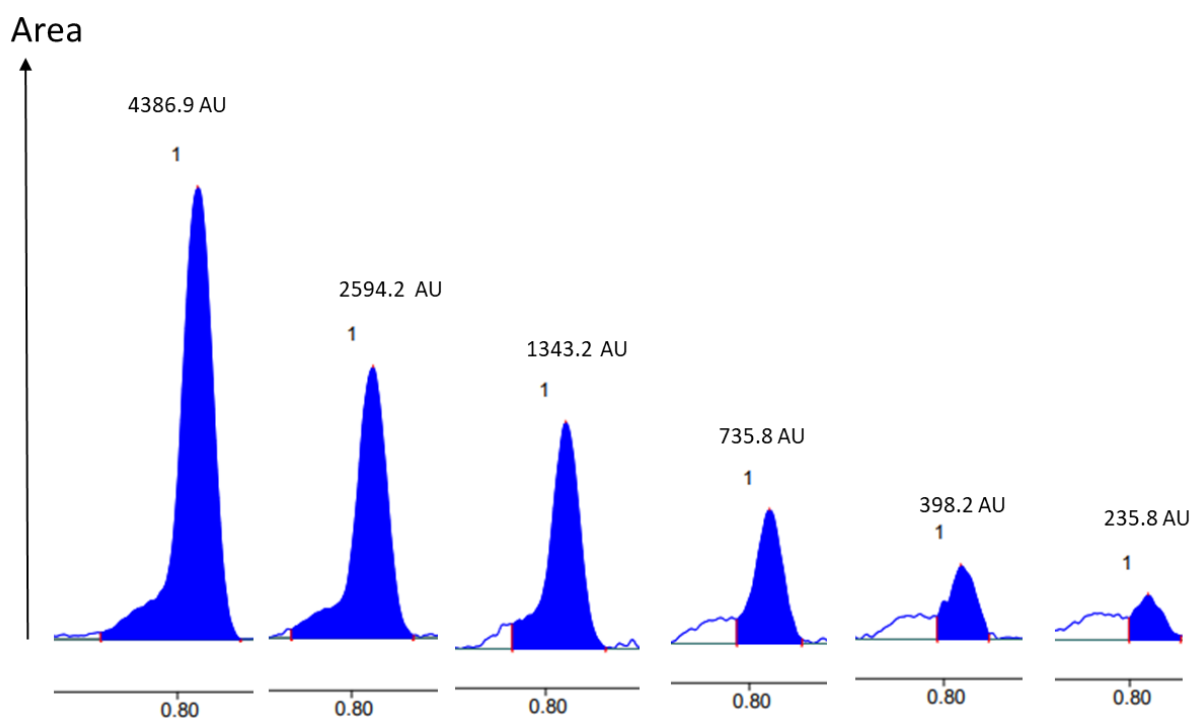


Figure 70: Densitogrammes du soyasapogénol obtenus à 6 concentrations différentes après révélation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et développement SS2, qui ont servi à calculer la courbe d'étalonnage

### 2.3.5.2 Quantification des extraits des 4 populations par spectrophotométrie

Extraits SI-P1, ZA-P1, BI-P1 et KAI-P1

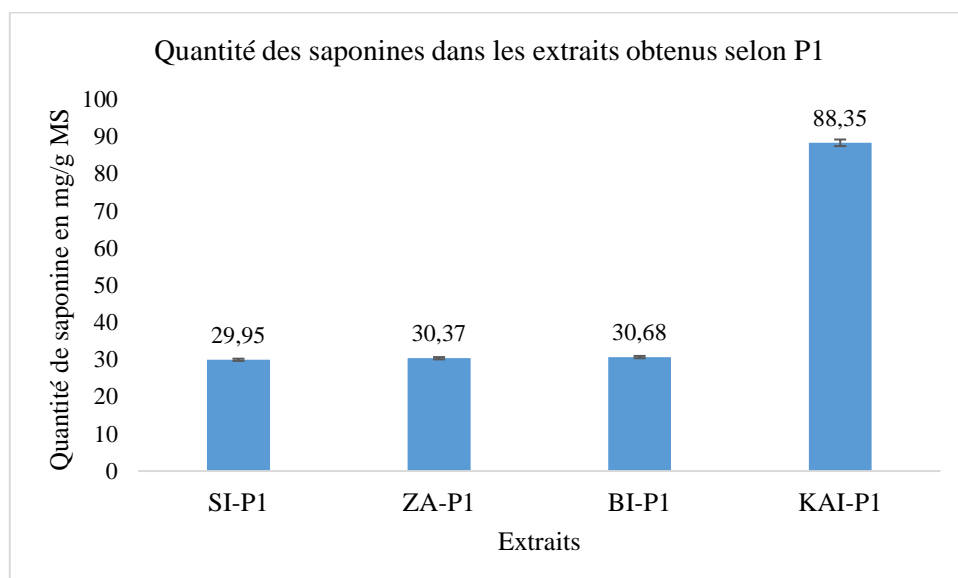


Figure 71: histogramme de quantité de saponines dans les extraits SI-P1, ZA-P1, BI-P1 et KAI-P1

Les extraits SI-P1, ZA-P1 et BI-P1 présentent sensiblement la même quantité de saponine, 0,03g/g d'extrait ou bien 3%.

Kairouan-P1 sort du lot et exhibe 8,35 % de saponine.

Comparant à d'autres Astragales, *Astragalus hamosus* L. présente une quantité élevée de saponine. Chez *Astragalus glycyphyllos*, la quantité de saponines est  $103,77 \pm 0,04$  ng/mg c'est dire 0,000103 g/g [229].

Chez *Astragalus Radix*, les concentration des principales saponines triterpéniques sont mentionnées par Lee et al ,2017 : AS-IV 83,79  $\mu$ g/g ; AS-III 181,23  $\mu$ g/g ; AS-II, 234,02  $\mu$ g/g et AS-I 647,09  $\mu$ g/g [292].

## 2.4 Conclusion

Une stratégie combinant différents protocoles d'extraction et systèmes d'élution HPTLC a été proposée afin de mettre en évidence la présence de saponines dans quatre populations d'*Astragalus hamosus* L. de Tunisie. Les différents protocoles mis en œuvre pour extraire la fraction saponine spécifique des plantes et pour identifier ces molécules ont permis d'avancer une hypothèse pour l'identification et la quantification des isomères de l'azukisaponine et/ou de la soyasaponine. Le système de développement multiple a permis de détecter les saponines triterpénoïde à un Rf retardé de 0,2. Ces deux molécules ne diffèrent que par la présence d'un galactose dans la soyasaponine au lieu d'un glucose dans l'azukisaponine et leur différenciation est impossible par ces techniques analytiques. Néanmoins, les résultats de cette étude démontrent que des isomères sont probablement présents dans les différents extraits d'*Astragalus hamosus* L. des populations tunisiennes et qu'un des quatre protocoles d'extraction évalués s'est avéré très efficace pour purifier les saponines triterpénoïdes d'*Astragalus hamosus*. Le couplage HPTLC-MS<sup>2</sup> devrait pouvoir confirmer l'identification de ces saponines dans les populations d'*Astragalus hamosus* L. de Zaghouan, Bizerte, Siliana et Kairouan.

### 3 Analyses des extraits d'*Astragalus hamosus L.* par spectrométrie de masse

Les molécules ciblées dans les extraits d'après la littérature [104], sont les isomères soyasaponine/asukisaponine ( $C_{48}H_{78}O_{18}$ ) dont la masse attendue est de  $m/z=943,10$  et l'aglycone soyasapogénol ( $C_{30}H_{50}O_3$ ) dont la masse est de  $m/z=458,72$ .

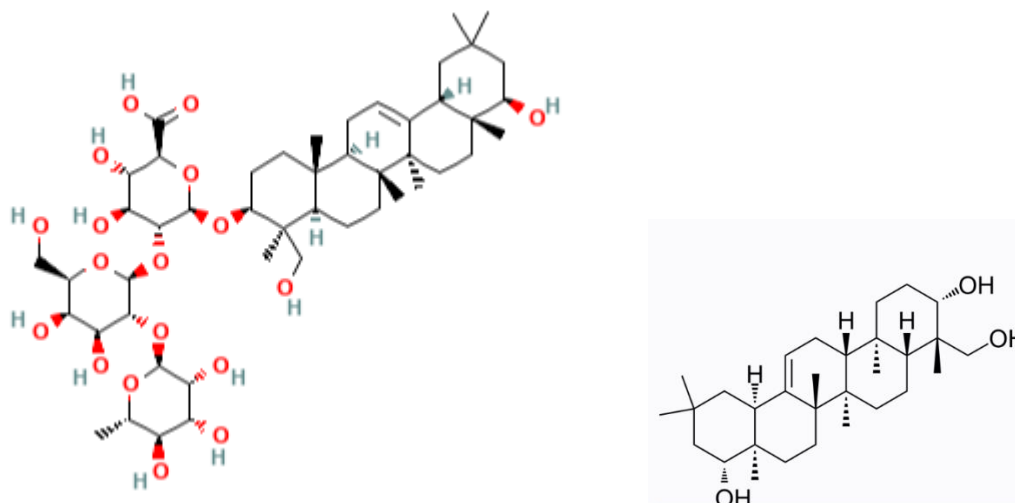


Figure 72: Formule chimique de la saponine soyasaponine et de son aglycone et soyasapogénol.

Les fragments suivants ont été recherchés dans les extraits d'*Astragalus hamosus L.* avant et après purification par HPTLC ainsi que dans les extraits hydrolysés par analyse LC- MS/MS (Figure 72).

En mode positif, les masses identifiées suite à l'analyse du standard de soyasaponine par LC-MS/MS et UPLC TOF-MS-ES+ et recherchées dans les extraits sont les suivantes :

$m/z=943$  :  $[M-H]^+$

$m/z=965$  :  $[M+Na]^+$

$m/z=957$  :  $[M+CH_2+H]^+$

$m/z=979$  :  $[M+CH_2+Na]^+$

En mode négatif, les masses identifiées suite à l'analyse du standard de soyasaponine par LC-MS/MS et UPLC TOF-MS-ES- et recherchées dans les extraits sont les suivantes:

$m/z=941$  :  $[M-H]^- = C_{48}H_{77}O_{18}$

$m/z=977$  :  $[M+Cl]^- = C_{48}H_{18}O_{18}Cl$

$m/z=991$  :  $[M+CH_2+Cl]^- = C_{49}H_{80}O_{18}Cl$

En mode positif, les masses identifiées suite à l'analyse du standard de soyasapogénol par LC-MS/MS et UPLC TOF-MS-ES+ et recherchées dans les extraits sont les suivantes:

$m/z=459$  :  $[M-H]^+$  puis perte d'eau ;  $m/z=441$  et  $m/z=423$ .

En mode négatif, les masses identifiées suite à l'analyse du standard de soyasapogénol par LC-MS/SM et UPLC TOF MS-ES+ et recherchées dans les extraits sont les suivantes:

$m/z = 457$  :  $[M-H]^-$ , pas d'ionisation de l'aglycone en UPLC TOF MS en mode ESI négatif pour le soyasapogénol.

### 3.1 Analyse de BI-25-M1 et BI-300-M1 par HPLC-SM<sup>2</sup>

Tout d'abord, les échantillons de la population de Bizerte obtenus par la méthode d'extraction M1 (extraction méthanolique) ont été analysés par HPLC-SM2 en mode ESI négatif selon les conditions décrites Chapitre 2 §6. Cette analyse n'a pas permis d'identifier la présence des saponines ciblées dans l'extrait. Cependant, 19 composés ont été détectés dans l'extrait BI-25-M1, pour 23 composés dans l'extrait plus concentré BI-300-M1 (Figure 73) dont les pics majoritaires sont récapitulés dans le tableau 14 (les spectres de chacun des pics sont donnés en annexe).

Il est important de noter que la présence ou l'absence de saponines dans un échantillon peut dépendre de nombreux facteurs tels que la méthode d'extraction, la concentration de l'échantillon et les conditions d'analyse. Il est donc possible que les saponines soient contenues dans l'extrait, mais qu'elles n'aient pas été détectées par la méthode d'analyse utilisée pour des raisons notamment de seuil de détection et de bruit de fond.

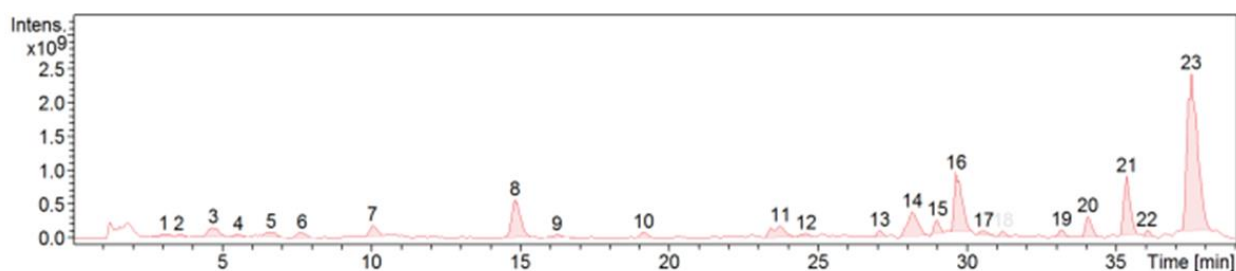


Figure 73: Chromatogramme de l'extrait BI-300 mg-M1.

Tableau 16: Composés détectés dans BI-300mg-M1

Pics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Rapport m/z pic majoritaire	533,1	641,06	625,07	609,09	517,11	310,04	301,03	315,04	291,018	331,16	277,18	316,28	254,2	364,32	256,23	282,25	342,36	284,29	338,37	609,26	609,29	429,29	593,26

### 3.2 Analyse des extraits de Zaghuan par spectromètre de masse en mode ESI<sup>-</sup>

Tous les extraits de Zaghuan obtenus par les différents protocoles d'extraction ainsi que les standards soyasaponine et soyasapogénol ont été analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électro-ébulisaison ESI<sup>-</sup> (Figures 74 à 76). Le résultat est récapitulé dans le tableau ci-dessous (Tableau 17) :

Tableau 17: Analyse des extraits d'*Astragalus hamosus* L. de la population de Zaghuan par spectrométrie de masse MS<sup>n</sup> en mode ESI négatif.

Échantillon	m/z	Attribution
Soyasaponine	941,85	[M-H] <sup>-</sup>
Soyasapogénol	457,86	[M-H] <sup>-</sup>
Zaghuan: Potocole 1	941,88 795,58 457,41	[M-H] <sup>-</sup> [M-H-Rha] <sup>-</sup> [M-H] <sup>-</sup> aglycone
Zaghuan: Potocole 2	942,32 795,57 457,41	[M-H] <sup>-</sup> [M-H-Rha] <sup>-</sup> [M-H] <sup>-</sup> aglycone
Zaghuan: Potocole 3	-----	-----
Zaghuan: Potocole 4	942,2 457,36 795,62	[M-H] <sup>-</sup> [M-H] <sup>-</sup> aglycone
Zaghuan: Méthode 1	942,53	[M-H] <sup>-</sup>

La soyasaponine ou son isomère azukisaponine V semble avoir été détectée dans les extraits ZA-P1, ZA-P2 et ZA-P4 et ZA-M1 par la présence de masses  $m/z = 941$  ou bien  $m/z = 942$ . La non détection de la molécule dans ZA-P3 est due probablement à une concentration inférieure au seuil de détection.

La soyasaponine ayant perdu un rhamnose dont le rapport  $m/z$  correspond à 795 et la soyasaponine ayant perdu son aglycone,  $m/z = 457$ , ont également été détectés.

Le schéma de fragmentation de la saponine dans la trappe d'ion est proposé par la perte de la partie glycosylée et d'un rhamnose comme expliqué sur la figure 76.

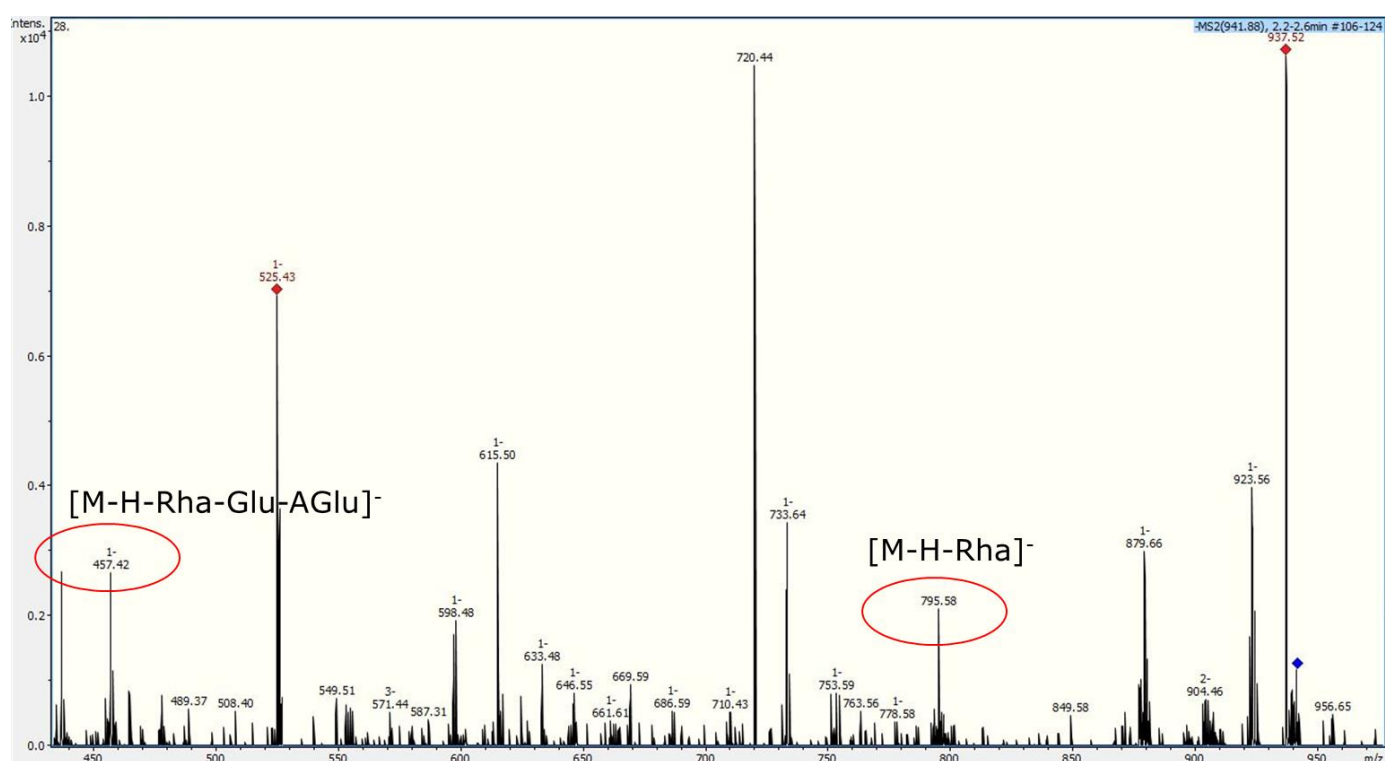


Figure 74: Spectre  $SM^2$  (ESI) de l'extrait de ZA-P1.



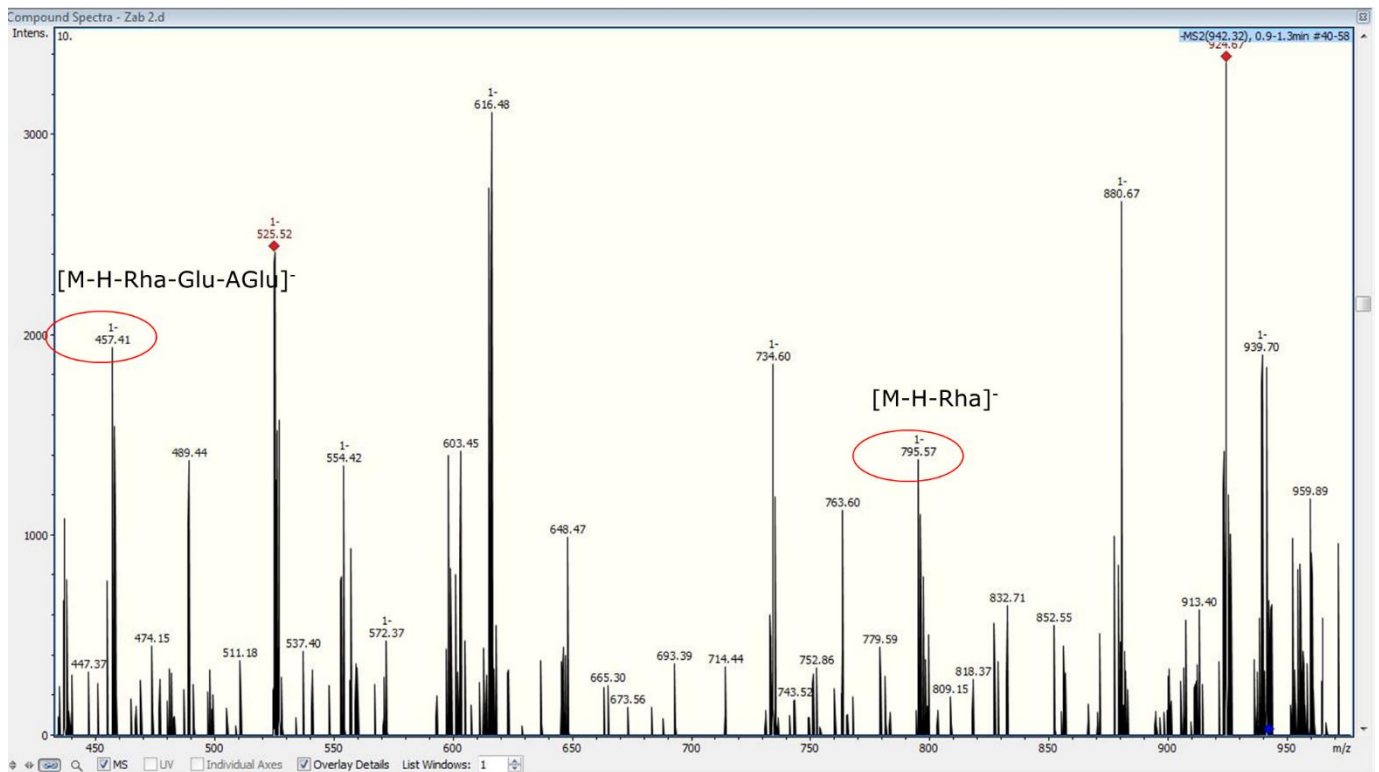


Figure 75: Spectre  $SM^2$  (ESI) de l'extrait de ZA-P2.

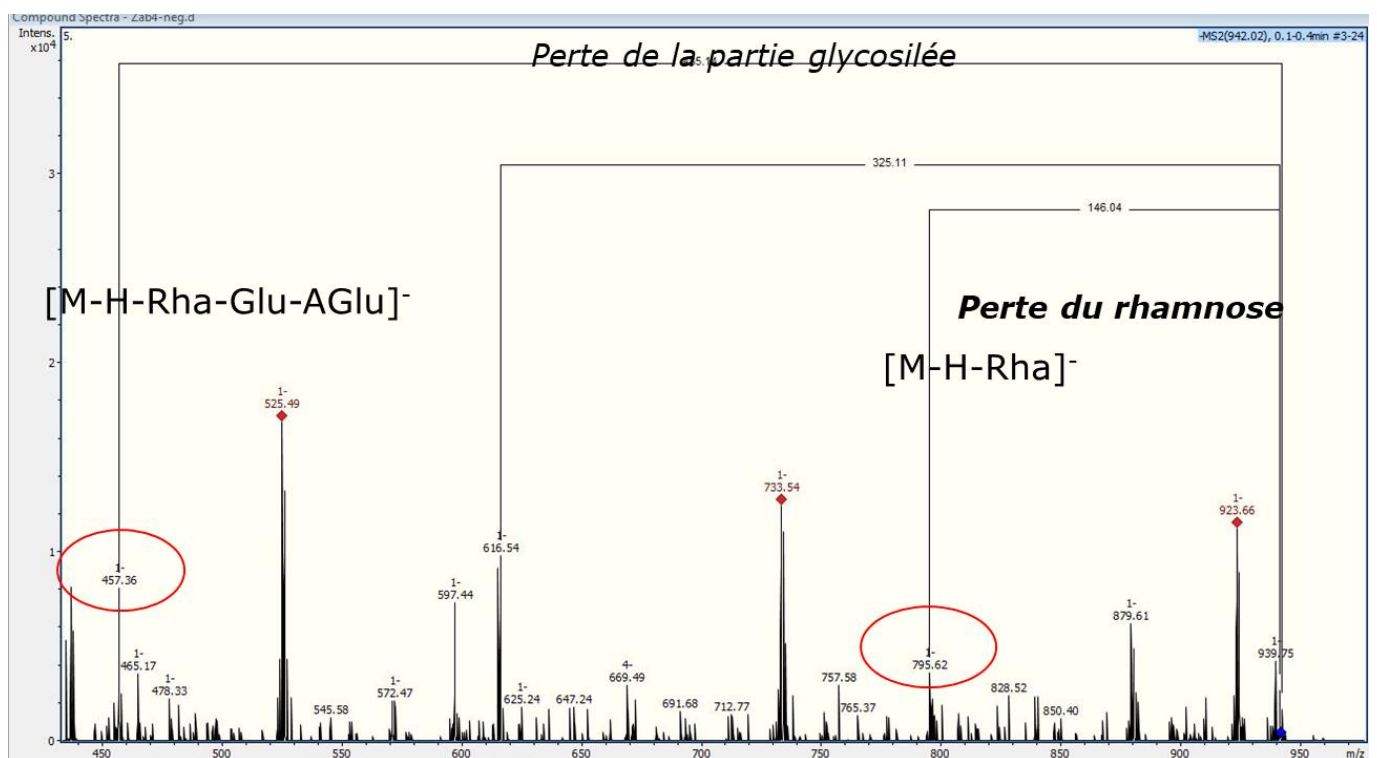


Figure 76: Hypothèse de fragmentation de la saponine azukisaponine dans les extraits de Zaghouan obtenus par le protocole P4 (Spectre  $SM^2$  (ESI)).

### 3.3 Couplage HPTLC - Spectrométrie de masse MSn et UPLC Q-TOF MS

Afin de confirmer la purification par HPTLC de la fraction saponine au  $R_f = 0,2$  (Figure 77), les spots positionnés à ce  $R_f$  ont été prélevés de deux manières. Soit au moyen de l'interface CAMAG TLC-SM qui permet de faire un transfert direct de la plaque TLC par élution vers le spectromètre de masse (voir protocole Chapitre 2 §7), soit par prélèvement de la zone de migration du chromatogramme par grattage au scalpel après migration des extraits. La silice prélevée est alors extraite au méthanol (voir protocole Chapitre 2 §8) et l'extrait méthanolique obtenu est ensuite injecté en spectrométrie de masse (Figure 78).

Les spots d'intérêt issus des extraits de la population de Zaghouan et obtenus par les protocoles P1, P2 et P4 ont été analysés par spectrométrie de masse SM<sup>n</sup> en mode ESI positif (Amzon SL ion trap, Bruker) selon les conditions décrites Chapitre 2 §6. Les résultats sont présentés dans la Figure 78.

La présence de soyasaponine ou de son isomère asukisaponine ( $m/z=942$ ) a été détectée, par son adduit sodium  $[M-Na]^+$ ,  $m/z=965$ , dans les extraits de Zaghouan obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2 et P4. Le rapport signal sur bruit est plus faible que pour les extraits totaux analysés en mode ESI négatif, cependant les fractions isolées s'ionisent difficilement en mode ESI négatif certainement en raison de la présence de sels et le mode ESI positif a été privilégié pour ces analyses.

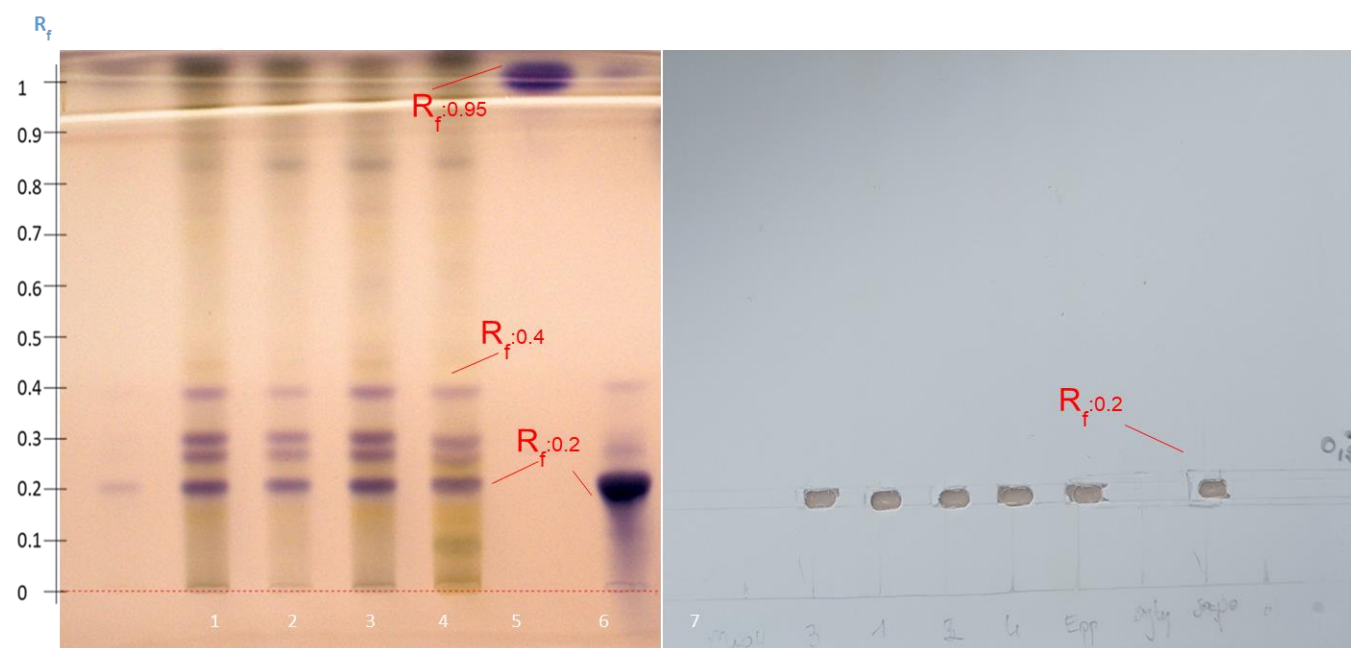


Figure 77: Principe du couplage HPTLC-SM<sup>n</sup>. Transfert direct du spot vers le spectromètre de masse ou bien récupération de la silice suivie d'une extraction méthanolique avant injection HPLC-MS.

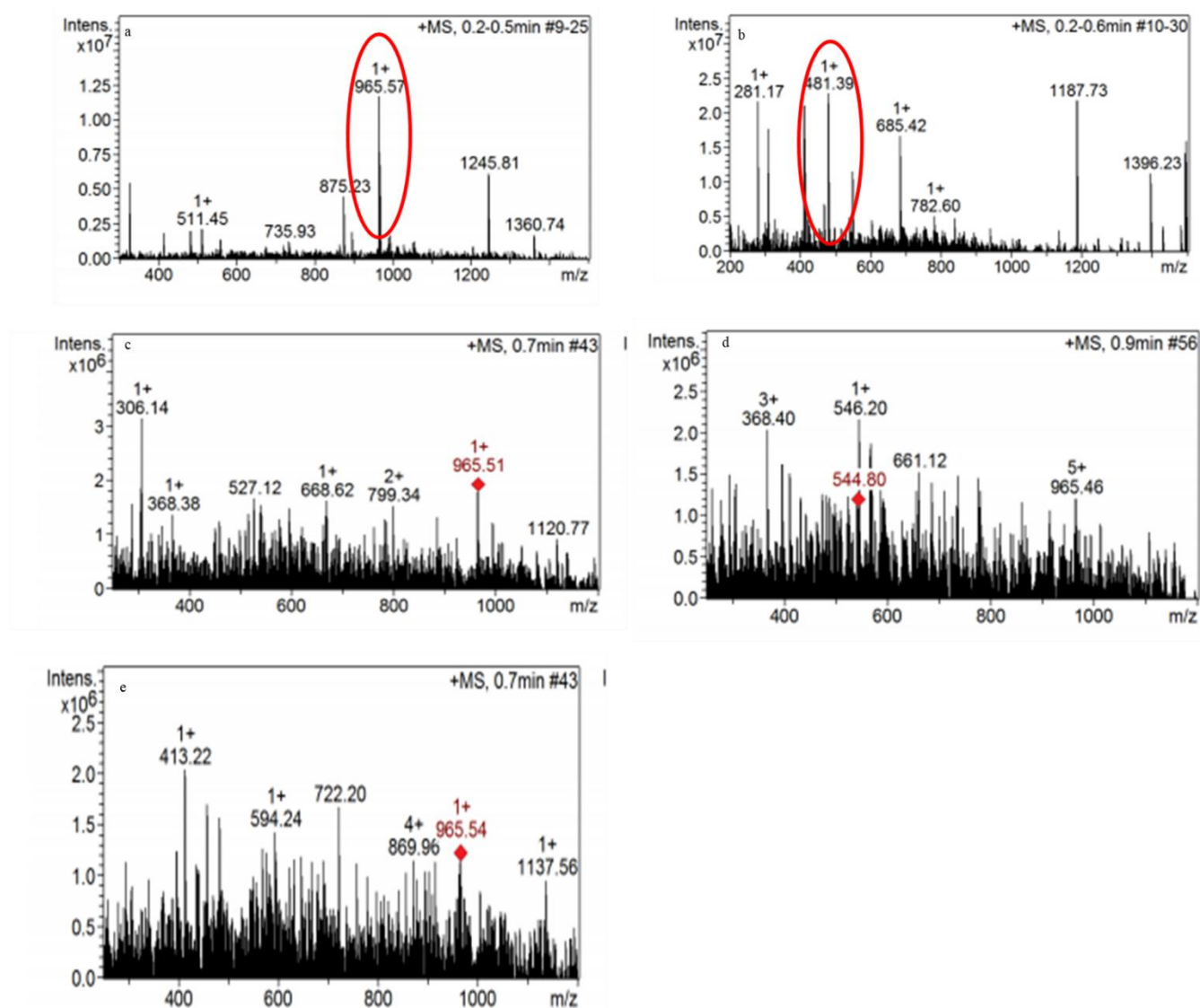


Figure 78: Spectres de masse en mode ESI + de Soyasaponine (a), Soyasapogenol (b), ZA-P1 (c), ZA-P2 (d) et ZA-P4 (e).

Un couplage HPTLC avec un spectromètre de masse à haute résolution, UPLC Xevo G2 Q TOF (Waters) de la plateforme de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT), a été expérimenté sur des plaques de silice réalisées avec des extraits de la population de Zaghouan avant et après hydrolyse identiques à celle de la Figure 68. Les zones de chromatographie d'intérêt situées aux  $R_f=0,2$  et  $R_f=0,8$  obtenus après un développement SS2, ont été prélevées et extraites au méthanol. Les extraits ont alors été analysés par spectrométrie de masse Q-TOF MS en mode ESI positif (Figures 79 et 80). Le standard soyasapogenol après migration en HPTLC ne s'ionise pas en mode ESI négatif.

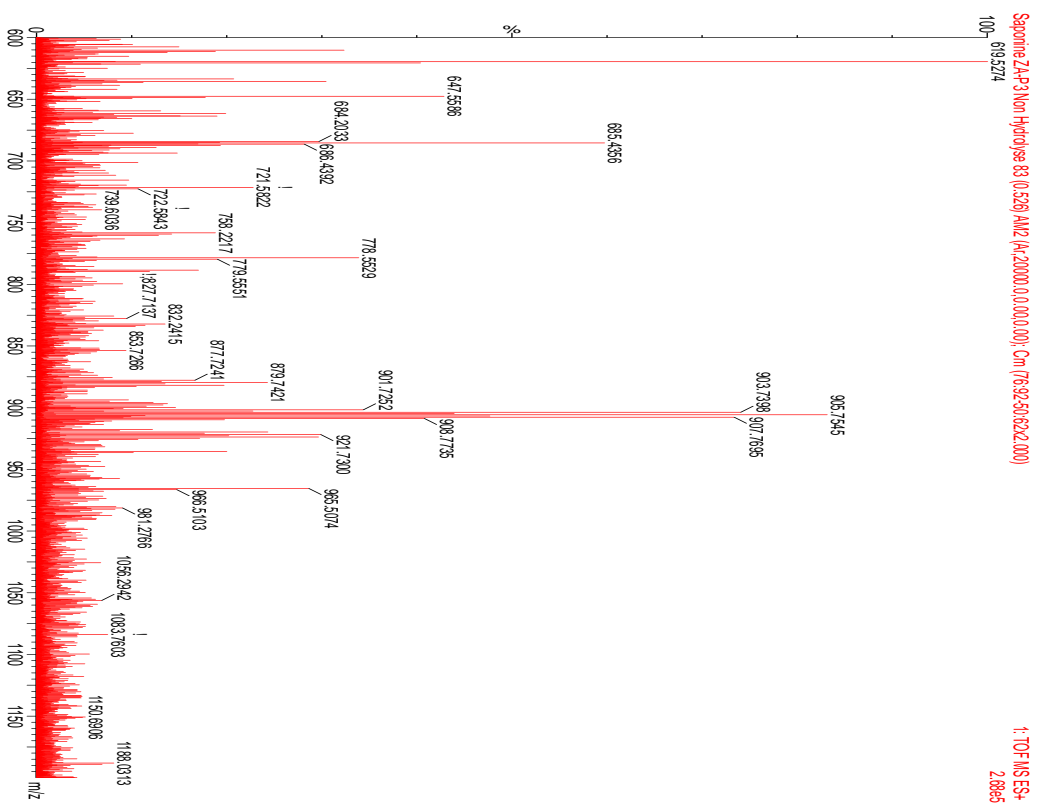
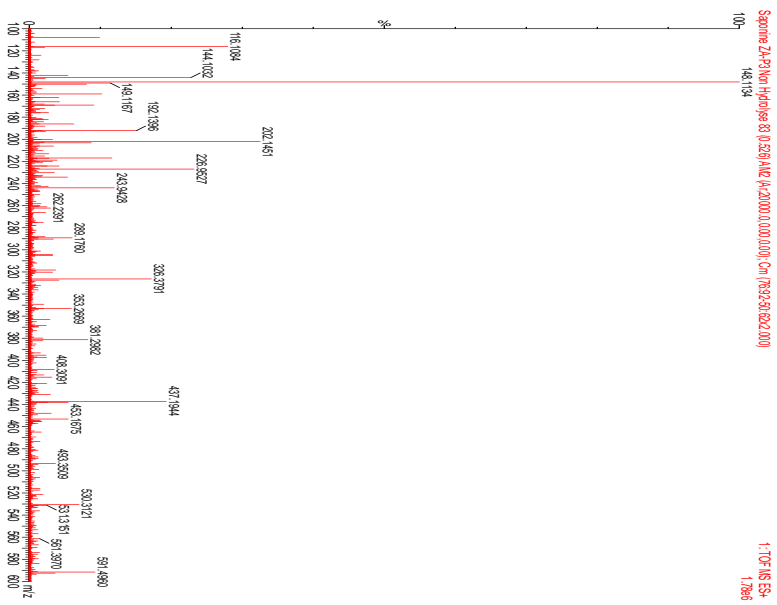
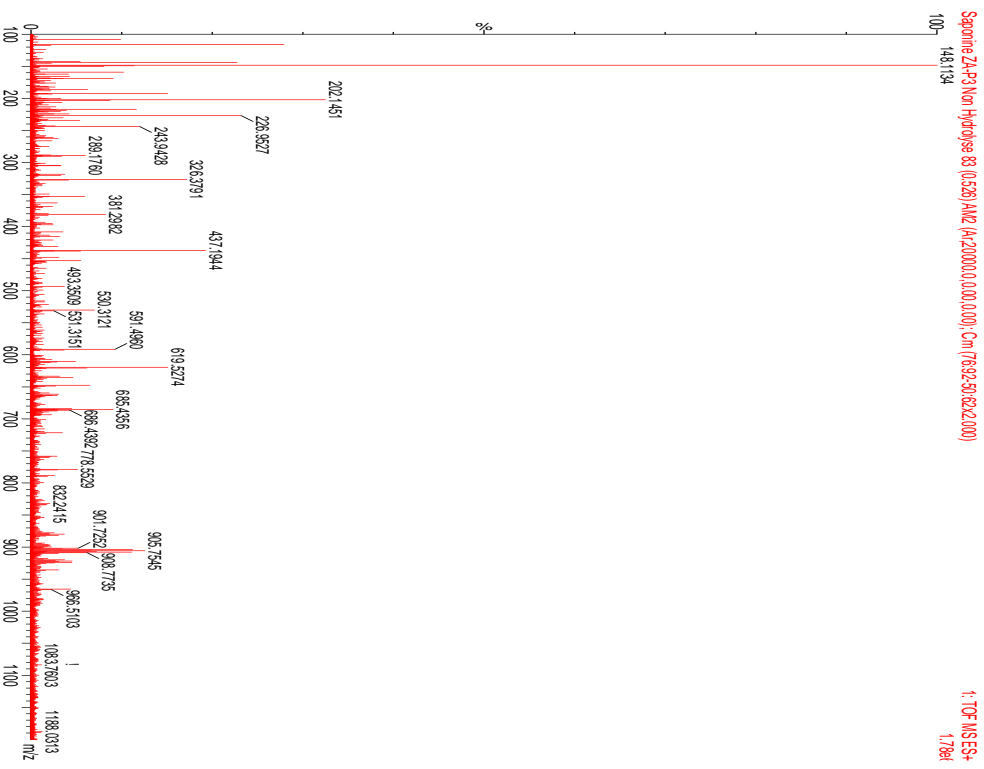


Figure 79: Zone chromatographique Rf=0,2 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF).

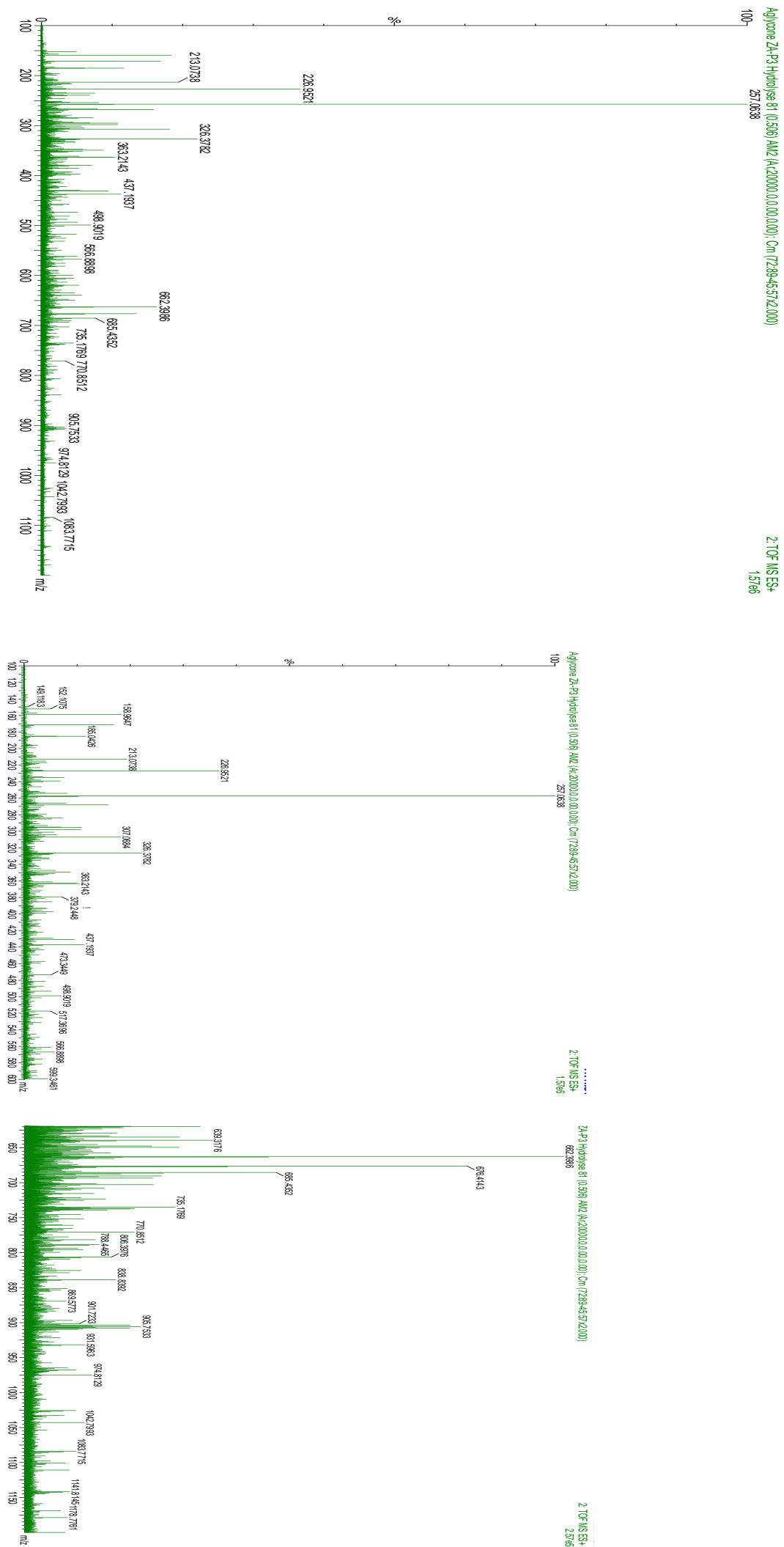


Figure 80: Zone chromatographique  $R_f=0,8$  HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) (spot d'hydrolyse).

Les composés attendus n'ont pas pu être détectés après plusieurs essais, ceci probablement lié à la présence de sels dans l'extrait ou à la concentration trop faible de l'échantillon. La limite de détection de l'aglycone soyasapogenol (prélevé sur la plaque de silice après analyse HPTLC) a été atteinte pour  $m/z=459$  :  $[M-H+]$  avec une dilution au  $10\ 000^{\text{ème}}$  dans le méthanol de la solution initiale à  $0,85\text{ g/L}$ . Pour le standard de soyasaponine (prélevé sur la plaque de silice après analyse HPTLC), la limite de détection en mode négatif est atteinte pour une dilution  $5000^{\text{ème}}$  de la solution initiale à  $1,95\text{ g/L}$  pour  $m/z=941$ . En mode positif la dilution au  $5000^{\text{ème}}$  pour  $m/z=943$  montre beaucoup de bruit de fond (Figures 81 à 84).

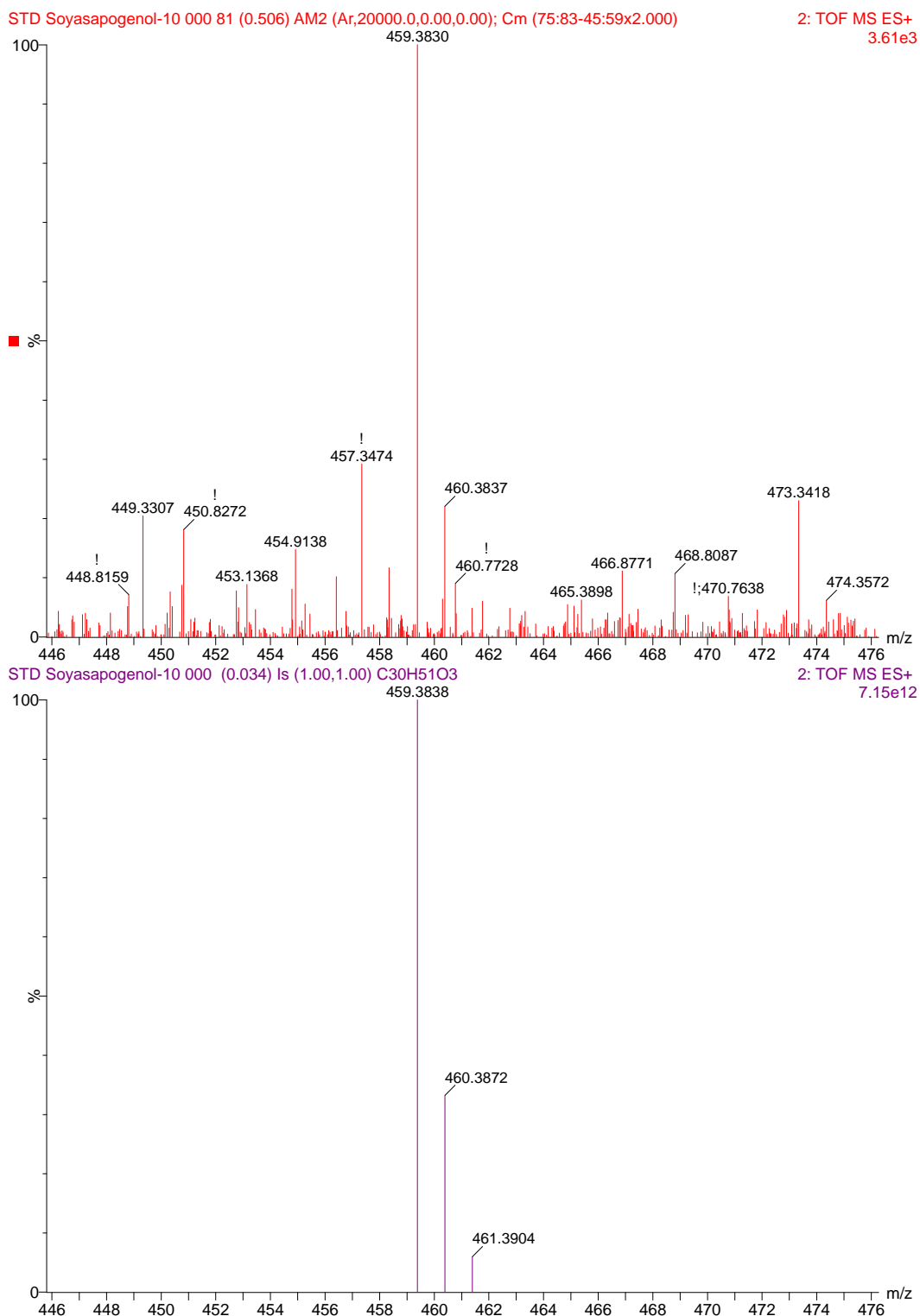


Figure 81: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (zoom à  $m/z=459$ ).

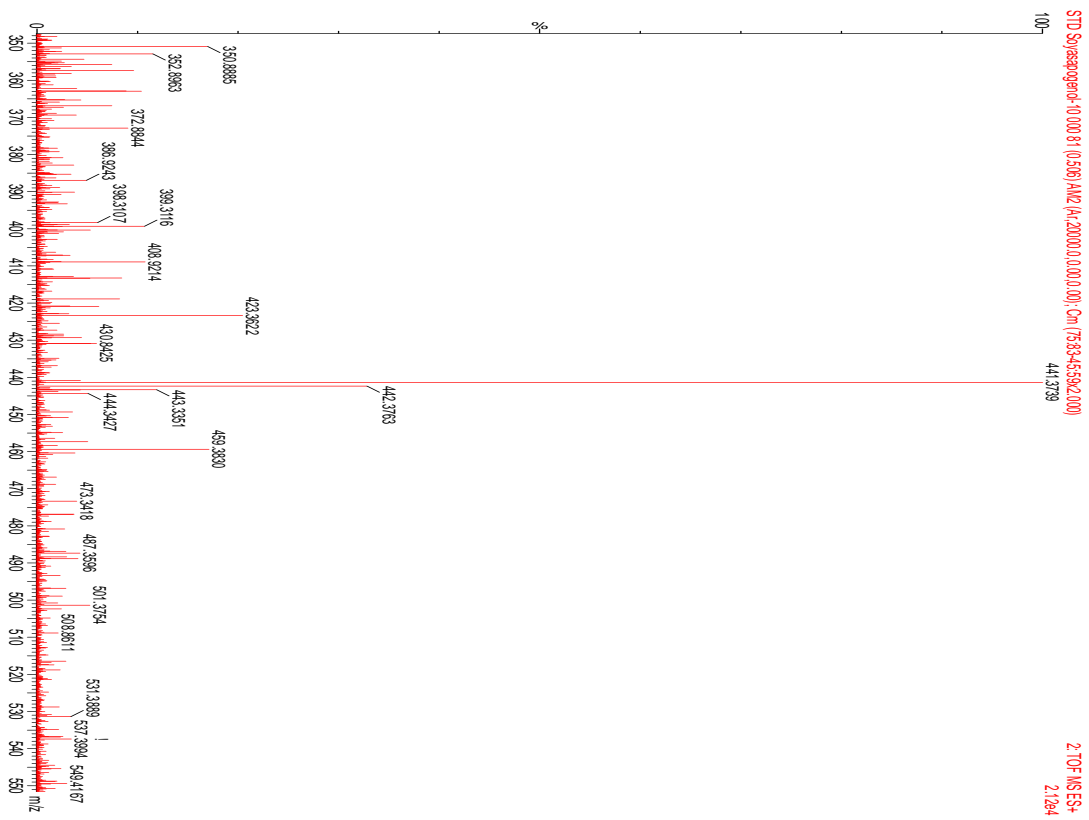


Figure 82: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 ( $m/z=50$  à  $m/z=550$ )

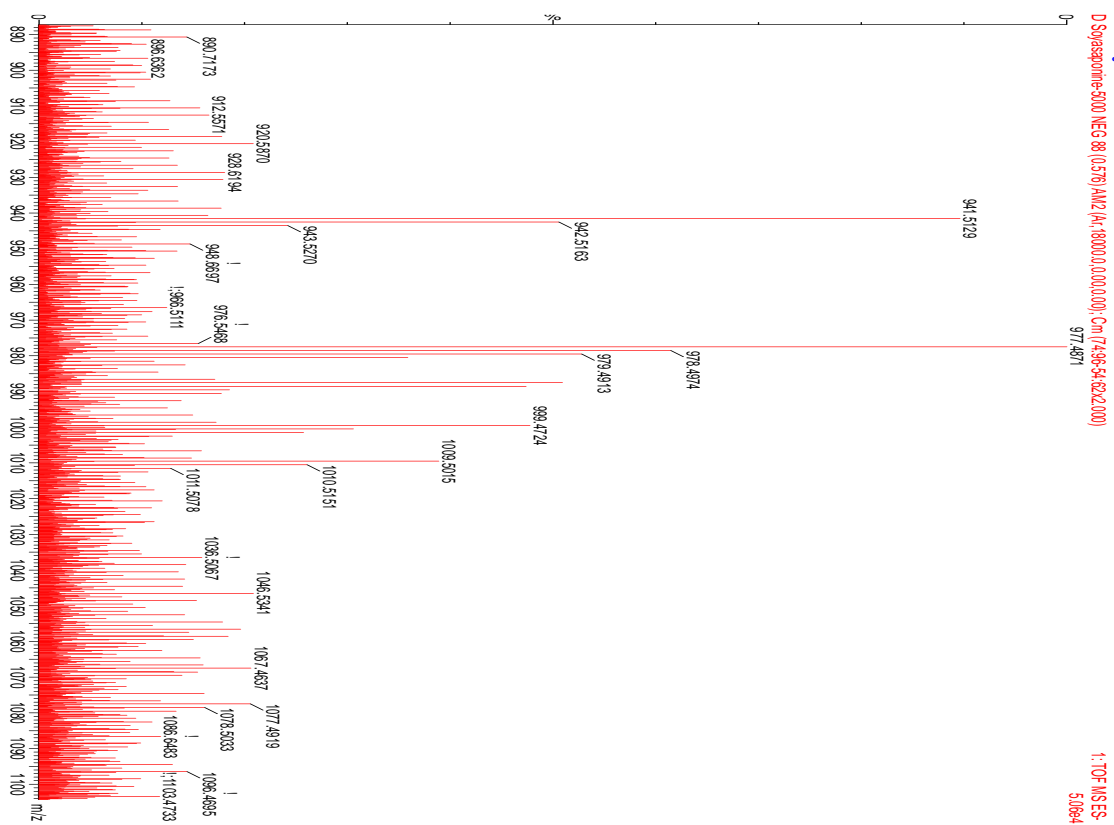


Figure 83: : Standard Soyasapogenol ESI MS NEG (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 5 000.



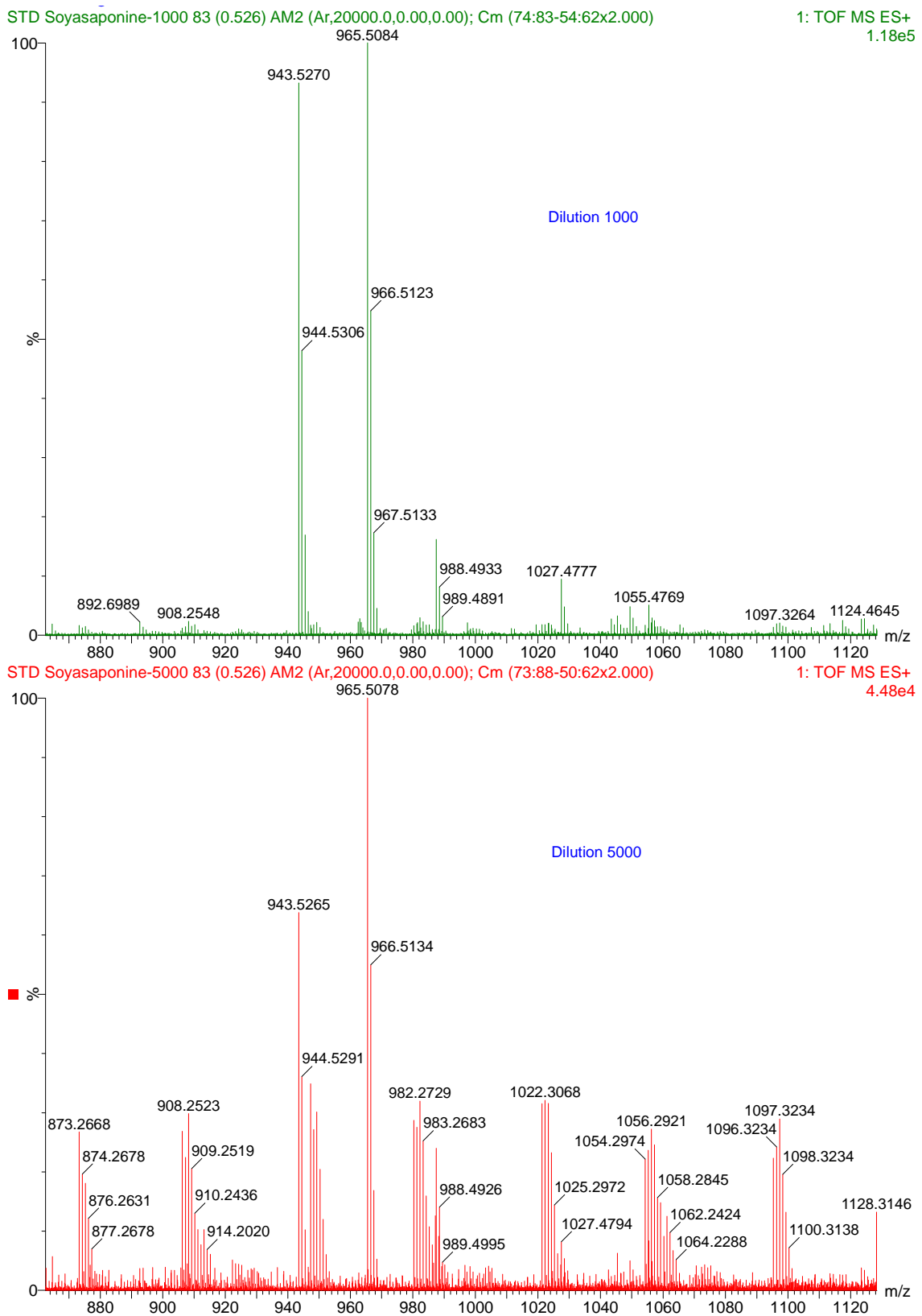


Figure 84: Standard Soyasaponine ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) comparatif facteurs de dilution 5 000 et 1 000.

En conclusion, les protocoles d'extraction d'*Astragalus hamosus* L. P1, P2, P4 et M1 ont permis de détecter les molécules d'intérêt par spectrométrie de masse MS<sup>n</sup>. De meilleurs résultats sont obtenus en mode ESI négatif pour l'injection directe des extraits alors que pour le couplage HPTLC-MS<sup>n</sup> ou HPTLC-TOF MS, c'est le mode ESI positif qui doit être privilégié.

### 3.4 Evaluation de la teneur en polyphénols totaux

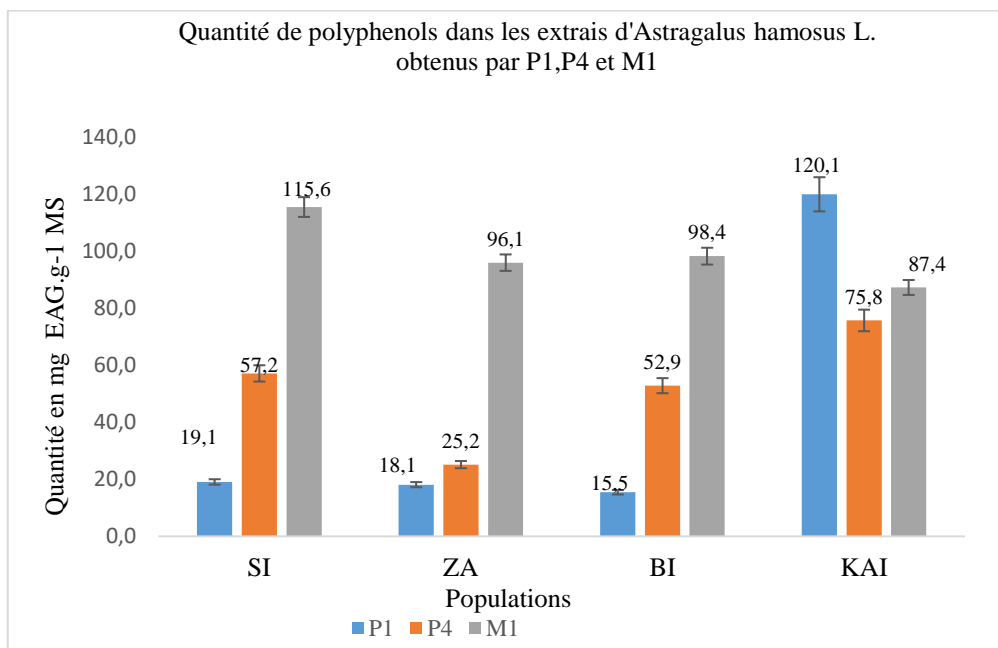


Figure 85: Quantité des polyphénols totaux dans les extraits d'*Astragalus hamosus* L. obtenus selon P1, P4 et M1 en mg EAG.g-1 MS

La quantité de polyphénols dans les extraits obtenus selon M1 est plus importante que dans les extraits obtenus par P1, et P4 sauf pour la population de Kairouan. Ce résultat paraît cohérent sauf pour l'échantillon de Kairouan sachant que M1 permet d'extraire très majoritairement les métabolites secondaires alors que la matière est plus fractionnée avec les protocoles d'extraction P1 et P4.

Les quantités de polyphénols obtenus par P1 sont similaires pour Siliana, Zaghouan et Bizerte (19 mg EAG.g-1 MS, 18,1 mg EAG.g-1 MS et 15,4 mg EAG.g-1 MS respectivement). Ce sont les quantités les plus faibles, ceci confirme que P1 purifie les extraits et semble éliminer des polyphénols. Le résultat de dosage des polyphénols pour KAI-P1 n'est pas attendu où cet extrait exhibe la quantité la plus élevée (120 mg EAG.g-1 MS). Une ou plusieurs molécules interfèreraient avec le dosage des polyphénols.

Les quantités de polyphénols obtenus par P4 sont similaires pour Siliana et Bizerte (57,1 mg EAG.g-1 MS et 52,8 mg EAG.g-1 MS respectivement). La quantité de polyphénols est également très élevée pour Kairouan comme avec le protocole d'extraction P1 : 75,7 mg EAG.g-1 MS, ce qui tendrait à confirmer l'interférence du dosage de polyphénols avec d'autres familles de molécules. De même que dans le cas du protocole P1, Zaghouan a la teneur la plus faible en polyphénols : 25,18 mg EAG.g-1 MS.

La quantification des polyphénols chez les astragales a été discuté dans plusieurs études. Chez *Astragalus ponticus* Pall. les fleurs contiennent 13,38 mg EAG.g-1 MS, les feuilles 26,4 mg EAG.g-1 MS, les racines 21,54 mg EAG.g-1 MS) et les tiges contiennent 13,35 mg EAG.g-1 MS [293]. Chez *Astragalus macrocephal*, les fleurs contiennent 37,68 mg EAG.g-1 MS et les racines contiennent 5,6 mg EAG.g-1 MS [294]. La teneur totale en composés phénoliques dans les échantillons d'*Astragalus danicus* L variait de  $100,75 \pm 3,87$  mg/g (district de Yashkinsky) à  $190,95 \pm 7,34$  mg/g (district de Belovsky) [295].

Des études récentes ont montré que les méthodes colorimétriques présentaient plusieurs inconvénients et que ces méthodes ne pouvaient pas refléter les teneurs précises de composés dans les extraits de plantes. La quantification précise doit être faite par HPLC.

### 3.5 Conclusions du chapitre:

L'extraction, la purification et la quantification des saponines présentent un véritable défi. Les astragales ont été largement étudiées mais les glycosides des soyasaponines sont structurellement similaires et peuvent posséder des temps de rétention HPLC identiques, ainsi que des masses moléculaires et des schémas de fragmentation similaires lorsqu'ils sont analysés par spectrométrie de masse. De plus certaines saponines du groupe B conjuguées au DDMP sont thermolabiles ce qui complique d'avantage l'identification et la quantification des saponines.

L'efficacité de l'extraction dépend principalement de trois facteurs : le temps, la température (température ambiante et température du solvant) et le choix des solvants.

Des analyses préliminaires nous ont orientés vers la recherche de nouveaux protocoles d'extraction et de paramètres analytiques HPTLC. Le choix des 4 protocoles d'extraction adaptés de la littérature dénommés P1, P2, P3 et P4, ainsi que la sélection d'un système de développement adapté nous ont permis d'avancer et d'atteindre le premier objectif de la thèse concernant l'hypothèse de présence de saponines dans les population tunisiennes d'*Astragalus hamosus L.* sélectionnées.

L'analyse par spectrométrie de masse en modes ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup> des extraits de la population de Zaghouan obtenus par les différents protocoles a permis de supposer la présence de la soyasaponine B ou son isomère l'azukisaponine. En effet, leur présence a été détectée, par leur adduit sodium [M-Na]<sup>+</sup>, m/z=965 dans ces extraits obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2 et P4.

La quantification des saponines a permis d'estimer 3 % d'équivalent soyasapogénol dans l'extrait ZA-P3.

Le dosage des polyphénols, quant à lui, a montré que les extraits obtenus par M1 sont plus riches en polyphénols que ceux obtenus par P1 et P4 et ce sont les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 qui ont exhibé les quantités les plus faibles confirmant ainsi la purification des extraits d'*Astragalus hamosus L.* par la méthode HPTLC.

## Chapitre 4 : Évaluation des Activités Biologiques

## Introduction :

Cette partie est consacrée à la détermination des propriétés biologiques anti-radicalaire, anti-acétylcholinestérase et neuroprotectrice des extraits des quatre populations d'*Astragalus hamosus* L. qui pourraient être notamment utilisés comme alternative à la protection du système nerveux contre l'accumulation du peptide AB et finalement l'activité cytotoxique.

L'activité antiradicalaire a été évaluée dans un premier temps. Puis les propriétés neuroprotectrices ont été à leur tour investiguées. Pour ce faire, une première étude qualitative de l'inhibition de l'AChE par certaines fractions a été réalisée par détection de l'inhibition basée sur la méthode HPTLC. Un essai colorimétrique d'ELLMAN a ensuite été mis en œuvre. Des études in vitro sur 21 fractions d'*Astragalus hamosus* L. par la méthode MTT ont alors été menées afin d'évaluer les propriétés de neuroprotection contre la toxicité induite du peptide AB dans un modèle cellulaire neurale PC12.

Les activités cytotoxiques contre une lignée cancer colorectal CACO-2 ont finalement été évaluées sur les fractions d'*Astragalus hamosus*. En effet, la Soyasaponine B et son aglycone le Soyasapogénol B sont connus par leur effet antiprolifératif sur plusieurs lignées cellulaires du cancer colorectal. L'activité cytotoxique de ces fractions a été évaluée sur la lignée cellulaire HE293 qui est la plus couramment utilisées tant pour la recherche universitaire que dans les industries pharmaceutique et biotechnologique.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre sont discutés et comparés à d'autres espèces du genre *Astragalus* ou bien d'autres plantes d'Afrique.

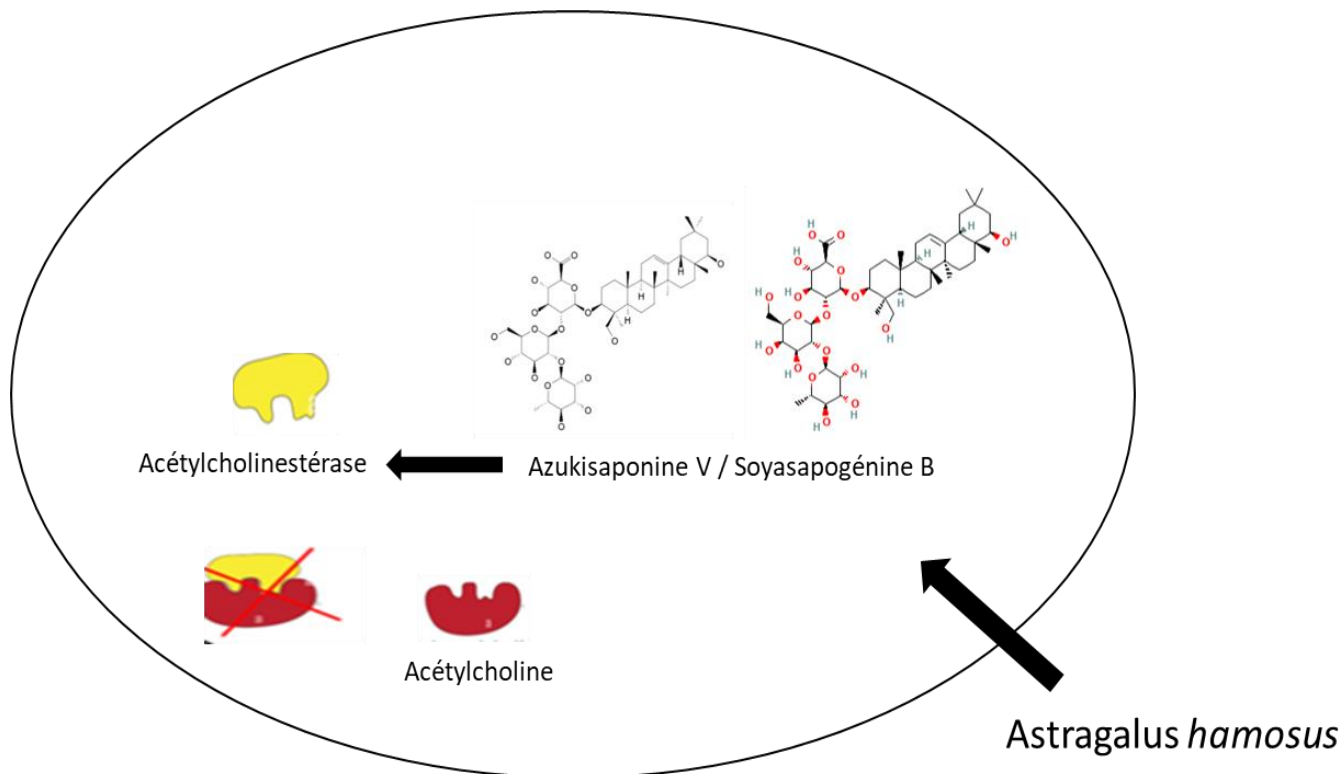
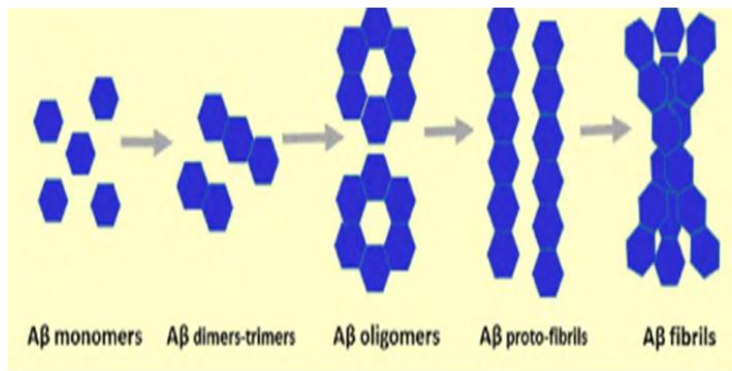
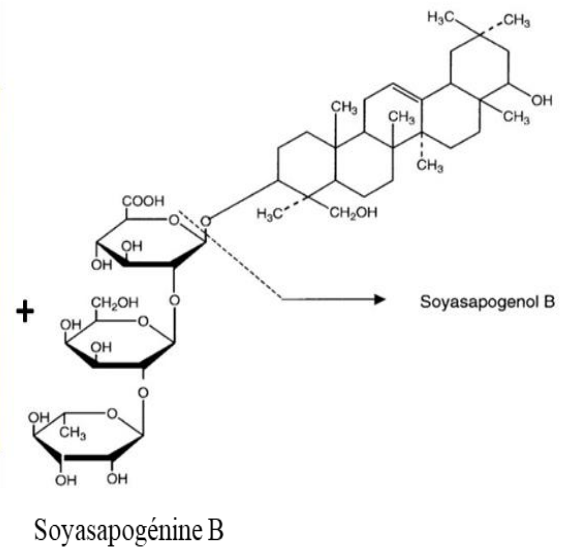


Figure 86: Première voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par inhibition de l'Ache



Peptide AB neurotoxique



Neutralisation du peptide AB

Figure 87: Deuxième voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par neutralisation du peptide AB

## 1 Évaluation de l'activité antiradicalaire

### 1.1 Cas des fractions ZA-P1, KAI-P1, BI-P1 et KAI-P1

L'activité anti radicalaire des fractions butanol obtenues par le protocole P1 a été évaluée pour les 4 populations par la méthode DPPH dont les conditions opératoires sont indiquées dans le chapitre 2 (§ 12).

L'objectif est de déterminer la concentration efficace en extrait d'*Astragalus hamosus* L. pour obtenir 50% d'inhibition. Pour ce faire des solutions méthanoliques d'extraits de différentes concentrations (entre 1 et 500 µg/mL) ont été évaluées.

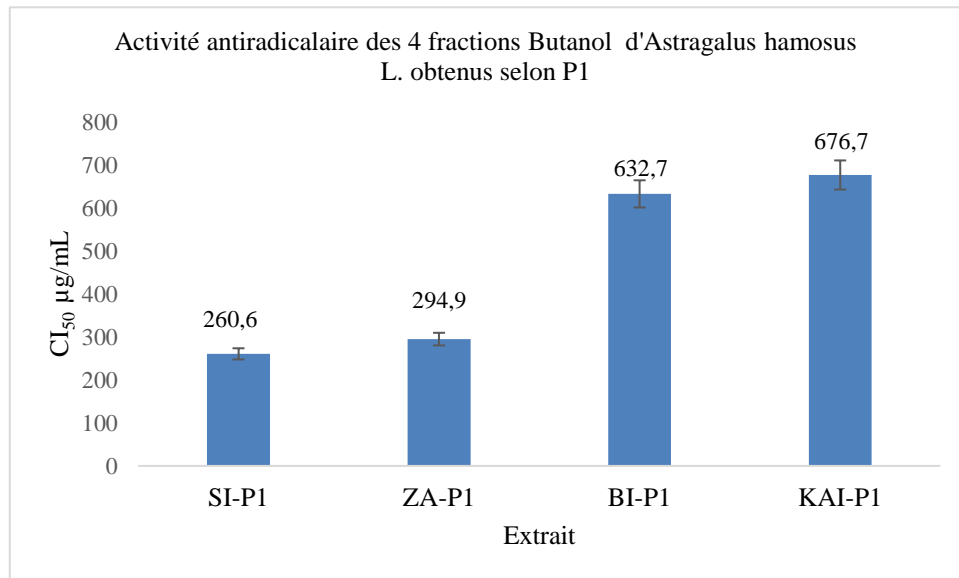


Figure 88: Activité anti radicalaire des 4 populations obtenus selon P1, exprimée en CI<sub>50</sub> en µg/mL

Le test de piégeage de DPPH montre une faible inhibition pour tous les extraits. Les concentrations inhibitrices CI<sub>50</sub> les plus importantes sont enregistrées chez les populations Siliana et Bizerte avec des CI<sub>50</sub> de 260 et 294 µg/mL successivement. Ces extraits montrent une activité plus faible que l'activité anti radicalaire la plus faible enregistrée chez *Astragalus membranaceus* du Liban pour lequel la CI<sub>50</sub> est de 102 µg/mL [296].

Des travaux ont montré une efficacité de piégeage des radicaux DPPH d'extraits au méthanol des parties racinaires et aériennes des espèces d'astragale pour des valeurs de CI<sub>50</sub> allant de 68,8 à 400,4 µg/mL [293].

Chez *A. ponticus* la CI<sub>50</sub> varie entre 207,9 et 141,1 µg/mL respectivement dans les parties racinaire et aérienne [297] alors qu'elle était de 626,66 et 473,33 µg/mL dans les racines et les parties aériennes d' *A. gombiformis* [298].

Récemment en 2021, les travaux de BENFARYDIA et al [299], ont montré que l'activité anti radicalaire d'*Astragalus gombo* variait entre 1,59 et 0,07 µg/mL. Dans cette étude les chercheurs considèrent que ces résultats montrent une activité antioxydante puissante.

Douze lots d'*Astragali Radix* d'origines différentes ont montré une large gamme d'activités de piégeage des radicaux DPPH (CI<sub>50</sub> = 1,40–9,90 µg/mL) [300].

Un extrait d'*Astragalus armatus* a exhibé une activité de piégeage de DPPH avec une CI<sub>50</sub> : 67,90 µg/mL [301].



Les résultats obtenus sont attendus parce que généralement ce sont les polyphénols qui sont responsables de cette activité antioxydante alors que le protocole 1 a été appliqué effectivement pour purifier et garder les molécules d'intérêts qui sont les saponines.

## 1.2 Cas des fractions ZA-P4, KAI-P4, BI-P4 et KAI-P4

L'activité anti radicalaire des 4 fractions issues des populations d'*Astragalus hamosus L.* obtenues selon le protocole P4 présentent des meilleurs résultats comparativement aux activités obtenues par les extraits du protocole 1. L'inhibition la plus importante est exhibé par l'extrait SI-P4 et la moins importante est enregistré chez Bizerte. Cette concentration inhibitrice est néanmoins deux fois moins importante que pour la fraction de la même population obtenue par le protocole P1 et trois fois moins importante dans le cas de la fraction de Kairouan. Le protocoles P4 a, à priori, permis de purifier les fractions de Bizerte et Kairouan vis à vis de métabolites secondaires réactifs à la DPPH.

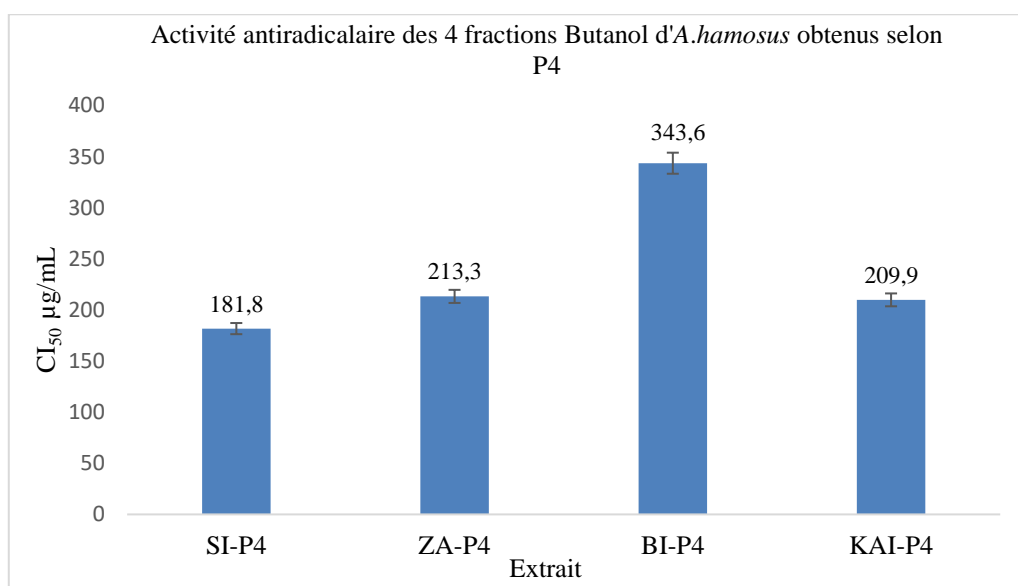


Figure 89: Activités anti radicalaires des SI-P4, ZA-P4, BI-P4 et KAI-P4 exprimées en CI50 en µg/m/L

## 2 Activité anti-acétylcholinestérase

### 2.1 Évaluation de l'activité anti-Ache par HPTLC-Biautographie

Les spots blancs sur le fond jaune montrent qu'il y a une inhibition de l'acétylcholinestérase par tous les extraits d'*Astragalus hamosus L.* obtenus selon P1, ainsi que les standards soyasaponine B et Soyasapogénol B. Les spots situés au R<sub>F</sub>=0,4 correspondent probablement à des saponines d'après les analyses HPTLC précédentes. Ces résultats sont promoteurs pour avancer dans les analyses et confirmer que les saponines peuvent inhiber l'AChE

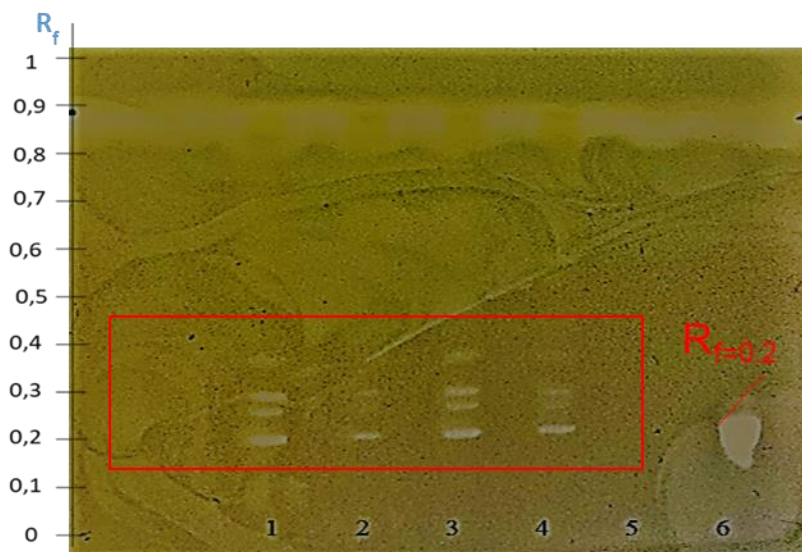


Figure 90: Dépistage de l'inhibition de l'AChE par HPTLC-Biautographie des extraits SI-P1 (piste), BI-P1 (piste 2), ZA-P1(piste 3) et KAI-P1(piste 4), ainsi que la soyasapogenol B (piste 5) et la soya saponine B (piste 6).

## 2.2 Évaluation de l'activité anti-Ache par la méthode d'Ellman

La méthode d'Ellman, qui repose sur la détermination de la quantité de thiocholine libérée lors de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'AChE, est la méthode la plus utilisée car elle est simple et donne un accès rapide aux informations contenues dans les extraits de plantes [302].

### 2.2.1 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la galanthamine

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par le témoin galanthamine augmente au cours du temps, alors que la  $CI_{50}$  diminue.

Au démarrage à T0, la  $CI_{50}$  est de 22,12  $\mu\text{g/mL}$ , puis à 42 secondes diminue à 9,3  $\mu\text{g/mL}$ , à 84 secondes devient 4,25  $\mu\text{g/mL}$ , 1,8  $\mu\text{g/mL}$  à 126 secondes et atteint 1,45  $\mu\text{g/mL}$  à 168 secondes (Figure 91). Les courbes d'inhibition de l'Ache par la galanthamine en fonction du temps et de la concentration en extrait sont présentées en annexe.

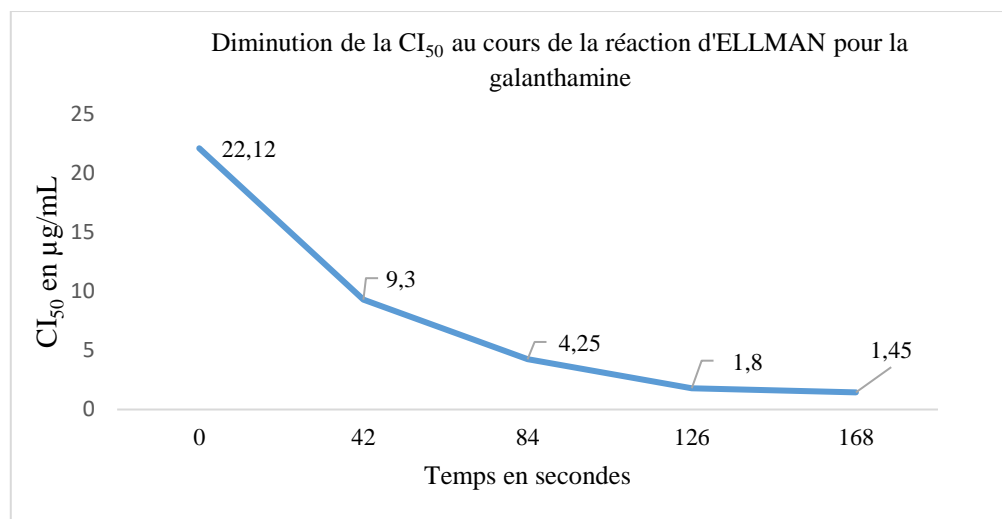


Figure 91: Diminution de la  $CI_{50}$  de la galanthamine en fonction du temps

### 2.2.2 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par les 4 Population SI, BI, ZA et KAI

L'inhibition de l'acétylcholinestérase peut être évaluée en se basant sur la  $CI_{50}$  de chaque extrait à un temps défini ou bien en comparant l'inhibition de chaque extrait à une même concentration.

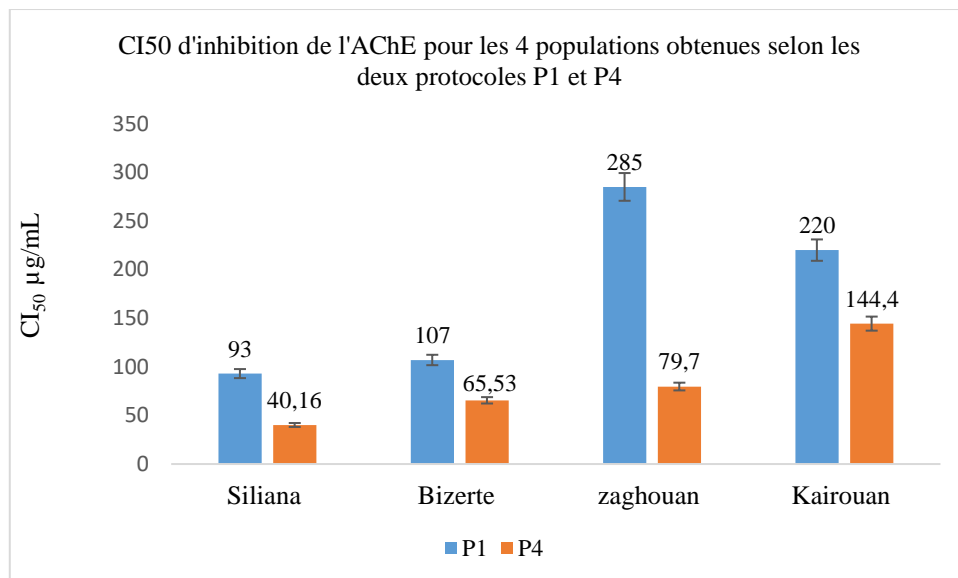


Figure 92: : Histogramme de présentation de la  $CI_{50}$  d'inhibition de l'AChE par les 4 extraits, Siliana, Bizerte Kairouan et Zaghouan selon P1 (bleue) et selon P4 (orange) à 168 secondes de la réaction d'Ellman

En se basant sur la  $CI_{50}$  de chaque extrait, on peut classer l'inhibition comme forte si  $CI_{50}$  varie, entre 0,3 et 19  $\mu\text{g/mL}$ , modérée si  $CI_{50}$  varie entre 21 et 184,5  $\mu\text{g/mL}$ , et faible si  $CI_{50}$  varie entre 218 et 1000  $\mu\text{g/mL}$  approximativement [303]. Chez les Astragales, ces limites d'évaluation ne sont pas pris en compte, par exemple la  $CI_{50}$  des extraits d' *A. gombiformis* est de valeur 110  $\mu\text{g/mL}$ , elle a été considérée comme importante et cette découverte suggère que cette espèce peut être une source possible de produits naturels anticholinestérasiques [304]. Chez *Astragalus Armatus*, la  $CI_{50}$  est de valeur l'AChE 40,25  $\mu\text{g/mL}$  et elle a été considérée comme significative [305].

Les extraits obtenus par le protocole 4 ont une meilleure inhibition que les extraits obtenus par le protocole 1, ceci peut être expliqué par la présence plus marquée de molécules inhibitrices d'acétylcholinestérase extraites grâce au protocole 4. SI-P4 exhibe la meilleure inhibition avec une  $CI_{50}$  égale à 40,16  $\mu\text{g/mL}$ , suivie de BI-P4 ( $CI_{50}$  =65,53  $\mu\text{g/mL}$ ) et ZA-P4 ( $CI_{50}$  =79,7  $\mu\text{g/mL}$ ) et finalement KAI-P4 avec  $CI_{50}$  =144,4  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.2.3 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la soyasaponine et Soyasapogénol B

Les fractions obtenues selon P1 et P4 exhibent des résultats d'inhibitions d'Ache plus importants que la Soyasaponine B et le Soyasapogénol B.

La  $CI_{50}$  de la Soyasaponine a une valeur de 993  $\mu\text{g/mL}$  et celle du Soyasapogénol B a une valeur de 446  $\mu\text{g/mL}$ . Ces concentrations sont considérées comme non significatives même si l'aglycone présente une meilleure inhibition que la saponine glycosylée. Une interaction de type synergie entre les molécules dont les saponines présentes dans les fractions butanol de P1 et P4 sont envisageables.

Généralement, les plantes stockent les saponines sous forme de glycosides, généralement sous forme bidesmosidique, qui peuvent être hydrolysées en formes monodesmosidiques et il a été rapporté que ce changement de bidesmosidique à monodesmosidique améliore la bioactivité des saponines [306].

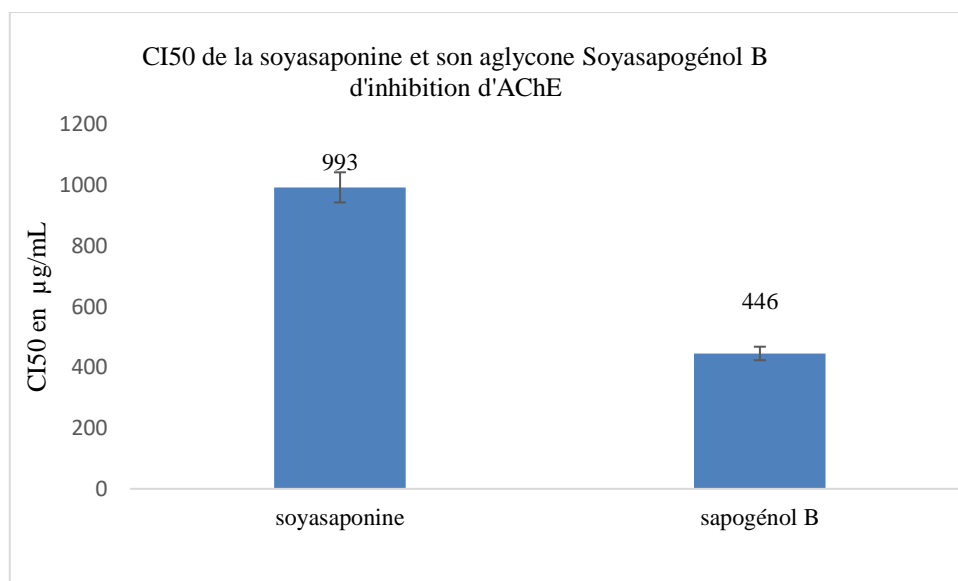


Figure 93: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'ACHé par la Soyasaponine et le Soyasapogénol

### 3 Évaluation de la Neuroprotection

#### *Évaluation de l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire*

La viabilité cellulaire fait référence au nombre de cellules saines dans une population. Elle a été déterminée en fonction de la capacité des cellules à réduire le colorant tétrazolium par l'action de l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en Formazan.

#### **3.1 Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sur la viabilité des cellules PC12 :**

ZA-P1, BI-P1, SI-P1 et KAI-P1 à 50 µg/mL augmentent la prolifération de plus ou égale à 200 %, Les pourcentages de viabilité sont 243,57; 221,11; 195,69; 197,27 pour ZA-P1, BI-P1, SI-P1 et KAI-P1 respectivement (Figure 94). En augmentant la concentration à 100 µg/mL, la prolifération reste importante mais diminue légèrement, ceci peut être expliqué par la mort cellulaire normale à cause d'une forte stimulation. En effet, en atteignant de la confluence, les cellules adhérentes occupent la totalité de la surface disponible du milieu de culture où elles se divisent jusqu'à la formation d'une monocouche, après cette étape les cellules meurent si elles ne différencient pas [307],[308]. La multiplication des cellules PC12 est toujours observée et à 5 µg/mL avec 120,16; 113,60; 107,04 et 141,30 pour les mêmes extraits respectivement. Un retour à une viabilité normale est observé lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL. On peut conclure que les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 ne sont pas toxiques sur PC12 ; ce sont plutôt des stimulateurs significatifs de leur prolifération jusqu'à une concentration de 5 µg/mL.

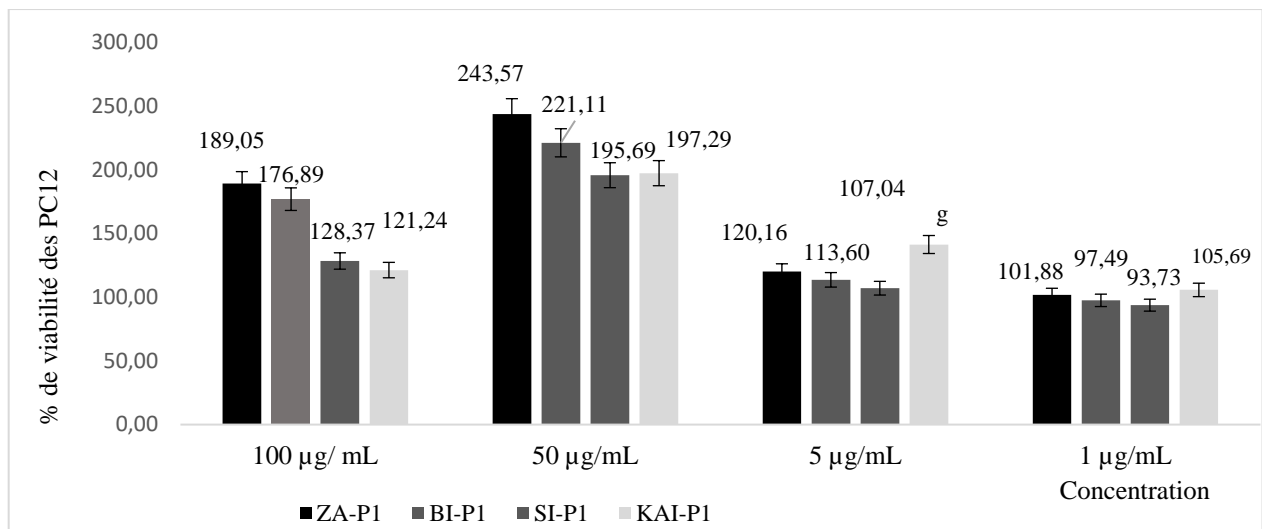


Figure 94: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des différentes fractions Butanol obtenues par le protocole d'extraction P1 pour les 4 populations à différentes concentrations.

### 3.2 Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 sur la viabilité des cellules PC12

De même, les extraits ZA-P2, ZA-P-HEX ont stimulé la prolifération de PC12 à 50 et 5 µg/mL et la viabilité reste normale (Figure 95). À 50 µg/mL, les pourcentages de viabilité sont de 166,22 et 182,96 pour ZA-P2 et ZA-P2/HEX respectivement et diminuent à 135 et 124,69 à 5 µg/mL.

À 100 µg/mL, les deux fractions butanol et hexane ont conservé la viabilité mais elles ne l'ont pas stimulé. Ce résultat est expliqué par la mort cellulaire normale à cause de la forte confluence.

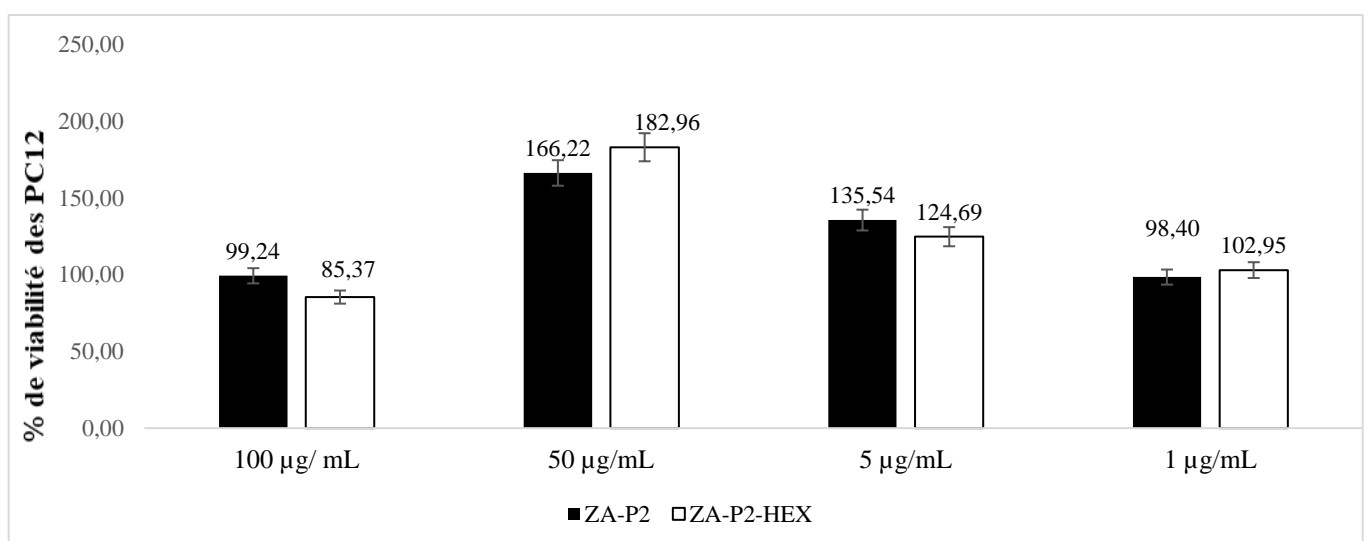


Figure 95: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des deux fractions ZA-P2 (butanol) et ZA-P2-HEX (hexane), obtenues au cours du procédé d'extraction P2, à différentes concentrations.

### 3.3 Évaluation des extraits obtenus par le protocole P3 d'extraction sur la viabilité des cellules PC12

L'étude de la viabilité en présence des extraits à 100 µg/mL a été réalisée mais les résultats n'ont pas été validés à cette concentration. Concernant les extraits P3 (Figure 96), KAI-P3 à 50 µg/mL stimule la prolifération des cellules PC12 de 59,93% ; elles sont normalement viables à 5 µg/mL et 1 µg/mL (106 et 103,47 % respectivement). L'extrait SI-P3 est légèrement cytotoxique à 50

$\mu\text{g/mL}$ , le % de viabilité est de 81,88, mais en abaissant la concentration à  $5 \mu\text{g/mL}$  l'extrait exerce une légère prolifération à 109,96 %. Le BI-P3 est neurotoxique à  $50 \mu\text{g/mL}$  avec 82,71% mais stimule la prolifération à  $5 \mu\text{g/mL}$  avec 112,04 %. ZA-P3 stimule légèrement la croissance à 50 et  $5 \mu\text{g/mL}$  de 111,27 et 112,82 % et revient à la normale à  $1 \mu\text{g/mL}$  de 101,87 %. En général, en abaissant la concentration à  $5 \mu\text{g/mL}$ , tous les extraits ont légèrement augmenté la prolifération et la viabilité de PC12 et sont revenus à la normale à  $1 \mu\text{g/mL}$ .

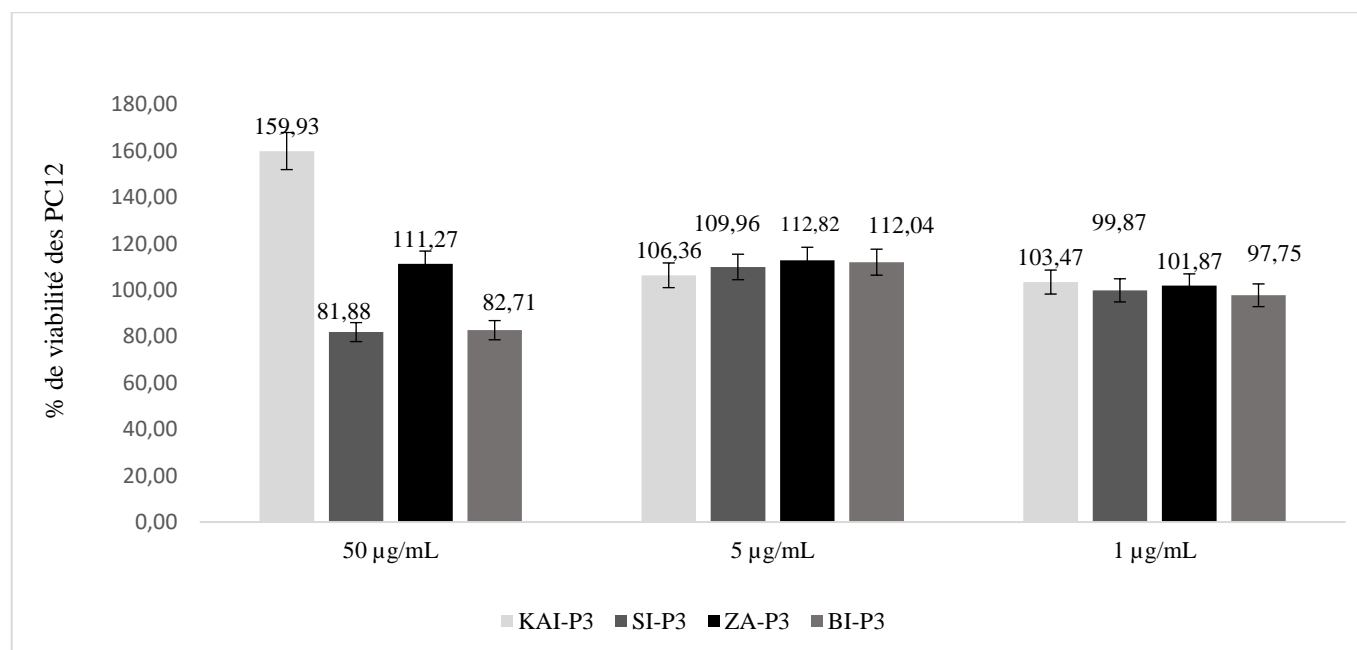


Figure 96: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions butanol de KAI-P3, SI-P3, ZA-P3 et BI-P3

### 3.4 Évaluation des extraits obtenus par le protocole P4 sur la viabilité des cellules PC12

Certains extraits obtenus par P4 sont toxiques pour PC12, tandis que d'autres stimulent la prolifération (Figure 97).

À  $50 \mu\text{g/mL}$ , l'extrait de SI-P4 stimule fortement la prolifération des cellules PC12 avec une viabilité de 267,48 %. KAI-P3 aussi est stimulant à cette concentration avec 130,21 % mais les fractions ZA-P4/HEX, ZA-P4/chloro, ZA-P4/AE et BI-P4 sont neurotoxiques. En abaissant, la concentration à  $5 \mu\text{g/mL}$ , SI-P4 conserve son effet stimulateur avec 122,37 % et la viabilité retourne à la normale pour KAI-P4 avec 103,73 % et toutes les autres fractions ne sont plus toxiques à  $5 \mu\text{g/mL}$  mais stimulent plutôt la prolifération, avec 119,56 %, 112,95 %, 122,6 % successivement pour ZA-P4/HEX, ZA-P4/CHLOR, ZA-P4/AE. Pour BI-P4 la viabilité est normale avec 92,46 %. La viabilité des cellules PC12 est normale à  $1 \mu\text{g/mL}$  pour tous les extraits.

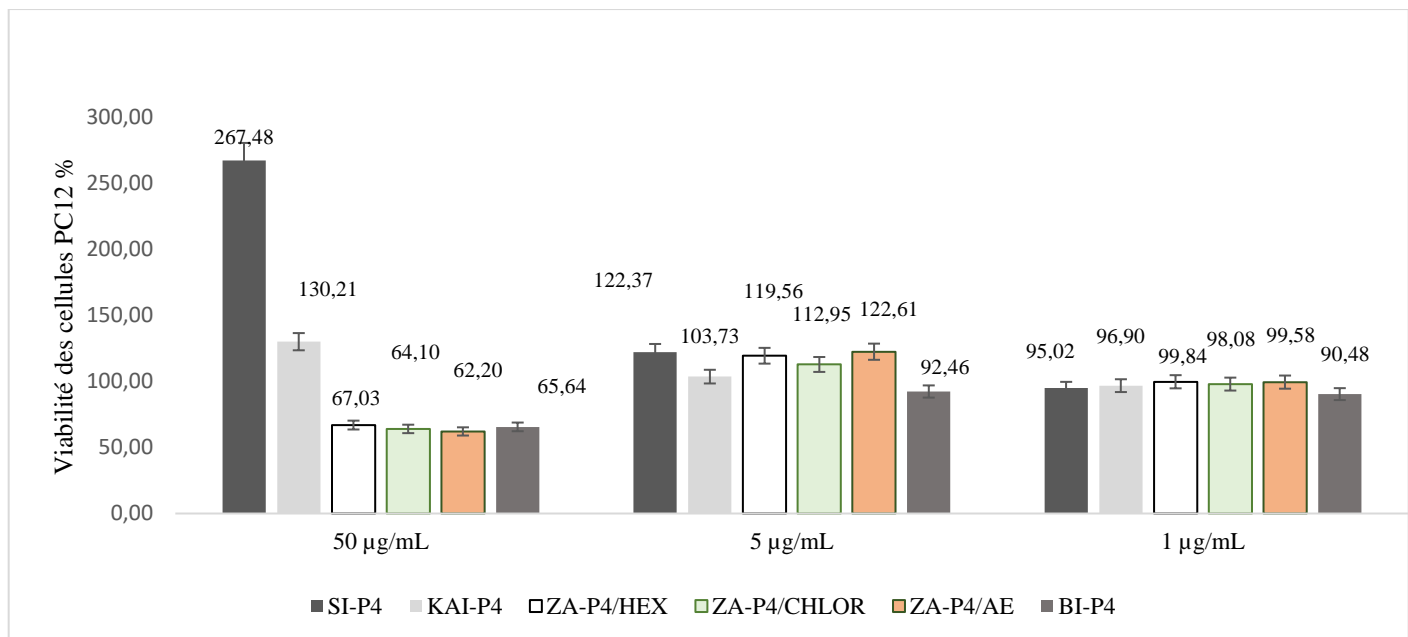


Figure 97: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence des Fractions obtenus par P4

### 3.5 Évaluation des extraits obtenus par le protocole M1 sur la viabilité des cellules PC12

Les 3 extraits SI-M1, KAI-M1 et BI-M1 sont neurotoxiques à 50 µg/mL mais la viabilité est normale à cette concentration pour ZA-M1 avec 86,02 %. En abaissant la concentration à 5 µg/mL tous les extraits deviennent des stimulateurs de prolifération des cellules PC12 avec 104 % ; 116 % ; 117,12 % et 138 % respectivement pour ZA-M1, SI-M1, BI-M1 et KAI-M1. La viabilité est normale en leur présence à 1 µg/mL (Figure 98).

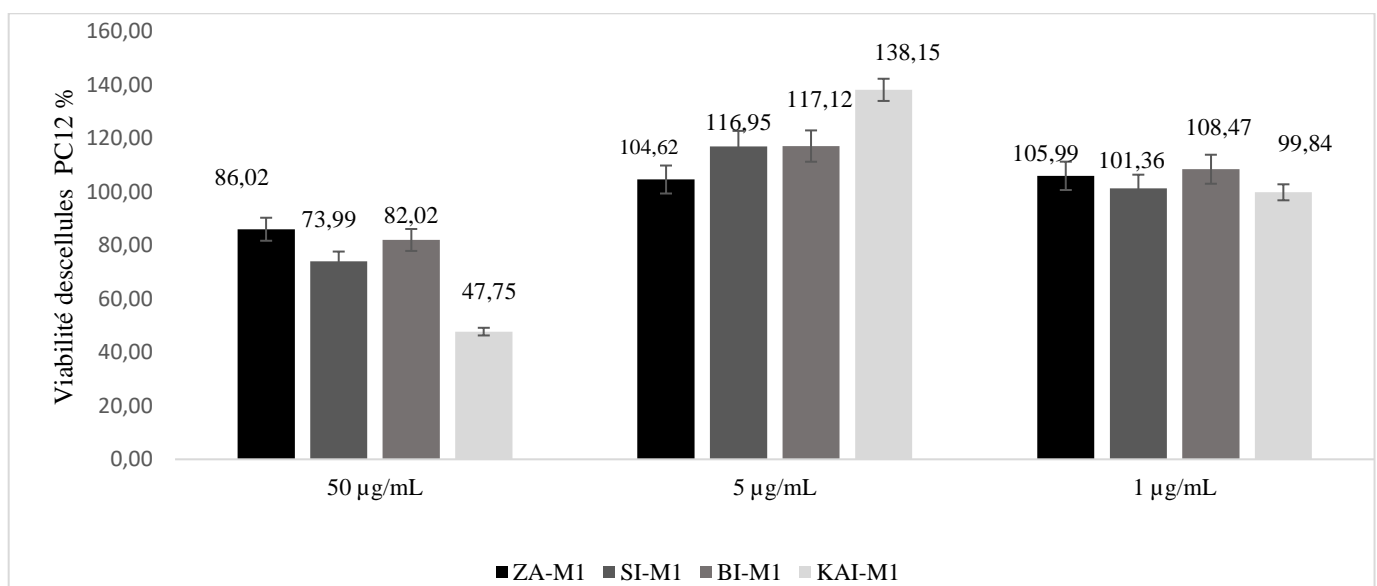


Figure 98: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions obtenus par M1

### 3.6 Évaluation de l'effet de soyasapogénol sur la viabilité des cellules PC12

L'aglycone soyasapogénol B était neurotoxique à 50 µg/mL avec 40,20 % mais stimulateur avec 145,07 % à 5 µg/mL. Une légère prolifération est observée même à 1 µg/mL avec 105,03 % de viabilité (Figure 99)

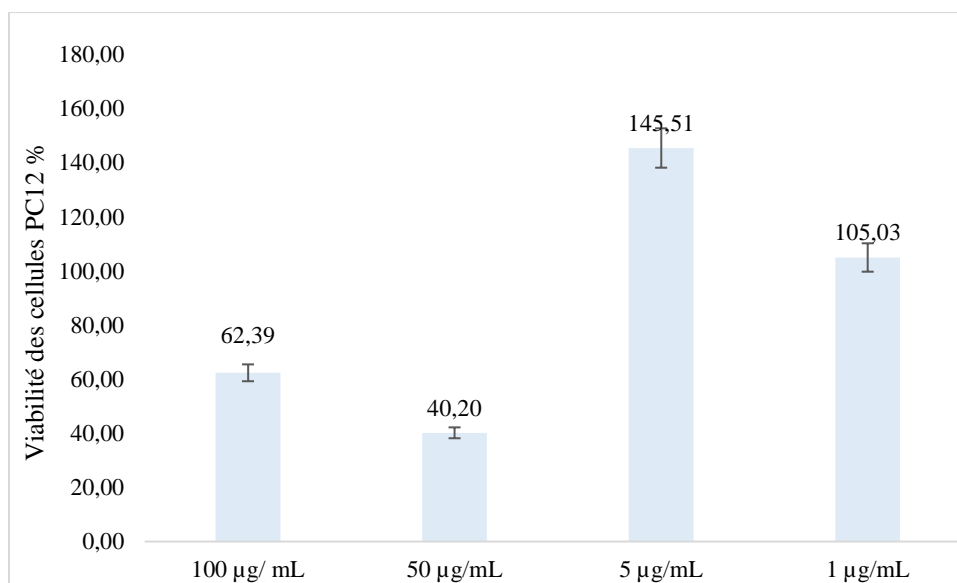


Figure 99: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B

### Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits contre la neurotoxicité induite par AB

Le peptide AB a une concentration de 5 µM provoque 55 % de mort cellulaire, c'est-à-dire 45 % des cellules restent viables.

Un extrait est considéré comme neuroprotecteur si en présence du peptide AB, plus de 45 % de viabilité est observée.

### 3.7 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1

Pour une concentration de 1 µg/mL, les extraits ZA, BI, SI exercent une très faible neuroprotection (Figure 100). Les pourcentages de viabilité en présence du peptide AB à 5 µM et des extraits à 1 µg/mL sont de 51; 50; 51 et 41 % pour ZA-P1, BI-P1, SI-P1 et KAI-P1 respectivement.

En présence du peptide AB et des extraits à 50 µg/mL, une neuroprotection et une stimulation de la prolifération ont été observées pour certains extraits. En effet, les pourcentages de viabilité sont de 123,37 ; 108,82; 113,96 et 77,72 pour ZA-P1, BI-P1, SI-P1 et KAI-P1 respectivement. À 5 µg/mL les extraits conservent toujours leur effet neuroprotecteur, avec une viabilité des cellules de 82,78 % ; 80,87 % ; 73,07 % et 51,4 %.



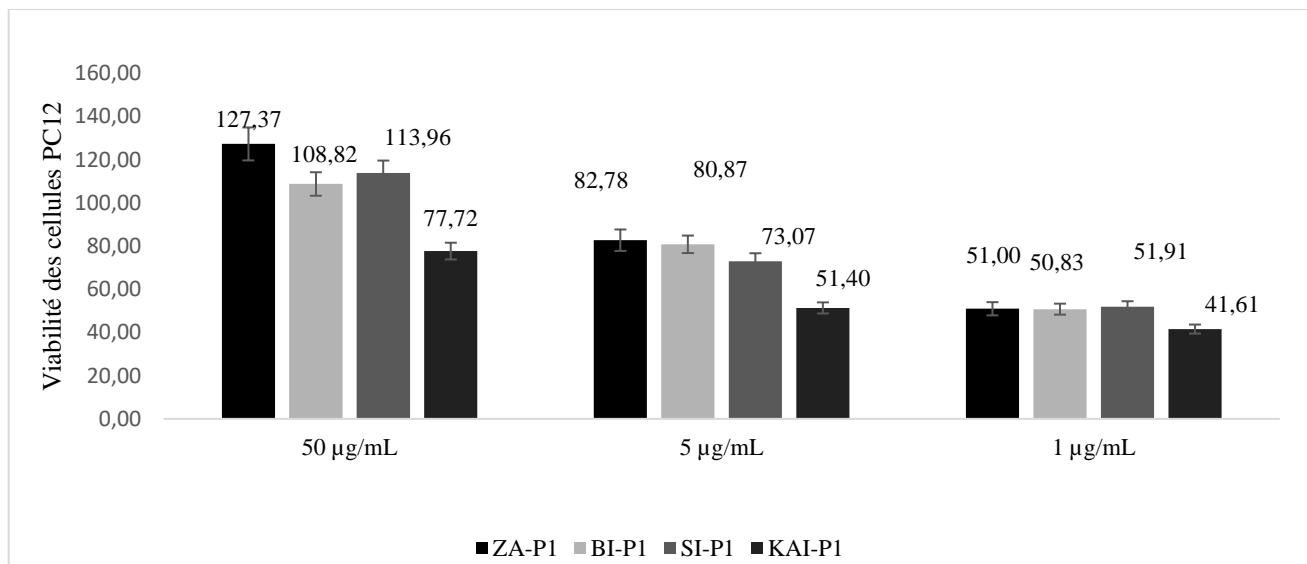


Figure 100: Histogramme représentatif des % de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B

### 3.8 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2

Les extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 n'ont aucun effet neuroprotecteur (Figure 101). On observe l'effet toxique du peptide AB en présence de l'extrait.

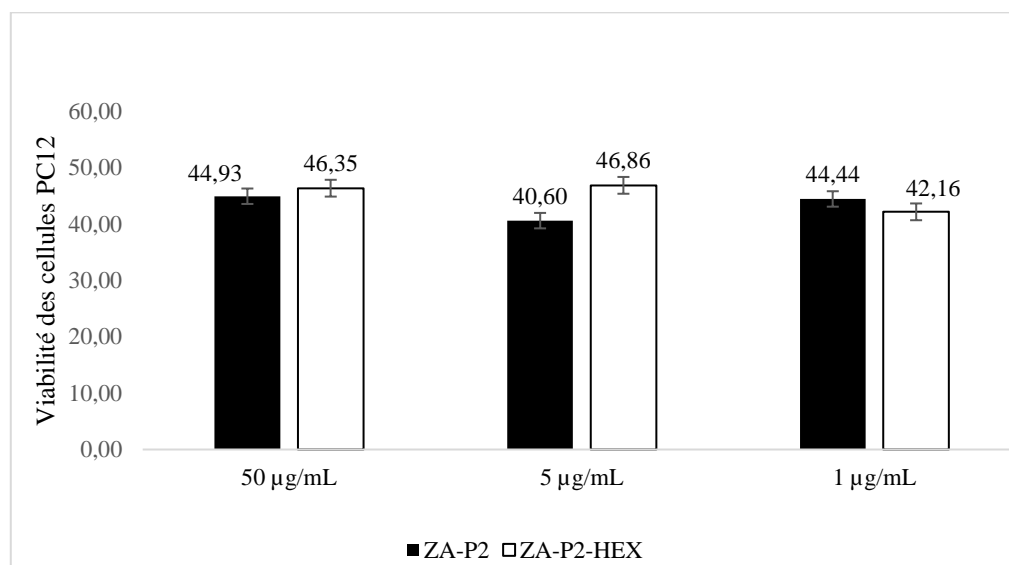


Figure 101: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 et du peptide AB 5 µM.

### 3.9 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P3

Tous les extraits obtenus par P3 sont neuroprotecteurs à 100 µg/mL (Figure 102). Les deux extraits KAI-P3 et SI-P3 sont stimulateurs de prolifération avec 172,30 % et 137,20 % successivement. En abaissant la concentration à 50 µg/mL, SI-P3 exerce la neuroprotection la plus importante avec 82,46 %, suivi de KAI-P3 avec 62,93 %. Pour ZA-P3 et KAI-P3 la neuroprotection est négligeable voire inexistante avec 35,37 et 53,83 successivement. À 5 µg/mL, seul l'extrait SI-P3 a montré un effet neuroprotecteur significatif avec 71,84 %. À 1 µg/mL, aucune neuroprotection par les extraits n'est observée.

Les deux extraits SI-P3 et BI-P3 étaient neurotoxiques à 50 µg/mL mais en présence du peptide AB, ces deux fractions deviennent neuroprotectrices, ce qui laisse supposer qu'il y a une interaction entre les molécules présentes dans ces fractions et l'AB peptide. Cette interaction est apparemment capable de neutraliser l'effet toxique provoqué par l'AB.

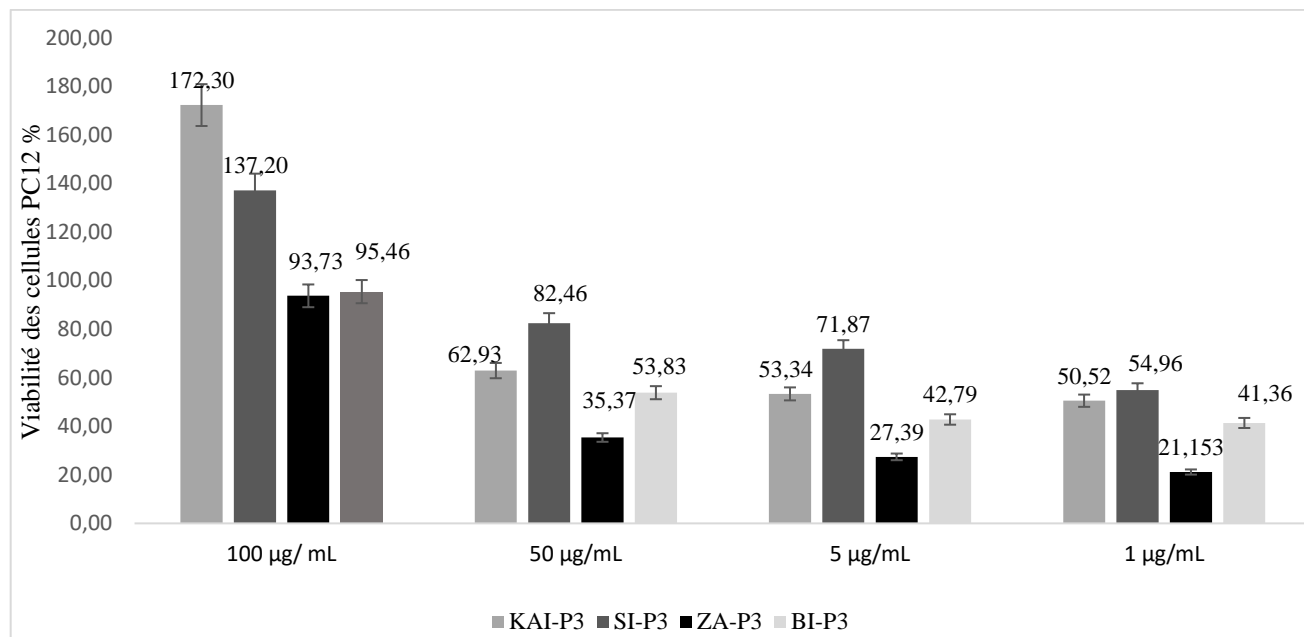


Figure 102: Histogramme représentatif des % de viabilité de PC12 en présence des extraits P3 et du peptide AB (5 µM)

### 3.10 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P4

En présence du peptide AB, la fraction ZA-P4/AE et l'extrait BI-P4 présentent les meilleurs pourcentages de viabilité des cellules PC12 à 50 µg/mL avec 60,32 % et 72,93 % respectivement. Pour le reste des fractions, la neuroprotection est négligeable. En abaissant la concentration à 5 µg/mL, l'extrait de BI-P4 conserve son effet neuroprotecteur avec 60,51 %.

SI-P4, KAI-P4, ZA-P4/HEX, ZA-P4/CHLOR, ont également montré une neuroprotection avec 53,39 % ; 54,49 % ; 58,10 % et 55,83 % respectivement (Figure 103).

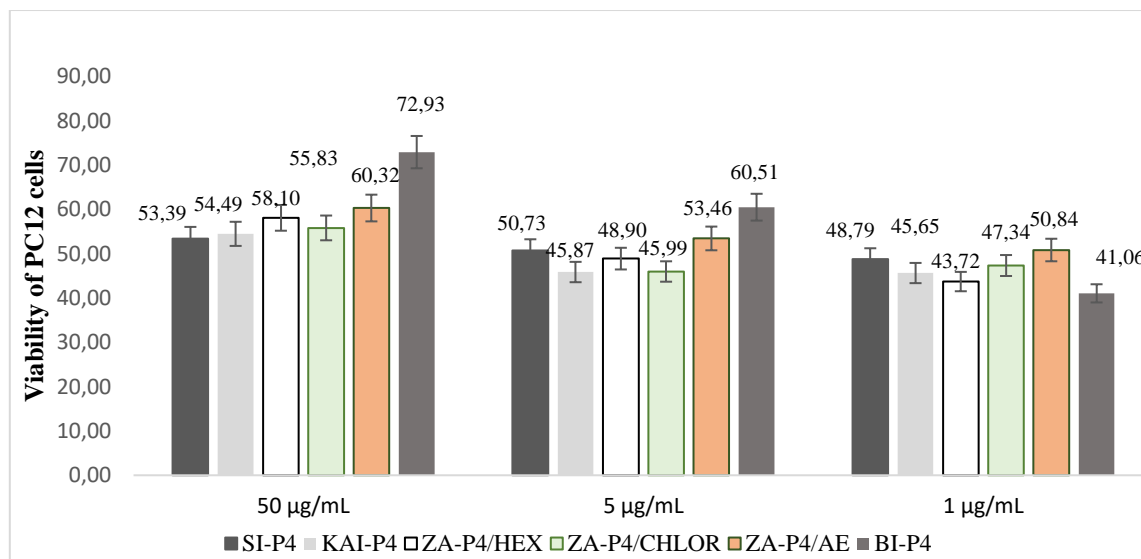


Figure 103: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits issus du protocole d'extraction P4 et du peptide AB (5 µM)

### 3.11 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction M1

À 50 µg/mL les extraits ZA-M1, SI-M1 et BI-M1 ont un effet neuroprotecteur avec 80,85%, 85,38% et 77,34% de viabilité respectivement qui diminue avec la concentration décroissante (Figure 104). L'extrait de KAI-M1 présente un effet neuroprotecteur avec 69,61 % de viabilité à une concentration de 5 µg/mL et cet effet diminue à 55,97 % de viabilité à 1 µg/mL.

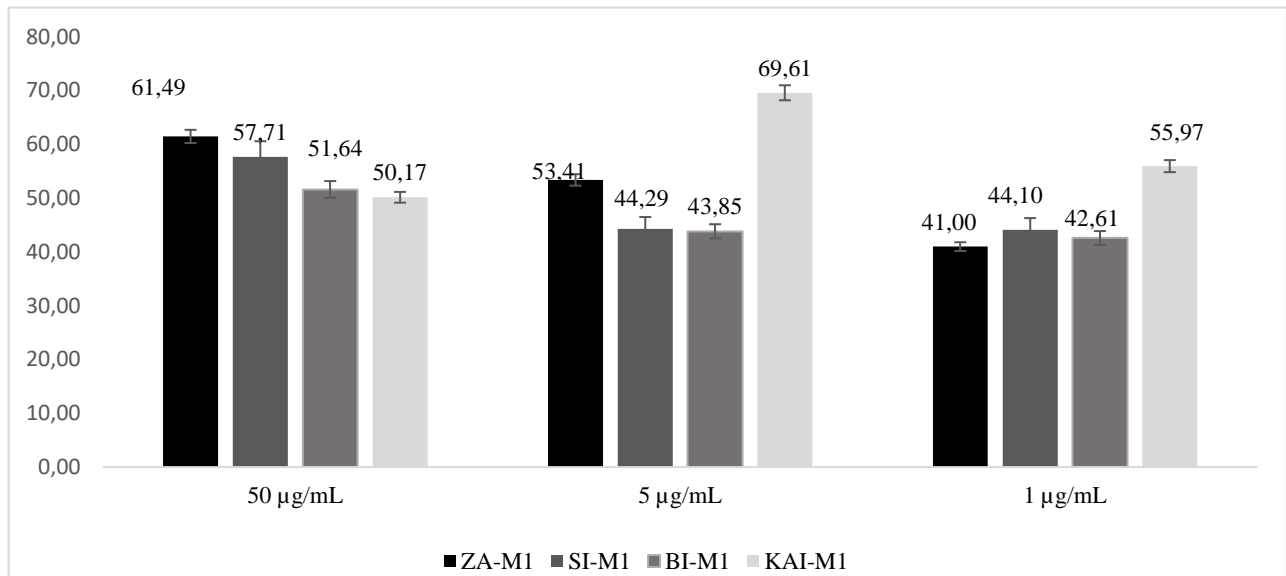


Figure 104: Histogramme représentatif des % de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus avec le protocole d'extraction M1 et du peptide AB (5 µM)

### 3.12 Évaluation de l'effet neuroprotecteur de l'aglycone Soyasapogénol B

Les résultats de l'analyse ont montré que le soyasapogénol B n'a un effet neuroprotecteur qu'à une concentration de 100 µg/mL en présence du peptide AB (Figure 105). À cette concentration cet aglycone était cytotoxique sur les cellules PC12 en absence du peptide AB. Il y aurait alors une réaction entre le soyasapogénol B et le peptide AB. En présence, l'un neutralise l'effet de l'autre et ces molécules perdent mutuellement leur toxicité sur les cellules PC12. Ceci peut être une voie de thérapie des maladies neurodégénératives dont la cause principale est la toxicité causée par le peptide AB.

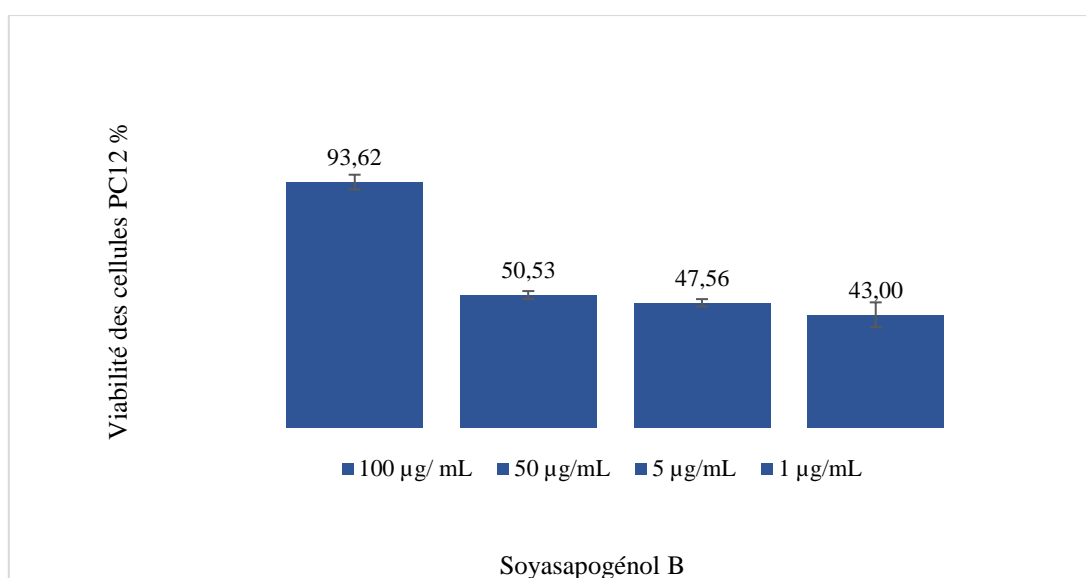


Figure 105: Histogramme représentatif des % de viabilité de PC12 en présence du Soyasapogénol B et du peptide AB (5 µM).

#### 4 Évaluation de l'effet cytotoxique sur la lignée CACO-2

Il convient de noter qu'au cours de la période (2010-2021), jusqu'à 360 saponines triterpéniques testées pour l'activité cytotoxique ont révélé des effets cytotoxiques aussi puissants : **IC 50 < 10 µM**. Le graphique ci-dessous (Figure 106) montre le nombre de ces composés hautement actifs étudiés par an et le nombre de rapports publiés qui paraissent chaque année. Comme on peut le constater, la communauté scientifique s'intéresse de façon soutenue aux recherches portant sur l'activité cytotoxique des saponines triterpéniques.

Dans des conditions in vitro, de nombreuses saponines ont démontré des effets antimutagènes, anti cancérigènes et anti métastatiques contre plusieurs lignées cellulaires.

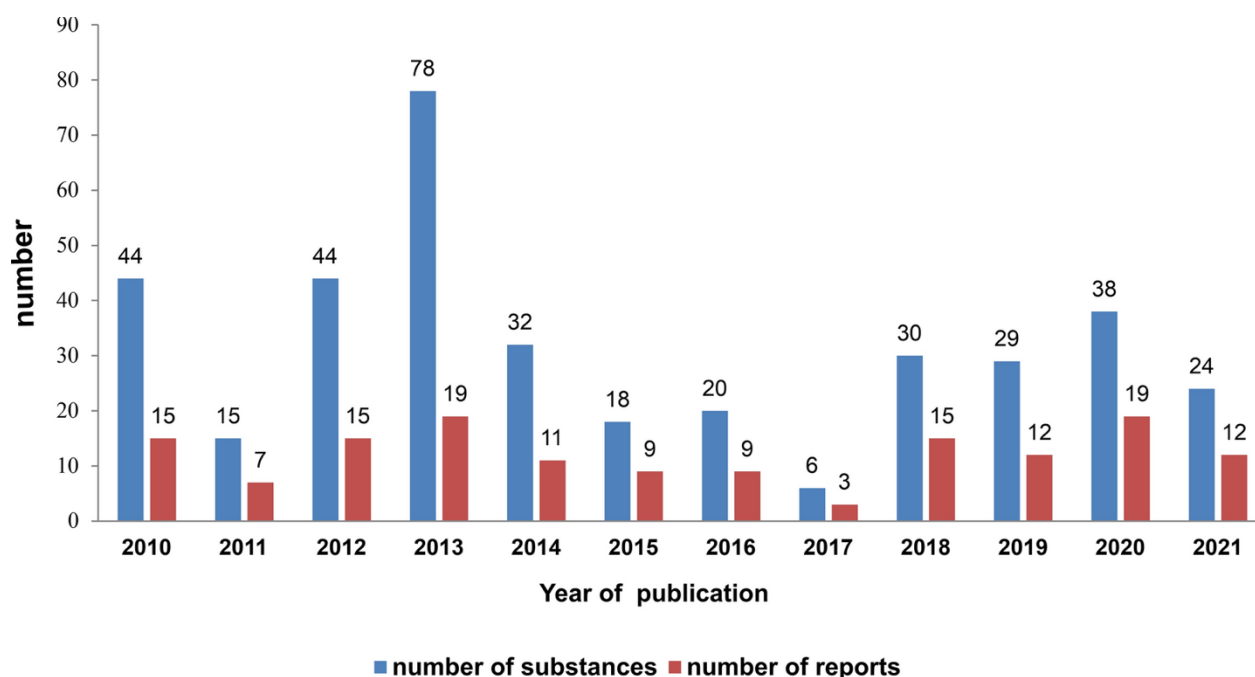


Figure 106: Le nombre de saponines tritérpéniques testées en tant qu'agents cytotoxiques et le nombre de rapports publiés dans la période couverte 2009/2021[309].

Concernant le cancer colorectal, il est l'un des types de cancer les plus répandus dans le monde. Les options de traitement pour le carcinome colorectal consistent généralement en une intervention chirurgicale, une radiothérapie et une chimiothérapie. La résistance aux médicaments des agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement actuel du cancer a entraîné la découverte de nouvelles molécules médicamenteuses provenant de certaines espèces végétales et aquatiques dans les approches thérapeutiques [307].

Les soyasaponines semblent passer le système digestif sans être digérées dans l'intestin grêle, puis sont partiellement métabolisées en sapogénols par les glycosidases bactériennes du côlon. Le mélange de saponines et de sapogénols qui en résulte est vraisemblablement bio disponible pour l'épithélium colique, ce qui suggère que les soyasaponines pourraient potentiellement moduler la carcinogenèse du côlon [130]. A. Ellington et al ont prouvé qu'un mélange des soyasaponines B supprime la prolifération dose-dépendante des cellule HT-15 et provoque la macro autophagie induite à 100 µg/mL après 24 h. Ils ont mis en évidence qu'en présence de ce mélange, les cellules se bloquent dans la phases S du cycle cellulaire [130].

Y. J. Oh et M. K. Sung ont mis en évidence qu'un mélange de soyasaponin B a permis la suppression de l'activité PKC et l'induction de la différenciation des cellules HT-29 du cancer coloréctal [131] . Dans d'autre travaux, le soyasapogénol B montre une suppression dose-dépendante de la lignée HT-29 de 6 à 50 µg/mL après 72 h. Les soyasaponines I et III ont été testées aussi mais la soyasaponine I n'était pas active sur la lignée HT-29 et la saponine III supprimait la croissance à 50 µg/mL après 72 h. Probablement, la suppression de la croissance cellulaire de la lignée HT-29 est intensifiée avec l'augmentation de la lipophilie des molécules (Sapogénol B > Saponine III > Saponine I) [133]. L'inhibition des cellules Caco-2 a été étudiée dans deux travaux, Hu et al ont montré que le soyasapogénol B a significativement réduit la viabilité cellulaire à 230 et 1375 µg/mL après 4 h [135] et MaCdonald et al ont montré que le soyasapogénol B a considérablement réduit la croissance cellulaire à 25, 50 et 100 µg/mL [136].

Toutes ces données nous ont encouragé pour évaluer la cytotoxicité de nos extraits contre la lignée Caco-2.

#### 4.1 La lignée CACO-2

La lignée cellulaire Caco-2, initialement isolée d'un adénocarcinome humain, a la particularité, une fois à confluence, de se différencier spontanément en une monocouche d'entérocytes polarisés comprenant des microvillosités, des transporteurs membranaires ainsi que les enzymes de la bordure en brosse [309]. En raison des mêmes activités biologiques et de la structure des microvillosités simulant l'intestin humain, le modèle cellulaire Caco-2 a été utilisé pour examiner le mécanisme de transport et d'absorption des médicaments dans une plaque transwell spéciale [310]. Les cellules Caco-2 subissent des processus de confluence, de prolifération et de différenciation au cours de leur croissance. Il a été prouvé qu'en conditions de culture, les cellules Caco-2 passent par une différenciation spontanée et présentent les caractéristiques des entérocytes matures. La bordure en brosse a été formée par la surface cellulaire qui fait face au milieu supérieur et cette bordure ressemble à la membrane luminale de l'épithélium intestinal humain. La membrane basolatérale est constituée par la surface cellulaire qui fait face au milieu inférieur et est attachée à la membrane perméable. Malgré leur origine colique, les cellules Caco-2 complètes polarisées ressemblent à des cellules de la muqueuse intestinale humaine présentant des jonctions serrées, des bordures en brosse, des transporteurs d'efflux et d'absorption au niveau des compartiments basolatéral et apical [311].

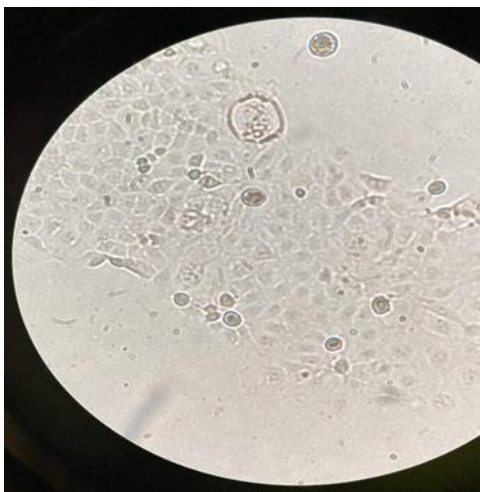


Figure 107: Début de confluence des cellules Caco-2 après 15 jours de culture

#### 4.2 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur Caco-2

Considérant que le critère d'activité de cytotoxicité pour les extraits bruts, tel qu'établi par l'American National Cancer Institute (NCI), est une concentration d'inhibition  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ , nous concluons que toutes les fractions analysées d'*Astragalus hamosus L.* sont « super actives » sur la lignée Caco-2.

Les  $CI_{50}$  ne sont pas inclus car les pourcentages d'inhibition sont très significatifs, dépassant 50 %, même pour les concentrations testées les plus faibles (5 et 1  $\mu\text{g/mL}$ ).

Pour ZA, BI, SI et KAI, les pourcentages d'inhibition ont été de 91 %, 88 %, 94 % et 87 % respectivement à une concentration de 5  $\mu\text{g/mL}$  lors de l'utilisation de P1. Même à une

concentration de 1 µg/mL, les taux d'inhibition demeurent significatifs, avec des valeurs de 73 %, 70 %, 67 % et 72 % pour les mêmes populations respectivement.

Ces résultats mettent en évidence l'efficacité des composés testés dans l'inhibition de la viabilité de la lignée Caco-2, même à des concentrations faibles de 1 µg/mL.

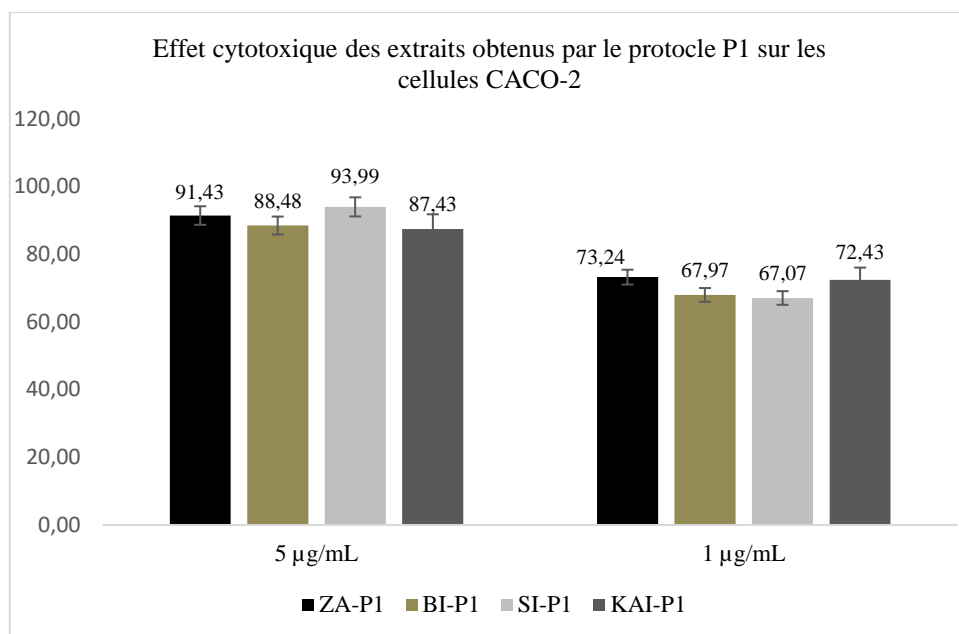


Figure 108: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P1

#### 4.3 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur Caco-2

Les extraits obtenus en utilisant le protocole 2 ont démontré une activité très élevée contre les cellules Caco-2. La fraction butanol a inhibé 86 % des cellules Caco-2, tandis que la fraction hexane a montré une inhibition de 93 % à une concentration de 5 µg/mL d'extrait (Figure 109).

Il est important de noter que l'inhibition est proportionnelle à la concentration. En réduisant la concentration à 1 µg/mL, l'inhibition reste significative mais diminue. La fraction hexane a inhibé 64 % des cellules Caco-2, tandis que la fraction butanol a montré une inhibition de 76 %.

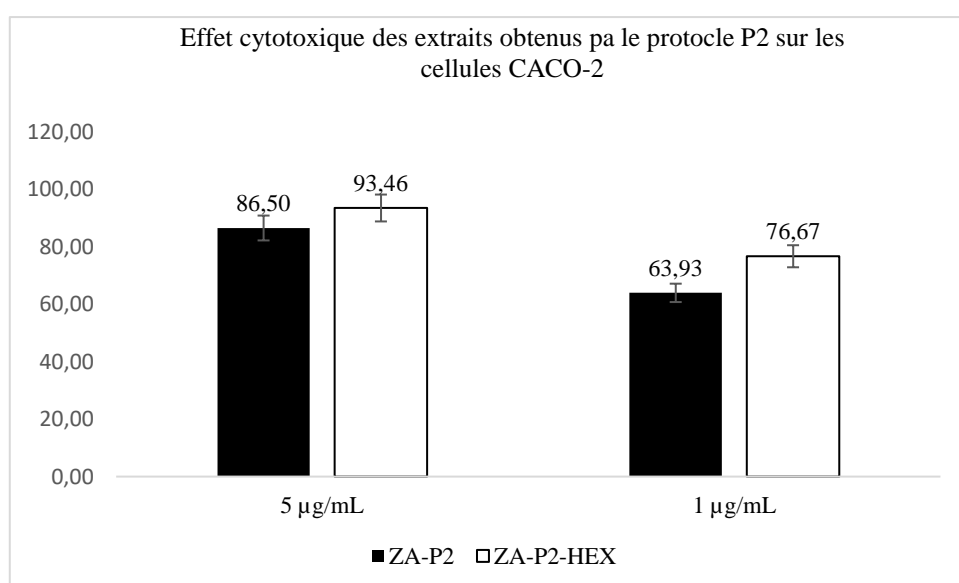


Figure 109: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P1

#### 4.4 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur Caco-2

À une concentration de 5 µg/mL, les extraits SI-P3, KAI-P3 et ZA-P3 ont démontré une capacité inhibitrice considérable contre la lignée Caco-2, avec des valeurs de 98 %, 98 % et 95 % respectivement. Quant à l'extrait BI-P3, il a présenté une inhibition de 74 % à cette concentration. En réduisant la concentration à 1 µg/mL, l'inhibition reste significative mais diminue, avec des valeurs de 66 %, 66 %, 59 % et 61 % respectivement pour les mêmes fractions (Figure 110). Ces résultats mettent en évidence la forte activité inhibitrice des extraits SI-P3, KAI-P3 et ZA-P3 à une concentration de 5 µg/mL, tandis que l'extrait BI-P3 présente une inhibition légèrement inférieure mais toujours significative. À une concentration plus faible de 1 µg/mL, l'inhibition se maintient, bien que réduite, pour toutes les fractions testées.

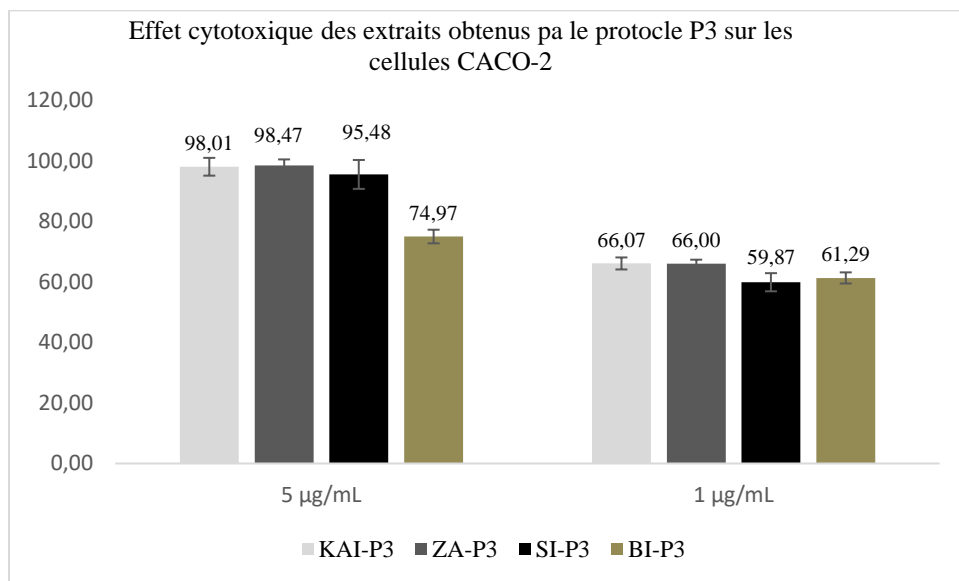


Figure 110: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P3

#### 4.5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur Caco-2

Les extraits obtenus en utilisant le protocole P4 ont révélé une cytotoxicité extrême contre les cellules cancéreuses Caco-2. Les extraits SI-P4 et KAI-P4 ont montré une inhibition de 100 % à une concentration de 5 µg/mL. Cependant, en réduisant la concentration des extraits à 1 µg/mL, l'inhibition reste significative mais diminue à 78 % et 74 % respectivement.

Ces résultats mettent en évidence l'activité exceptionnelle de ces extraits obtenus par le protocole P4 contre les cellules cancéreuses Caco-2. De même, les autres fractions ont présenté des pourcentages d'inhibition élevés : 98 %, 93 %, 92 % et 89 % respectivement pour ZA-P4/HEX, ZA-P4/CHLOR, ZA-P4/AE et BI-P4.

Ces résultats confirment la remarquable efficacité des extraits obtenus par le protocole P4 dans l'inhibition des cellules cancéreuses Caco-2. Lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL, les pourcentages d'inhibition demeurent significatifs, comme illustré dans la Figure 111.



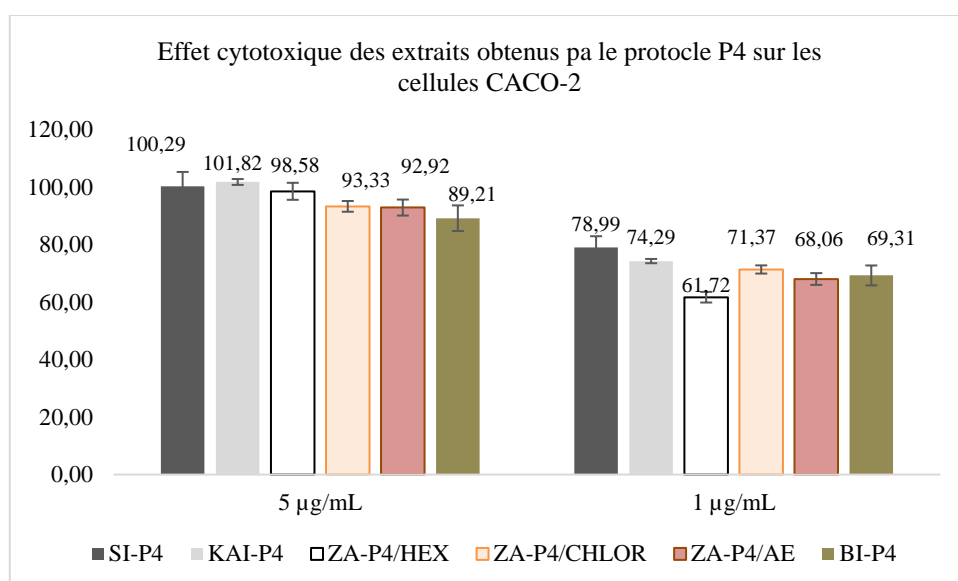


Figure 111: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules CACO-2 par les extraits P4

#### 4.6 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur Caco-2

Les valeurs de CI50 obtenues pour toutes les populations M1 sont extrêmement significatives, se situant respectivement à 1,45 µg/mL pour ZA, 1,29 µg/mL pour SI, 1,22 µg/mL pour BI et également 1,22 µg/mL pour KAI.

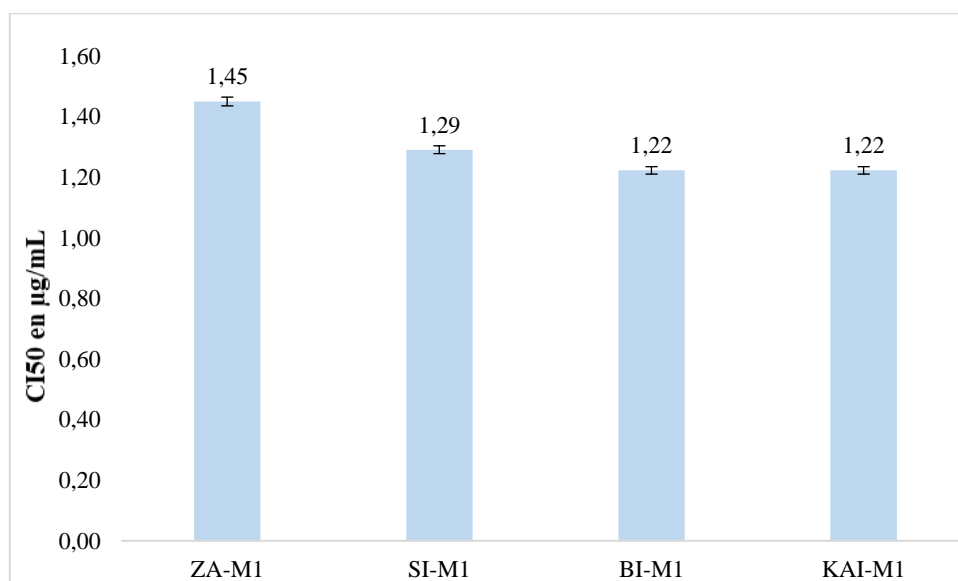


Figure 112: Histogramme de représentation des CI50 des cellules CACO-2 par les extraits M1

#### 4.7 Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B

L'aglycone Soyasapogénol B présente une CI50=1,25 (Figure 113). Cette molécule pure inhibe significativement la lignée Caco-2. Les résultats présentés précédemment montrent qu'il existe des extraits d'*Astragalus hamosus L.* plus actifs que cette molécule pure connue pour ses activités cytotoxiques multiples (voir 4.1.2.1.1 dans chapitre 1), tels que KAI-P1, ZA-P2-HEX, BI-P3 et SI-P4. Ceci peut être expliqué en partie par l'effet synergique des saponines.

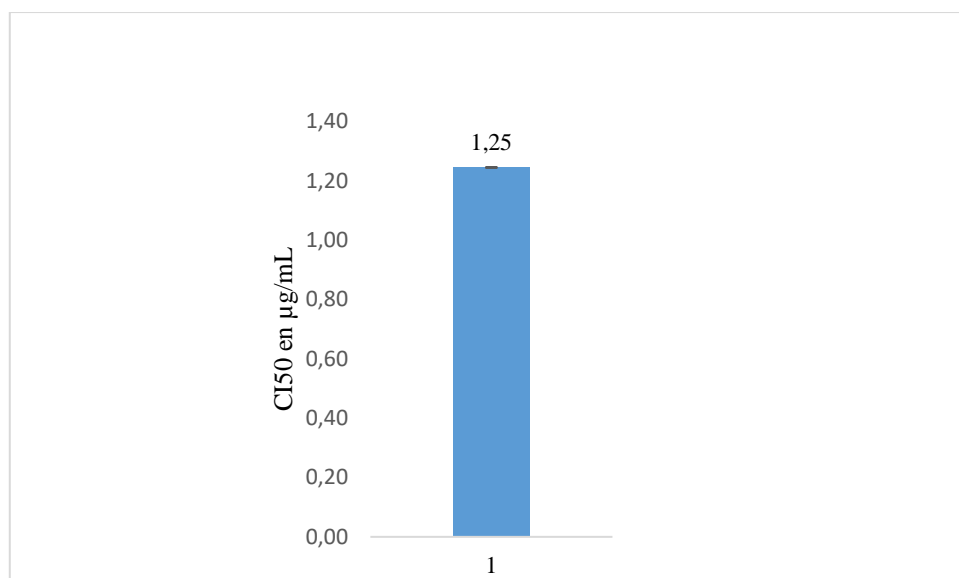


Figure 113: Histogramme représentant les CI50 des cellules CACO-2 par l'aglycone Soyasapogénol B

## 5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits sur la lignée HEK293

### 5.1 La lignée HEK293

La lignée cellulaire 293 a été dérivée par transformation de cultures primaires de cellules de rein embryonnaire humain (HEK) avec de l'ADN d'adénovirus cisailé (Ad)5. Une combinaison d'immunostaining, d'immunoblot et d'analyse de microréseau a montré que 293 cellules expriment les sous-unités de neurofilament (NF) NF-L, NF-M, NF-H et  $\alpha$ -internexine ainsi que de nombreuses autres protéines généralement présentes dans les neurones [312].

La lignée cellulaire HEK293 est d'origine épithéliale et de nature adhérente. Il a été adaptée pour se développer en culture en suspension dans des milieux sans sérum ou chimiquement définis et est actuellement utilisé pour l'expression de protéines recombinantes dans des plateformes adhérentes et en suspension [313].

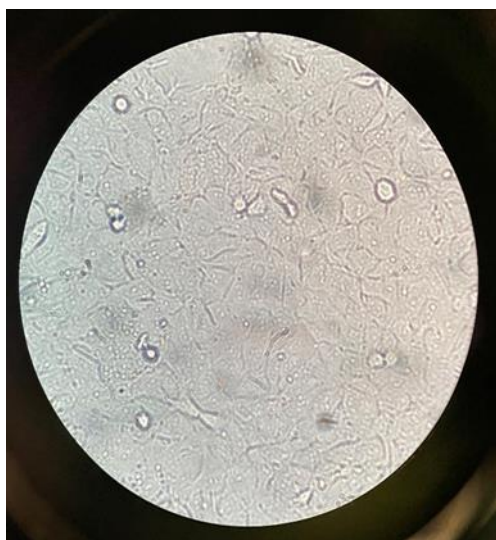


Figure 114: Confluence des cellules HEK293 après une semaine de culture

### 5.2 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur HEK293

Les extraits obtenus en utilisant le protocole d'extraction P1 se sont révélés être hautement cytotoxiques pour les cellules HEK293. Les pourcentages d'inhibition à une concentration de 5

$\mu\text{g/mL}$  sont de 90 %, 101 %, 97,7 % et 93 % respectivement pour ZA, BI, SI et KAI, en suivant le protocole P1. À une concentration de  $1 \mu\text{g/mL}$ , les pourcentages d'inhibition restent significatifs et dépassent les 50 % pour tous les extraits obtenus par le protocole P1.

Ces résultats mettent en évidence la forte cytotoxicité de tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sur les cellules HEK293. À la fois à une concentration de  $5 \mu\text{g/mL}$  et à une concentration plus basse de  $1 \mu\text{g/mL}$ , les extraits ont montré des pourcentages d'inhibition importants, témoignant de leur potentiel cytotoxique (Figure 115).

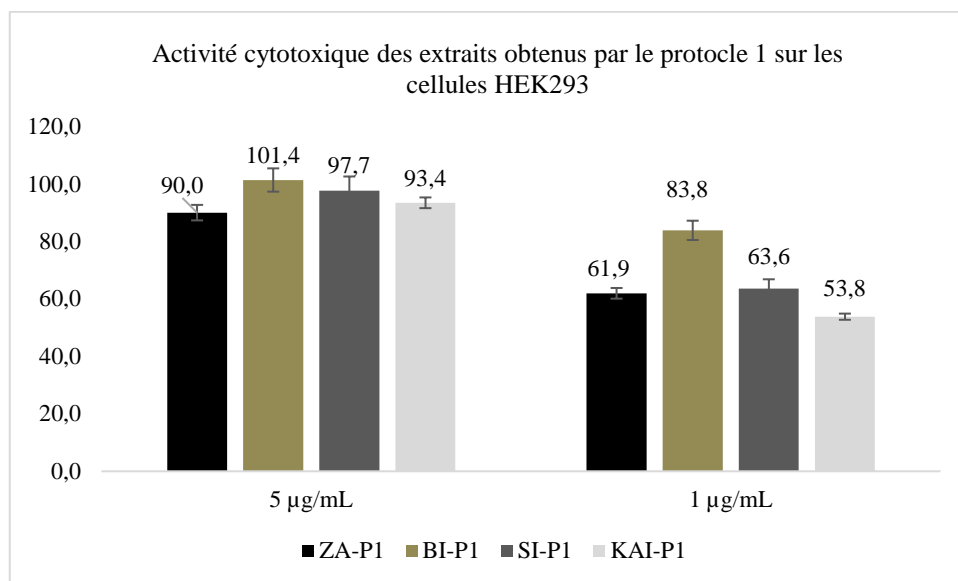


Figure 115: Histogramme de représentation des % d'inhibition des cellules HEK293 par les extraits P1

### 5.3 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur HEK293

La fraction butanol ZA-P2 démontre une  $CI_{50}$  très basse, ce qui est extrêmement significatif, équivalant à  $1 \mu\text{g/mL}$ . En ce qui concerne la fraction hexane, les pourcentages d'inhibition dépassent les 50 % même à une concentration de  $1 \mu\text{g/mL}$ , la  $CI_{50}$  n'a donc pas été mentionnée ici (Figure 116).

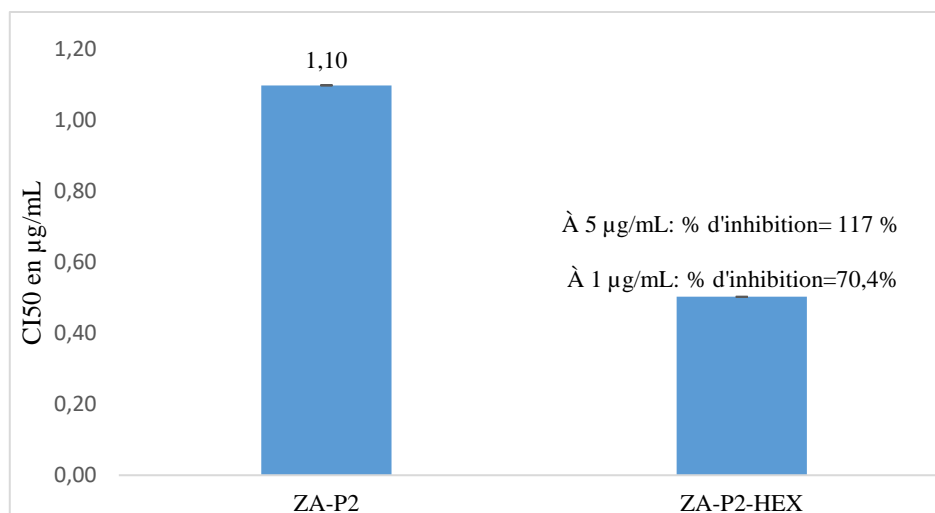


Figure 116: Histogramme représentant la  $CI_{50}$  des cellules HEK293 par la fraction ZA-P2 et les % d'inhibition de la fraction ZA-P2/HEX

### 5.4 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur HEK293

Les extraits KAI, ZA et SI obtenus en utilisant le protocole P3, à une concentration de 5 µg/mL, ont montré des résultats exceptionnellement significatifs en termes de capacité d'inhibition de la lignée HEK293, avec des pourcentages d'inhibition de 102 %, 120 % et 107 % respectivement. Pour ce qui est de BI-P3, le pourcentage d'inhibition est de 84 % à cette même concentration. De plus, les pourcentages d'inhibition restent significatifs même lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL (Figure 117).

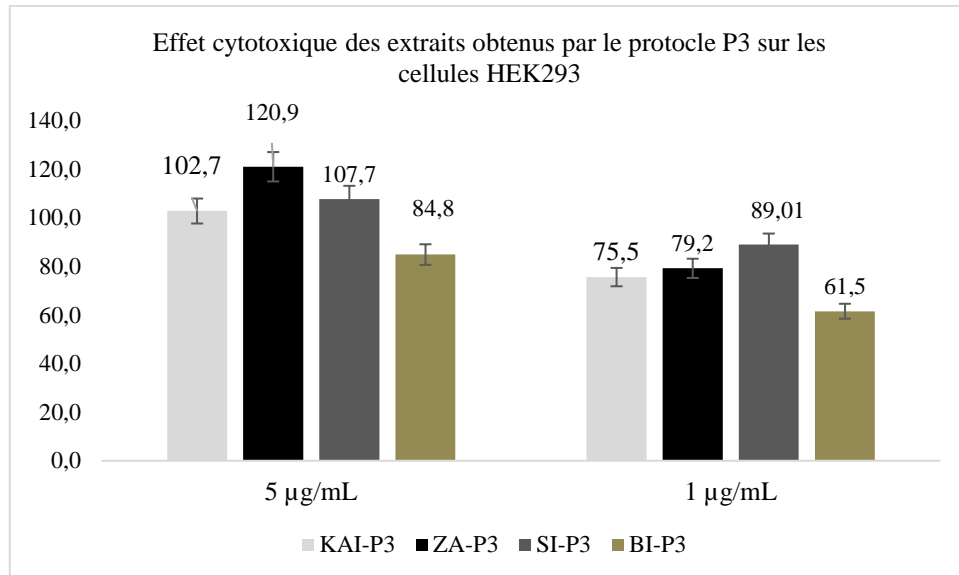


Figure 117: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P3

### 5.5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur HEK293

Les résultats obtenus sont particulièrement remarquables, car les pourcentages d'inhibition de la lignée HEK293 dépassent les 100 % pour toutes les fractions obtenues grâce au protocole P4 (Figure 118). Un tel taux d'inhibition indique un fort potentiel anticancéreux de ces extraits. En outre, l'extrait ZA-P4 CHLOR a démontré une CI50 exceptionnellement basse, évaluée à seulement 1,07 µg/mL. Dans le cas de cet extrait, une telle efficacité à une concentration aussi faible et particulièrement remarquable.

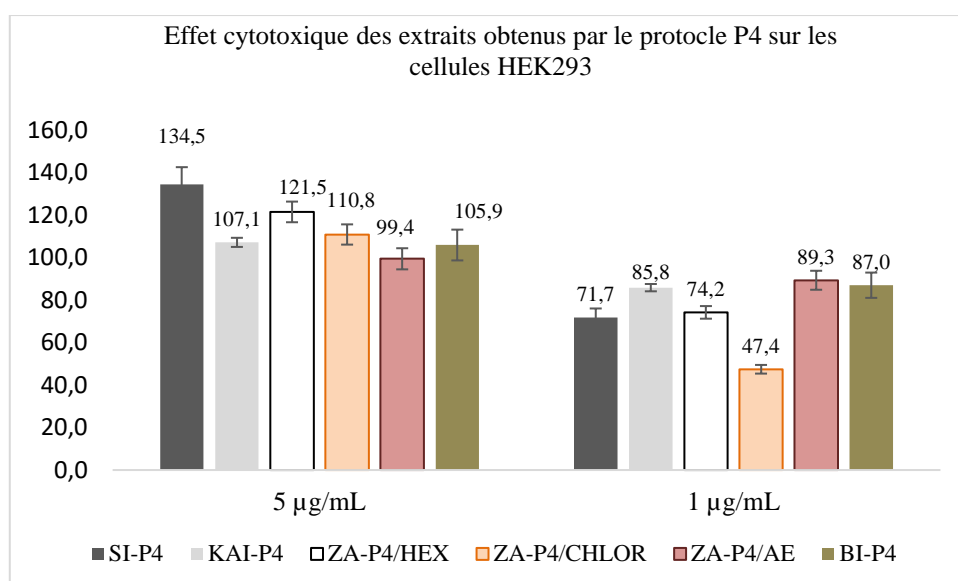


Figure 118: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P4

### 5.6 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur HEK293

Comme anticipé, les extraits obtenus par M1 ont démontré des pourcentages d'inhibition significatifs à la fois à une concentration de 5 µg/mL et à 1 µg/mL. Ces résultats indiquent que l'activité inhibitrice est proportionnelle à la concentration des extraits testés (Figure 119).

La CI50 pour l'extrait BI-M1 est de 1,01 µg/mL.

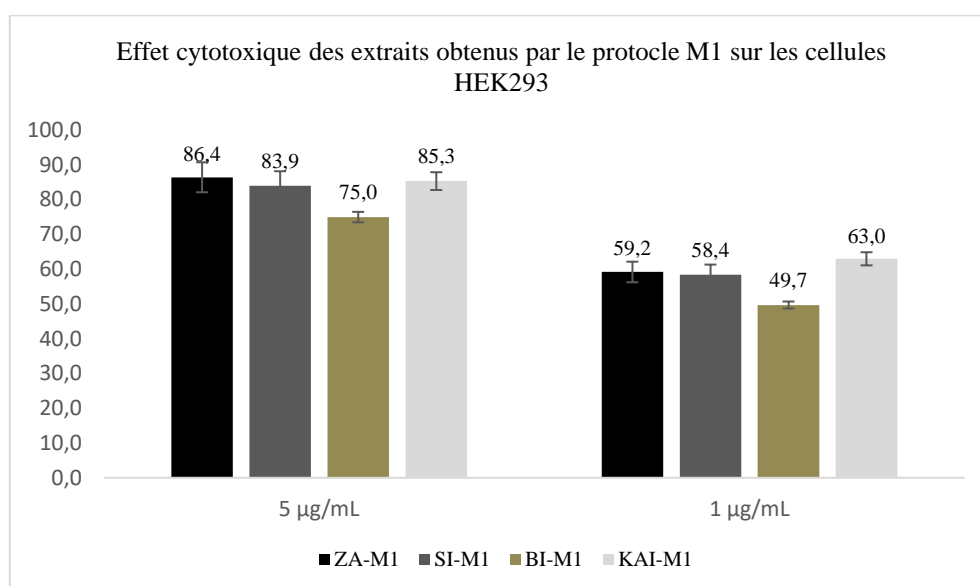


Figure 119: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions M1

### 5.7 Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B sur HEK293

Les résultats de l'analyse du standard soyasapogénol mettent en évidence son effet cytotoxique sur les cellules HEK293 (Figure 120). Les pourcentages d'inhibition observés sont de 100 % à une concentration de 5 µg/mL et de 61,6 % à une concentration de 1 µg/mL, respectivement. Ces résultats confirment l'activité cytotoxique du standard soyasapogénol sur les cellules HEK293.

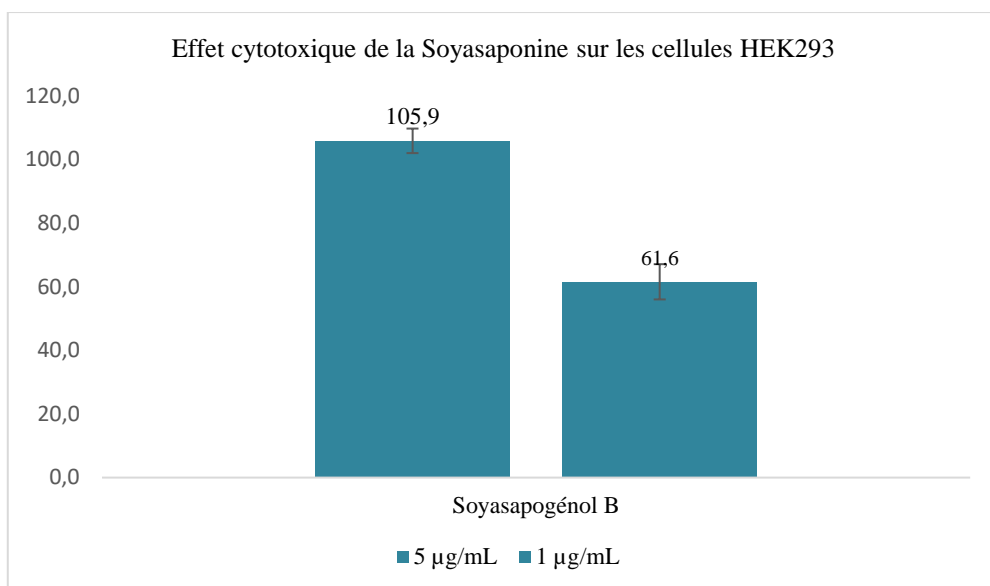


Figure 120: Histogramme représentant les % d'inhibition des cellules HEK293 par le Soyasapogénol B

## 6 Discussion :

### 6.1 Évaluation de la neuroprotection

Plusieurs études ont été réalisées pour mettre en valeur les rôles des saponines dans la neuroprotection des maladies neurodégénératives. Muhammad Imran Khan et al (2022) ont révélé que l'asaponine E1 pourrait être un produit naturel thérapeutique pour le traitement et la prévention de la MA. Il a été constaté que la théasaponine E1 réduisait le NFT en diminuant les niveaux de protéine tau et la formation de A $\beta$  via la suppression de l'expression et de l'activité de la protéine kinase, ainsi que des gènes et des cytokines favorisant la pathologie AD [314]. Yong Qiang Zhou et al (2009) ont prouvé que les extraits aqueux de DAW, la fraction de saponines et la saponine D d'akebia avaient la capacité neuroprotectrice d'antagoniser la cytotoxicité induite par A beta (25-35) dans les cellules PC 12 [315]. Dans une autre étude de Kewen Ding et al (2019), une nouvelle saponine tritérpénique a présenté une excellente neuroprotection sur les lésions des cellules PC12 induites par A $\beta$ 25-35 aux doses de 150  $\mu$ mol/L et 200  $\mu$ mol/L. Les viabilités cellulaires étaient  $(76,18 \pm 2,09)$  % et  $(76,02 \pm 3,20)$  %, respectivement. Yue et al (2015) ont montré que L'astragaloside IV atténue la neurotoxicité induite par le glutamate dans les cellules PC12 d'une manière dose dépendante [316]. Nos extraits *Astragalus hamosus L.* ont présentés des % de viabilité intéressant en présence du peptide AB sauf pour les extraits P2, ceci peut être dû à des alcaloïdes potentiellement présents dans ces extraits. On note aussi que certains extraits toxiques sur les cellules PC12 en absence du peptide AB, deviennent neuroprotecteurs en présence du peptide. On a supposé que ces extraits sont riches en molécules qui interagissent avec le peptide AB bloquant ainsi sa neurotoxicité.

### 6.2 Évaluation de la cytotoxicité

Toutes les CI50 exhibées sont très significatives et ces résultats sont promoteurs pour évaluer cet effet anti cancer sur un modèle murin. *Astragalus hamosus L.* a été récolté en Tunisie, aussi dans

ce paragraphe, nos résultats seront comparés avec des études de cytotoxicité conduites sur d'autres plantes d'Afrique.

L'extrait brut de *C. orbiculata* a diminué la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante des lignées cellulaires HCT116 et KYSE70 avec des valeurs de CI50 de 64,9 et 36,9 µg/mL, respectivement [317]. De plus, Mfengwana et al. (2019) ont montré que l'extrait méthanol d'*A. laricinus* (CI50 = 97,6 µg/mL) et l'extrait dichlorométhane de *S. asperulus* (CI50 = 69,15 µg/mL) sont cytotoxiques sur les cellules cancéreuses MCF-7 [318]. Enfin, l'extrait acétone de *C. dentata* a révélé une cytotoxicité de manière significative avec des CI50 de 41,55, 45,13, 57,35 et 43,24 µg/mL contre les lignées cellulaires A549, HeLa, Caco-2 et MCF-7, respectivement [319]. Les extraits à l'acétone de *W. salutaris* ont montré une valeur de CI50 de 34,15 µg/mL contre la lignée cellulaire MCF-7 [319]. D'autres études ont révélé des valeurs de CI50 supérieures à 100 µg/mL. Par exemple, dans l'étude de Zoyane et al. (2020) des extraits de *S. frutescens* produits à partir de plantes poussant dans différentes localités géographiques d'Afrique du Sud, les valeurs de CI50 ont confirmé la puissance relativement plus élevée des plantes de Colesburg, Zastron et Gansbaai 1 (158,7, 172,7 et 176,7 µg/mL, respectivement) [320]. De plus, dans l'étude d'Izuegbuna et al. (2019) [17], l'extrait séché à l'acétone d'*O. stricta* a montré une légère cytotoxicité (CI50 = 110,1 µg/mL), et Unuofin et al. (2018) ont montré des valeurs de CI50 pour des extraits aqueux et éthanoliques de *K. africana* > 200 µg/mL [321].

Pour les plantes récoltées au Cameroun, des valeurs de CI50 inférieures ou voisines de 30 µg/mL ont été mises en évidence dans la quasi-totalité des études analysées. L'extrait brut de fruit obtenu à partir de *T. tetraptera* a affiché des valeurs de CI50 inférieures à 20 µg/mL sur sept des neuf lignées cellulaires cancéreuses testées. Les valeurs de CI50 obtenues variaient de 10,27 µg/mL (dans les cellules leucémiques CCRF-CEM) à 23,61 µg/mL (contre les cellules cancéreuses du côlon HCT116 p53<sup>-/-</sup>) [330]. Mbaveng et al. (2019) ont également déterminé la cytotoxicité de des extraits méthanoliques d'écorce de *F. tessmannii*, dans sept lignées cellulaires cancéreuses. Après 72 h d'incubation, les CI50 de valeur inférieures à 20 µg/mL ont été enregistrées avec le même extrait brut dans trois lignées cellulaires cancéreuses (MDA-MB-231-pcDNA, CI 50 = 19,43 µg/mL ; MDA-MB-231-BCRP, CI 50 = 18,87 µg/mL ; U87MG.ΔEGFR, CI 50 = 17,34 µg/mL) [323]. Dans une étude précédente de Mbaveng et al. (2018), les rhizomes de *C. longa* et les feuilles de *L. esculentum* affichaient des valeurs de CI 50 inférieures à 20 µg/mL dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses évaluées [324]. De plus, Mbosso Teinkela et al. (2018) ont montré des valeurs de CI50 de 20 µg/mL pour l'extrait au méthanol de feuilles de *S. vogelii* et l'extrait au méthanol de bois de racines aériennes de *F. elastica* [325]. Mfotie Njoya et al. (2017) ont également trouvé des valeurs de CI 50 inférieures à 30 µg/mL sur des cellules MCF-7 et HeLa pour les extraits au méthanol de *S. pobeguini* des feuilles et de l'écorce [326]. Enfin, Potesta et al. (2019) ont étudié l'activité antiproliférative d'extraits aqueux bouillis et congelés de *M. oleifera*, une espèce bien connue utilisée à des fins médicinales et nutritionnelles [327].

Dans deux études réalisées avec des plantes du Maroc, un extrait au méthanol de *C. arvensis* (fleurs) était l'agent anticancéreux anti-myéloïde le plus significatif, montrant une valeur de CI50 de 31 µg/mL [328]. Des valeurs similaires de CI50 ont été montrées dans l'étude de Belayachi et al. (2017) pour PC-3 (19,31 µg/mL) et pour les cellules LN229 (41,67 µg/mL) après traitement avec l'extrait hexanique d'*O. eriolepis* [329].

Pour les plantes récoltées dans d'autres pays africains (par exemple, l'Éthiopie, l'Égypte, le Burkina Faso et le Kenya), des valeurs de CI 50 allant jusqu'à 30 µg/mL ont également été observées. Tesfaye et al. (2021) ont montré la puissante activité de deux plantes sur 22 collectées en Éthiopie contre les 10 lignées cellulaires évaluées, à savoir l'extrait d'*A. schimperi* (80 % de méthanol), avec des valeurs de CI50 de 1,87 à 10,31 µg /mL, et des extraits de *K. petitiana* qui avaient des valeurs de CI50 de 2,09 à 10,41 µg/mL[330]. De plus, l'extrait de *B. nigra*, collecté en Égypte et évalué dans l'étude d'Ahmed et al. (2020) [331], a montré des valeurs de CI50 de 32,02 et 25,38 µg/mL contre les lignées cellulaires A549 et H1299, respectivement. Sawadogo et al. (2020) [332] ont montré pour l' extrait brut de *L. ukambensis* (plante collectée au Burkina Faso) une valeur de CI 50 de 23,05 µg/mL dans la lignée cellulaire HCT-116. Enfin, dans l'étude d'Ochwang'I et al. (2018) réalisée avec 35 plantes médicinales du Kenya, la concentration la plus élevée testée (40 µg/mL) a montré une valeur de CI50 de 30 µg/mL [333].

Toutes ces études tendent à démontrer que les résultats des analyses de cytotoxicité réalisées sur les deux lignées de cellules Caco-2 et HEK293 avec les différentes fractions d'*Astragalus hamosus L.* sont très performants.

## 7 Conclusion:

Le résultat le plus remarquable dans ce chapitre 4 est la spécificité des extraits d'*Astragalus hamosus L.* vis-à-vis des cellules neurales PC12. La cytotoxicité des extraits a été testée sur CACO-2 qui est une lignée cancéreuse, sur les cellules HEK293 qui sont à l'origine saines mais qui suite à la transfection se comportent comme des cellules cancéreuses et sur les cellules PC12 de type neurales. Les travaux de ce chapitre ont pu montrer que les extraits d'*Astragalus hamosus L.* sont cytotoxiques sur la lignée Caco-2 et HEK293 mais sont cytoprotecteurs et stimulateurs de la prolifération des cellules PC12. Les extraits choisis sont probablement riches en molécules spécifiques à la protection des PC12 neurales.

Les extraits obtenus par P1 présentent les meilleurs résultats, en effet, tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sont stimulateurs de la prolifération des cellules PC12, neuroprotecteurs contre la toxicité induite par AB et cytotoxiques sur les lignées Caco-2 et HEK293. L'ensemble des résultats sur le pourcentage d'inhibition des extraits d'*Astragalus hamosus L.* sur les lignées Caco-2 et HEK293, ainsi que sur la viabilité et la neuroprotection des cellules PC12 en présence des extraits et AB 5 µM sont présentés ci-après sous forme de tableaux synthétiques



Tableau 18: Tableau récapitulatif des % d'inhibition des extraits d'*Astragalus hamosus* L. sur les lignées Caco-2 et HEK293

Lignée cellulaire	Caco-2		HEK293	
	% d'inhibition (5 µg/mL)	% d'inhibition (1 µg/m)	% d'inhibition (5 µg/mL)	% d'inhibition (1 µg/mL)
<b>ZA-P1</b>	91,43	73,24	90,00	61,93
<b>BI-P1</b>	88,48	67,97	101,36	83,84
<b>SI-P1</b>	93,99	67,07	97,68	63,62
<b>KAI-P1</b>	87,43	72,43	93,43	53,80
<b>ZA-P2</b>	86,50	63,93	121,91	45,44
<b>ZA-P2/HEX</b>	93,46	76,67	117,47	70,39
<b>KAI-P3</b>	98,01	66,07	102,73	75,55
<b>ZA-P3</b>	98,47	66,00	120,93	79,15
<b>SI-P3</b>	95,48	59,87	107,71	89,01
<b>BI-P3</b>	74,97	61,29	84,81	61,50
<b>SI-P4</b>	100,29	78,99	134,45	71,73
<b>KAI-P4</b>	101,82	74,29	107,13	85,82
<b>ZA-P4/HEX</b>	98,58	61,72	121,46	74,18
<b>ZA-P4/CHLOR</b>	93,33	71,37	110,84	47,43
<b>ZA-P4/AE</b>	92,92	68,06	99,40	89,30
<b>BI-P4</b>	89,21	69,31	105,88	86,97
<b>ZA-M1</b>	74,92	42,62	86,40	59,17
<b>SI-M1</b>	80,15	44,36	83,94	58,38
<b>BI-M1</b>	73,46	46,75	74,95	49,69
<b>KAI-M1</b>	78,16	42,27	85,29	62,95
<b>Soyasapogénol B</b>	75,78	46,18	105,92	61,58

Tableau 19: Tableau récapitulatif des % de viabilité et de neuroprotection des PC12 en présence des extraits et AB 5  $\mu$ M

EXTRAITS	% de viabilité des PC12				% de Neuroprotection des PC12			
	100 $\mu$ g/ mL	50 $\mu$ g/mL	5 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/ mL	50 $\mu$ g/mL	5 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
<b>ZA-P1</b>	189,05	243,57	120,16	101,88		127,37	82,78	51,00
<b>BI-P1</b>	176,89	221,11	113,60	97,49		108,82	80,87	50,83
<b>SI-P1</b>	128,37	195,69	107,04	93,73		113,96	73,07	51,91
<b>KAI-P1</b>	121,24	197,29	141,30	105,69		77,72	51,40	41,61
<b>ZA-P2</b>	99,24	166,22	135,54	98,40		44,93	40,60	44,44
<b>ZA-P2-HEX</b>	85,37	182,96	124,69	102,95		46,35	46,86	42,16
<b>KAI-P3</b>		159,93	106,36	103,47	172,30	62,93	53,34	50,52
<b>SI-P3</b>		81,88	109,96	99,87	137,20	82,46	71,87	54,96
<b>ZA-P3</b>		111,27	112,82	101,87	93,73	35,37	27,39	21,15
<b>BI-P3</b>		82,71	112,04	97,75	95,46	53,83	42,79	41,36
<b>SI-P4</b>		267,48	122,37	95,02		53,39	50,73	48,79
<b>KAI-P4</b>		130,21	103,73	96,90		54,49	45,87	45,65
<b>ZA-P4/HEX</b>		67,03	119,56	99,84		58,10	48,90	43,72
<b>ZA-P4/CHLOR</b>		64,10	112,95	98,08		55,83	45,99	47,34
<b>ZA-P4/AE</b>		62,20	122,61	99,58		60,32	53,46	50,84
<b>BI-P4</b>		65,64	92,46	90,48		72,93	60,51	41,06
<b>ZA-M1</b>		86,02	104,62	105,99		61,49	53,41	41,00
<b>SI-M1</b>		73,99	116,95	101,36		57,71	44,29	44,10
<b>BI-M1</b>		82,02	117,12	108,47		51,64	43,85	42,61
<b>KAI-M1</b>		47,75	138,15	99,84		50,17	69,61	55,97
Soyasaponine	62,39	40,20	145,51	105,03	93,62	50,53	47,56	43,00

# Conclusion générale

#### 4 Conclusion générale et perspectives

Ce travail a été conduit dans le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) sous la direction de Mme Christine RAYNAUD et l'encadrement de Mme Géraldine GIACITNI en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) sous la direction de Mr Jalloul BOUJILA à la Faculté de pharmacie de Toulouse et le Laboratoire LGMIB sous la direction de Mme Sonia MARGHALI où des études préliminaires sur l'espèce *Astragalus hamosus* L. ont été initiées depuis le master.

Notre pays, la Tunisie est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales. Ces plantes restent toujours une source fiable de principes actifs, connus par leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des potentialités biologiques d'une espèce non valorisée en Tunisie qui est *Astragalus hamosus*.

L'objectif de cette thèse a été de mettre en lumière les saponines de l'espèce *Astragalus hamosus* L. de la Tunisie.

En raison de leurs caractéristiques chimiques et structurales particulières, l'extraction et l'isolement des saponines des plantes représentent un sérieux défi cependant les résultats de ces travaux ont permis de confirmer l'hypothèse la présence de saponines dans les extraits d'*Astragalus hamosus* L. d'origine tunisienne.

Une stratégie combinant différents protocoles d'extraction et systèmes d'élution HPTLC a été proposée. Une première méthode d'extraction méthanolique basique (M1) a permis d'extraire les molécules bioactives mais les quatre protocoles mis en œuvre (P1, P2, P3 et P4) ont permis une première purification. En effet, ces protocoles sont basés sur l'augmentation des polarités des solvants organiques au cours du fractionnement de la plante dont le but est de récupérer les saponines polaires dans la dernière fraction butanolique. Les protocoles P1, P2 et P4 ont fait appel à l'utilisation du soxhlet. Cette technique s'appuie notamment sur l'énergie thermique lors des extractions, ce qui peut provoquer une déglycosylation des saponines par rapport à l'extraction à température ambiante. L'énergie thermique peut probablement transformer les soyasaponines de groupe B conjuguées au DDMP, telles que bg, en la soyasaponine I non-DDMP correspondante. Le Protocole P3 quant à lui basé sur la macération à température ambiante a été sélectionné comme protocole le plus pertinent pour la détection des saponines d'*Astragalus hamosus*.

Tout d'abord, des extraits méthanoliques (M1) de la population de Bizerte ont été analysés par HPTLC-UV-VIS et par HPLC. Les extraits BI-M1-25 et BI-M1\_300 ont montré une richesse notable en métabolites mais aucune saponine répertoriée dans la littérature a été détectée. L'analyse des extraits BI-25-M1, SI-25-M1, KAI-25-M1 et ZA-25-M1 par HPTLC suivant le système S1, a montré que la population Siliana était plus riche en métabolites. La visualisation des HPTLC sous UV a montré que les saponines ne sont pas détectables à 366 nm et ceci est expliqué par l'absence de chromophore.

L'ensemble de ces résultats a suggéré de changer la méthode d'extraction en premier lieu et ensuite le système de développement S1 qui n'a pas permis de purifier les saponines qui sont restées au

$R_F=0$  en HPTLC. En effet, la population Zaghouan a été choisie pour optimiser les analyses et appliquer 4 protocoles d'extraction adaptés de la littérature (P1, P2, P3 et P4). Une HPTLC a été préparée pour purifier les extraits ZA-P1, ZA-P2, ZA-P3, ZA-P4 et ZA-25-M1 selon le système de développement S1. À niveau, nous avons confirmé la non validité du système S1. Les mêmes extraits ont été alors analysés selon un système de développement S2 où l'élution se fait théoriquement suivant 3 niveaux : les méthylxanthines, ensuite les polyphénols et en dernier les saponines. Le nouveau système d'élution a permis la migration des molécules polaires qui restaient auparavant avec le système S1 au niveau de la ligne de dépôt. L'augmentation de la force d'élution dans le système S2 de SS1 à SS3 a permis d'éluer les molécules les moins polaires jusqu'au front de solvant et de faire migrer les molécules les plus polaires qui étaient localisées au  $R_F=0$ .

L'analyse HPTLC suivant le système d'élution S2 des extraits Zaghouan obtenus par les 5 protocoles a montré que le protocole P3 est le plus sélectif, nous ne détectons plus qu'un seul spot au  $R_F=0,2$  au même  $R_F$  que la Soyasaponine B et c'est pour cette raison que cet extrait a été hydrolysé et analysé par HPTLC-UPLC. Les résultats HPTLC ont démontré que l'hydrolyse avait libéré la partie glycosylée de son aglycone.

Les extraits Zaghouan ont fait l'objet d'une analyse directe en HPLC-SM<sup>n</sup> en mode ESI négatif. La soyasaponine, ainsi que son aglycone ont été détectés dans tous les extraits. Ces résultats ont été confirmés, après une phase d'optimisation des paramètres analytiques par un couplage HPTLC-SM<sup>n</sup> en mode ESI positif où les spots d'intérêt ont été adsorbés directement de la plaque de silice après une élution suivant le système S2 et injectés en spectrométrie de masse. La soyasaponine B et son aglycone ont été détectées sous forme d'adduit sodium  $[M-Na]^+$ ,  $m/z=965$  et,  $m/z=481$  respectivement dans les extraits Zaghouan obtenus par les protocoles d'extraction P1, P2 et P4. Au final, les résultats de cette étude ont permis de démontrer que les saponines triterpénoïdes d'*Astragalus hamosus L.* sont probablement présentes dans les différents extraits d'*Astragalus hamosus L.* des populations Zaghouan, Bizerte, Siliana et Kairouan.

La quantification des saponines a été évaluée par spectrophotométrie et par HPTLC en se basant sur la gamme étalon du Soyasapogénol, 3 % de saponines ont été estimées en équivalent soyasapogénol dans l'extrait ZA-P3.

Les extraits ZA obtenus par les protocoles d'extraction P1, P4 et M1 ont été évalués pour leurs quantités en polyphénols en équivalent d'acide gallique. Les quantités de polyphénols obtenus par P1 étaient proches pour Siliana, Zaghouan et Bizerte (19 mg EAG.g<sup>-1</sup> MS ; 18,1 mg EAG.g<sup>-1</sup> MS et 15,4 mg EAG.g<sup>-1</sup> MS successivement). Ce sont les quantités les plus faibles en comparaison avec les autres protocoles d'extraction, ceci confirme que P1 purifie plus efficacement les extraits d'*Astragalus hamosus L.* vis à vis des polyphénols. Le protocole d'extraction méthanolique M1 a permis d'avoir des extraits plus riches en polyphénols. La faible quantité des polyphénols explique l'activité antiradicalaire non significative des extraits obtenus par les protocoles P1 et P4.

La détermination des propriétés biologiques neuroprotectrices des extraits des quatre populations d'*Astragalus hamosus L.* ont apporté des résultats concluants.

Dans le cadre du volet neuroprotection, l'évaluation qualitative par bioautographie a montré une inhibition de l'Ache par tous les spots situés entre  $R_F=0,2$  et  $R_F=0,4$ , qui sont probablement des saponines glycosylées, ainsi que pour la Soyasaponine B.

S'agissant du test d'Ellman, SI-P4 et BI-P4 présentaient les CI50 les plus importantes de valeur 40,16 et 65,35  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Les standards présentaient des CI50 non significatives et à ce stade nous avons décidé de tester une autre voie thérapeutique. Nous avons commencé par tester l'effet des extraits sur les cellules neurales PC12 en absence du peptide AB. Les extraits obtenus par P1 étaient tous stimulateurs de la prolifération des cellules PC12 même à 100  $\mu\text{g/mL}$  d'extrait, il en a été de même pour les extraits obtenus par P2. Quant à SI-P3 et BI-P3, ils sont légèrement toxiques à une concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

La fraction SI-P4 est stimulatrice de la prolifération des cellules PC12 mais BI-P4 est neurotoxique même à la plus faible concentration et toutes les fractions hexane, chloroforme, acétate d'éthyle de l'extrait ZA-P4 ont montré un effet neurotoxique à 50  $\mu\text{g/mL}$ . Toutes les fractions obtenues par M1 sont neurotoxiques à 50  $\mu\text{g/mL}$ . Le Soyasapogénol B est neurotoxique à 100 et 50  $\mu\text{g/mL}$  mais stimulateur de la prolifération à 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Le peptide AB à 5  $\mu\text{M}$  a causé 55 % de mort cellulaire, c'est-à-dire que seulement 45 % des cellules restaient viables. Tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 étaient neuroprotecteurs, contrairement aux deux fractions obtenues par P2 qui ne présentaient aucune neuroprotection. Les extraits obtenus par P3, sont neuroprotecteurs à différentes concentrations. Concernant P4, SI-P4 présentait les meilleurs résultats, il est neuroprotecteur et stimulateur même en présence du peptide AB, suivie de BI-P4 qui a exhibé 72,93 % de viabilité à 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Par rapport à la méthode M1, ZA-M1, SI-M1 et BI-M1 exerçaient une neuroprotection proportionnelle à la concentration.

Ce qui est intéressant et marquant dans ces travaux dans le cadre de l'évaluation de la neuroprotection, ce sont les extraits qui exerçaient une toxicité sur les cellules PC12 en absence du peptide AB et une neuroprotection en présence d'AB. Ce résultat peut s'expliquer par une interaction qui a lieu entre le peptide AB et les molécules présentes dans nos extraits, cette interaction neutralise probablement la toxicité.

L'effet cytotoxique des astragales cité dans la littérature nous a encouragé à évaluer nos extraits sur la lignée du cancer colorectal CACO-2. En effet, tous les extraits ont exercé une inhibition significative de la prolifération sans exception. Tous les extraits obtenus à partir des protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4 ont démontré leur cytotoxicité, avec une CI50 estimée probablement inférieure à 1  $\mu\text{g/mL}$ . Les pourcentages d'inhibition observés étaient supérieurs à 50 % même à une concentration de 1  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui suggère une activité inhibitrice importante. Il convient d'explorer des concentrations encore plus faibles pour préciser la CI50.

Les extraits obtenus par le protocole M1 ont également présenté une activité similaire, avec une CI50 exceptionnellement basse de 1  $\mu\text{g/mL}$ . Cette valeur est remarquable par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature, soulignant ainsi la puissance inhibitrice des extraits obtenus par ce protocole.

Ces résultats démontrent clairement la cytotoxicité des extraits obtenus à partir des différents protocoles d'extraction, ainsi que l'efficacité des extraits obtenus par le protocole M1. Il convient de poursuivre les recherches pour mieux comprendre leur mécanisme d'action et leur potentiel en tant qu'agents anticancéreux prometteurs.

Les extraits d'*Astragalus hamosus L.* exercent une activité cytotoxique sur les cellules Caco-2 plus importante que le soyasapogénol B qui a exhibé une CI50 de valeur 1,25 µg/mL, concentration hautement significative.

La cytotoxicité des extraits *Astragalus hamosus L.* sur les cellules HEK293 est également significative.

En conclusion, les fractions isolées d'*Astragalus hamosus L.* issues de quatre populations tunisiennes ont montré des activités biologiques prometteuses permettant d'envisager la valorisation de cette plante à des fins thérapeutiques.

Des travaux complémentaires d'isolement et d'identification des molécules d'intérêt permettraient de comprendre plus spécifiquement les réactions biochimiques mises en jeu dans les activités de neuroprotection. Des molécules autres que les saponines semblent entrer également en jeu dans ces mécanismes réactionnels.

## **Références bibliographiques**



- [1] W. Reith, « Neurodegenerative Erkrankungen », *Radiologe*, vol. 58, n° 3, p. 241-258, mars 2018, doi: 10.1007/s00117-018-0363-y.
- [2] U. Ziegler et G. Doblhammer, « [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002] », *Gesundheitswesen*, vol. 71, n° 5, p. 281-290, mai 2009, doi: 10.1055/s-0028-1119384.
- [3] C. Qiu, D. De Ronchi, et L. Fratiglioni, « The epidemiology of the dementias: an update », *Current Opinion in Psychiatry*, vol. 20, n° 4, p. 380-385, juill. 2007, doi: 10.1097/YCO.0b013e32816ebc7b.
- [4] P. Hobson et J. Meara, « Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom », *Movement Disorders*, vol. 19, n° 9, p. 1043-1049, 2004, doi: 10.1002/mds.20216.
- [5] « La maladie d'Alzheimer : plus de 100 ans d'histoire et de découvertes », *France Culture*, 21 septembre 2016. <https://www.franceculture.fr/sciences/la-maladie-dalzheimer-plus-de-100-ans-dhistoire-et-de-decouvertes> (consulté le 28 octobre 2021).
- [6] J. L. Crimins, A. Pooler, M. Polydoro, J. I. Luebke, et T. L. Spires-Jones, « The intersection of amyloid  $\beta$  and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease », *Ageing Res Rev*, vol. 12, n° 3, p. 757-763, juin 2013, doi: 10.1016/j.arr.2013.03.002.
- [7] R. A. Nixon, « Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease », *J Cell Sci*, vol. 120, n° Pt 23, p. 4081-4091, déc. 2007, doi: 10.1242/jcs.019265.
- [8] J. Lewis et D. W. Dickson, « Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies », *Acta Neuropathol*, vol. 131, n° 1, p. 27-48, janv. 2016, doi: 10.1007/s00401-015-1507-z.
- [9] H. V. Goodson et E. M. Jonasson, « Microtubules and Microtubule-Associated Proteins », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, n° 6, p. a022608, juin 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a022608.
- [10] L. C. Kapitein et C. C. Hoogenraad, « Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton », *Neuron*, vol. 87, n° 3, p. 492-506, août 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.046.
- [11] N. El Kadmiri, K. Hamzi, B. El Moutawakil, I. Slassi, et S. Nadifi, « Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer (Revue) », *Pathologie Biologie*, vol. 61, n° 6, p. 228-238, déc. 2013, doi: 10.1016/j.patbio.2013.04.001.
- [12] L. Buée, T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, et P. R. Hof, « Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders », *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 33, n° 1, p. 95-130, août 2000, doi: 10.1016/s0165-0173(00)00019-9.
- [13] J.-P. Brion, « Neurofibrillary Tangles and Alzheimer's Disease », *ENE*, vol. 40, n° 3, p. 130-140, 1998, doi: 10.1159/000007969.
- [14] H. Gao, L. Dou, L. Shan, Y. Sun, et W. Li, « Proliferation and committed differentiation into dopamine neurons of neural stem cells induced by the active ingredients of radix astragali », *Neuroreport*, vol. 29, n° 7, p. 577-582, mai 2018, doi: 10.1097/WNR.0000000000000997.
- [15] R. Wang, G.-J. Wang, X.-L. Wu, F. Zhou, et Y.-N. Li, « Ginsenoside Rg1 attenuates structural disruption of the blood-brain barrier to protect the central nervous system in ischemia/reperfusion », *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 11, n° 1, p. 30-37, janv. 2013, doi: 10.1016/S1875-5364(13)60004-7.
- [16] B. R. Hoover *et al.*, « Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration », *Neuron*, vol. 68, n° 6, p. 1067-1081, déc. 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030.
- [17] N. Sergeant, A. Delacourte, et L. Buée, « Tau protein as a differential biomarker of tauopathies », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1739, n° 2-3, p. 179-197, janv. 2005, doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020.
- [18] Y. Ju et K. Y. Tam, « Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease », *Neural Regen Res*, vol. 17, n° 3, p. 543-549, août 2021, doi: 10.4103/1673-5374.320970.
- [19] D. Allsop, M. Landon, et M. Kidd, « The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein », *Brain Res*, vol. 259, n° 2, p. 348-352, janv. 1983, doi: 10.1016/0006-8993(83)91273-8.
- [20] A. Mudher et S. Lovestone, « Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? », *Trends Neurosci*, vol. 25, n° 1, p. 22-26, janv. 2002, doi: 10.1016/s0166-2236(00)02031-2.

- [21] M. S. Parihar et T. Hemnani, « Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions », *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 11, n° 5, p. 456-467, juin 2004, doi: 10.1016/j.jocn.2003.12.007.
- [22] « Causes et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer », *Fondation pour la Recherche sur Alzheimer*. <https://alzheimer-recherche.org/la-maladie-alzheimer/quest-maladie-dalzheimer/facteurs-de-risques/> (consulté le 3 novembre 2021).
- [23] J. Ankri, « Prévalence, incidence et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer », *Gerontologie et société*, vol. 32 / n° 128-129, n° 1, p. 129-141, sept. 2009.
- [24] D. Blacker et R. E. Tanzi, « The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects », *Arch Neurol*, vol. 55, n° 3, p. 294-296, mars 1998, doi: 10.1001/archneur.55.3.294.
- [25] S. Craft *et al.*, « Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes with Alzheimer's disease », *Neurology*, vol. 51, n° 1, p. 149-153, juill. 1998, doi: 10.1212/wnl.51.1.149.
- [26] N. Schupf, D. Kapell, B. Nightingale, A. Rodriguez, B. Tycko, et R. Mayeux, « Earlier onset of Alzheimer's disease in men with Down syndrome », *Neurology*, vol. 50, n° 4, p. 991-995, avr. 1998, doi: 10.1212/wnl.50.4.991.
- [27] R. Mayeux, « Understanding Alzheimer's disease: expect more genes and other things », *Ann Neurol*, vol. 39, n° 6, p. 689-690, juin 1996, doi: 10.1002/ana.410390602.
- [28] P.-A. Kenigsberg *et al.*, « Impact socio-économique de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées en Europe », *Gérontologie et société: cahiers de la Fondation nationale de gérontologie*, vol. 128-129, p. 297-318, janv. 2009, doi: 10.3917/gs.128.0297.
- [29] C. L. Joachim et D. J. Selkoe, « The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease », *Alzheimer Dis Assoc Disord*, vol. 6, n° 1, p. 7-34, 1992, doi: 10.1097/00002093-199205000-00003.
- [30] J. Hardy et D. J. Selkoe, « The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics », *Science*, vol. 297, n° 5580, p. 353-356, juill. 2002, doi: 10.1126/science.1072994.
- [31] H. Lin, R. Bhatia, et R. Lal, « Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology », *The FASEB Journal*, vol. 15, n° 13, p. 2433-2444, 2001, doi: 10.1096/fj.01-0377com.
- [32] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, et K. Beyreuther, « Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, n° 12, p. 4245-4249, juin 1985, doi: 10.1073/pnas.82.12.4245.
- [33] D. M. Mann et M. M. Esiri, « The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome », *J Neurol Sci*, vol. 89, n° 2-3, p. 169-179, févr. 1989, doi: 10.1016/0022-510x(89)90019-1.
- [34] F. Checler *et al.*, « Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines », *Med Sci (Paris)*, vol. 18, n° 6-7, Art. n° 6-7, juin 2002, doi: 10.1051/medsci/20021867717.
- [35] « Les plaques amyloïdes — Site des ressources d'ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre ». <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/alzheimer/la-maladie-dalzheimer-a-lechelle-cellulaire-et-moleculaire/les-palques> (consulté le 28 octobre 2021).
- [36] A. Delacourte, « De la physiopathologie au traitement de la maladie d'Alzheimer », 2006, doi: 10.1016/S0035-3787(06)75099-8.
- [37] A. Hémar et C. Mulle, « Maladie d'Alzheimer, peptide  $\beta$ -amyloïde et synapses », *Med Sci (Paris)*, vol. 27, n° 8-9, Art. n° 8-9, août 2011, doi: 10.1051/medsci/2011278015.
- [38] C. Haass *et al.*, « Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism », *Nature*, vol. 359, n° 6393, p. 322-325, sept. 1992, doi: 10.1038/359322a0.
- [39] A. Jan, O. Gokce, R. Luthi-Carter, et H. A. Lashuel, « The ratio of monomeric to aggregated forms of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 42, p. 28176-28189, oct. 2008, doi: 10.1074/jbc.M803159200.
- [40] T. Li *et al.*, « Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities », *J Neurosci*, vol. 27, n° 40, p. 10849-10859, oct. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2152-07.2007.
- [41] J. R. Cirrito *et al.*, « Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo », *Neuron*, vol. 48, n° 6, p. 913-922, déc. 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.028.
- [42] E. S. Musiek, D. D. Xiong, et D. M. Holtzman, « Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease », *Exp Mol Med*, vol. 47, p. e148, mars 2015, doi: 10.1038/emmm.2014.121.

- [43] M. Meyer-Luehmann *et al.*, « Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease », *Nature*, vol. 451, n° 7179, p. 720-724, févr. 2008, doi: 10.1038/nature06616.
- [44] J. Götz, F. Chen, R. Barmettler, et R. M. Nitsch, « Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau », *J Biol Chem*, vol. 276, n° 1, p. 529-534, janv. 2001, doi: 10.1074/jbc.M006531200.
- [45] « Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25853174/> (consulté le 8 novembre 2022).
- [46] B. Zott *et al.*, « A vicious cycle of  $\beta$  amyloid-dependent neuronal hyperactivation », *Science*, vol. 365, n° 6453, p. 559-565, août 2019, doi: 10.1126/science.aay0198.
- [47] D. Rice *et al.*, « Exercise-Induced Hypoalgesia in Pain-Free and Chronic Pain Populations: State of the Art and Future Directions », *Journal of Pain*, mars 2019, doi: 10.1016/j.jpain.2019.03.005.
- [48] V. Kumar, A. J. Hart, T. T. Wimalasena, G. A. Tucker, et D. Greetham, « Expression of RCK2 MAPKAP (MAPK-activated protein kinase) rescues yeast cells sensitivity to osmotic stress », *Microb Cell Fact*, vol. 14, n° 1, p. 85, déc. 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0276-7.
- [49] Y. Hou *et al.*, « Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease », *Nat Rev Neurol*, vol. 15, n° 10, p. 565-581, oct. 2019, doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.
- [50] I. M. Rea, D. S. Gibson, V. McGilligan, S. E. McNerlan, H. D. Alexander, et O. A. Ross, « Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines », *Front Immunol*, vol. 9, p. 586, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00586.
- [51] V. Di Donato *et al.*, « An Attractive Reelin Gradient Establishes Synaptic Lamination in the Vertebrate Visual System », *Neuron*, vol. 97, n° 5, p. 1049-1062.e6, mars 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.030.
- [52] V. Calsolaro et P. Edison, « Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions », *Alzheimers Dement*, vol. 12, n° 6, p. 719-732, juin 2016, doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.
- [53] E. E. Spangenberg et K. N. Green, « Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models », *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 61, p. 1-11, mars 2017, doi: 10.1016/j.bbi.2016.07.003.
- [54] C. Zhang, Y. Wang, D. Wang, J. Zhang, et F. Zhang, « NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies », *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 10, 2018, Consulté le: 9 novembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2018.00083>
- [55] « Alzheimer : l'arrivée de la mémantine, antagoniste des récepteurs NMDA », *Le Quotidien du Médecin*. <https://www.lequotidiendumedecin.fr/archives/alzheimer-larrivee-de-la-memantine-antagoniste-des-recepteurs-nmda> (consulté le 8 novembre 2022).
- [56] A. J. Granger, Y. Shi, W. Lu, M. Cerpas, et R. A. Nicoll, « LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type », *Nature*, vol. 493, n° 7433, p. 495-500, janv. 2013, doi: 10.1038/nature11775.
- [57] A. Reiner et J. Levitz, « Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert », *Neuron*, vol. 98, n° 6, p. 1080-1098, juin 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018.
- [58] C. P. Jacob *et al.*, « Alterations in Expression of Glutamatergic Transporters and Receptors in Sporadic Alzheimer's Disease », *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 11, n° 1, p. 97-116, janv. 2007, doi: 10.3233/JAD-2007-11113.
- [59] C. C. Rudy, H. C. Hunsberger, D. S. Weitzner, et M. N. Reed, « The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease », *Aging and disease*, vol. 6, n° 2, p. 131, 2015, doi: 10.14336/AD.2014.0423.
- [60] S. Claeyssen, « Modulation du microbiote intestinal comme nouvelle voie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer », *Revue Neurologique*, vol. 178, p. S149, avr. 2022, doi: 10.1016/j.neurol.2022.02.024.
- [61] C. S. Atwood, X. Huang, R. D. Moir, R. E. Tanzi, et A. I. Bush, « Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease », *Met Ions Biol Syst*, vol. 36, p. 309-364, 1999.
- [62] H. Y. Zhou, J. L. Hong, P. Shu, Y. J. Ni, et M. J. Qin, « A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino », *Fitoterapia*, vol. 80, n° 5, p. 283-285, juill. 2009, doi: 10.1016/j.fitote.2009.03.005.
- [63] M. A. Ansari, H. M. Abdul, G. Joshi, W. O. Opii, et D. A. Butterfield, « Protective effect of quercetin in primary neurons against A $\beta$ (1-42): relevance to Alzheimer's disease », *J Nutr Biochem*, vol. 20, n° 4, p. 269-275, avr. 2009, doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.03.002.

- [64] « Phytochemicals Having Neuroprotective Properties from Dietary Sources and Medicinal Herbs | Pharmacognosy Journal ». <https://phcogj.com/article/28> (consulté le 29 octobre 2021).
- [65] B. Moosmann et C. Behl, « Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders », *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 11, n° 10, p. 1407-1435, oct. 2002, doi: 10.1517/13543784.11.10.1407.
- [66] B. Halliwell, « Biochemistry of oxidative stress », *Biochem Soc Trans*, vol. 35, n° Pt 5, p. 1147-1150, nov. 2007, doi: 10.1042/BST0351147.
- [67] W.-Z. Li *et al.*, « Protective effect of extract of Astragalus on learning and memory impairments and neurons' apoptosis induced by glucocorticoids in 12-month-old male mice », *Anat Rec (Hoboken)*, vol. 294, n° 6, p. 1003-1014, juin 2011, doi: 10.1002/ar.21386.
- [68] S. Zhu, L. Qi, Y. Rui, R. Li, X. He, et Z. Xie, « Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca<sup>2+</sup> oscillations on hippocampal neurons », *Acta Pharmacol Sin*, vol. 29, n° 1, p. 57-64, janv. 2008, doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00712.x.
- [69] Y. Luo *et al.*, « Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia », *Neurosci Lett*, vol. 363, n° 3, p. 218-223, juin 2004, doi: 10.1016/j.neulet.2004.03.036.
- [70] M. Kondeva-Burdina, I. Krasteva, et M. Mitcheva, « Effects of rhamnocitrin 4-β-D-galactopyranoside, isolated from Astragalus hamosus L. on toxicity models in vitro », *Pharmacogn Mag*, vol. 10, n° Suppl 3, p. S487-S493, août 2014, doi: 10.4103/0973-1296.139778.
- [71] B. M. Abdelaziz, M. W. Helmy, M. A. Katary, M. M. Abd-Alhaseeb, et A. I. Ghoneim, « Protective effects of Astragalus kahiricus root extract on ethanol-induced retrograde memory impairments in mice », *J Herbmед Pharmacol*, vol. 8, n° 4, p. 295-301, sept. 2019, doi: 10.15171/jhp.2019.43.
- [72] Z. Bahaeddin, A. Yans, F. Khodagholi, et S. Sahranavard, « Dietary supplementation with Allium hirtifolium and/or Astragalus hamosus L. improved memory and reduced neuro-inflammation in the rat model of Alzheimer's disease », *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, vol. 43, déc. 2017, doi: 10.1139/apnm-2017-0585.
- [73] W. Xie *et al.*, « Panax Notoginseng Saponins: A Review of Its Mechanisms of Antidepressant or Anxiolytic Effects and Network Analysis on Phytochemistry and Pharmacology », *Molecules*, vol. 23, n° 4, p. 940, avr. 2018, doi: 10.3390/molecules23040940.
- [74] Z. Zhang, T. Deng, M. Wu, A. Zhu, et G. Zhu, « Botanicals as modulators of depression and mechanisms involved », *Chinese Medicine*, vol. 14, n° 1, p. 24, juill. 2019, doi: 10.1186/s13020-019-0246-9.
- [75] H.-T. A. E. Abd Elkader, H. M. Abdou, O. A. Khamiss, et A. E. Essawy, « Anti-anxiety and antidepressant-like effects of astragaloside IV and saponins extracted from Astragalus spinosus against the bisphenol A-induced motor and cognitive impairments in a postnatal rat model of schizophrenia », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, n° 26, p. 35171-35187, juill. 2021, doi: 10.1007/s11356-021-12927-5.
- [76] L. Li, X. Hou, R. Xu, C. Liu, et M. Tu, « Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV », *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 31, n° 1, p. 17-36, févr. 2017, doi: 10.1111/fcp.12232.
- [77] A. Sun, X. Xu, J. Lin, X. Cui, et R. Xu, « Neuroprotection by Saponins », *Phytotherapy Research*, vol. 29, n° 2, p. 187-200, 2015, doi: 10.1002/ptr.5246.
- [78] B. Pál, « Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability », *Cell Mol Life Sci*, vol. 75, n° 16, p. 2917-2949, août 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2837-5.
- [79] W.-Z. Li *et al.*, « Protective effects of astragalosides on dexamethasone and Aβ<sub>25-35</sub> induced learning and memory impairments due to decrease amyloid precursor protein expression in 12-month male rats », *Food Chem Toxicol*, vol. 50, n° 6, p. 1883-1890, juin 2012, doi: 10.1016/j.fct.2012.03.064.
- [80] X. Wang, W. Xu, H. Chen, W. Li, W. Li, et G. Zhu, « Astragaloside IV prevents Aβ<sub>1-42</sub> oligomers-induced memory impairment and hippocampal cell apoptosis by promoting PPARγ/BDNF signaling pathway », *Brain Research*, vol. 1747, p. 147041, nov. 2020, doi: 10.1016/j.brainres.2020.147041.
- [81] X. Wang *et al.*, « Lychee Seed Saponins Improve Cognitive Function and Prevent Neuronal Injury via Inhibiting Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Alzheimer's Disease », *Nutrients*, vol. 9, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.3390/nu9020105.

- [82] H. Pei *et al.*, « Traditional Chinese Medicine for Alzheimer's Disease and Other Cognitive Impairment: A Review », *Am J Chin Med*, vol. 48, n° 3, p. 487-511, 2020, doi: 10.1142/S0192415X20500251.
- [83] L. Wang et W. S. Kisaalita, « Administration of BDNF/ginsenosides combination enhanced synaptic development in human neural stem cells », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 194, n° 2, p. 274-282, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.10.025.
- [84] N. Ye, J. Cruz, X. Peng, J. Ma, A. Zhang, et X. Cheng, « Remyelination is enhanced by Astragalus polysaccharides through inducing the differentiation of oligodendrocytes from neural stem cells in cuprizone model of demyelination », *Brain Res*, vol. 1763, p. 147459, juill. 2021, doi: 10.1016/j.brainres.2021.147459.
- [85] Z. Zheng et B. Zhao, « RETRACTED: Astragalus polysaccharide protects hypoxia-induced injury by up-regulation of miR-138 in rat neural stem cells », *Biomed Pharmacother*, vol. 102, p. 295-301, juin 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.040.
- [86] « Cancer colorectal et facteurs de risque • Cancer Environnement », *Cancer Environnement*. <https://www.cancer-environnement.fr/fiches/cancers/cancer-colorectal/> (consulté le 7 avril 2023).
- [87] E. Lecommandeur, « Le microbiote intestinal joue-t-il un rôle dans le cancer colorectal ? », *Microbiote intestinal & Bien-être*, 10 août 2021. <https://blog.nahibu.com/le-microbiote-intestinal-joue-t-il-un-role-dans-le-cancer-colorectal/> (consulté le 8 avril 2023).
- [88] A. Rondon, « Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale », 2018.
- [89] J. C. Fabregas, B. Ramnarain, et T. J. George, « Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022 », *Clinical Colorectal Cancer*, vol. 21, n° 3, p. 198-203, sept. 2022, doi: 10.1016/j.clcc.2022.05.006.
- [90] « Cancer du colon rectum ». <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum> (consulté le 13 mars 2023).
- [91] I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, et M. J. Rodriguez Yoldi, « Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer », *Int J Mol Sci*, vol. 18, n° 1, p. 197, janv. 2017, doi: 10.3390/ijms18010197.
- [92] R. Lotte, « Caractérisation des interactions moléculaires entre la GTPase Rac1 et son régulateur HACE1 : perspectives en infectiologie et en cancérologie », 2017.
- [93] A. Al-Snafi, « CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ASTRAGALUS HAMOSUS L. AND ASTRAGALUS TRIBULOIDES GROWN IN IRAQ », *Asian J of Pharm Sci & Tech*, vol. 5, p. 321-328, janv. 2015.
- [94] I. Ionkova, A. Shkondrov, I. Krasteva, et T. Ionkov, « Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Astragalus saponins », *Phytochemistry Reviews*, vol. 13, p. 343-374, juin 2014, doi: 10.1007/s11101-014-9347-3.
- [95] « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales - Detail - Hermes ». <https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/doc/exploitation/HORIZON/493163/nouvelle-flore-de-l-algerie-et-des-regions-desertiques-meridionales> (consulté le 29 octobre 2021).
- [96] « Flore et écologie taxonomique de Tunisie : dicotyledones - Sécheresse ». <http://www.secheresse.info/spip.php?article23696> (consulté le 29 octobre 2021).
- [97] G. A. Pottier-Alapetite, *Flore de la Tunisie : Angiospermes-dicotylédones*. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture. [Tunis], 1979.
- [98] D. Podlech, « The genus Astragalus L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union », *Feddes Repertorium*, vol. 119, n° 5-6, p. 310-387, 2008, doi: 10.1002/fedr.200811171.
- [99] M. national d'Histoire naturelle, « Astragalus hamosus L. L., 1753 - Astragale à gousses en hameçon », *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/84846](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/84846) (consulté le 29 octobre 2021).
- [100] F. Dane, Ö. D. Aksoy, et G. Yılmaz, « Karyological and palynological studies on Astragalus hamosus L. and A. glycyphyllos in Turkey », p. 6, 2007.
- [101] C. P. Khare, Éd., *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. New York, NY: Springer New York, 2007. doi: 10.1007/978-0-387-70638-2.
- [102] I. Krasteva, S. Platikanov, S. Nikolov, et M. Kaloga, « Flavonoids from Astragalus hamosus L. », *Natural Product Research*, vol. 21, n° 5, p. 392-395, mai 2007, doi: 10.1080/14786410701236871.
- [103] S. Saleem *et al.*, « Anticancer potential of rhamnocitrin 4'-β-D-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats », *Mol Cell Biochem*, vol. 384, n° 1-2, p. 147-153, déc. 2013, doi: 10.1007/s11010-013-1792-6.

- [104] I. Krasteva, G. Momekov, P. Zdraveva, S. Konstantinov, et S. Nikolov, « Antiproliferative effects of a flavonoid and saponins from *Astragalus hamosus* L. against human tumor cell lines », *Pharmacognosy Magazine*, vol. 4, p. 269-272, oct. 2008.
- [105] M. Mahmoodi *et al.*, « Fabrication and Characterization of a Three-Dimensional Fibrin Gel Model to Evaluate Anti-Proliferative Effects of *Astragalus hamosus* L. Plant Extract on Breast Cancer Cells », *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 23, n° 2, p. 731-741, févr. 2022, doi: 10.31557/APJCP.2022.23.2.731.
- [106] J. Ai *et al.*, « The anti-angiogenic effect of *Astragalus hamosus* L. extract on human umbilical vein endothelial cells cultured on three-dimensional fibrin gel model », In Review, preprint, août 2022. doi: 10.21203/rs.3.rs-1960472/v1.
- [107] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, et H. Gruppen, « Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom », *Phytochemistry*, vol. 68, n° 3, p. 275-297, févr. 2007, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008.
- [108] W. A. Oleszek, « Chromatographic determination of plant saponins », *Journal of Chromatography A*, vol. 967, n° 1, p. 147-162, août 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01556-4.
- [109] N.-H. Nguyen, T. K. Q. Ha, J.-L. Yang, H. T. T. Pham, et W. K. Oh, « Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: Chemistry and pharmacological activities », *J Ethnopharmacol*, vol. 268, p. 113574, mars 2021, doi: 10.1016/j.jep.2020.113574.
- [110] K. Hostettmann, H. Kizu, et T. Tomimori, « Molluscicidal Properties of Various Saponins », *Planta Med*, vol. 44, n° 1, p. 34-35, janv. 1982, doi: 10.1055/s-2007-971396.
- [111] « Chemical diversity and biological activities of the saponins isolated from *Astragalus* genus: focus on Astragaloside IV | SpringerLink ». <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-019-09626-y> (consulté le 9 octobre 2022).
- [112] J. Zhang, C. Wu, L. Gao, G. Du, et X. Qin, « Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: A research review on the pharmacological effects », *Adv Pharmacol*, vol. 87, p. 89-112, 2020, doi: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.
- [113] L. Verotta et N. A. El-Sebakhy, « Cycloartane and oleanane saponins from *Astragalus* sp. », in *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Éd., in Bioactive Natural Products (Part F), vol. 25. Elsevier, 2001, p. 179-234. doi: 10.1016/S1572-5995(01)80008-9.
- [114] W. Tang et G. Eisenbrand, « *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees », in *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*, W. Tang et G. Eisenbrand, Éd., Berlin, Heidelberg: Springer, 1992, p. 97-103. doi: 10.1007/978-3-642-73739-8\_14.
- [115] « Effects of Plant-Derived Polysaccharides on Murine Cytomegalovirus and Encephalomyocarditis Virus Infections in Mice - D. F. Smee, A. J. Verbiscar, 1995 ». <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/095632029500600606> (consulté le 10 octobre 2022).
- [116] E. Polat, E. Bedir, A. Perrone, S. Piacente, et O. Alankus-Caliskan, « Triterpenoid saponins from *Astragalus wiedemannianus* Fischer », *Phytochemistry*, vol. 71, n° 5, p. 658-662, avr. 2010, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.11.013.
- [117] Y.-Y. Bian, J. Guan, Z.-M. Bi, Y. Song, et P. Li, « Studies on chemical constituents of *Astragalus membranaceus* (Fisch. ) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao », *Chinese Pharmaceutical Journal*, vol. 41, p. 1217-1221, août 2006.
- [118] R. P. Mamedova et M. I. Isaev, « Triterpenoids from *Astragalus* Plants », *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 40, n° 4, p. 303-357, juill. 2004, doi: 10.1023/B:CONC.0000048246.16075.62.
- [119] X. Li *et al.*, « A Review of Recent Research Progress on the *Astragalus* Genus », *Molecules*, vol. 19, n° 11, Art. n° 11, nov. 2014, doi: 10.3390/molecules191118850.
- [120] Y. Lee, J.-C. Jung, Z. Ali, I. A. Khan, et S. Oh, « Anti-Inflammatory Effect of Triterpene Saponins Isolated from Blue Cohosh (*Caulophyllum thalictroides*) », *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2012, p. 798192, 2012, doi: 10.1155/2012/798192.
- [121] P. Liu, H. Zhao, et Y. Luo, « Anti-Aging Implications of *Astragalus Membranaceus* (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic », *Aging Dis*, vol. 8, n° 6, p. 868-886, déc. 2017, doi: 10.14336/AD.2017.0816.
- [122] Y. Zhang *et al.*, « Oleanane type saponins from the stems of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao », *Fitoterapia*, vol. 109, p. 99-105, mars 2016, doi: 10.1016/j.fitote.2015.12.006.
- [123] Y. Zhang *et al.*, « Rearranged oleanane type saponins, astraisoolesaponins A1–A3 and B, from the stems of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao », *Tetrahedron*, vol. 72, n° 44, p. 7008-7013, nov. 2016, doi: 10.1016/j.tet.2016.09.034.

- [124] W. Zhang et D. G. Popovich, « Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy », *Molecules*, vol. 14, n° 8, Art. n° 8, août 2009, doi: 10.3390/molecules14082959.
- [125] C. Guang, J. Chen, S. Sang, et S. Cheng, « Biological Functionality of Soyasaponins and Soyasapogenols », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, n° 33, p. 8247-8255, août 2014, doi: 10.1021/jf503047a.
- [126] M. Wink, « Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine », *Current Drug Metabolism*, vol. 9, n° 10, p. 996-1009, déc. 2008, doi: 10.2174/138920008786927794.
- [127] J. T. Salyer, « Effect of Soyasaponin Fractions on Human Colon Cancer Cells ».
- [128] A. V. Rao et M. K. Sung, « Saponins as anticarcinogens », *J Nutr*, vol. 125, n° 3 Suppl, p. 717S-724S, mars 1995, doi: 10.1093/jn/125.3\_Suppl.717S.
- [129] S. Mk, K. Cw, K. Mm, et R. Av, « Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture », *Nutrition and cancer*, vol. 23, n° 3, 1995, doi: 10.1080/01635589509514380.
- [130] A. A. Ellington, M. A. Berhow, et K. W. Singletary, « Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells », *Carcinogenesis*, vol. 27, n° 2, p. 298-306, févr. 2006, doi: 10.1093/carcin/bgi214.
- [131] Y. J. Oh et M. K. Sung, « Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells », *Nutr Cancer*, vol. 39, n° 1, p. 132-138, 2001, doi: 10.1207/S15327914nc391\_18.
- [132] « L'extrait de saponine de soja brut antiprolifératif module l'expression d'IkappaBalpha, de la protéine kinase C et de la cyclooxygénase-2 dans les cellules cancéreuses du côlon humain - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15172114/> (consulté le 8 mars 2023).
- [133] D. M. Gurfinkel et A. V. Rao, « Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity », *Nutr Cancer*, vol. 47, n° 1, p. 24-33, 2003, doi: 10.1207/s15327914nc4701\_3.
- [134] C.-Y. Tsai, Y.-H. Chen, Y.-W. Chien, W.-H. Huang, et S.-H. Lin, « Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells », *World J Gastroenterol*, vol. 16, n° 27, p. 3371-3376, juill. 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i27.3371.
- [135] J. Hu, M. B. Reddy, S. Hendrich, et P. A. Murphy, « Soyasaponin I and Saponin B Have Limited Absorption by Caco-2 Intestinal Cells and Limited Bioavailability in Women », *The Journal of Nutrition*, vol. 134, n° 8, p. 1867-1873, août 2004, doi: 10.1093/jn/134.8.1867.
- [136] R. S. MacDonald *et al.*, « Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer », *J Nutr*, vol. 135, n° 5, p. 1239-1242, mai 2005, doi: 10.1093/jn/135.5.1239.
- [137] X. Xia *et al.*, « Anti-Colon Cancer Activity of Dietary Phytochemical Soyasaponin I and the Induction of Metabolic Shifts in HCT116 », *Molecules*, vol. 27, n° 14, p. 4382, juill. 2022, doi: 10.3390/molecules27144382.
- [138] J.-X. Xiao, G.-Q. Huang, et S.-H. Zhang, « Soyasaponins inhibit the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis », *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 59, n° 1, p. 35-42, sept. 2007, doi: 10.1016/j.etp.2007.02.004.
- [139] W. Zhang et D. G. Popovich, « Effect of Soyasapogenol A and Soyasapogenol B Concentrated Extracts on Hep-G2 Cell Proliferation and Apoptosis », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, n° 8, p. 2603-2608, avr. 2008, doi: 10.1021/jf0731550.
- [140] X. Li *et al.*, « A Review of Recent Research Progress on the Astragalus Genus », *Molecules*, vol. 19, n° 11, Art. n° 11, nov. 2014, doi: 10.3390/molecules191118850.
- [141] J. M. Augustin, V. Kuzina, S. B. Andersen, et S. Bak, « Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins », *Phytochemistry*, vol. 72, n° 6, p. 435-457, avr. 2011, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015.
- [142] Ö. Güçlü-Üstündağ et G. Mazza, « Saponins: Properties, Applications and Processing », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, n° 3, p. 231-258, mars 2007, doi: 10.1080/10408390600698197.
- [143] S. M. Hassan, A. U. Haq, J. A. Byrd, M. A. Berhow, A. L. Cartwright, et C. A. Bailey, « Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal », *Food Chemistry*, vol. 119, n° 2, p. 600-605, mars 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.06.066.
- [144] H. Sun, L. Chen, J. Wang, K. Wang, et J. Zhou, « Structure–function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity », *International Immunopharmacology*, vol. 11, n° 12, p. 2047-2056, déc. 2011, doi: 10.1016/j.intimp.2011.08.018.

- [145] S. G. Sparg, M. E. Light, et J. van Staden, « Biological activities and distribution of plant saponins », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 94, n° 2, p. 219-243, oct. 2004, doi: 10.1016/j.jep.2004.05.016.
- [146] T.-C. Cheng, J.-F. Lu, J.-S. Wang, L.-J. Lin, H.-I. Kuo, et B.-H. Chen, « Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, n° 20, p. 11319-11329, oct. 2011, doi: 10.1021/jf2018758.
- [147] S. Man, W. Gao, Y. Zhang, L. Huang, et C. Liu, « Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents », *Fitoterapia*, vol. 81, n° 7, p. 703-714, oct. 2010, doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.004.
- [148] A. Waheed, J. Barker, S. J. Barton, C. P. Owen, S. Ahmed, et M. A. Carew, « A novel steroidal saponin glycoside from *Fagonia indica* induces cell-selective apoptosis or necrosis in cancer cells », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 47, n° 2, p. 464-473, sept. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2012.07.004.
- [149] K. W. Chan, N. M. H. Khong, S. Iqbal, et M. Ismail, « Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran », *Journal of Cereal Science*, vol. 57, n° 3, p. 480-485, mai 2013, doi: 10.1016/j.jcs.2013.02.002.
- [150] I. Dini, G. C. Tenore, et A. Dini, « Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties », *Food Chemistry*, vol. 113, n° 2, p. 411-419, mars 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.053.
- [151] J. Li *et al.*, « Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity », *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, n° 4, p. 637-643, oct. 2010, doi: 10.1016/j.ifset.2010.06.004.
- [152] A. Estrada, G. S. Katselis, B. Laarveld, et B. Barl, « Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. », *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 23, n° 1, p. 27-43, janv. 2000, doi: 10.1016/S0147-9571(99)00020-X.
- [153] Q. Wang *et al.*, « Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice », *Phytother Res*, vol. 24, n° 12, p. 1748-1754, déc. 2010, doi: 10.1002/ptr.3130.
- [154] E.-H. Joh, I.-A. Lee, et D.-H. Kim, « Kalopanaxsaponins A and B isolated from *Kalopanax pictus* ameliorate memory deficits in mice », *Phytother Res*, vol. 26, n° 4, p. 546-551, avr. 2012, doi: 10.1002/ptr.3596.
- [155] S.-W. Hong, H. Heo, J. Yang, M. Han, D.-H. Kim, et Y. K. Kwon, « Soyasaponin I improved neuroprotection and regeneration in memory deficient model rats », *PLoS One*, vol. 8, n° 12, p. e81556, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0081556.
- [156] A. Shkondrov, I. Krasteva, F. Bucar, O. Kunert, M. Kondeva-Burdina, et I. Ionkova, « A new tetracyclic saponin from *Astragalus glycyphyllos* L. and its neuroprotective and hMAO-B inhibiting activity », *Natural Product Research*, vol. 34, n° 4, p. 511-517, févr. 2020, doi: 10.1080/14786419.2018.1491040.
- [157] M. Kondeva-Burdina, I. Krasteva, G. Popov, et V. Manov, « Neuroprotective and antioxidant activities of saponins' mixture from *Astragalus glycyphylloides* in a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on isolated rat brain synaptosomes », *Pharmacia*, vol. 66(4), p. 233-236, déc. 2019, doi: 10.3897/pharmacia.66.e37997.
- [158] S. Samaddar, « OLEANANE-TYPE TRITERPENOID SAPONIN OF *MOMORDICA CYMBALARIA* EXHIBITS NEUROPROTECTIVE ACTIVITY IN DIABETIC PERIPHERAL NEUROPATHY BY AFFECTING THE POLYOL PATHWAY », *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 7, p. 618-625, févr. 2016, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(2).618-25.
- [159] Y.-H. Qian, Y. Liu, H.-T. Hu, H.-M. Ren, X.-L. Chen, et J.-H. Xu, « The effects of the total saponin of *Dipsacus asperoides* on the damage of cultured neurons induced by beta-amyloid protein 25-35 », *Anat Sci Int*, vol. 77, n° 3, p. 196-200, sept. 2002, doi: 10.1046/j.0022-7722.2002.00029.x.
- [160] M. I. Khan *et al.*, « Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Isolated Saponin Due to the Amelioration of Tauopathy and Alleviation of Neuroinflammation: A Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease », *Molecules*, vol. 27, n° 7, Art. n° 7, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27072079.
- [161] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, et H. Gruppen, « Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom », *Phytochemistry*, vol. 68, n° 3, p. 275-297, févr. 2007, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008.



- [162] I. Dineva, I. Krasteva, M. Berger, et S. Konstantinov, « In vitro antineoplastic activity of some cyto-reductive drugs versus new compounds of plant origin », *International Journal of Current Chemistry*, vol. 1, n° 4, p. 281-290, 2010.
- [163] L. Verotta *et al.*, « Cycloartane and Oleanane Saponins from Egyptian Astragalus spp. as Modulators of Lymphocyte Proliferation », *Planta medica*, vol. 68, p. 986-94, déc. 2002, doi: 10.1055/s-2002-35654.
- [164] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, et R. Sulaiman, « Extraction and quantification of saponins: A review », *Food Research International*, vol. 59, p. 16-40, mai 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.
- [165] S.-Y. Chang, M. J. Han, E.-H. Joh, et D.-H. Kim, « Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of soyasaponin Ab metabolites by human fecal microflora », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 52, n° 5, p. 752-756, sept. 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.011.
- [166] K. Decroos, J. P. Vincken, L. Heng, R. Bakker, H. Gruppen, et W. Verstraete, « Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection », *J Chromatogr A*, vol. 1072, n° 2, p. 185-193, avr. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.03.021.
- [167] J. Hu, S.-O. Lee, S. Hendrich, et P. A. Murphy, « Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography », *J Agric Food Chem*, vol. 50, n° 9, p. 2587-2594, avr. 2002, doi: 10.1021/jf0114740.
- [168] J. KINJO *et al.*, « HPLC Profile Analysis of Oleanene-Glucuronides in Several Edible Beans », *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 62, n° 3, p. 429-433, janv. 1998, doi: 10.1271/bbb.62.429.
- [169] « Saponin and Sapogenol. XXXII. Chemical Constituents of the Seeds of *Vigna angularis* (WILLD.) OHWI et OHASHI. (2). Azukisaponins I, II, III, and IV ». [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/31/2/31\\_2\\_674/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/31/2/31_2_674/_article) (consulté le 12 mai 2023).
- [170] T. Iida, Y. Yoshiki, K. Okubo, H. Ohroi, J. Kinjo, et T. Nohara, « Triterpenoid saponins from *Vigna angularis* », *Phytochemistry*, vol. 51, n° 8, p. 1055-1058, août 1999, doi: 10.1016/S0031-9422(99)00148-X.
- [171] L. Pistelli, I. Giachi, E. Lepori, et A. Bertoli, « Further Saponins and Flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris », *Pharmaceutical Biology*, vol. 41, n° 8, p. 568-572, janv. 2003, doi: 10.1080/13880200390501370.
- [172] H. Zhang, R. Liu, H. Li, et F. Zhou, « Purification and Separation of Astragalosides from *Astragalus membranaceus* Hairy Roots », *Chem Nat Compd*, vol. 57, n° 5, p. 978-981, sept. 2021, doi: 10.1007/s10600-021-03530-8.
- [173] V. U. Ahmad, F. V. Mohammad, et R. B. Tareen, « Laceioside, a new cycloartane saponin from *Astragalus tephrosioides* Boiss. var. lacei (Ali) Kirchoff. », *Natural Product Research*, vol. 33, n° 3, p. 393-399, févr. 2019, doi: 10.1080/14786419.2018.1455042.
- [174] J. Azmir *et al.*, « Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review », *Journal of Food Engineering*, vol. 117, n° 4, p. 426-436, août 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [175] L. Wang et C. L. Weller, « Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 17, n° 6, p. 300-312, juin 2006, doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.
- [176] M. Y. Heng, S. N. Tan, J. W. H. Yong, et E. S. Ong, « Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 50, p. 1-10, oct. 2013, doi: 10.1016/j.trac.2013.03.012.
- [177] C. P. Trentini, D. M. Oliveira, C. M. Zanette, et C. da Silva, « Low-pressure solvent extraction of oil from macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp: characterization of oil and defatted meal », *Cienc. Rural*, vol. 46, n° 4, p. 725-731, janv. 2016, doi: 10.1590/0103-8478cr20150740.
- [178] C. Reichardt et T. Welton, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, 2010.
- [179] T.-C. Cheng, J.-F. Lu, J.-S. Wang, L.-J. Lin, H.-I. Kuo, et B.-H. Chen, « Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, n° 20, p. 11319-11329, oct. 2011, doi: 10.1021/jf2018758.
- [180] S. T. Lee, R. B. Mitchell, Z. Wang, C. Heiss, D. R. Gardner, et P. Azadi, « Isolation, Characterization, and Quantification of Steroidal Saponins in Switchgrass (*Panicum*

- virgatum L.) », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n° 6, p. 2599-2604, mars 2009, doi: 10.1021/jf803907y.
- [181] S. G. Verza *et al.*, « Immunoadjuvant Activity, Toxicity Assays, and Determination by UPLC/Q-TOF-MS of Triterpenic Saponins from *Chenopodium quinoa* Seeds », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, n° 12, p. 3113-3118, mars 2012, doi: 10.1021/jf205010c.
- [182] H.-J. Bart, « Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction », in *Industrial Scale Natural Products Extraction*, John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-25. doi: 10.1002/9783527635122.ch1.
- [183] « Appareil de soxhlet animation », *Appareil de soxhlet animation*. <http://chariotelevateur.blogspot.com/2017/09/appareil-de-soxhlet-animation.html> (consulté le 17 octobre 2021).
- [184] Z. Bialy, M. Jurzysta, M. Mella, et A. Tava, « Triterpene Saponins from Aerial Parts of *Medicago arabica* L. », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n° 5, p. 1095-1099, mars 2004, doi: 10.1021/jf030446+.
- [185] Z. Bialy, M. Jurzysta, M. Mella, et A. Tava, « Triterpene Saponins from the Roots of *Medicago hybrida* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n° 7, p. 2520-2526, avr. 2006, doi: 10.1021/jf0581628.
- [186] B. Ncube, V. N. P. Ngunge, J. F. Finnie, et J. Van Staden, « A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 134, n° 3, p. 775-780, avr. 2011, doi: 10.1016/j.jep.2011.01.039.
- [187] A. C. Soria et M. Villamiel, « Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, n° 7, p. 323-331, juill. 2010, doi: 10.1016/j.tifs.2010.04.003.
- [188] « PII: S1350-4177(01)00071-2 | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1350417701000712?token=CAC7D3779267118ABC1E068BC67DDE8864DCE344811889D917C3D330E91586FB31F48B814465AF85D91C466FACE698BC&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010130535> (consulté le 10 octobre 2021).
- [189] « doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014 | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1466856407001245?token=7811F43BFF4DD89CE216078ED918BB7DEEA60B55C5735B1B67E2B336F743AB7C37A5570752BF2F411BB1323FCE1BF845&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010130850> (consulté le 10 octobre 2021).
- [190] « Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0926669013003610?token=C05A6F9C8369B4E9B762D3FB748E1F6996D8DAF6AFE44CAEE637EC9742AB749A3C00E236A325AA4DAF543815B7D498F9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010131359> (consulté le 10 octobre 2021).
- [191] « Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0260877409000703?token=8F745838CA72B691BF5F40BD24157D8030569559553679808C6C4CB262A3AD7A025E797AAAA6AACA B1F9D3BAA1B6DFA2&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010131425> (consulté le 10 octobre 2021).
- [192] H.-F. Zhang, X.-H. Yang, et Y. Wang, « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, n° 12, p. 672-688, déc. 2011, doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.003.
- [193] T. Takeuchi, C. G. Pereira, M. E. Braga, M. R. Maróstica, P. F. Leal, et M. A. Meireles, « Low-Pressure Solvent Extraction (Solid, Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants », *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*, p. 137-218, déc. 2008, doi: 10.1201/9781420062397.ch4.
- [194] W. Routray et V. Orsat, « Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review », *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, n° 2, p. 409-424, févr. 2012, doi: 10.1007/s11947-011-0573-z.
- [195] Ö. Güçlü-Üstündağ et G. Mazza, « Saponins: Properties, Applications and Processing », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, n° 3, p. 231-258, mars 2007, doi: 10.1080/10408390600698197.
- [196] « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions | Elsevier Enhanced Reader ».

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S092422441100149X?token=855C6CBBDA8B765C1DBA5C8609A6D880DBC8DAF49F449F1694DCD10DFFD11CD07A7FE7CAC5B687AB1B9F6DEF69B19F71&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010132634> (consulté le 10 octobre 2021).

- [197] « Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0003267011009597?token=9F5355FAE497AF025242D20A79A3BF0974D31BBDF0AB3BB50258F986108EB680988D25791952DD11B5835591A87FF127&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010133840> (consulté le 10 octobre 2021).
- [198] « Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation | SpringerLink ». [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-624-1\\_4](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-624-1_4) (consulté le 10 octobre 2021).
- [199] « Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021967312003871?token=885F72398B151D0B29261F7BB1187D1992674B22C1E05B28AEAF21A6C9AF520541B7193C1499B12B15DA07B84E591A64&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010134345> (consulté le 10 octobre 2021).
- [200] Z. M. Qian, J. Lu, Q. P. Gao, et S. P. Li, « Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium Ginseng and Radix Ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, n° 18, p. 3825-3830, mai 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.02.065.
- [201] J. Wan, Q. Zhang, W. Ye, et Y. Wang, « Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from Panax notoginseng with macroporous resins », *Separation and Purification Technology*, vol. 60, n° 2, p. 198-205, avr. 2008, doi: 10.1016/j.seppur.2007.08.007.
- [202] J. B. Wan, C. M. Lai, S. P. Li, M. Y. Lee, L. Y. Kong, et Y. T. Wang, « Simultaneous determination of nine saponins from Panax notoginseng using HPLC and pressurized liquid extraction », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, n° 1, p. 274-279, avr. 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2005.10.023.
- [203] B. Avula, Y.-H. Wang, C. S. Rumalla, Z. Ali, T. J. Smillie, et I. A. Khan, « Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, n° 5, p. 895-903, déc. 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.07.028.
- [204] R. M. Borges, S. S. Valença, A. A. Lopes, N. dos S. Barbi, et A. J. R. da Silva, « Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity », *Phytochemistry Letters*, vol. 6, n° 1, p. 96-100, févr. 2013, doi: 10.1016/j.phytol.2012.11.006.
- [205] M. Ganzera, J. Gampenrieder, R. S. Pawar, I. A. Khan, et H. Stuppner, « Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography », *Analytica Chimica Acta*, vol. 516, n° 1-2, p. 149-154, juill. 2004, doi: 10.1016/j.aca.2004.04.002.
- [206] Y. W. Ha, Y.-C. Na, J.-J. Seo, S.-N. Kim, R. J. Linhardt, et Y. S. Kim, « Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1135, n° 1, p. 27-35, nov. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.015.
- [207] X.-Y. Lian et Z. Zhang, « Quantitative analysis of gleditsia saponins in the fruits of *Gleditsia sinensis* Lam. by high performance liquid chromatography », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 75, p. 41-46, mars 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.007.
- [208] T. Zhang, H. Liu, X.-T. Liu, D. Xu, X. Chen, et Q. Wang, « Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, n° 1, p. 114-124, janv. 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2009.08.020.
- [209] A.-J. Lau, S.-O. Woo, et H.-L. Koh, « Analysis of saponins in raw and steamed *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with diode array detection », *Journal of Chromatography A*, vol. 1011, n° 1-2, p. 77-87, sept. 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)01135-X.

- [210] N. Boutaghane, L. Voutquenne-Nazabadioko, D. Harakat, A. Simon, et Z. Kabouche, « Triterpene saponins of *Genista ulicina* Spach », *Phytochemistry*, vol. 93, p. 176-181, sept. 2013, doi: 10.1016/j.phytochem.2013.03.020.
- [211] T. Zheng, G. Shu, Z. Yang, S. Mo, Y. Zhao, et Z. Mei, « Antidiabetic effect of total saponins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in type 2 diabetic rats », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, n° 3, p. 814-821, févr. 2012, doi: 10.1016/j.jep.2011.12.025.
- [212] T. J. Ha *et al.*, « Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean Leguminous species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC–PDA–ESI/MS) analysis », *Food Chemistry*, vol. 146, p. 270-277, mars 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.051.
- [213] H. He *et al.*, « Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 140, n° 1, p. 73-82, mars 2012, doi: 10.1016/j.jep.2011.12.024.
- [214] J.-C. Chen *et al.*, « Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* », *Phytochemistry*, vol. 70, n° 1, p. 133-140, janv. 2009, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.10.011.
- [215] L. Bi, X. Tian, F. Dou, L. Hong, H. Tang, et S. Wang, « New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis* », *Fitoterapia*, vol. 83, n° 1, p. 234-240, janv. 2012, doi: 10.1016/j.fitote.2011.11.002.
- [216] W. A. Oleszek, « Composition and Quantitation of Saponins in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Seedlings », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, n° 3, p. 960-962, mars 1998, doi: 10.1021/jf970766r.
- [217] I. Horo, E. Bedir, M. Masullo, S. Piacente, F. Özgökçe, et Ö. Alankuş-Çalışkan, « Saponins from *Astragalus hareftae* (NAB.) SIRJ. », *Phytochemistry*, vol. 84, p. 147-153, déc. 2012, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.015.
- [218] J. Linnek, A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, O. Duchamp, J.-F. Mirjolet, et M.-A. Lacaille-Dubois, « Cycloartane-type Glycosides from Two Species of *Astragalus* (Fabaceae) », *Natural Product Communications*, vol. 4, n° 4, p. 1934578X0900400, avr. 2009, doi: 10.1177/1934578X0900400406.
- [219] L. Maamria, C. Long, H. Haba, C. Lavaud, A. Cannac, et M. Benkhaled, « Cycloartane glycosides from *Astragalus gombo* », *Phytochemistry Letters*, vol. 11, p. 286-291, mars 2015, doi: 10.1016/j.phytol.2015.01.014.
- [220] V. U. Ahmad, F. V. Mohammad, et R. B. Tareen, « Laceioside, a new cycloartane saponin from *Astragalus tephrosioides* Boiss. var. *lacei* (Ali) Kirchoff. », *Natural Product Research*, vol. 33, n° 3, p. 393-399, févr. 2019, doi: 10.1080/14786419.2018.1455042.
- [221] M. Hirotni, Y. Zhou, H. Lui, et T. Furuya, « Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus* », *Phytochemistry*, vol. 36, n° 3, p. 665-670, juin 1994, doi: 10.1016/S0031-9422(00)89793-9.
- [222] F. Fathiazad, M. K. Khosropanah, et A. Movafeghi, « Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb. », *Natural Product Research*, vol. 24, n° 11, p. 1069-1078, juill. 2010, doi: 10.1080/14786410902975582.
- [223] H. Li, Y. Zhao, W. Yang, et Z. Zhang, « Characterization of astragaloside I-IV based on the separation of HPTLC from *Pleurotus ostreatus* cultivated with *Astragalus* », *J Food Sci*, vol. 85, n° 10, p. 3183-3190, oct. 2020, doi: 10.1111/1750-3841.15398.
- [224] C. Chu *et al.*, « Characterization of novel astragaloside malonates from *Radix Astragali* by HPLC with ESI quadrupole TOF MS », *Journal of Separation Science*, vol. 33, n° 4-5, p. 570-581, 2010, doi: 10.1002/jssc.200900687.
- [225] X. Q. Ma, Q. Shi, J. A. Duan, T. T. X. Dong, et K. W. K. Tsim, « Chemical Analysis of *Radix Astragali* (Huangqi) in China: A Comparison with Its Adulterants and Seasonal Variations », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n° 17, p. 4861-4866, août 2002, doi: 10.1021/jf0202279.
- [226] « Full article: Effect of astragaloside on cardiomyocyte apoptosis in murine coxsackievirus B3 myocarditis ». <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020412331286506> (consulté le 23 août 2022).
- [227] « *Astragalus membranaceus* : examen de sa protection contre l'inflammation et les cancers gastro-intestinaux | Le Journal américain de médecine chinoise ». <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X16500014> (consulté le 23 août 2022).

- [228] I. Horo, E. Bedir, M. Masullo, S. Piacente, F. Özgökçe, et Ö. Alankuş-Çalışkan, « Saponins from *Astragalus harefaetae* (NAB.) SIRJ. », *Phytochemistry*, vol. 84, p. 147-153, déc. 2012, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.015.
- [229] A. Shkondrov *et al.*, « Production of saponins from in vitro cultures of *Astragalus glycyphyllos* and their antineoplastic activity », *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 33, n° 1, p. 1413-1418, janv. 2019, doi: 10.1080/13102818.2019.1671222.
- [230] Q. T. Yu, P. Li, Z. M. Bi, J. Luo, et X. D. Gao, « Two new saponins from the aerial part of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* », *Chinese Chemical Letters*, vol. 18, n° 5, p. 554-556, mai 2007, doi: 10.1016/j.ccllet.2007.03.025.
- [231] E. Graf, « Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Von W. Tang und G. Eisenbrand. Springer-Verlag Berlin etc. 1992, X, 1056, S., 41 Abb. gebd. DM 248,00 », *Pharmazie in unserer Zeit*, vol. 21, n° 6, p. 281-281, 1992, doi: 10.1002/pauz.19920210612.
- [232] K. Guo *et al.*, « Cycloartane-type triterpenoids from *Astragalus hoantchy* French. », *Natural Product Research*, vol. 31, n° 3, p. 314-319, févr. 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1236100.
- [233] M. Mitcheva, M. Kondeva-Burdina, V. Vitcheva, I. Krasteva, et S. Nikolov, « Effect of Purified Saponin Mixture from *Astragalus corniculatus* on Toxicity Models in Isolated Rat Hepatocytes », *Pharmaceutical Biology*, vol. 46, n° 12, p. 866-870, janv. 2008, doi: 10.1080/13880200802367247.
- [234] K. Nafti, G. Giacinti, S. Marghali, et C. D. Raynaud, « Screening for *Astragalus hamosus* L. Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods: Prior Identification of Azukisaponin Isomers », *Molecules*, vol. 27, n° 17, Art. n° 17, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27175376.
- [235] M. F. Striegel et J. Hill, *Thin-layer chromatography for binding media analysis*. in Scientific tools for conservation. Los Angeles: Getty Conservation Institute, 1996.
- [236] « Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry S. Mitra, ed., John Wiley & Sons, 2003, 488 pp., hard cover | Sigma-Aldrich ». <http://www.sigmaaldrich.com/> (consulté le 14 octobre 2021).
- [237] « The Book Corner », *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, vol. 28, n° 2, p. 169-172, avr. 2007, doi: 10.1080/15321810701212104.
- [238] E. Hahn-Deinstrop, *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*, 1<sup>re</sup> éd. Wiley, 2006. doi: 10.1002/9783527610259.
- [239] T. Do, « Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels », 2016.
- [240] « Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach », *Routledge & CRC Press*. <https://www.routledge.com/Practical-Thin-Layer-Chromatography-A-Multidisciplinary-Approach/Fried-Sherma/p/book/9780849326608> (consulté le 14 octobre 2021).
- [241] C. F. Poole, H. T. Butler, M. E. Coddens, et S. A. Schuette, « Instrumental Evaluation of Thin-Layer Chromatograms », in *Analytical and Chromatographic Techniques in Radiopharmaceutical Chemistry*, D. M. Wieland, M. C. Tobes, et T. J. Manger, Éd., New York, NY: Springer, 1986, p. 3-37. doi: 10.1007/978-1-4612-4854-5\_1.
- [242] « Système HPTLC Vario System », VWR. <https://ch.vwr.com/store/product/fr/2103197/systeme-hptlc-vario-system> (consulté le 14 octobre 2021).
- [243] « 9788123918372: High Performance Thin Layer Chromatography In Food Analysis (Hb) - AbeBooks - Jaiswal: 8123918372 ». <https://www.abebooks.com/9788123918372/High-Performance-Thin-Layer-Chromatography-8123918372/plp> (consulté le 14 octobre 2021).
- [244] P. E. Wall, *Thin-Layer Chromatography*. 2005. doi: 10.1039/9781847552464.
- [245] M. F. Chaplin et J. F. Kennedy, *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Oxford; Washington, DC: IRL Press, 1986.
- [246] « CAMAG® AMD 2 System Automated Multiple Development ». <https://www.camag.com/product/camag-amd-2-system-automated-multiple-development> (consulté le 14 octobre 2021).
- [247] « Application Notes ». <https://www.camag.com/applications/application-Notes> (consulté le 14 octobre 2021).
- [248] « Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach By Peter E. Wall. Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2005. x + 184 pp. £69.95. ISBN: 0-85404-535-x. », *Org. Process Res. Dev.*, vol. 10, n° 4, p. 849-849, juill. 2006, doi: 10.1021/op0600658.

- [249] « Sherma 2003- Handbook of Thin Layer Chromatography - DocShare.tips ». [https://docshare.tips/sherma-2003-handbook-of-thin-layer-chromatography\\_58b46fffb6d87fc13f8b4b31.html](https://docshare.tips/sherma-2003-handbook-of-thin-layer-chromatography_58b46fffb6d87fc13f8b4b31.html) (consulté le 15 octobre 2021).
- [250] « HPTLC Method Development and Validation | PDF », *Scribd*. <https://www.scribd.com/doc/213938657/hptlc-method-development-and-validation> (consulté le 15 octobre 2021).
- [251] « Chromatographic Methods 5th Edition (A. Braithwaite & F. J. Smith) - LIVRO EM INGLÊS - Docsity ». <https://www.docsity.com/pt/chromatographic-methods-5th-edition-a-braithwaite-f-j-smith/4749720/> (consulté le 15 octobre 2021).
- [252] H. Wagner et S. Bladt, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media, 1996.
- [253] D. H. C. Andola, « High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical tool for Biological Analysis », p. 4.
- [254] M. Srivastava, Éd., *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-14025-9.
- [255] « Handbook of Analytical Derivatization Reactions | Wiley », *Wiley.com*. <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Analytical+Derivatization+Reactions-p-9780471034698> (consulté le 15 octobre 2021).
- [256] « 1: généralités; 2: l'évaluation par l'opérateur; 3: l'analyse d'image; 4: la densitométrie en absorbance et en fluorescence; 5: la conclusion. - PDF Free Download ». <https://docplayer.fr/1726040-1-generalites-2-l-evaluation-par-l-operateur-3-l-analyse-d-image-4-la-densitometrie-en-absorbance-et-en-fluorescence-5-la-conclusion.html> (consulté le 15 octobre 2021).
- [257] B. Khakimov, L. Tseng, M. Godejohann, S. Bak, et S. Engelsen, « Screening for Triterpenoid Saponins in Plants Using Hyphenated Analytical Platforms », *Molecules*, vol. 21, n° 12, p. 1614, nov. 2016, doi: 10.3390/molecules21121614.
- [258] N. Kambouche, B. Merah, A. Derdour, S. Bellahouel, C. Younos, et R. Soulimani, « Activité antihyperglycémique d'un stérol  $\beta$ -sitoglucoside isolé de la plante *Anabasis articulata* (Forssk) Moq », *Phytothérapie*, vol. 9, n° 1, p. 2-6, févr. 2011, doi: 10.1007/s10298-010-0603-4.
- [259] S. Hiai, H. Oura, et T. Nakajima, « COLOR REACTION OF SOME SAPOGENINS AND SAPONINS WITH VANILLIN AND SULFURIC ACID », *Planta Med*, vol. 29, n° 02, p. 116-122, mars 1976, doi: 10.1055/s-0028-1097639.
- [260] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, et C. Berset, « Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity », *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, n° 1, p. 25-30, janv. 1995, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- [261] I. K. Rhee, M. van de Meent, K. Ingkaninan, et R. Verpoorte, « Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining », *Journal of Chromatography A*, vol. 915, n° 1, p. 217-223, avr. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00624-0.
- [262] J. W. Tan et M. K. Kim, « Neuroprotective Effects of Biochanin A against  $\beta$ -Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via a Mitochondrial-Dependent Apoptosis Pathway », *Molecules*, vol. 21, n° 5, Art. n° 5, mai 2016, doi: 10.3390/molecules21050548.
- [263] B. A. Yankner, L. R. Dawes, S. Fisher, L. Villa-Komaroff, M. L. Oster-Granite, et R. L. Neve, « Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease », *Science*, vol. 245, n° 4916, p. 417-420, juill. 1989, doi: 10.1126/science.2474201.
- [264] T. Mosmann, « Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays », *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, n° 1, p. 55-63, déc. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [265] A. Zoghalmi et M. Zouaghi, « Morphological variation in *Astragalus hamosus* L. L. and *Coronilla scorpioides* L. populations of Tunisia », *Euphytica*, vol. 134, n° 2, p. 137-147, 2003, doi: 10.1023/B:EUPH.0000003881.85977.10.
- [266] A. Hakim, Tajuddin, A. Ghufran, et J. Nasreen, « Evaluation of anti-inflammatory activity of the pods of *Iklil-ul-Malik* (*Astragalus hamosus* L. Linn.) », *undefined*, 2010, Consulté le: 25 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-anti-inflammatory-activity-of-the-of-Hakim-Tajuddin/5d16b0f0b17b4e9389b7a7ea59e529ee2efffcdb>
- [267] A. Shojaii, M. Motaghinejad, S. Norouzi, et M. Motevalian, « Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of the Extract and Fractions of *Astragalus hamosus* L. in Animal Models », *Iran J Pharm Res*, vol. 14, n° 1, p. 263-269, 2015.

- [268] A. Shkondrov et I. Krasteva, « Liquid chromatography – high resolution mass spectrometry screening of *Astragalus hamosus* L. and *Astragalus corniculatus* », *PHAR*, vol. 68, n° 1, p. 135-139, janv. 2021, doi: 10.3897/pharmacia.68.e60621.
- [269] A. Hamed, M. M. Zarshenas, et M. Sohrabpour, « Phytochemical assessments of *Astragalus hamosus* L. pods (Iklil-ul-Malik) », *Trends in Pharmaceutical Sciences*, vol. 2, p. 77-84, mars 2016.
- [270] « Activités biologiques et distribution des saponines végétales - ScienceDirect ». <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002557> (consulté le 27 avril 2023).
- [271] A. Osbourn, R. J. M. Goss, et R. A. Field, « The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities », *Nat Prod Rep*, vol. 28, n° 7, p. 1261-1268, juill. 2011, doi: 10.1039/c1np00015b.
- [272] M. Ligor, A. Kiełbasa, I.-A. Ratiu, et B. Buszewski, « Separation and Quantification of Selected Sapogenins Extracted from Nettle, White Dead-Nettle, Common Soapwort and Washnut », *Molecules*, vol. 26, n° 24, Art. n° 24, janv. 2021, doi: 10.3390/molecules26247705.
- [273] A. Estrada, G. S. Katselis, B. Laarveld, et B. Barl, « Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. », *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 23, n° 1, p. 27-43, janv. 2000, doi: 10.1016/S0147-9571(99)00020-X.
- [274] R. R. T. Majinda, « Extraction and Isolation of Saponins », in *Natural Products Isolation*, S. D. Sarker et L. Nahar, Éd., in *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, p. 415-426. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1\_16.
- [275] W. Oleszek et Z. Bialy, « Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005) », *Journal of Chromatography A*, vol. 1112, n° 1, p. 78-91, avr. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.037.
- [276] D. V. Huhman, M. A. Berhow, et L. W. Sumner, « Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula* », *J Agric Food Chem*, vol. 53, n° 6, p. 1914-1920, mars 2005, doi: 10.1021/jf0482663.
- [277] « Separations | Free Full-Text | Recent Advances in Separation and Analysis of Saponins in Natural Products ». <https://www.mdpi.com/2297-8739/9/7/163> (consulté le 27 avril 2023).
- [278] E. Shawky et S. M. Sallam, « Simultaneous Determination of Soyasaponins and Isoflavones in Soy (*Glycine max* L.) Products by HPTLC-densitometry-Multiple Detection », *Journal of Chromatographic Science*, vol. 55, n° 10, p. 1059-1065, nov. 2017, doi: 10.1093/chromsci/bmx062.
- [279] R. Gaceb-Terrak et F. Rahmania, « Détection et identification de saponines stéroïdes de type spirostane chez le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae) », *Acta Botanica Gallica*, vol. 159, n° 4, p. 477-483, déc. 2012, doi: 10.1080/12538078.2012.758496.
- [280] X. Q. Ma, Q. Shi, J. A. Duan, T. T. X. Dong, et K. W. K. Tsim, « Chemical Analysis of *Radix Astragali* (Huangqi) in China: A Comparison with Its Adulterants and Seasonal Variations », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n° 17, p. 4861-4866, août 2002, doi: 10.1021/jf0202279.
- [281] G. Giacinti, C. Raynaud, S. Capblancq, et V. Simon, « Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1483, p. 8-19, févr. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2016.12.056.
- [282] P. Kaltbach, « New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea », *Journal of Food Composition and Analysis*, p. 11, 2020.
- [283] T. Mad, H. Sterk, M. Mittelbach, et G. N. Rechberger, « Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa* », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, n° 6, p. 795-806, juin 2006, doi: 10.1016/j.jasms.2006.02.013.
- [284] M. A. da Silva, V. Calabrese, J. Schmitt, D. Celebi, J. L. Scott, et K. J. Edler, « Alcohol induced gelation of TEMPO-oxidized cellulose nanofibril dispersions », *Soft Matter*, vol. 14, n° 45, p. 9243-9249, nov. 2018, doi: 10.1039/C8SM01815D.
- [285] L. Filipe-Ribeiro, J. Milheiro, C. C. Matos, F. Cosme, et F. M. Nunes, « Data on changes in red wine phenolic compounds, headspace aroma compounds and sensory profile after treatment of red wines with activated carbons with different physicochemical characteristics », *Data in Brief*, vol. 12, p. 188-202, juin 2017, doi: 10.1016/j.dib.2017.03.055.
- [286] M. Masomian, R. Rahman, et A. Salleh, « A Novel Method of Affinity Tag Cleavage in the Purification of a Recombinant Thermostable Lipase from *Aneurinibacillus*

- thermoaerophilus Strain HZ », *Catalysts*, vol. 8, p. 479, oct. 2018, doi: 10.3390/catal8100479.
- [287] R. L. Munier et A. M. Drapier, « Nouvelles méthodes de séparation et comportement des alcaloïdes en chromatographie en milieux très polaires, neutres ou acides, sur gel de silice non modifié (1ère partie) », *Chromatographia*, vol. 10, n° 5, p. 226-232, mai 1977, doi: 10.1007/BF02274471.
- [288] R. MUNIER et D. AM, « NOUVELLES METHODES DE SEPARATION ET COMPORTEMENT DES ALCALOÏDES EN CHROMATOGRAPHIE EN MILIEUX TRES POLAIRES, NEUTRES OU ACIDES, SUR GEL DE SILICE NON MODIFIE. II. », *NOUVELLES METHODES DE SEPARATION ET COMPORTEMENT DES ALCALOÏDES EN CHROMATOGRAPHIE EN MILIEUX TRES POLAIRES, NEUTRES OU ACIDES, SUR GEL DE SILICE NON MODIFIE. II.*, 1977.
- [289] H. T. Nguyen *et al.*, « Evaluation of the Saponin Content in *Panax vietnamensis* Acclimatized to Lam Dong Province by HPLC–UV/CAD », *Molecules*, vol. 26, n° 17, p. 5373, sept. 2021, doi: 10.3390/molecules26175373.
- [290] G. G. Jiménez, A. G. Durán, F. A. Macías, et A. M. Simonet, « Structure, Bioactivity and Analytical Methods for the Determination of *Yucca* Saponins », *Molecules*, vol. 26, n° 17, p. 5251, août 2021, doi: 10.3390/molecules26175251.
- [291] N. A. Andriamasinoro, « Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques », p. 176.
- [292] S.-M. Lee, J.-S. Jeong, H.-J. Kwon, et S.-P. Hong, « Quantification of isoflavonoids and triterpene saponins in *Astragali Radix*, the root of *Astragalus membranaceus*, via reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled with integrated pulsed amperometric detection », *Journal of Chromatography B*, vol. 1070, p. 76-81, déc. 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.046.
- [293] R. Arumugam, B. Kirkan, et C. Sarikurkcü, « Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall. », *South African Journal of Botany*, vol. 120, p. 268-273, janv. 2019, doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.002.
- [294] C. Sarikurkcü et G. Zengin, « Polyphenol Profile and Biological Activity Comparisons of Different Parts of *Astragalus macrocephalus* subsp. *finitimus* from Turkey », *Biology (Basel)*, vol. 9, n° 8, p. 231, août 2020, doi: 10.3390/biology9080231.
- [295] O. Babich, A. Prosekov, A. Zaushintsena, A. Sukhikh, L. Dyshlyuk, et S. Ivanova, « Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions », *Heliyon*, vol. 5, n° 8, p. e02245, août 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02245.
- [296] Z. Sheng, Y. Jiang, J. Liu, et B. Yang, « UHPLC–MS/MS Analysis on Flavonoids Composition in *Astragalus membranaceus* and Their Antioxidant Activity », *Antioxidants*, vol. 10, n° 11, Art. n° 11, nov. 2021, doi: 10.3390/antiox10111852.
- [297] A. ADIGÜZEL, M. SÖKMEN, H. ÖZKAN, G. AĞAR, M. GÜLLÜCE, et F. ŞAHİN, « In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Methanol and Hexane Extract of *Astragalus* Species Growing in the Eastern Anatolia Region of Turkey », *Turkish Journal of Biology*, vol. 33, n° 1, p. 65-71, janv. 2009, doi: 10.3906/biy-0805-1.
- [298] H. Teyeb *et al.*, « Biological and Chemical Study of *Astragalus gombiformis* », *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 67, n° 7-8, p. 367-374, août 2012, doi: 10.1515/znc-2012-7-803.
- [299] S. Benferdia *et al.*, « Phytochemical composition and antioxidant activity of Algerian *Astragalus gombo* stems », p. 6.
- [300] H. Wu *et al.*, « Quality Evaluation of *Astragali Radix* based on DPPH Radical Scavenging Activity and Chemical Analysis », *Chinese Herbal Medicines*, vol. 6, n° 4, p. 282-289, nov. 2014, doi: 10.1016/S1674-6384(14)60043-5.
- [301] A. Labed *et al.*, « Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities », *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, n° 12, p. 3026-3032, déc. 2016, doi: 10.1080/13880209.2016.1200632.
- [302] M. P. de Torre, R. Y. Caverro, et M. I. Calvo, « Anticholinesterase Activity of Selected Medicinal Plants from Navarra Region of Spain and a Detailed Phytochemical Investigation of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* », *Molecules*, vol. 27, n° 20, Art. n° 20, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27207100.
- [303] « fphar-09-01192-t001.jpg (1156×6421) ». [https://www.frontiersin.org/files/Articles/387238/fphar-09-01192-HTML/image\\_m/fphar-09-01192-t001.jpg](https://www.frontiersin.org/files/Articles/387238/fphar-09-01192-HTML/image_m/fphar-09-01192-t001.jpg) (consulté le 1 septembre 2022).

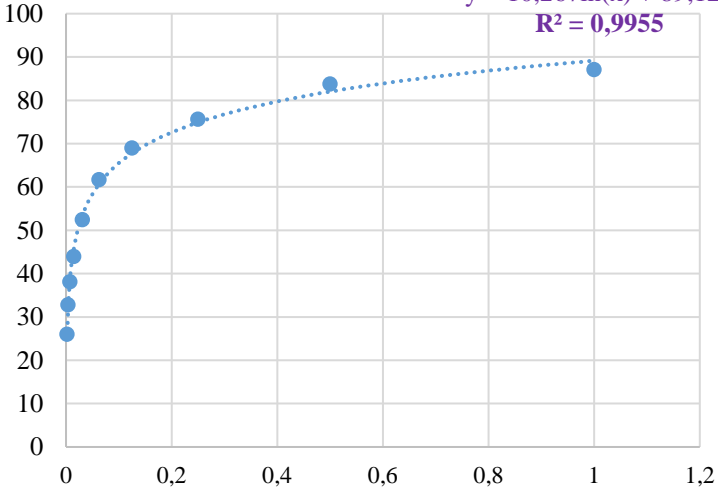


- [304] H. Teyeb, H. Mabrouk, M. Neffati, W. Douki, et M. F. Najjar, « Anticholinesterase Activity of *Astragalus gombiformis* Extracts », *Journal of Biologically Active Products from Nature*, vol. 1, n° 5-6, p. 344-348, janv. 2011, doi: 10.1080/22311866.2011.10719103.
- [305] S. Lekmine *et al.*, « Ultrasound-Assisted Extraction, LC–MS/MS Analysis, Anticholinesterase, and Antioxidant Activities of Valuable Natural Metabolites from *Astragalus armatus* Willd.: In Silico Molecular Docking and In Vitro Enzymatic Studies », *Antioxidants*, vol. 11, n° 10, p. 2000.
- [306] M. Wink, « Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine », 2008. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2008/00000009/00000010/art00002> (consulté le 13 mars 2023).
- [307] T. L. Riss *et al.*, « Cell Viability Assays », in *Assay Guidance Manual [Internet]*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Consulté le: 17 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [308] « Culture\_cellules\_animales.pdf ». Consulté le: 17 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: [http://eric.vinas.free.fr/IMG/pdf/Culture\\_cellules\\_animales.pdf](http://eric.vinas.free.fr/IMG/pdf/Culture_cellules_animales.pdf)
- [309] E. Fournier, L. Etienne-Mesmin, S. Blanquet-Diot, et M. Mercier-Bonin, « Microplastiques dans notre alimentation: un focus sur la santé intestinale », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 57, n° 4, p. 270-283, août 2022, doi: 10.1016/j.cnd.2022.03.001.
- [310] J. Keemink et C. A. S. Bergström, « Caco-2 Cell Conditions Enabling Studies of Drug Absorption from Digestible Lipid-Based Formulations », *Pharm Res*, vol. 35, n° 4, p. 74, févr. 2018, doi: 10.1007/s11095-017-2327-8.
- [311] S. Sadeghi Ekbatan *et al.*, « Absorption and Metabolism of Phenolics from Digests of Polyphenol-Rich Potato Extracts Using the Caco-2/HepG2 Co-Culture System », *Foods*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, janv. 2018, doi: 10.3390/foods7010008.
- [312] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, et F. L. Graham, « Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells », *The FASEB Journal*, vol. 16, n° 8, p. 869-871, 2002, doi: 10.1096/fj.01-0995fje.
- [313] L. Abaandou, D. Quan, et J. Shiloach, « Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes », *Cells*, vol. 10, n° 7, Art. n° 7, juill. 2021, doi: 10.3390/cells10071667.
- [314] M. I. Khan *et al.*, « Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Isolated Saponin Due to the Amelioration of Tauopathy and Alleviation of Neuroinflammation: A Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease », *Molecules*, vol. 27, n° 7, p. 2079, mars 2022, doi: 10.3390/molecules27072079.
- [315] Y.-Q. Zhou, Z.-L. Yang, L. Xu, P. Li, et Y.-Z. Hu, « Akebia saponin D, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity », *Cell Biol Int*, vol. 33, n° 10, p. 1102-1110, oct. 2009, doi: 10.1016/j.cellbi.2009.06.028.
- [316] R. Yue *et al.*, « Astragaloside IV Attenuates Glutamate-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells through Raf-MEK-ERK Pathway », *PLOS ONE*, vol. 10, p. e0126603, mai 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126603.
- [317] T. J. Makhafola *et al.*, « Apoptosis in Cancer Cells Is Induced by Alternative Splicing of hnRNPA2/B1 Through Splicing of Bcl-x, a Mechanism that Can Be Stimulated by an Extract of the South African Medicinal Plant, *Cotyledon orbiculata* », *Frontiers in Oncology*, vol. 10, 2020, Consulté le: 11 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.547392>
- [318] P. H. Mfengwana, S. S. Mashele, et I. T. Manduna, « Cytotoxicity and cell cycle analysis of *Asparagus laricinus* Burch. and *Senecio asperulus* DC. on breast and prostate cancer cell lines », *Heliyon*, vol. 5, n° 5, p. e01666, mai 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01666.
- [319] O. S. Soyngbe, N. I. Mongalo, et T. J. Makhafola, « In vitro antibacterial and cytotoxic activity of leaf extracts of *Centella asiatica* (L.) Urb, *Warburgia salutaris* (Bertol. F.) Chiov and *Curtisia dentata* (Burm. F.) C.A.Sm - medicinal plants used in South Africa », *BMC Complement Altern Med*, vol. 18, n° 1, p. 315, nov. 2018, doi: 10.1186/s12906-018-2378-3.
- [320] S. Zonyane, O. A. Fawole, C. la Grange, M. A. Stander, U. L. Opara, et N. P. Makunga, « The Implication of Chemotypic Variation on the Anti-Oxidant and Anti-Cancer Activities of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. (Fabaceae) from Different Geographic Locations », *Antioxidants*, vol. 9, n° 2, Art. n° 2, févr. 2020, doi: 10.3390/antiox9020152.
- [321] J. O. Unuofin, G. A. Otunola, et A. J. Afolayan, « In vitro  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase inhibitory and cytotoxic activities of tuber extracts of *Kedrostis africana* (L.) Cogn », *Heliyon*, vol. 4, n° 9, p. e00810, sept. 2018, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00810.

- [322] A. T. Mbaveng *et al.*, « Cytotoxic phytochemicals from the crude extract of *Tetrapleura tetrapleura* fruits towards multi-factorial drug resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 267, p. 113632, mars 2021, doi: 10.1016/j.jep.2020.113632.
- [323] A. T. Mbaveng, F. Damen, İ. Çelik, P. Tane, V. Kuete, et T. Efferth, « Cytotoxicity of the crude extract and constituents of the bark of *Fagara tessmannii* towards multi-factorial drug resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 235, p. 28-37, mai 2019, doi: 10.1016/j.jep.2019.01.031.
- [324] A. T. Mbaveng, H. T. Manekeng, G. S. Nguenang, J. K. Dzotam, V. Kuete, et T. Efferth, « Cytotoxicity of 18 Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multi-factorial drug resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 222, p. 21-33, août 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.04.036.
- [325] F. Meyer *et al.*, « Biological activities of plant extracts from *Ficus elastica* and *Selaginella vogelli*: an antimalarial, antitrypanosomal and cytotoxicity evaluation », 2018, doi: 10.1016/j.sjbs.2017.07.002.
- [326] E. Mfotie Njoya, A. M. Munvera, P. Mkounga, A. E. Nkengfack, et L. J. McGaw, « Phytochemical analysis with free radical scavenging, nitric oxide inhibition and antiproliferative activity of *Sarcocephalus pobeguini* extracts », *BMC Complement Altern Med*, vol. 17, n° 1, p. 199, avr. 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1712-5.
- [327] M. Potestà *et al.*, « Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam on lymphoid and monocytoid cells », *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 18, n° 1, p. 5-17, juill. 2019, doi: 10.3892/etm.2019.7544.
- [328] A.-M. Abudunia *et al.*, « Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers », *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 27, n° 1, p. 90-97, mars 2017, doi: 10.1016/j.mycmed.2016.11.002.
- [329] L. Belayachi *et al.*, « Induction of cell cycle arrest and apoptosis by *Ormenis eriolepis* a Moroccan endemic plant in various human cancer cell lines », *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 14, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.4314/ajtcam.v14i2.
- [330] S. Tesfaye *et al.*, « Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer; Part 3: Selective Cytotoxic Activity of 22 Plants against Human Cancer Cell Lines », *Molecules*, vol. 26, n° 12, Art. n° 12, janv. 2021, doi: 10.3390/molecules26123658.
- [331] A. G. Ahmed *et al.*, « Mustard Seed (*Brassica nigra*) Extract Exhibits Antiproliferative Effect against Human Lung Cancer Cells through Differential Regulation of Apoptosis, Cell Cycle, Migration, and Invasion », *Molecules*, vol. 25, n° 9, Art. n° 9, janv. 2020, doi: 10.3390/molecules25092069.
- [332] W. R. Sawadogo, Y. Luo, B. Elkington, T.-C. He, C.-Z. Wang, et C.-S. Yuan, « Cytotoxicity and Preliminary Analysis of the Pro-apoptotic and Cell Cycle Arrest Effects of *Lantana ukambensis* Against Colorectal Cancer Cells », *Int J Appl Biol Pharm*, vol. 11, n° 3, p. 170-187, 2020.
- [333] D. O. Ochwang'i, C. N. Kimwele, J. A. Oduma, P. K. Gathumbi, S. G. Kiama, et T. Efferth, « Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 215, p. 233-240, avr. 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.01.004.

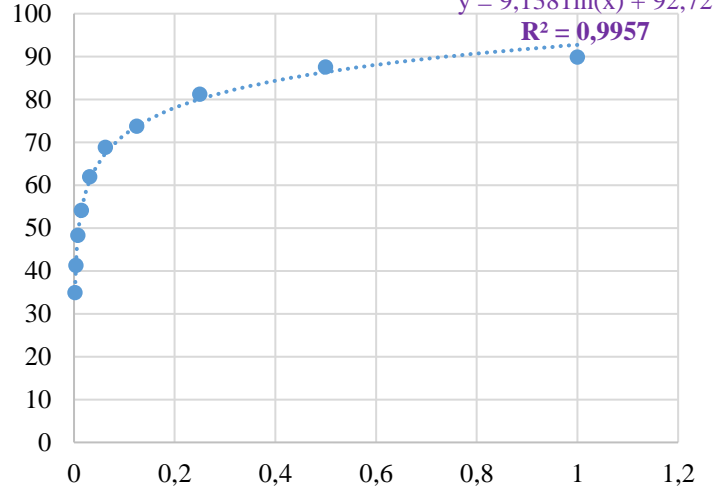
Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 0 seconde

$$y = 10,267\ln(x) + 89,129$$
$$R^2 = 0,9955$$



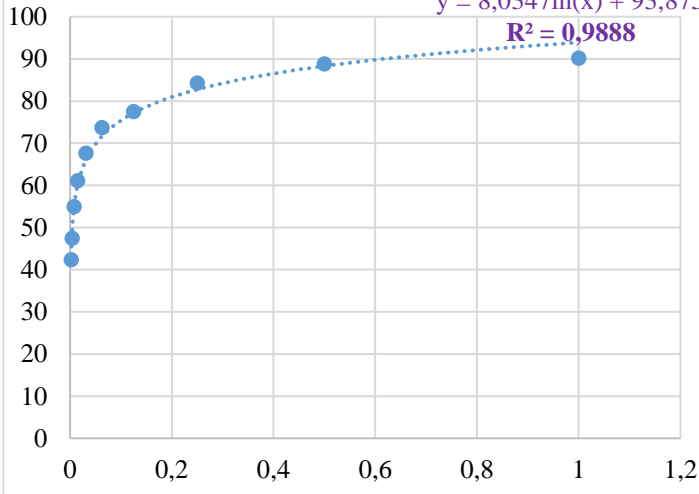
Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 42 seconde

$$y = 9,1381\ln(x) + 92,72$$
$$R^2 = 0,9957$$



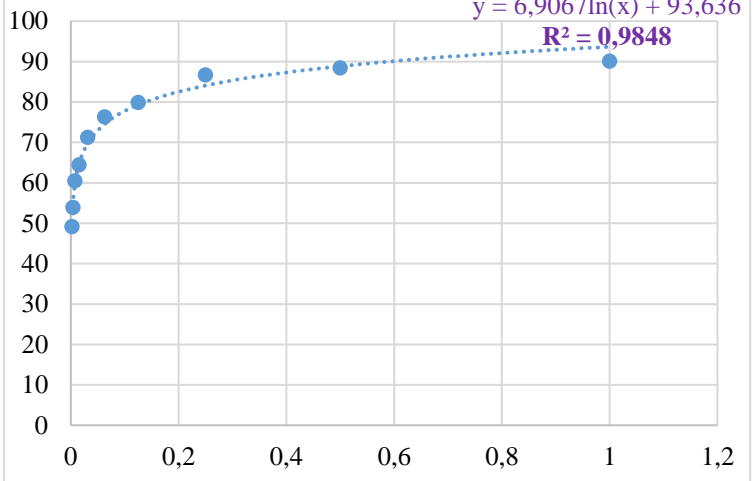
Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 84 secondes

$$y = 8,0347\ln(x) + 93,875$$
$$R^2 = 0,9888$$



Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 126 secondes

$$y = 6,9067\ln(x) + 93,636$$
$$R^2 = 0,9848$$



Augmentation de l'inhibition en fonction de la concentration à 168 secondes

$$y = 6,6961\ln(x) + 93,764$$
$$R^2 = 0,9818$$

