



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

Investigation phytochimique et activité antioxydante de la
plante médicinale algérienne *Astragalus armatus Willd*
(Fabaceae)

Présenté et soutenu publiquement le : 02/07/2019

Par

BENZAID Oumeima

&

CHERABI Sabrina

Jury

TENIOU Soumia

MAA. UFM Constantine

Président

BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine

Rapporteur

MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine

Examineur

Année universitaire

2018– 2019

Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements à Mme **BOUTEGHANE Naima**, notre encadreur, pour ses conseils, sa disponibilité et sa patience.*

*Nous remercions également Mme **KHALFALAH Assia**, qui nous a accompagné durant la préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions aussi Mme **KABOUCHE Zahia**, directrice du Laboratoire d'obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), qui nous a accepté et facilité notre travail au sein du laboratoire, nous remercions ainsi toute l'équipe du LOST, pour leurs aides et leurs esprits de travail en équipe et de collaboration.*

*Nous remercions également les responsables et les chercheurs de CRBT, qui nous en faciliter et diriger une partie de ce travail ; Mr **BENDJABELLAH Nadji**, Secrétaire général, Mr **BENSOUCI Chawki**, chef du laboratoire de Biochimie.*

*Nous tenons aussi à remercier Mme **TENIOU Soumia** et Mme **MOUSBAH Asma** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude et nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail avec amour, sincérité et fierté.

A ma très chère mère Rachida.

A mon très cher père Abderrahmane.

A mes chères sœurs Sara et Yasmine.

A mon chère frère Abdelhak Oussama.

A mon cher oncle Abdelaziz.

A ma chère tante Karima.

A mon cher cousin Imed Eddine.

*A mes chers amis : Chaima, Imene, Norhene, Maroua, Rabia,
Yaser, Abdelkarim, Oussama et Abderaraouf.*

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Sabrina

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

À mes parents qui m'ont donné la naissance et la croyance religieuse.

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure

*À l'homme de ma vie mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir qui m'a élevé, éduqué et m'a donné les actes les plus nobles de la vie pour grandir dans un environnement sain : **Mon père AZZEDINE***

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ma profonde gratitude. A tous celui qui a sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite : **Ma mère SAMIA***

*À ma petite chère sœur ma source de joie et de bonheur : **Meriem que j'adore.***

*À la mémoire de ma grande mère : **YAMINA** j'aurais tant aimé que vous soyez présents.*

À mon cher ami Younes.

*A mes chères amies : **BATOUL, NOUR ELIMENE, RANIA et SOUROUR***

*A mes collègues d'étude : **BRAHIM et ABD ELKARIM.***

À tous ceux qui utilisent la science pour le bonheur et la prospérité de l'humanité.

Dumeima

Liste des abréviations

1D : Monodimensionnelle

1O₂ : Oxygène singulet

2D : Bidimensionnelle

A : Absorbance

A_{0,5} : Concentration à A=0,5

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

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP-ribose : Adénosine diphosphate-ribose

AH : Antioxydant donneur d'hydrogène

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

APG : Angiosperm Phylogeny Group

BHA : Butyl-hydroxy-anisole

BHT : Butyl-hydroxy-toluène

carboxylase/oxygénase « L »

CC : Chromatographie sur colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur couche mince

CD₃OD : Méthanol deutéré

CHCl₃ : Chloroforme

CI₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

CJB : Conservatoire et jardin botaniques

COSY : Spectroscopie de Corrélation H-H

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity

d : Doublet

dd : Doublet de doublets

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl

e⁻ : Electron

EOR : Espèces oxygénées réactives

g : Gramme

GLc : Glucose

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃BO₃ : Acide borique

HCT-15 : Human colon adenocarcinoma

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOCl : Acide hypochlorique

HPLC : High pressure liquid chromatography

HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HSV-1 : Virus Herpès simplex de type 1

Hz : Hertz

INPN : Inventaire national du patrimoine naturel

IPNI : International Plant Names Index

J=Hz : Constante de couplage exprimée en Hertz

LOST : Laboratoire d'Obtention de Substances
m : Multiplet

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation – 7 (Adénocarcinome du sein)

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

ml : Millilitre

NaOAc : Acétate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NBT : Nitro bleu tétrazolium

NC : néocuproïne

NCI-H460 : Non-small-cell lung cancer cell line-H460

nm : Nanomètre

NO : Monoxyde d'azote

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH : Radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONOO- : Ion peroxyinitrite

Phen assay : test de phénanthroline

ppm : parties par million

PR : Pouvoir réducteur

rbcL : Ribulose-1,5-bisphosphate

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire
du carbone

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du
proton

RO : Radical alkoxy

RO₂ : Radical peroxy

ROOH : Hydroperoxyde

RP-18 : Reversed phase C18

SOD : Superoxyde dismutase

ssp : Sous espèce

t : Triplet

Thérapeutique

TMS : Tétraméthylsilane

trnL-trnF : Chloroplast tRNA gene « Leucine
» chloroplast tRNA gene «phenylalanine »

UV : Ultra-violet

v/v : Volume par Volume

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

δ : Déplacement chimique

δc : Déplacement chimique du carbone en ppm

δH : Déplacement chimique du proton en ppm

μl : Microlitre

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	---

1ère Partie : Recherche bibliographique

Chapitre I : Aspect botanique et études chimiques antérieures

I.1. Fabales	3
I.1.1 Famille des fabaceae	3
I.1.2. Généralité	3
I.1.3 Distribution de la famille Fabaceae	3
I.1.4 Caractères botaniques de la famille Fabaceae	4
I.1.5 Classification systématique	10
I.1.6 La symbiose rhizobium-légumineuses	11
I.1.7 Intérêts économique et thérapeutique des Fabaceae	13
I.2. Présentation du genre Astragalus	14
I.2.1. Description botanique du genre Astragalus	14
I.2.2. Répartition géographique du genre <i>Astragalus</i>	16
I.2.3. Classification systématique	16
I.2.5. Les espèces du genre Astragalus	17
I.2.5.1. Description botanique du genre <i>Astragalus</i>	19
I.2.6. Etudes phytochimiques antérieures du genre Astragalus	20
I.2.7. Astragalus en médecine traditionnelle	20
I.2.7.1. En médecine humaine	20
I.2.7 .2. En médecine vétérinaire	21
I.2.7 .3. Autres usages de l' <i>Astragalus</i>	21
I.2.8. Activités biologiques	22

Chapitre II : Les composés phénoliques

II. Les composés phénoliques	24
II. 2. Présentation des flavonoïdes	24
II.2. 1. Classification des flavonoides	25
a. Les dérivés du 2-phénylchromane	25
b. Les chalcones et auronones	26
II.2.2. Propriétés thérapeutiques des flavonoides	26
II. 3. Présentation des saponosides	28
II.3.1. Classification des saponosides	29
II.3 1.1. Saponosides à génines stéroïdiques	29

III. 3.1.2. Saponosides à génines tri terpéniques	29
II. 4. Les sucres.....	30
II. 5. Les acides organiques	31
II. 5 1. Propriétés biologiques des saponosides	32
III.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	35
III.2.1 Antioxydants et systèmes de défense.	36
III.2.2 Les antioxydants enzymatiques.....	37
III.2.3. Les antioxydants non enzymatiques	37
III.3.3 Antioxydants de synthèse	38
III.4. Conséquence du stress oxydatif.....	39
III.5. Quelques activités biologiques antioxydantes.....	39
III.5.1. Piégeage du radical 2.2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	40
III.5.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	41
III.5.3. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS•+	41
III.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)	42
III.5.5. L'activité de phenanthroline.....	43

Deuxième partie : Matériels et méthodes

IV.2. Matériels et méthodes	44
IV. 2 1. . Matériel végétal.....	44
IV. 2 1. 1 Description de la zone de la récolte.....	44
IV. 2. 1. 2. Récolte de la plante du genre	45
IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques.....	45
IV.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	45
IV.3. 2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	45
IV. 3.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	46
IV. 4. Méthodes d'analyses physico-chimiques	46
IV. 4. 1. Spectroscopie de RMN.....	46
IV. 4. 2. Spectrophotométrie UV-visible.....	46
IV. 5. Etude phytochimique de <i>Astragalus armatus</i> Willd	47
IV. 5.1. Extraction de la plante par macération à froid	47
IV. 5. 2. Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	49
IV. 6. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	51
IV. 6 .1. Dosage des polyphénols totaux.....	51
IV. 6. 2. dosage des flavonoïdes totaux.....	52
IV. 7. Evaluation des activités antioxydantes de l'espèce du genre <i>Astragalus armatus</i> Willd.....	52

IV. 7. 1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	53
IV. 7. 2. Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS ^{•+}).....	53
IV. 7. 3. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC).....	54
IV. 7. 4. Test de l'activité de phénanthroline	54
IV. 7. 5. Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur).....	54
IV. 8. Analyses statistiques	55

Troisième partie : Résultats et discussion

VII.1 Identification des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle	56
VII.1. 1. Détermination structurale du composé Aa1	56
VII. 1. 2. Détermination structurale du composé Aa3.....	59
VII. 1. 3. Détermination structurale du composé Aa2.....	66
VIII. 2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux	67
VII.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	68
VIII.3. 1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH	68
VI. 3. 2. Test de l'activité scavenger du radical l'ABTS.....	70
VI.I.3 3. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC).....	72
VI. 3. 4. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur).....	74
VI. 3. 5. Test de phénanthroline	76
Conclusion	79
Références bibliographiques	80

Liste des figures

Figure 1: Carte de répartition géographique des Fabaceae. Les légumineuses se trouvent dans quatre biomes majeurs.....	4
Figure 2: Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses.....	12
Figure 3 : <i>Astragalus adscendens</i>	15
Figure 4 : Quelques gousses des plantes du genre <i>Astragalus</i> présentes en Algérie	16
Figure 5 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre <i>Astragalus</i>	16
Figure 6 : Quelques espèces du genre <i>Astragalus</i> présentes en Algérie.....	17
Figure 7: Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (A) et du 2-phényl chromone (B).	24
Figure 8: Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.	25
Figure 9 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones	26
Figure 10 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.	26
Figure 11 : Principaux squelettes stéroïdiques.	29
Figure 12 : Principaux squelettes tri terpéniques rencontrés.....	30
Figure 13 : les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.....	30
Figure 14 : les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.....	31
Figure 15 : Composantes de la balance entre les molécules anti-et pro-oxydantes.....	34
Figure 16 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.....	35
Figure 17 : Les défenses antioxydantes : complémentarité entre systèmes non enzymatiques et enzymatiques	36
Figure 18 : Structure chimique de BHA et BHT	39
Figure 19 : Equation du radical DPPH transformé en DPPH.....	40
Figure 20 : Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•	42
Figure 21 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	42
Figure 22: Carte de Géologie et une photo du Parc National de Belezma	44
Figure 23 : Les différentes étapes de macération, de filtration et d'évaporation de l'extrait hydroalcooliques de la plante <i>Astragalus armatus willd.</i>	47
Figure 24 : Différentes étapes de l'extraction de la plante <i>Astragalus armatus Willd.</i>	48
Figure 25 : plaque CCM après révélation. 2 : plaque CCM sous la lampe UV 365. 3 : plaque CCM sous la lampe UV 254.	49
Figure 26 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice.....	50
Figure 27 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction (136-137-138).	51
Figure 28 : La structure partielle du composé Aa1	56
Figure 29 : La série spectrale UV de la fraction Aa1	57

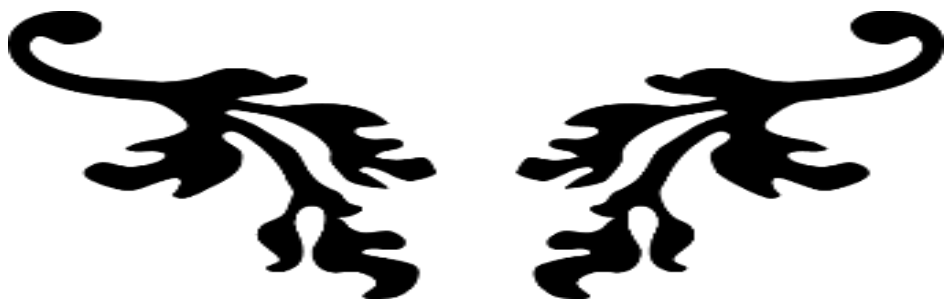
Figure 30 : Corrélation COSY entre H- 6 et H-8 du cycle A.....	58
Figure 31 : Spectre de RMN 1H du composé Aa1	58
Figure 32 : Corrélation COSY entre H- 2', H-5' et H-6' du cycle B.....	59
Figure 33 : structure du composé Aa1 : Isorhamnétine	59
Figure 34 : La structure partielle du composé Aa3	60
Figure 35 : Série spectrale UV de la fraction Aa3	61
Figure 36 : Spectre RMN 13C du composé Aa3	62
Figure 37 : Spectre de RMN 1H du composé Aa3	63
Figure 38 : Spectre COSY de la partie sucres du composé Aa3	63
Figure 39 : Spectre HSQC de la partie sucres du composé Aa3	64
Figure 40 : Spectre HMBC de la partie sucres du composé Aa3	64
Figure 41 : Spectre HMBC du composé Aa3 (partie II : δC entre 55 et 75 ppm).	65
Figure 42 : structure du composé Aa3 : L'isorhamnétine 3-O-robinobioside	65
Figure 43 : Spectre de RMN 1H du composé Aa2	66
Figure 44 : Photo prises lors du dosage de flavonoïdes totaux.	67
Figure 45 : Photo prises lors du dosage de polyphénols totaux.	68
Figure 46 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....	69
Figure 47 : Les CI50 des échantillons testés classées par ordre croissant DPPH.	69
Figure 48 : Photos prise lors de dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.	7170
Figure 49 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons (ABTS).	71
Figure 50 : Les CI50 des échantillons testés classées par ordre croissant ABTS.	71
Figure 51 : Photo prise lors de dosage de l'activité du piégeage de radical ABTS +•.	72
Figure 52 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons (CUPRAC)	73
Figure 53 : Les A0.5 des échantillons testés classées par ordre croissant CUPRAC.....	73
Figure 54 : photo prise lors de dosage de l'activité réductrice de l'ion cuivrique (CUPRAC).	74
Figure 55 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (pouvoir réducteur).	75
Figure 56 : Les A0,5 des échantillons testés classées par ordre croissant (pouvoir réducteur).....	75
Figure 57 : Photos prises lors du dosage de l'activité réductrice (Pouvoir réducteur).	76
Figure 58 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Phénanthroline).....	77
Figure 59 : Les A0,5 des échantillons testés classées par ordre croissant (Phénanthroline).	77
Figure 60 : photo prise lors du dosage de l'activité de phénanthroline.....	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Morphologie principales des six sous familles (Papillonoideae, Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae)	6
Tableau 2 : Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique.....	10
Tableau 3 : Espèces du genre <i>Astragalus</i> L. en Algérie.....	18
Tableau 4 : Les activités biologiques que possèdent certains métabolites secondaires isolés du genre <i>Astragalus</i>	22
Tableau 5 : Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice normale.....	50
Tableau 6 : Données spectrales UV du composé Aa1.....	57
Tableau 7 : données spectrales UV du composé Aa3.....	60



Introduction



Introduction

Etant donné l'intérêt immense que suscite actuellement l'emploi des plantes médicinales à travers le monde pour combattre diverses maladies ou préserver la santé de l'être humain, la connaissance de la composition chimique de ces plantes et la détermination de leurs activités biologiques revêtent une importance capitale car leurs propriétés médicinales sont sûrement dues aux substances chimiques qu'elles renferment.

Aujourd'hui, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles, a abouti à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles jouant un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim., 2006).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 80 % de la population en Afrique et Asie emploient principalement les médicaments traditionnels (drogues végétales) obtenus à partir de plantes aromatiques et médicinales (PAM), pour leurs soins de santé primaire. Par ailleurs, seulement 17 % d'espèces de plantes supérieures dans le monde, ont été étudiées pour leur potentiel médical. La diversité chimique et biologique de ces plantes représente une source renouvelable et potentiellement illimitée pour leur utilisation dans le développement de nouveaux produits cosmétiques et pharmaceutiques. (Pelt., 2001).

La recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur les études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays dont l'Algérie (Muanda et al., 2009)

En effet, notre pays dispose de plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, restent très peu explorées tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (Dupont et Guignard, 2012).

Dans le cadre de la valorisation de la flore du nord algérien, par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) a entamé un programme de recherche destiné à l'étude chimique et biologique de cette flore.

La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phytochimique et biologique. C'est dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de

l'espèce *Astragalus armatus* Willd, appartenant à la famille des *Légumineuses* (Fabaceae), sous famille de Papilionaceae (Faboideae). Les diverses investigations phytochimiques menées sur cette famille et plus particulièrement sur le genre *Astragalus* ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires comme, notamment les flavonoïdes et les saponosides (**Labed et al., 2016 ; khalfallah et al., 2014**)

Notre travail sera présenté comme suit :

- **La première partie** dans cette partie nous avons commencé par une étude bibliographique, réunit en trois chapitres distincts :
 - **Le 1^{er} chapitre** sera consacré à une étude bibliographique incluant la systématique de la famille Fabaceae, la présentation du genre *Astragalus* et enfin le passage en revue des principaux résultats phytochimiques antérieurs relatifs aux plantes appartenant au genre *Astragalus*.
 - **Le 2^{ème} chapitre**, consacré à un aperçu théorique sur les métabolites secondaires notamment, les flavonoïdes et les saponosides.
 - **Le 3^{ème} chapitre** s'intéresse au stress oxydant, les différents systèmes antioxydant et une présentation générale de quelques tests de la capacité antioxydante.
- **La deuxième partie** de ce manuscrit est consacré aux travaux personnels. Nous présenterons les étapes d'extraction, d'isolement, de détermination des structures et des tests biologiques effectués sur les extraits et les composés isolés.
- Enfin une troisième partie qui présente les résultats obtenus, leurs discussions et leurs comparaison avec des études antérieurs.



Chapitre I

Aspects botaniques et études

chimiques antérieures



I.1. Fabales

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 20 400 espèces (**Dupont et Guignard, 2016**). Les familles sont les Fabacées, les Polygalaceae, les Quillajaceae et les Surianaceae (**Byng et al., 2016**). Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Astragalus armatus* que nous avons étudiée.

I.1.1 Famille des fabaceae

I.1.2. Généralité

La famille des fabacées ou légumineuses est la troisième plus grande famille d'angiospermes (**Mabberley, 1997**) avec environ 751 genres et plus de 19500 espèces dans le monde (**Lewis 2005, 2013 ; LPWG et al., 2017**). Ses plantes ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées. Les Fabaceae étaient appelées légumineuses, du latin legumen qui s'appliquait aux graines se formant dans les gousses. Actuellement, 'légume' désigne une catégorie plus large de plantes alimentaires (plantes potagères) (**Martin, 2014**). Elle abrite le plus grand genre de plantes à fleurs l'*Astragalus* L (**Sanderson et Wojciechowski, 1996**), et certains des clades de plantes les plus en évolution (**Scherson., 2008**).

Les Fabaceae sont souvent caractérisées par un métabolisme azoté élevé et des acides aminés inhabituels. Elles présentent souvent des nodosités traduisant une symbiose avec la bactérie fixatrice d'azote *Rhizobium*, c'est particulièrement le cas chez les Faboideae (**Wojciechowski et al., 2004 ; De Faria et al., 1989**). De ce fait les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (**Stacey et al., 2006**). De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et huiles végétales (**Graham et Vance, 2003**) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète.

I.1.3 Distribution de la famille Fabaceae

Les plantes de la famille Fabaceae sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille :

- Les Papilionoideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre. Cette dernière fait l'objet de notre présente étude (**LPWG et al., 2017; Lewis et al., 2005**).
- Les Caesalpinioideae occupent surtout les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, Afrique et Asie. (**White, 1983**).

- Les Detarioideae sont présentées en Afrique et en Asie (**Bruneau et al., 2014; Breteler, 1999**).
- Les Cercidoideae sont largement cultivées comme arbres d'ornement aux États-Unis et en Europe. (**Lewis et Forest., 2005**).
- Les Duparquetia présentes dans les forêts tropicales humides d'Afrique occidentale et centrale (**Bruneau et al., 2014**).
- Les Dialioideae dominent les régions tropicales de l'Afrique (**Mackinder et Wieringa.,2013**).

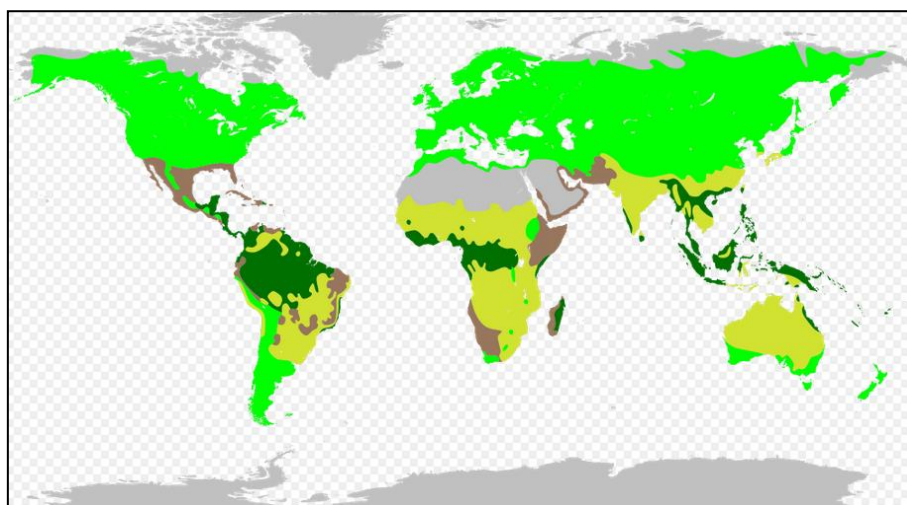


Figure 1: Carte de répartition géographique des Fabaceae. Les légumineuses se trouvent dans quatre biomes majeurs : **Forêt tropicale**, **tempérée**, **herbée** et **succulente** (**Schrire, 2005**).

I.I.4 Caractères botaniques de la famille Fabaceae

Basé sur la structure phylogénétique de la famille des légumineuses (**LPWG. 2017**), la famille Fabaceae est divisée en six sous-familles pouvant être identifiées facilement par leurs fleurs. Elles ont en commun le fruit communément appelé gousse. Ci-dessous une clé de description taxonomique pour chacun des six sous-familles.

- Les Papilionoideae représentant la sous-famille la plus variée avec 503 genres dont l'*Astragalus* et 4400 espèces, comprenant des herbes et de petits arbustes Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tempérées et tropicales Cette sous famille inclut les légumineuses à grain telle que les haricots, les pois et les lentilles (**Ferchichi., 2006**). Les fleurs sont hermaphrodites, zygomorphe par la corolle généralement papilionnée, corolle à 5 pétales ; l'étendard correspond au pétale supérieur, les 2 pétales latéraux correspondent aux ailes et la carène est formée par deux

pétales inférieurs, les 10 étamines sont incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil (**Maxted et Bennett, 2001**) les graines ont une valve hilaire complexe, pleurogramme absent (**LPWG.,2017**).

- Les Caesalpinioideae de 148 genres et 4400 espèces sont constituées pour la plupart d'arbres et arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leurs fleurs sont irrégulières (zygomorphe) avec cinq pétales et des étamines visibles extérieurement, feuilles bipennées ; graine avec un pleurogramme ouvert ou fermé de chaque côté, inflorescences principalement en panicules (**LPWG., 2017 ; Maxted et Bennett., 2001**).
- Les Cercidoideae comptant un seul genre et 12 espèces, feuilles unifoliolées, bifolioles, graine avec hile en forme de croissant (**LPWG., 2017**)
- Les Detarioideae formé de 84 genres et 760 espèces, Nectaires (Formation glanduleuse située le plus souvent sur des constituants floraux ou des feuilles, sécrétant un liquide souvent sucré ou odorant recherché par des insectes) extra-floraux absents ou présents sur le pétiole ou sur le rachis de la feuille; stipules latérales et libres ou absentes (**De La Estrella et al., 2018; LPWG, 2017**). Les Duparquetioideae comptent un seul genre et espèce, présent au centre et l'Ouest d'Afrique, fleurs avec Pétales à structure glandulaire marginale ; anthères à 4 étamines, feuilles pennées. (**LPWG et al., 2017**)
- Les Dialioideae près de 17 genres et 85 espèces, Fleurs solitaires, feuilles surtout imparipennées avec folioles alternées, nectaires extra-floraux sur le pétiole. (**LPWG, 2017 ; Zimmerman et al., 2017**)

Tableau 1 : Morphologie principales des six sous familles (Papillonoideae, Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae) (Banks et Lewis, 2008 ; Gwilym, 2018 ; De La Estrella et al., 2018 ; LPWG et al., 2017).

Sous famille	Caesalpinioideae (incl. Mimosoideae)	Papillonoideae	Cercidoideae	Detarioideae	Duparquetioideae	Dialioideae
Genres / Espèces	146-148/4400	445-503 /14000	12-12/1	79-84/760	1/1	15-17/85
Inflorescence	Panicules, racèmes ou fleurs en fascicules.	Principalement des racèmes, pseudoracèmes ou panicules.	Racème ou pseudo racème.	Racème ou panicule.	Grappe terminale.	Fleursolitaire.
Forme biologique	Arbres, arbustes, lianes, herbe, non armé ou généralement armé depiquants ou épines.	Habituellement non armé, arbre, arbuste, herbe, liane.	Arbres, arbustes ou lianes, beaucoup avec vrilles, généralement non armées mais fréquemment avec des piquants ou épines infrastipulaires ; branches rarement modifié en cladodes	Généralement des arbres non armés, parfois des arbustes.	Liane, non armé.	Arbres non armés ou arbustes.

Gynécée	Généralement monomère, rarement à plusieurs carpelle, ovule une à plusieurs.	Monomère rarement à 2carpelles, une à plusieurs ovules.	Un seul carpelle, une à plusieurs ovules.	Un seul carpelle, une à plusieurs ovules.	Un seul carpelle, 2 à 5 ovules.	Un seul carpelle, parfois deux carpelles, 2 ovules.
Les grains de pollen	Monades, tricolporés, rarement dans les tétrades. Ornementation généralement réticulé.	Monades, principalement tricolporés.	Monades, tricolporés, tri-hexacolpés, tripodes, tri ou tétracolporoïdés, inaperturé. Avec déférente ornementation.	Monades, principalementtricolporés avec déférente ornementation.	Monades tricolporés, ornementation réticulé.	Monades, asymétriques, un entourant équatorial ectoaperture avec deux équatoriales endoapertures.
Feuilles	Généralement bipennées, parfois pennées, surtout paripennées.	Principalement pari- ou imparipennées et ou palmées, unifoliolées outrifoliolées.	Unifoliées ou bifoliolées.	Généralement paripennées ou bifoliolées.	Imparipennées	Généralement imparipennées, rarement paripennées ou palmées.

Fleurs	Zygomorphes, hermaphrodite, parfois papillonnée	Zygomorphe, hermaphrodite, papillonnée	Zygomorphe, hermaphrodite, parfois papillonnée	Généralement Zygomorphe, hermaphrodite, non papillonnée	Zygomorphe, hermaphrodite, non papillonnée.	Zygomorphe, hermaphrodite, parfois papillonnée.
Pétales	(3–) 5 (–6), libre ou fusionné ou pétale absent, valvaire ou imbriquer, pétale adaxiale disposé à l'intérieur.	Corolle à 5 pétales typiques (1 supérieur dorsal = étendard, 2 latéraux = ailles, 2 inférieurs souvent soudés = carène), imbriquer, le pétale adaxiale disposé à l'extérieur.	5, libre, imbriqué, l'étendard (pétale adaxial) disposé à l'intérieur est fréquemment différencié.	0–5 (–7), libre, imbriqué, le pétale adaxial généralement disposé à l'extérieur.	5, libre, imbriqué, le pétale adaxial disposé à l'extérieur, l'adaxial et les deux latéraux sont ovales, deux pétales abaxiaux oblong (arrondi).	5 ou moins, rarement 6, libre, imbriqué, le pétale adaxial disposé à l'intérieur.
Sépales	(3–)5(–6), libre ou fusionné, ou sépale absent.	Calice à 5 sépales Plus ou moins soudés, parfois bilabié.	Calice à 5 sépales soudés ou libres.	Calice à 5 ou 4 sépales (deux sépales adaxiaux souvent fusionné), rarement certains ou tous absents.	4, inégale, libre, l'abaxiale et adaxiale sépales cucullés, le latérale pétaloïde.	(3 ou 4) –5– (6), libre.

Etamines	Variet de 1 à 10 rarement plus, basifixe ou médifixe, sur filaments soudés ou libres.	Androcée à 10, basifixe, souvent soudées sur un tube.	10 (parfois moins) dont souvent 9 soudées par leurs filets et 1 libre.	Androcée à 10 étamines, médifixe sur filaments soudé ou libre.	Androcées à 4 étamines, basifixe sur filament libre.	Anthères à 5 étamines, basifixe sur filament libre.
Graines	Habituellement avec un pleurogramme, parfois avec un arille charnu ou, parfois ailé ; hile habituellement apical ; lentille habituellement discret.	Avec un arille charnu ; hile allongé et lentille habituellement présente, pleurogramme absent.	Avec un hile apical en forme de croissant, rarement circulaire ; lentille discrète, sans pleurogrammes, pseudopleurogrammes aile ou arille.	Avec pseudopleurogrammes; arillé.	Sans pleurogrammes.	1–2, rarement de plus, absence de pleurogrammes.
Fruit	Sec déhiscent (gousse).	Sec déhiscent (gousse).	Sec déhiscent (gousse).	Gousses principalement ligneuses, déhiscentes.	Sec dehiscent.	Drupe communément indéhiscente.

I.I.5 Classification systématique

I.I.5.1 Classification ancienne

La phylogénie des légumineuses a fait l'objet de nombreuses études par des groupes de recherche du monde entier. Ces études ont utilisé des données de morphologie, l'ADN (l'intron des chloroplastes *trnL*, les gènes chloroplastiques *rbcL* et *matK*, ou les espaceurs ribosomiaux ITS) et l'analyse cladistique, afin d'étudier les relations entre les différentes lignées de la famille. Toutes les études ont démontré systématiquement le caractère monophylétique des Fabaceae, en outre, ils ont confirmé que les sous-familles traditionnelles des Mimosoideae et des Papilionoideae étaient toutes deux monophylétiques mais qu'elles étaient toutes deux nichées dans la sous-famille des Caesalpinioideae qui est, elle, paraphylétique. Toutes les différentes approches ont donné des résultats similaires en ce qui concerne les relations entre les principaux clades de la famille des fabaceae (LPWG *et al.*, 2017; Bruneau *et al.*, 2008; Kass et Wink, 1996; Sanderson et Wojciechowski, 1996; Lavin *et al.*, 1990).

Dans la plupart des classifications trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabaceae : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (= Papilionoideae). Ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist) (Spichiger *et al.*, 2004 ; Judd *et al.*, 2002). La position systématique des Fabaceae est présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique (The APG., 1998 ; Thorne.,1992b ; Thorne.,1992 ; Engler et Prantl, 1889 ; Cronquist., 1988).

	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APG III (2009)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytae	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae	-	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae

Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Eurosidæ (= Fabidées)
Sous-ordre	Leguminosineae	-	Fabineae	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae (=Papilionaceae) Mimosaceae Caesalpiniaceae	Fabaceae	Fabaceae (=Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae	-	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae Swartzioideae	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae

I.I.5.2 Classification actuelle

Le Legume Phylogeny Working Group (**LPWG., 2017**) basé sur l'analyse de séquences peptidiques de 81 protéines codées par un gène chloroplastique matK a subdivisé les Fabaceae en six sous-familles au lieu de trois, ce qui a nécessité la recircumscription des Caesalpinoideae en une sous-famille réduite (Caesalpinoideae, sensu stricto), incluant l'ancienne sous-famille des Mimosoideae, et quatre nouvelles sous-familles.

- Règne Plantae
- Embranchement Spermatophyta
- Sous embranchement Angiospermae
- Classe Eudicotyledonae
- Sous-classe Rosidae
- Ordre Fabidées
- Sous-ordre Fabales
- Famille Fabaceae
- Sous-famille Caesalpinoideae (Mimosoideae.incl) ; Cercidoideae, Dialioideae ;Duparquetioideae ; Papilionoideae

I.I.6 La symbiose rhizobium-légumineuses

L'établissement de la symbiose entre une Légumineuse et son rhizobium spécifique se manifeste par la formation de nodules, Le site de fixation symbiotique (**Cullimore., 2001**).

Les bactéries du genre *Rhizobium* possèdent une enzyme, la nitrogénase, pour fixer l'azote atmosphérique, et le transformer en NH_4^+ directement exploitable par la plante. Cette enzyme est irréversiblement inhibée par l'oxygène, c'est pourquoi la bactérie va travailler en anaérobie (Compant.,2010). La légumineuse va, une fois la bactérie installée dans les nodules, piéger l'oxygène à proximité de la nitrogénase de la bactérie, pour éviter une accumulation ou une élévation de pression de O_2 (Doyle., 1998 ; Dart., 1977).

Ces bactéries *Rhizobium* dans le sol peuvent être libres, elles n'utilisent pas l'azote atmosphérique. Attirées par chimiotactisme des poils absorbants des légumineuses, les bactéries vont migrer dans la racine et former des nodules très organisés (Cullimore., 2001 ; Miklashevichs *et al.*, 2001, Perret.,2000).

La légumineuse va émettre des molécules de type flavonoïdes pour inciter le gène du *Rhizobium* à fabriquer l'enzyme nitrogénase (Long., 1996). On parle de conversation moléculaire entre *Rhizobium* et la plante (fig. 2) (Lerouge., 1990).

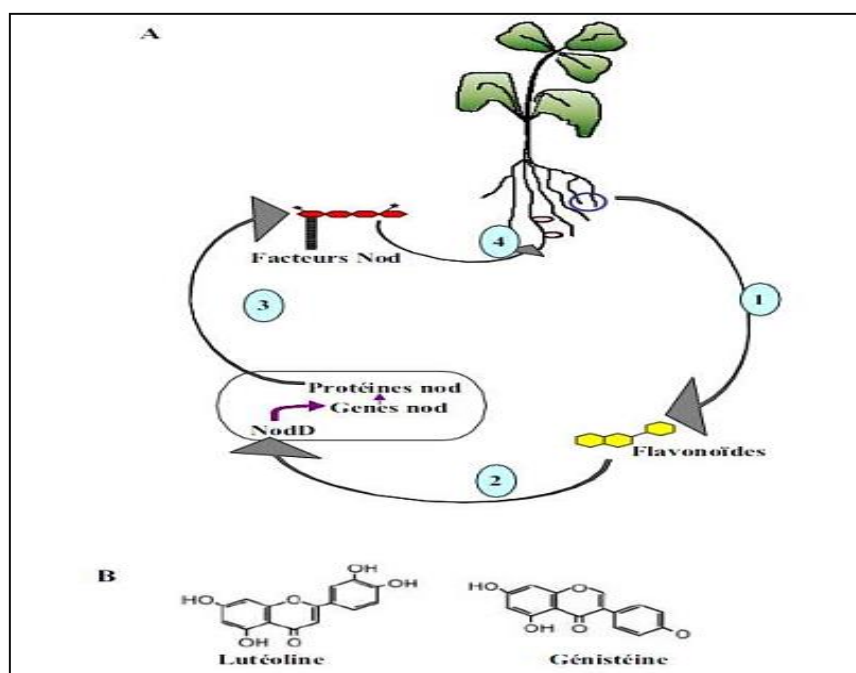


Figure 2: Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. **A.** (1) Les racines de la plante hôte sécrètent des flavonoïdes. (2) Les flavonoïdes sont perçus par les Rhizobies et activent la protéine NodD à l'origine la transcription des gènes nod. (3) Les gènes nod permettent la synthèse et l'excrétion des facteurs Nod. (4) Les facteurs Nod sont perçus par les racines de la plante et induisent les premières réponses morphogénétiques à l'origine de la formation des nodules. **B.** Structure de deux flavonoïdes : la lutéoline, secrétée par *Medicago truncatula* et la genisteine, secrétée par *Glycine max.* B (Brencic et Winans., 2005).

I.I.7 Intérêts économique et thérapeutique des Fabaceae

I.I.7.1 Intérêts thérapeutiques

Les plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies. On citera (**Spichiger et al., 2004 ; El rhaffari., 2002**).

- *Melilotus officinalis* (L.) les Sommités fleuries de cette espèce utilisée comme un anticoagulant.
- *Melilotus altissima* Thuill, utilisé pour le traitement Anti-œdémateux et Anti-hémorroïdaire.
- Les graines de la plante *Retama raetam* Forsk sont fraîchement broyées et appliquées en cataplasme contre les étourdissements.
- Les plantes *Astragalus armatus* Willd., *Astragalus gombiformis* Pomel et *Crotalaria saharae* Coss. Sont utilisées contre les morsures de serpents et de scorpions.
- Les feuilles de *Genista saharae* Coss. & Dur. Sont utilisées comme tisane pour traiter les troubles digestifs
- Les parties aériennes de la plante *Genista microcephala* Coss. & Dur. Sont utilisées par voie orale pour le traitement des vers intestinaux, des intoxications alimentaires et des infections microbiennes. Les feuilles de cette plante sont réduites en poudre et appliquées localement pour soigner les cicatrises des blessures.
- La décoction des racines de l'espèce *Ononis natrix* L. est employée pour traiter l'arthrite rhumatoïde, les problèmes de prostate, les coliques néphrétiques et les troubles digestifs ainsi que la constipation.

I.I.7.2 Intérêts économiques

- De nombreuses espèces de la famille Fabaceae sont utilisées comme plantes alimentaires, fourragères ou comme fertilisants verts (**Wichtl et Anton., 2003 ; Bado., 2002 ; Bruneton, 1999 ; Skerman., 1982**).
- *Astragalus gummifer* Labill riche en polysaccharides, amidon et substances minérales. Exsudation gommeuse est utilisée comme émulsifiant ou Laxatif.
- *Cytisus scoparius* Link (Genêt à balais) contient les Amines, les Flavonoïdes et les Alcaloïdes (spartéine). Les Rameaux et les Fleurs sont utilisés comme source industrielle de spartéine.

- *Derris spp* contient les roténoïdes. Les racines sont utilisées comme insecticide pour l'agriculture biologique et ichthyotoxique.
- Les Graines de *Glycine max* (L.) Merr (Soja) riche en protéines isoflavonoïdes saponines, stérols et lécithine, utilisés dans la synthèse de phyto-œstrogènes, de lécithines, phytostérols (stigmastérol et sitostérol).
- Les Racines de *Glycyrrhiza glabra* L (Réglisse) contient les Flavonoïdes et les Saponines (glycyrrhizine), utilisés comme Matière première pour la confiserie (aromatisant, édulcorant), pour le traitement Antitussif, Antiulcéreux gastrique et anti-inflammatoire.
- Trèfle, Luzerne, Sainfoin (*Onobrychis*) utilisé comme fixateurs d'azote atmosphérique par la présence de symbiose racinaires avec *Rhizobium*, utilisé comme engrais vert. (Dupond., 2015 ; Martin.,2014).
- Certaines espèces sont particulièrement toxiques, par la présence d'alcaloïdes ou de lectines : *Arbus prectorious*, *Cytisus scorapius*, *Labumun anagyroides*, *Lathyrus div.sp.*, *Lupinus div.sp.*, *Physostigma Venenosium*. (Martin., 2014 ; Spichiger *et al.*, 2004).

I.2. Présentation du genre *Astragalus*

L'*Astragalus* est considérée comme le genre le plus important chez les plantes à fleur (Watrous et Cane 2011), il représente également l'un des genres les plus populaires de la famille des fabacées (Li *et al.*, 2014 ; Scherson *et al.*, 2008 ; Ozenda 1991). L'*Astragalus* comporte environ 3000 espèces d'herbes, de sous-arbustes ou d'arbustes annuels ou pérennes qui prévalent dans les régions et arides tempérées (Li *et al.*, 2014), il se caractérise par son fort taux de diversification morphologique et sa large répartition géographique (Li *et al.*, 2014 ; Zarre et Azani, 2013). L'origine probable du genre *Astragalus* est l'Eurasie et plus précisément les régions situées entre les montagnes du sud-ouest asiatique et le plateau de l'Himalaya (Podlech, 1986 ; Lock et Simpson 1991).

I.2.1. Description botanique du genre *Astragalus*

Astragalus L. (Légumineuses) Papilionidés, c'est une plante sous-ligneuse, à feuilles composées, pennées à folioles entières, stipulées (Paul *et al.*, 1836), peuvent avoir jusqu'à quarante-cinq folioles. La fleur d'*Astragalus* : papilionacées, en grappes axillaires (Paul *et al.*, 1836) est composée par un calice tubulaire en cloche, à cinq dents subégales ou très inégales. Les pétales généralement longuement onguiculés. Etendard dressé. La carène égalant environ les ailes (Quezel et santa., 1962). Les étamines sont diadelphes (Quezel et santa., 1962 ; Paul *et al.*, 1836), à gaine fendue au sommet (Quezel et Santa., 1962). L'ovaire pluri-ovule à ovules

sur deux rangs (Quesel et Santa., 1962), Style glabre, Stigmate petit (Gatin., 1965). Le fruit est une gousse de forme variée, rarement uniloculaire, généralement à deux loges plus ou moins complètes par intro flexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente (Quesel et Santa., 1962). Gousse sessile ou un peu stipitée (Paul *et al.*, 1836) gousse non divisée transversalement en article successifs. Gousse divisée longitudinalement en deux loges par une cloison ou profond sillon (Ozenda., 1977). La gousse peut développer également une fausse cloison longitudinale par intra flexion (Dupont et Guignard., 2012).

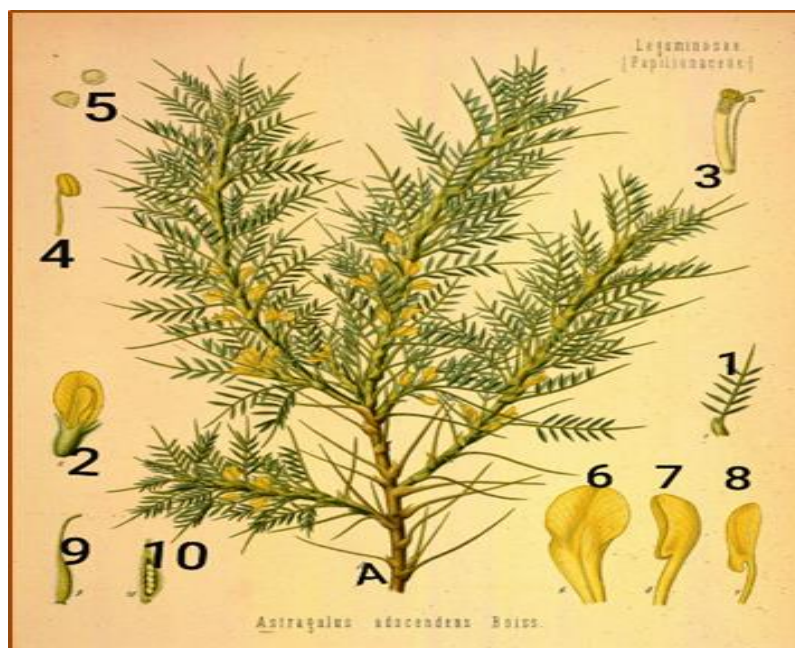


Figure 3 : *Astragalus adscendens*.

A : partie aérienne ; 1 : feuille bipennée ; 2 : fleur zygomorphe ; 3 : les étamines, 9 soudés et 1 libre ; 4 : pistil ; 5-9 et 10 : gousse ; 6 : étendard ; 7 et 8 : ailes. (<http://plantcurator.com/medicinal-plants-german>).

Selon (Ozenda., 1983) le genre de l'*Astragalus* est divisé en trois séries selon l'épaisseur de la gousse :

A : Gousse épaisse, renflé, dépassant un centimètre de diamètre, droite et des grandes fleurs jaunes : série 1 (Ozenda., 1983).

B : Gousse étroite ne dépassant pas cinq millimètres de diamètre, droite ou fortement arquée, et des fleurs de teinte variable, il est fractionné en deux selon l'état de gousse :

1-Gousse arquée en demi-cercle, et d'épaisseur régulière : série 2 (Ozenda., 1983).

2-Gousse droite ou peu arquée, plus ou moins dilatée : série 3 (Ozenda., 1983).

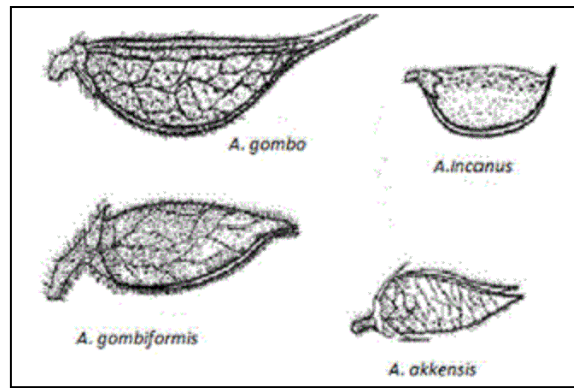


Figure 4 : Quelques gousses des plantes du genre *Astragalus* présentes en Algérie (**Ozenda., 2004**).

La croissance des espèces de genre *Astragalus* se produit de l'automne au printemps elles demeurent vertes pendant l'hiver quand l'herbe est peu disponible (**Colegate et al., 1985**).

I.2.2. Répartition géographique du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* représente l'un des plus grands genres de la famille des Fabaceae, il est largement distribué dans le monde entier (**Ozenda., 1991**). Environ 3000 espèces du genre *Astragalus* se propagent dans les zones continentales et les régions arides de l'ouest de l'Amérique du Nord (400 espèces) et d'Asie centrale (2000 à 2500 espèces). D'autres espèces sont également présentes dans les régions tempérées d'Amérique du Sud et d'Afrique du Nord, de l'Est et du Sud (**Boual et al., 2015 ; Liston et Wheeler., 1991 ; Davis., 1982**). Les espèces d'astragales qui se développent en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie) sont des plantes arabo-sahariennes méditerranéennes. Ils sont représentés par plus de 50 espèces délimitées en plusieurs sections. (**Ozenda., 1991 ; Quezel et Santa., 1963**).

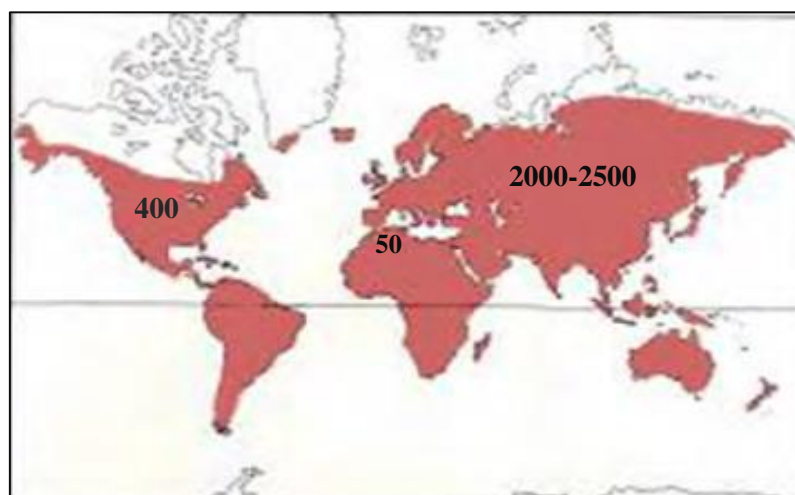


Figure 5 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre *Astragalus* (**Hewood., 1996**).

I.2.3. Classification systématique

Selon Quézel et Santa (1962) et Lock, Schrire (2005), la classification botanique menant au genre *Astragalus* est la suivante :

- Règne : Plantae.
- Sous Règne : Tracheobionta.
- Division : Magnoliophyta
- Embranchement : Spermatophytes.
- Sous embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Rosidaceae.
- Ordre : Fabales.
- Famille : Fabaceae.
- Sous famille : Papilionaceae.
- Tribu : Galegeae.
- Sous Tribu : Astragalina.
- Genre : *Astragalus* L.

I.2.5. Les espèces du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* est assez bien représenté en Algérie. En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'astragales (45 taxons en comptant les sous espèces) (Quézel et Santa., 1962).

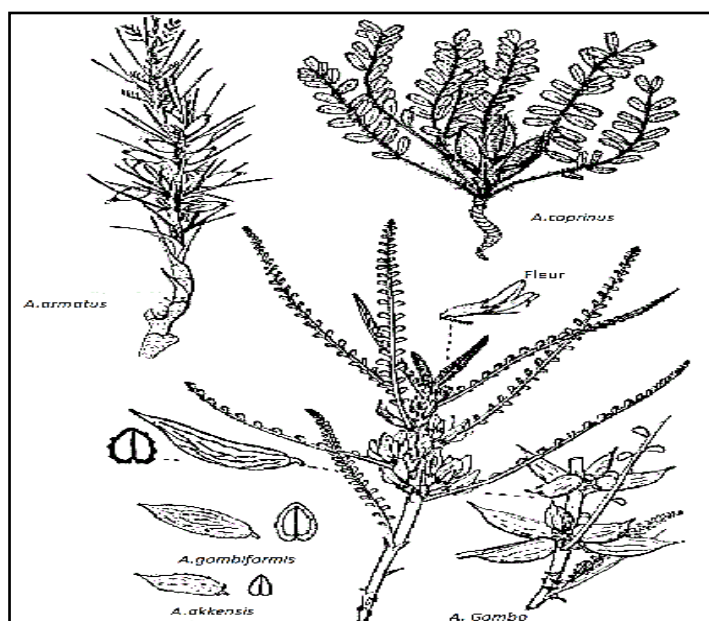


Figure 6 : Quelques espèces du genre *Astragalus* présentes en Algérie (Ozenda P., 2004).

Ces espèces se divisent en espèces annuelles et vivaces appartiennent à différentes aires de répartition (Tableau 3) (Quézel et Santa., 1962).

Tableau 3 : Espèces du genre *Astragalus* L. en Algérie décrites par Quézel et Santa (1962).

Type de plante	Espèces	Chorologie
Annuelle	<i>A. cruciatus</i> Link.	Méditerranéen-Saharien
	<i>A. mauritanicus</i> Coss. Et Dur.	Bético-Rifain
	<i>A. corrugatus</i> Bertol. <i>A. gyzensis</i> Del. <i>A. eremophilus</i> Boiss. <i>A. mareoticus</i> Del.	Sahara –Sindien
	<i>A. gryphus</i> Coss. Et Dur.	Endémique. Nord-Africain
	<i>A. scorpioides</i> Pourret <i>A. geniculatus</i> Desf.	Ibéro-Mauritanien
	<i>A. sesameus</i> L.	West Méditerranéen
	<i>A. stella</i> Gouan <i>A. hamosus</i> L. <i>A. baeticus</i> L. <i>A. epiglottis</i> L. <i>A. echinatus</i> Murr.	Méditerranéen
	<i>A. sinaicus</i> Boiss.	Méditerranéen. Irano-Tour
	<i>A. tribuloides</i> Del.	Saharien
	<i>A. gombo</i> Coss. Et Dur. <i>A. gomboeformis</i> Pomel	Endémique. Nord Saharien
	<i>A. edulis</i> Coss. Et Dur.	Marocain
	<i>A. peregrinus</i> Vahl.	Est médéteranien

	<i>A. pseudotrigonus</i> Batt. et Trab. <i>A. akkensis</i> Coss.	Endémique. Saharien
	<i>A. Vogelii</i> (Webb).	Paléo-tropical. Saharien
	<i>A. armatus</i> Willd	Nord-Africain
	<i>A. Faurei</i> Maire	Endémique. Traras
Vivace	<i>A. falciformis</i> Desf.	Endémique. Nord-Africain
	<i>A. glaux</i> L. <i>A. Narbonensis</i> Gouan <i>A. incanus</i> L.	Ouest Méditerranéen
	<i>A. bourgeanus</i> Coss. N/A V <i>A. tenuifoliosus</i> Maire	Ibéro-Mauritanien.
	<i>A. monspessulanus</i> L. 16 V	Méditerranéen
	<i>A. Font-queri</i> Maire	Endémique. Est Marocain
	<i>A. caprinus</i> L. 16 V <i>A. lusitanicus</i> Lamk	Méditerranéen.
	<i>A. depressus</i> L.	Montagnard méditerranéen
	<i>A. Onobrychis</i> L.	Européen- Irano-Touranien

1.2.5.1. Description botanique du genre *Astragalus*

Le nom générique est dû à la ressemblance des gousses de certaines espèces avec l'os du talon ou astragale. Le terme *armatus*, s'applique aux aiguillons vulnérantes dont cette plante est « armée ».

Plante vivace très épineuse, a tiges ligneuses dressées, ne dépassent guère 60 cm de haut. Feuilles pétiolées, imparipennées, composées de folioles étroites d'un vert foncé. Fleurs médiocre axillaires. Calice tubuleux à 5 dents courtes, souvent rougeâtre. Corolle étroite, d'un bleu rose, a 5 pétales – dont l'étendard plus ou moins dresse. 10 étamines, dont 9 a filets soudés et 1 libre. 1 style. Fruits : gousses à l'intérieur du calice gonflé, papyracé, a réseau de nervure très dense.

Hérissé de longues et fortes épines, cet *Astragalus* retient l'attention lorsqu'au tour des fruits, les calices membraneux ballonnent tout au long des tiges, avant de s'envoler au gré du vent, emportant avec eux, enfermées dans leurs gousses, les précieuses graines à disséminer (Beniston,1984).

I.2.6. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* est très connu par sa richesse en secondes métabolites. Des précédentes investigations phytochimiques de diverses espèces d'*Astragalus* ont montrés principalement l'isolement et la caractérisation de deux principales classes qui sont :

- Les saponines : Deux saponines tridesmosidiques acylés (armatoside I et II) et deux glycosides de type cycloartane (trigonoside II et trojanoside H) étaient isolés des racines de *A. armatus* Willd (Niu *et al.*, 2011 ; Avunduk 2008).
- Les flavonoïdes (Sun *et al.*, 2011 ; Yahara *et al.*, 2000) huit flavonoïdes provenaient de ses parties aériennes florale (Khalfallah *et al.*, 2014).

Cependant, les chercheurs sont principalement concentrés sur l'isolement et l'élucidation de triterpènes de type cycloartane (Savran *et al.*, 2012 ; Polat *et al.*, 2010), de triterpènes de type Oléane (Gulcemal., 2013), flavonoïdes (Benchadi *et al.*, 2013 ; Chaturvedula et Prakash., 2013) et isoflavonoïdes (Zheng Zhong CAO *et al.*, 1998) de diverses espèces. Les stérols (Niu *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2011), Les polysaccharides et les composés phénoliques sont aussi abondants dans ce genre, tandis que les composés toxiques qui se constitue de nitrotoxine, imidazole, alcaloïdes (Niu *et al.*, 2011 ; Khalfallah *et al.*, 2014).

I.2.7. *Astragalus* en médecine traditionnelle

I.2.7.1. En médecine humaine

Les espèces du genre *Astragalus* sont appréciées dans la médecine traditionnelle à travers le monde et utilisées comme herbes médicinales contre l'ulcère de l'estomac, la toux, la bronchite chronique, l'hypertension, les troubles gynécologiques, diabète et les morsures venimeuses de scorpion ainsi que pour le traitement du diabète (Bellakhdar., 1997) de la néphrite, de la leucémie ou du cancer de l'utérus (Sun *et al.*, 2011).

Beaucoup de ces espèces étaient largement adoptées pour augmenter la résistance immunitaire et permet au corps de résister au froid. Etant un vasodilatateur et diminue les sueurs excessives. Il a aussi des propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire (Fathiazad *et al.*, 2010

; Iserin., 2001), le soulagement de la dépression (Choudhary *et al.*, 2008 ; Avunduk *et al.*, 2007) et comme diurétique et tonique (Fathiazad *et al.*, 2010 ; Iserin., 2001).

Traditionnellement, l'*Astragalus* est appelé "Gendoul", et est utilisé pour le traitement de diverses maladies (Trabut., 1935).

- A Ghardaïa, par exemple, les différentes parties de la plante *Astragalus armatus* Willd (l'écorce et les graines) sont fréquemment utilisées pour le traitement de différents types de plaies et de problèmes d'estomac, de douleurs, de fièvre et de constipation (Voisin., 1987).
- En Tunisie, il est utilisé comme tonique, stimulant et en cas d'anémie (Khalfallah *et al.*, 2011). Augmenter l'endurance et les défenses immunitaires de l'organisme. Les racines séchées de cette plante sont de plus en plus prescrites (Hans., 2007).
- En Europe pour prévenir les rhumes et les infections virales et pour soulager les douleurs menstruelles (Hans., 2007).
- En médecine traditionnelle chinoise, est utilisé pour traiter les maladies de l'œil, la cirrhose, et les maladies de la gorge (Cakilcioğlu et Türkoğlu., 2010 ; Lev, 2002 ; Tang et Eisenbrand, 1992).

I.2.7 .2. En médecine vétérinaire

Parmi certains arbustes du désert, l'*Astragalus armatus* Willd, est importante pour la production animale en raison de son valeur nutritive potentiellement bonne. La valeur de cette plante dans la nutrition animale est associée à des caractéristiques telles que son offre abondante. En outre, l'espèce mentionnée est répandue dans les zones où l'élevage est une source essentielle de revenus pour les agriculteurs, contrairement aux plantes annuelles qui ont généralement des périodes de croissance plus courtes et des rendements plus faibles (Gokkuş et Koc., 2001).

I.2.7 .3. Autres usages de l'*Astragalus*

Le fourrage reste l'usage le plus commun du genre *Astragalus*. D'un point de vue écologique, ce genre permet de lutter contre l'érosion des sols tout en améliorant leur qualité (Williams., 1981). Les astragales ont des propriétés nutritionnelles et cosmétiques. Elles sont utilisées aussi comme substituants de nombreuses boissons comme le café ou le thé (Li *et al.*, 2014) comme les feuilles de *A. glycyphyllos* (Motta F., 1962). En Turquie, de nombreuses espèces ont été exploitées dans la production de la gomme adragante à usage alimentaire et

pharmaceutique, ainsi que comme agents médicaux et cosmétiques en s'appuyant sur leur richesse en acides aminés, polysaccharides et éléments métalliques (Çalış et Sticher., 1996).

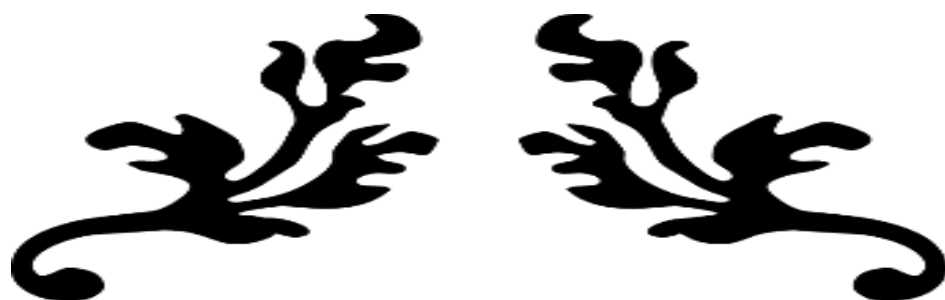
I.2.8. Activités biologiques

Des précédentes études sur plusieurs espèces d'*Astragalus* ont démontrées que ce genre possède des propriétés pharmacologiques (Huang *et al.*, 2009), notamment des activités biologiques en particulier des propriétés antivirales et hépato protectrices, en plus de stimuler la réponse immunitaire (Linneke *et al.*, 2011 ; Huang *et al.*, 2009). Des activités cardiotoniques, anti-oxydants, cytotoxiques, anticancéreuses ainsi que des effets anti-inflammatoire et analgésique ont également été constatés (Huang *et al.*, 2009), Certaines espèces du même genre sont reconnues pour leur potentiel anti-transpirant, diurèse, détoxification et tonique. Cela pourrait sans doute être attribué à l'existence de nombreux métabolites secondaires bioactifs, notamment des alcaloïdes, des anthraquinones, des flavonoïdes et des saponines. (Niu *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2011).

Tableau 4 : Les activités biologiques que possèdent certains métabolites secondaires isolés du genre *Astragalus*.

Metabolites secondaires	Activités biologiques	Références
Polysaccharides	Antitumorale Améliore l'immunité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	(Simee et Verbiscar, 1995 ; Liu <i>et al.</i> , 1994)
Triterpènes glycosylés à squelette cycloartane Et océaniens	Immunostimulante Antiprotozale Antivirale Cytotoxique Cardiotonique Adjuvante Cicatrisation des plaies	(Yeşilada <i>et al.</i> , 2005 ; Bedir <i>et al.</i> , 2000 ; Çalış <i>et al.</i> , 1997) (Özipek <i>et al.</i> , 2005 ; Isaev <i>et al.</i> , 1989) (Gariboldi <i>et al.</i> , 1995) (Radwan M. <i>et al.</i> , 2004) (Khushbraktova <i>et al.</i> , 1994) (Nalbantsoy A <i>et al.</i> , 2011) (Huang <i>et al.</i> , 2009)
Flavonoïdes	Antibactérienne	

	Cytotoxicité contre la leucémie de la ligne cellulaire HL-60 et l'hépatome de la ligne cellulaire SMMC-7721	(Jia C <i>et al.</i>, 2012)
Autres triterpenes à squelette cycloartane	Anti-inflammatoire, Analgésique Diurétique Hypotensive et sédatif	(Çalış <i>et al.</i>, 1997)



Chapitre II

Les composés phénoliques



II. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille. Le terme « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de molécules divisé en une dizaine de classes chimiques, selon le nombre d'unités phénoliques présentes. Elles présentent un point commun : la présence dans leur structure d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. (Bruneton, 1999)

Ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilbénoides, lignanes et xanthones. Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

Les différentes études phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Astragalus* (Fabaceae) ont montré la présence de polyphénols sous forme de flavonoïdes, terpènes et saponosides nous présenterons ici un aperçu bibliographique non exhaustif sur ces métabolites secondaires.

II. 2. Présentation des flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes, et à ce jour, plus de 6500 structures naturelles ont été isolées et caractérisées, répartie en 12 squelettes de base. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅ caractérisée par un enchaînement C₆-C₃-C₆. Ils ont une origine biosynthétique commune et possèdent la même structure de base à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (Fig. 7) (De Rijke *et al.*, 2006).

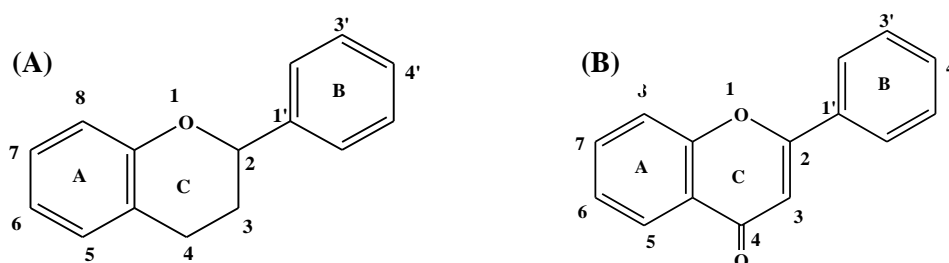


Figure 7: Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (A) et du 2-phényl chromone (B).

II.2. 1. Classification des flavonoïdes

On distingue plusieurs classes de flavonoïdes (Bruneton 2009., Ghedira, 2005) Les dérivés du 2-phénylchromone

Cette classe regroupe les flavones, flavonols, flavanones et les dihydroflavonols. Chez ces molécules, le cycle A est dans la plupart des cas substitué par deux hydroxyles phénoliques en position 5 et 7 et le cycle B par un hydroxyle en position 4' ou deux hydroxyles en position 3' et 4' (Fig. 8). Les flavanones et dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de double liaison en position 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie. Chez les flavanones naturelles, le carbone C-2 est normalement de configuration *2S* et chez les dihydroflavonols hydroxylés en position 3, la configuration est généralement *trans* (*2R*, *3R*).

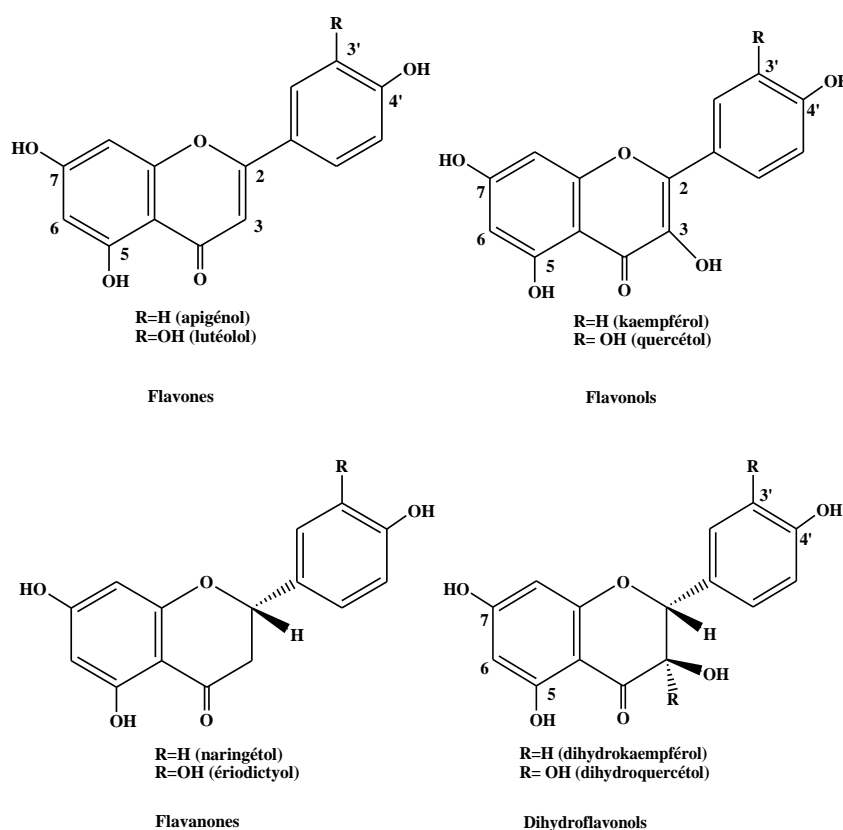


Figure 8: Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.

a. Les dérivés du 2-phénylchromane

Les catéchols (flavan-3-ol) et les leuco anthocyanes (flavan-3,4-diols) ne possèdent pas de fonction carbonyle en position 4. Ils sont poly-hydroxylés de la même façon que décrite pour les dérivés du 2-phénylchromone (Fig. 9).

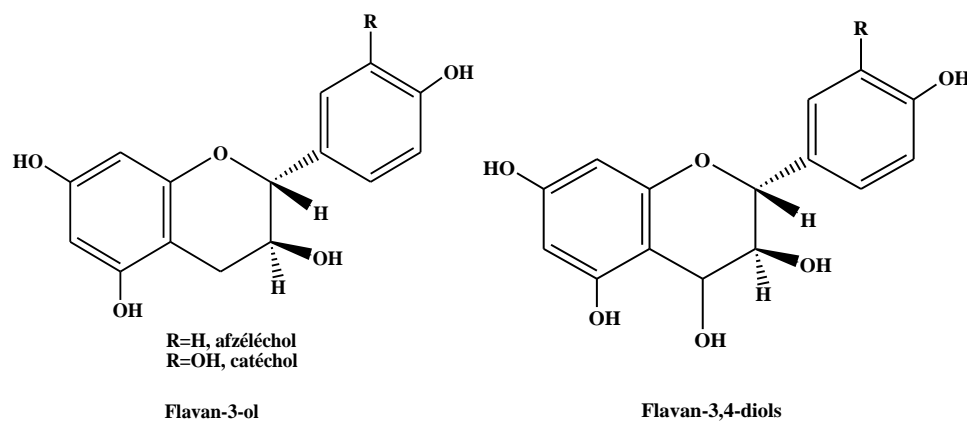


Figure 9 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones

b. Les chacones et aurones

Les chacones sont dépourvues de l'hétérocycle central et sont caractérisées par la présence d'un chaînon tri carboné, cétonique, α , β -insaturé (**Fig. 10**). Les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes mais le noyau B est assez fréquemment monosubstitué ou non substitué.

Les aurones sont des homologues des flavones mais à noyau C pentacyclique.

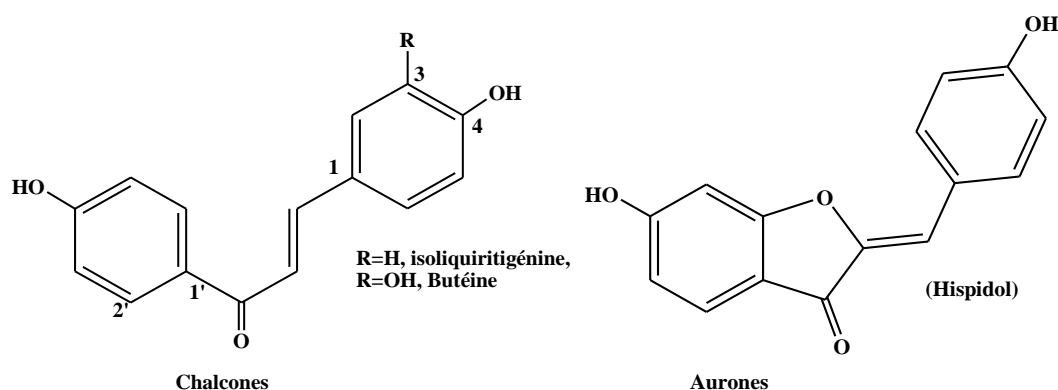


Figure 10 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.

II.2.2. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement prises en compte dans le domaine médical où on leur reconnaît diverses activités très intéressantes : anti-inflammatoire, antivirale, antibactérienne, anti-allergique et antitumorale (**Xu et al., 2007**). L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été exploitée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox (**Rice-Evans., 1996**).

Les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkyle et l'hydroxyle par l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes (**Halbwirth, 2010 ; Kale et al., 2008 ; Mladinka et al., 2010 ; Rufer et al., 2006**).

Est conditionnée par :

- Pour le cycle C : la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4 et une hydroxylation en 3
- Pour le cycle A : une hydroxylation en 5 et 7
- Pour le cycle B : une *ortho*-hydroxylation.

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (**Halbwirth, 2010 ; Leopoldini, 2010**). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (**Halbwirth, 2010**).

Les trois sites de chélation principaux (**Mladinka et al., 2010**), se situent :

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4
- Entre les deux hydroxyles en positions 3' et 4' sur le cycle B

Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur (**Goodman et Chan., 2004**). Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques » (**Middleton et al., 2000**).

Une panoplie d'études *in vitro* ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (**Middleton et al., 2000**), ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Récemment, plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (**Ramos., 2007 ; Yang et al., 2001 ; Birt et al., 2001**).

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, la quercétine et la catéchine, très abondantes dans les aliments, sont très citées. (Tomofuji *et al.*, 2009 ; Pietta., 2000). Par ailleurs, les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase (Ouali *et al.*, 2007 ; Goodarzi *et al.*, 2006).

D'autre part, les flavonoïdes jouent également un rôle clé dans la signalisation entre les plantes et les microbes, dans la fertilité masculine de certaines espèces, dans la défense en tant qu'agents antimicrobiens et dissuasifs alimentaires, ainsi que dans la protection contre les rayons UV (Dixon et Patinette., 2010 ; Winkel-Shirley., 2001). Les flavonoïdes exercent également une activité significative lorsqu'ils sont ingérés par les animaux, et leurs avantages potentiels pour la santé sont particulièrement intéressants. Une grande attention est actuellement portée aux flavonoïdes, qui se trouvent dans les graines, les herbes, les fleurs, l'huile d'olive, le thé et le vin rouge (Dixon et Pasinetti., 2010).

II. 3. Présentation des saponosides

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires, abondamment trouvés dans certaines familles du règne végétal. (Sparg *et al.*, 2004)

Leur nom provient du latin *sapo* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. (Dewick., 2002).

Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, qui se composent d'une partie lipophile l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immuno-adjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille-Dubois, 2000).

Les chaînes oligosaccharidiques greffées sur l'aglycone sont soit linéaires, soit branchées et peuvent renfermer jusqu'à 11 monosaccharides.

La partie osidique est souvent la plus inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie. La partie sucre et l'aglycone sont normalement liées par une fonction éther ou ester.

II.3.1. Classification des saponosides

Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique ou tri terpénique (**Bruneton, 1999**).

II.3 1.1. Saponosides à génines stéroïdiques

Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau formosane et spinosante (Fig. 11). Ces saponosides ont généralement un hydroxyle en position 3. Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique.

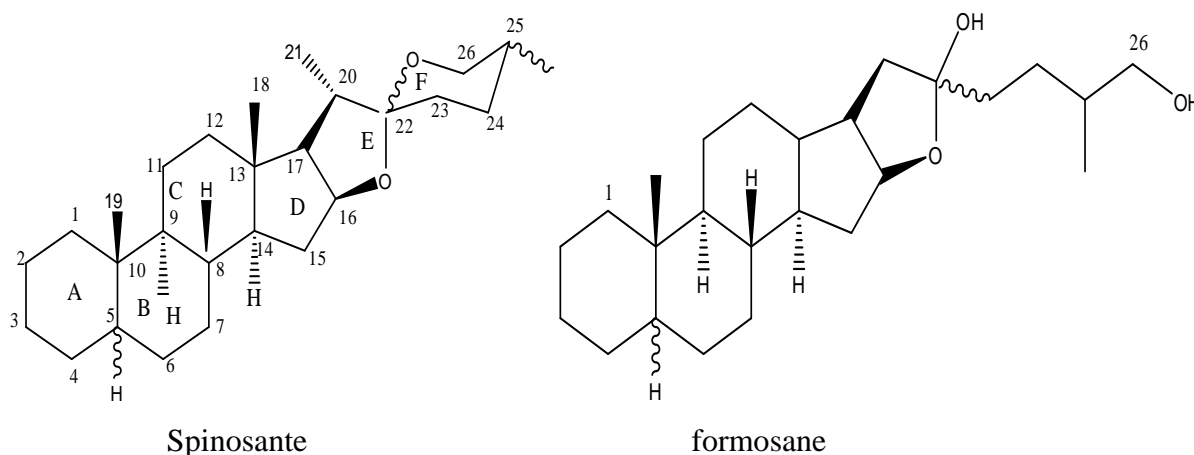


Figure 11 : Principaux squelettes stéroïdiques.

III. 3.1.2. Saponosides à génines tri terpéniques

Ils constituent la majorité des saponines des angiospermes dicotylédones (**Sparg et al., 2004**). Et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles (Fig.12). Ce sont des dérivés du noyau Oléane, urane, lupane, Friedel âne, havane (pentacycle), ou parfois du noyau dammarane, cucurbitane, lanostane et cycloartane (tétracycle).

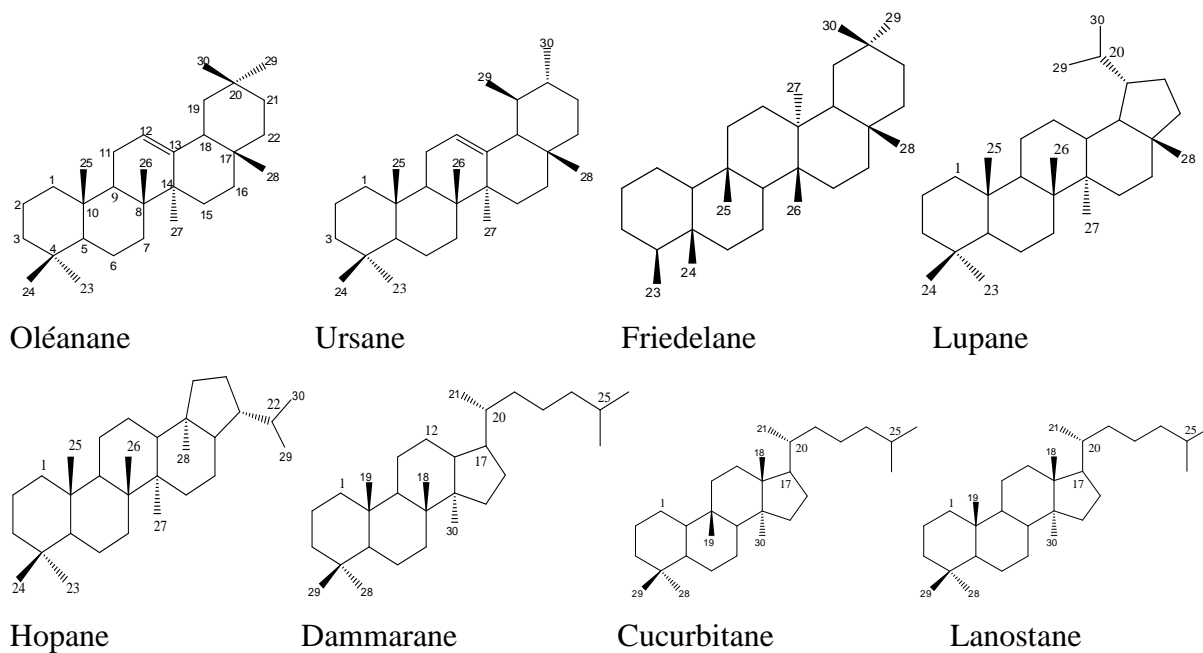


Figure 12 : Principaux squelettes tri terpéniques rencontrés.

II. 4. Les sucres

Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D'apios, le L'arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique (fig. 13) sont les oses les plus fréquemment rencontrés dans la structure des saponosides.

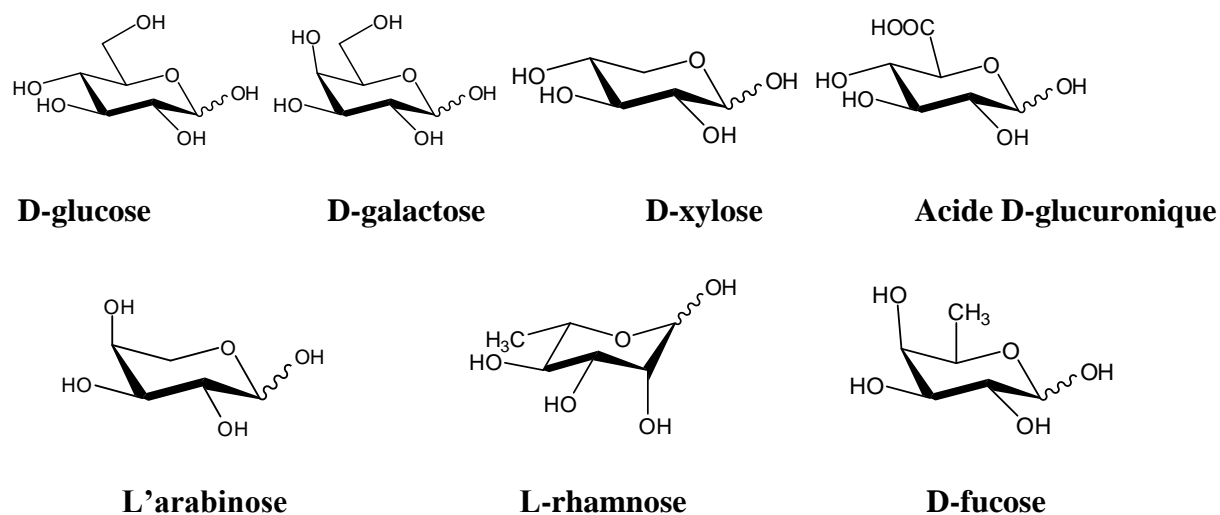


Figure 13 : les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.

II. 5. Les acides organiques

Divers acides peuvent estérifier les saponosides au niveau de l'aglycone ou au niveau des sucres (Fig. 14). Ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés sont les suivants

(Hostettmann *et al.*, 1995) :

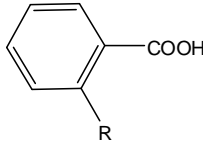
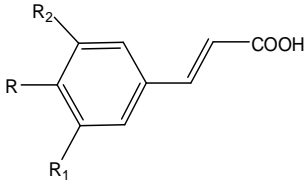
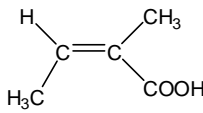
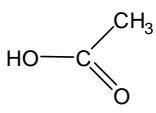
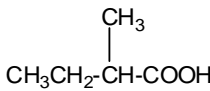
	Acide benzoïque	R		
	Acide salicylique	H		
	Acide N-méthylanthranilique	OH		
	Acide cinnamique	R	R₁	R₂
	Acide <i>p</i> -coumarique	H	H	H
	Acide 4-méthoxycinnamique	OH	H	H
	Acide 3,4-diméthoxycinnamique	OCH ₃	H	H
	Acide 3,4,5-triméthoxycinnamique	OCH ₃	OCH ₃	H
	Acide férulique	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
	Acide férulique	OH	OCH ₃	H
	Acide angélique			
	Acide acétique			
	Acide isobutyrique			

Figure 14 : les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides (Hostettmann *et al.*, 1995).

II. 5 1. Propriétés biologiques des saponosides

De nombreuses études biologiques ont montré que les saponosides possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses : molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice (Lacaille-Dubois., 2005 ; Lacaille-Dubois et Wagner., 2000 ; Lacaille-Dubois *et al.*, 1996).

➤ Activités cytotoxique et anti-tumorale

De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses (Gauthier., 2008). Les valeurs d'CI₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 µg/ml et 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire (Gauthier., 2006). En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que :

➤ Activité hémolytique

Le pouvoir des saponosides à lyser les globules rouges ou hémolytique (érythrocytes) est connu depuis très longtemps. Cette propriété peut être utilisée comme moyen de détection au sein des plantes. Cependant, en raison de la variation structurale de cette classe de métabolites secondaires, chaque saponoside n'est pas forcément hémolytique. Le phénomène d'hémolyse est expliqué par l'adsorption du saponoside sur la membrane cellulaire des érythrocytes. Cette adsorption se ferait par complexation du saponoside avec les stéroïdes membranaires. Le pouvoir hémolytique dépend de la nature de la génine et du nombre d'unités osidiques (Alabdul Magid., 2005).

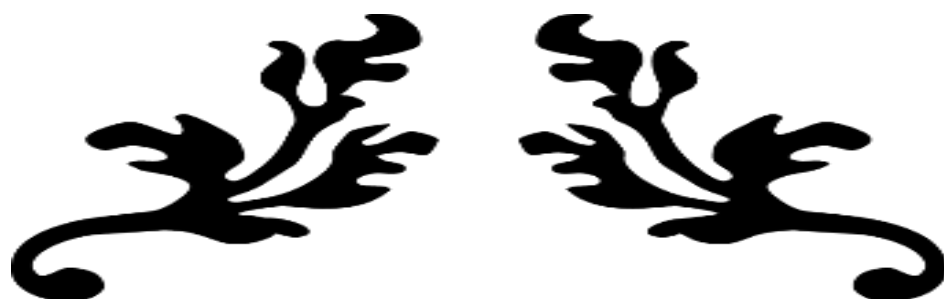
➤ Activité immunostimulante

Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités antiapoptotiques sur différents types de cellules : Jurkat (lymphocytes T humains leucémiques), tératocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques (Gaidi *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 1997).

➤ Autres activités

Une autre application importante des saponines réside dans leur utilisation comme adjuvants dans la production des vaccins. Quelques sapogénines stéroïdiques sont des matières premières importantes utilisées dans la production des hormones stéroïdiques dans l'industrie pharmaceutique. Les saponines possèdent d'autres propriétés : expectorante, hypoglycémique, vasoprotectrice, hypocholestérolémique

Certains autres saponosides à squelette cycloartane comme l'oleifolioside A, oleifolioside B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de l'espèce *Astragalus oleifolius*, sont très actifs contre la leishmaniose (**Sparg et al., 2004**).



Chapitre III

Stress oxydant et activités

antioxydante



II.1 Stress oxydant

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (EOR) et leur destruction par des systèmes de défense antioxydants (**Christophe *et al.*, 2011 ; Papazian *et al.*, 2008**). La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR) tels que les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Dans les conditions physiologiques normales, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs (vitamines, enzymes, oligoéléments) qui permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydant/ anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant, et est alors à l'origine d'un stress oxydant. (**Favier., 2003 ; Pincemail., 1999**).

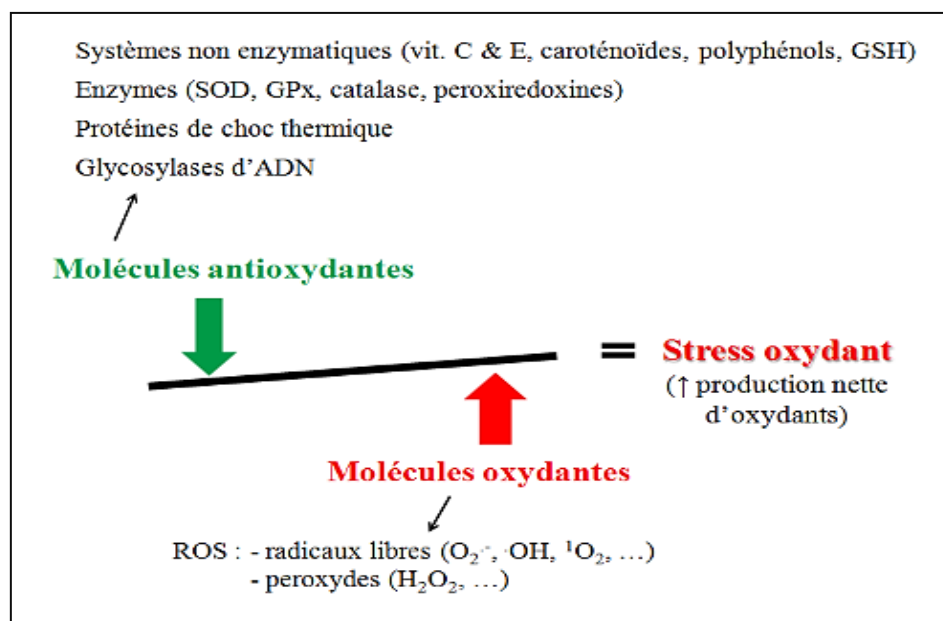


Figure 15 : Composantes de la balance entre les molécules anti-et pro-oxydantes (**Pincemail., 1999**).

III.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Physiologiquement et dans certaines circonstances, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO). Ces molécules sont indépendantes (libres) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela leur confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ces molécules auront toujours tendance à remplir leur orbitales en captant un électron pour devenir plus stable. (Goudable et Favier., 1997). Les principaux (ERO) physiologiques sont les intermédiaires métaboliques entre l'oxygène et l'eau (radical superoxyde (O_2^\ominus), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle (OH^\ominus)), ainsi que le monoxyde d'azote (NO^\ominus) et son dérivé : le peroxynitrite (ONOO^\ominus) (Fig. 16).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Medart., 2009 ; Poirier., 2004).

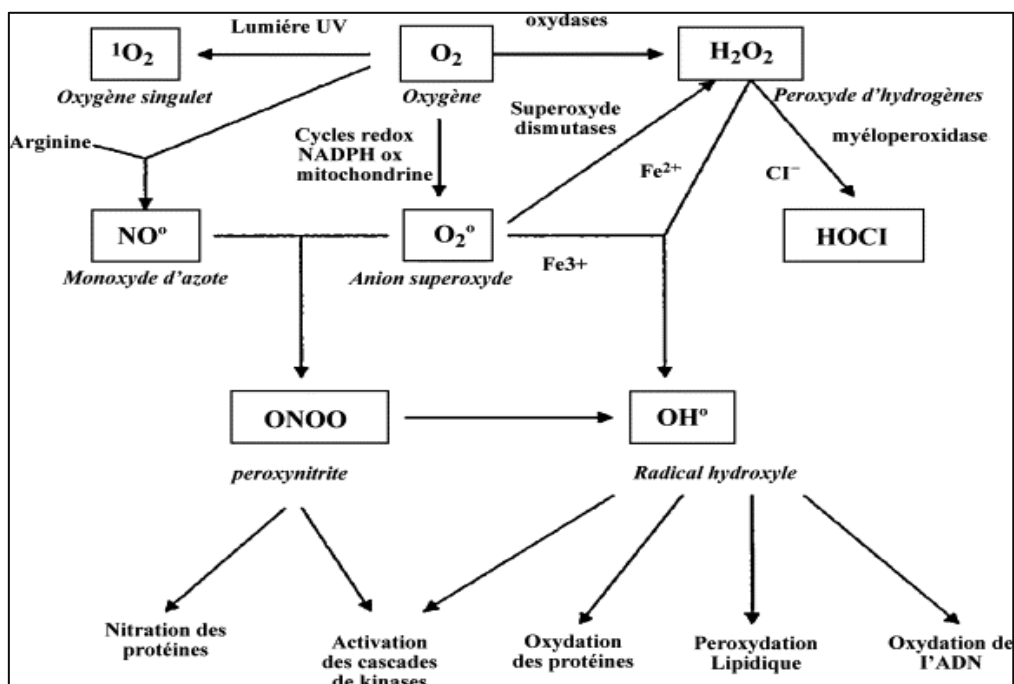


Figure 16 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

III.2.1 Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro-ou liposolubles (Cano *et al.*, 2006).

Plusieurs processus de défense contre les ERO existent de manière à contrer leurs effets néfastes sur les fonctions cellulaires. La première ligne de défense est leur captation par des systèmes non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion réduit, et plusieurs enzymes dont les plus importantes sont les enzymes superoxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase et les peroxiredoxines (Piquet et Hebuterne., 2007 ; Boldyrev., 1993).

Des concentrations tissulaires normales d'antioxydants suppriment les processus oxydatifs et protègent les tissus. Par contre, lorsque cette première ligne de défense antioxydante n'est plus suffisante, des mécanismes secondaires sont recrutés pour réparer les dommages subis et préparer les tissus contre les futures attaques oxydantes. Ces mécanismes incluent les gènes et les protéines induits par le stress tels que les protéines de choc thermique et les enzymes de réparations oxydantes comme les glycosylases d'ADN qui sont activées une fois les dommages subis (Fig. 17).

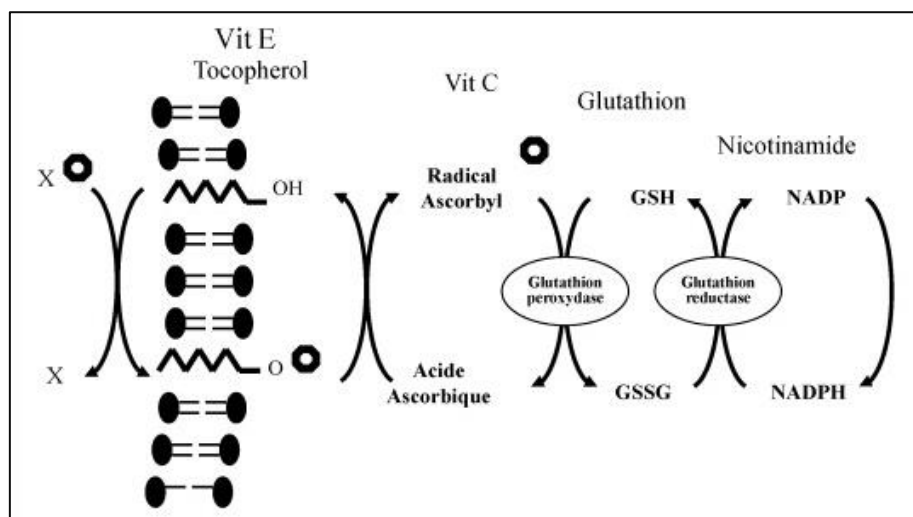


Figure 17 : Les défenses antioxydantes : complémentarité entre systèmes non enzymatiques et enzymatiques (Leverve., 2009).

III.2.2 Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EOR.

- ❖ **La catalase** : catalyse la dismutation de l' H_2O_2 pour donner $2 \text{H}_2\text{O}$. C'est un complexe tétramérique contenant un hème, localisé essentiellement dans les peroxysomes. La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (**Ichai et al., 2011**).
- ❖ **La superoxyde dismutase** : est une des rares enzymes capables d'avoir un radical substrats, en l'occurrence l'anion superoxyde. Le superoxyde dismutase transforme les radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier étant beaucoup moins réactif. Le peroxyde d'hydrogène produit sera ensuite détoxifié par la catalase (**Ichai et al., 2011**).
- ❖ **La glutathion peroxydase** : catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène (**Levrault et al., 2003**), Elle peut aussi réagir avec d'autres substrats comme les lipides expliquant son rôle protecteur *vis-à-vis* la peroxydation lipidique. Son site actif contient du sélénium et elle a besoin de glutathion réduit pour fonctionner. C'est une enzyme ubiquitaire. Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme (**Ichai et al., 2011**). Contenant un hème, localisé essentiellement dans les peroxysomes. La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (**Ichai et al., 2011**).
- ❖ **Les thiorédoxines** : Les thiorédoxines sont des enzymes qui réduisent les ponts disulfures. Une fois oxydées à leur tour, elles sont régénérées par la thiorédoxine réductase. Elles peuvent être inhibées par la thioredoxin-interacting protein (Txnip). Cette dernière peut être activée en cas d'hyperglycémie par exemple : une cascade signalétique impliquant la p38 MAP kinase induit l'expression de Txnip, qui inhibe alors l'activité de la thiorédoxine. L'équilibre redox est rompu et on voit apparaître un stress oxydant (**Schulze et al., 2004**).

III.2.3. Les antioxydants non enzymatiques

- ❖ **Le glutathion** : est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité.

Le glutathion est capable de réagir *in vitro*, avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, 1O₂, ONOO⁻ (Delattre *et al.*, 2005).

- ❖ **La vitamine E** : est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. (Yoshida *et al.*, 1993 ; Kaiser *et al.*, 1990).
- ❖ **La vitamine C** : La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. C'est un excellent piègeur des ERO qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) (Ichai *et al.*, 2011 ; Retsky *et al.*, 1999).
- ❖ **Les Caroténoïdes** : agissent en tant qu'antioxydant en bloquant les radicaux libres. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt (Monaghan et Schmitt., 1932) et ils sont capables de réagir avec les radicaux libres par trois manières : par le transfert d'électron, d'hydrogène ou par la liaison avec le radical. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes., 2005).
- ❖ **Les flavonoïdes** : Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (Igor., 2002).
- ❖ **Les tanins** : La propriété majeure de ces molécules est celle d'être antioxydantes (Pietta., 2000). Ce sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin., 1999).
- ❖ **Les coumarines** sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Igor., 2002).

III.3.3 Antioxydants de synthèse

Il existe plusieurs antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels. Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques phénoliques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), (fig. 18) sont largement

utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils sont susceptibles de manifester des effets secondaires et même toxiques. Le BHA et BHT ont été suspectés d'être responsables de lésions hépatiques et de la carcinogénèse (Sherwin., 1990 ; Wichi., 1988).

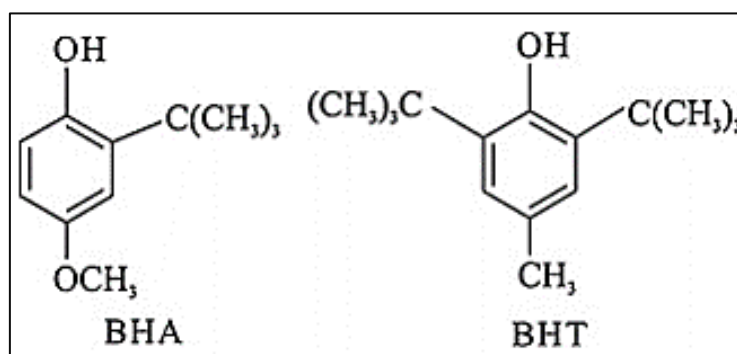


Figure 18 : Structure chimique de BHA et BHT (Heloizy *et al.*, 2010).

III.4. Conséquence du stress oxydatif

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), (Jacob., 2007 ; Davies., 1987) Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et la dégradation des cellules et des tissus (Bonnet *et al.*, 2010 ; Favier., 2003).

De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète...) (Pincemail et Defraigne., 2003 ; Favier., 2003).

III.5. Quelques activités biologiques antioxydantes

Les tests d'activité antioxydante sont effectués en utilisant plusieurs méthodes dans la littérature. En raison de la complexité chimique des extraits, souvent un mélange de dizaines de composés avec différents groupes fonctionnels, polarité et comportement chimique pourrait conduire à des résultats dispersés, selon le test employé. Par conséquent, une approche

avec plusieurs tests pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus informatif et même nécessaire. (Gülse., 2012)

III.5.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand Et Williams 1995 ; Blois., 1958). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig. 20.). De couleur violette en solution. Lorsqu'il est réduit en présence d'une substance réductrice (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), la couleur de la solution devient jaune. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (Brand et Williams, 1995).

Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu généralement méthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants (Huang *et al.*, 2005). La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction comme La lumière, l'oxygène et le pH du mélange réactionnel affectent également l'absorbance du DPPH.

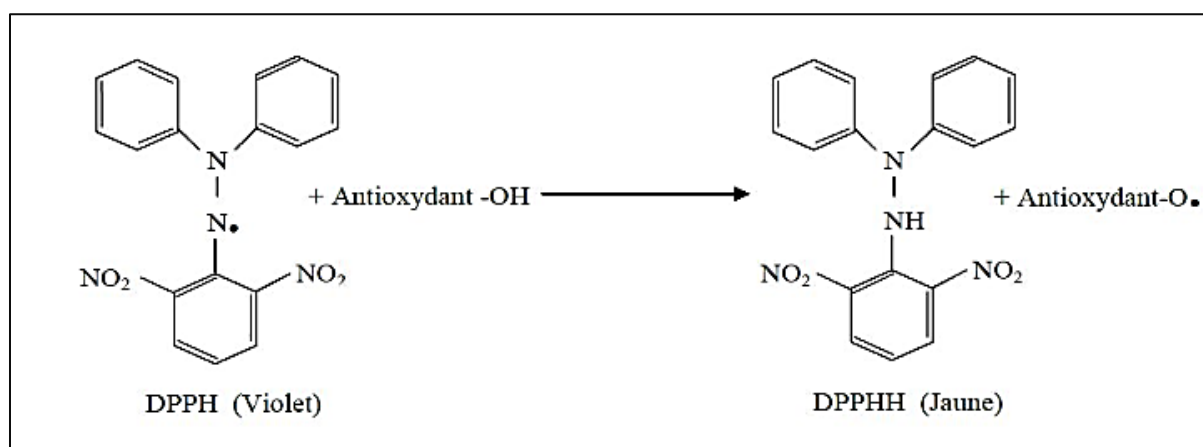


Figure 19 : Equation du radical DPPH transformé en DPPH (Talbi *et al.*, 2015).

III.5.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisée pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxy cinnamiques, flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanines, ainsi que pour des thiols et les antioxydants synthétiques, les vitamines C et E. (Özyürek *et al.*, 2011). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{2+} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^{+} -Nc qui absorbe à 450 nm. (Apak *et al.*, 2011) (Apak *et al.*, 2004).

III.5.3. Capacité de piégeage du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant, capable de réagir avec des antioxydants classiques phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron. (Rice *et al.*, 1997., Rice et Miller, 1996). Ce radical pourrait être généré par voies enzymatiques, chimiques et électrochimiques. (Roberta *et al.*, 1999 ; Rice et Miller., 1999 ; Bourbonnais *et al.*, 1998 ; Campos *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1993 ; Childs et Badsy., 1975).

Le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron e^- à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H^{\bullet}), l'atome d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution (Lien *et al.*, 1999).

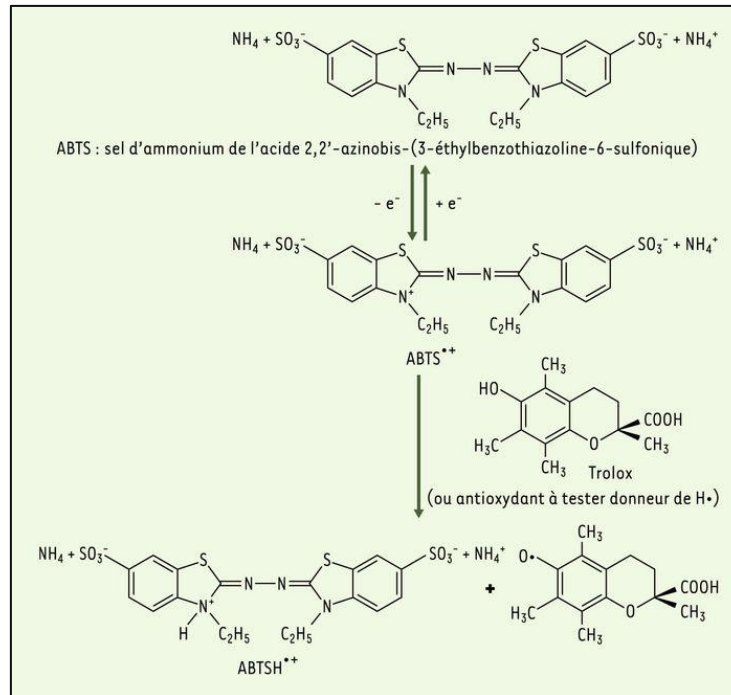


Figure 20 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H• (Lien., 1999).

III.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaiz., 1986). La présence des réductants dans les extraits provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm (Ou *et al.*, 2001).

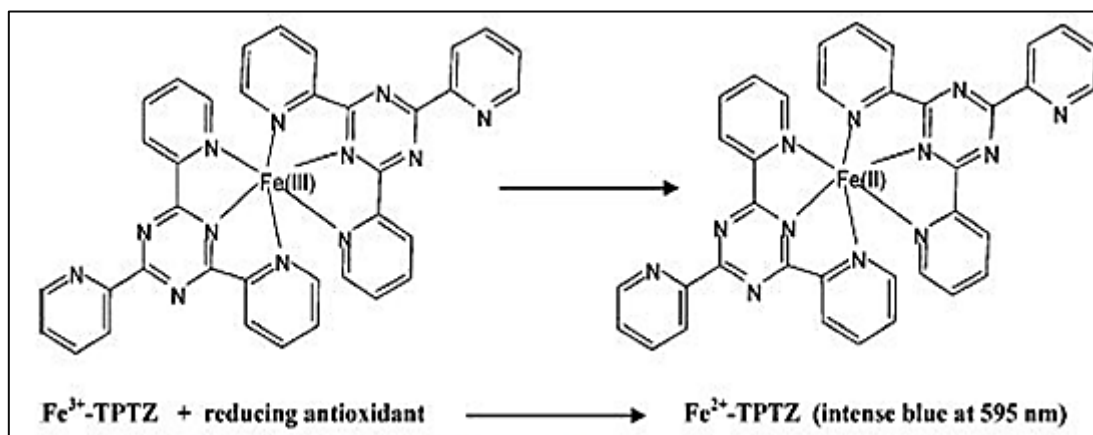
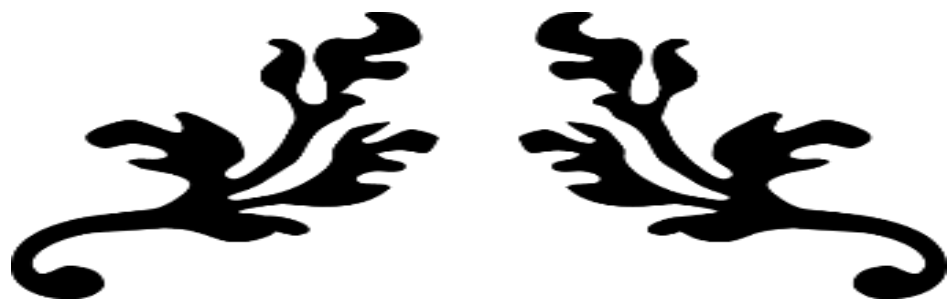


Figure 21 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (Prior *et al.*, 2005).

III.5.5. L'activité de phénanthroline

Phénanthroline-1,10, ou orthophénanthroline, constituent une famille de composés organique qui forment des complexes stables avec le fer (II) et certains autres ions. Le composé de base a deux atomes d'azote situés dans les positions telles que chacun d'eux peut former une liaison covalente avec l'ion fer (II). Trois molécules d'orthophénanthroline se combinent avec chaque ion fer (II) pour former un complexe. Ce complexe, aussi appelé « ferroïne ».

En pratique la couleur de la forme oxydée est trop pale pour être détectable et le virage associé à la réduction passe du quasi incolore au rouge (Szydłowska., 2008).



Deuxième partie

Matériels et méthodes



IV. .1. Aperçu du but de travail

Ce présent travail a pour but de rechercher de nouvelles molécules et de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans l'espèce *Astragalus armatus* Willd en vue de contribuer à la valorisation de la flore Algérienne qui reste jusqu'à présent très mystérieuse. Après l'extraction de la plante entière, l'extrait acétate d'éthyle a été fractionné en utilisant la technique de chromatographie sur colonne ouverte (CC). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparation et purification chromatographiques, conduisant à l'isolement et l'identification de **trois** composés naturels purs.

Notre étude a porté aussi sur le dépistage des activités antioxydantes, l'activité enzymatique des extraits méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique ainsi que des fractions chromatographiques provenant de l'extrait acétate d'éthyle.

IV.2. Matériels et méthodes

IV. 2. 1. Matériel végétal

IV. 2 1. 1 Description de la zone de la récolte

Le Parc National de Belezma se situe dans la partie orientale de l'Algérie du Nord, dans le massif montagneux de Belezma qui à l'extrémité Ouest des monts des Aurès, situés à 7km environ au Nord-Ouest de la ville de Batna (Fig. 22). Il correspond à un chaînon montagneux marquant le début du massif des Aurès. Il s'étend sur une superficie de 26 250 ha.

Ce massif majestueux imprime à la région un relief très accentué caractérisé par de fortes pentes et des sommets avoisinant les 2000 m d'altitude (Djebel Tichaou 2.136m; Touggurt 2.090m; Boumerzoug 1.779m et Djebel Kasserou 1614m).

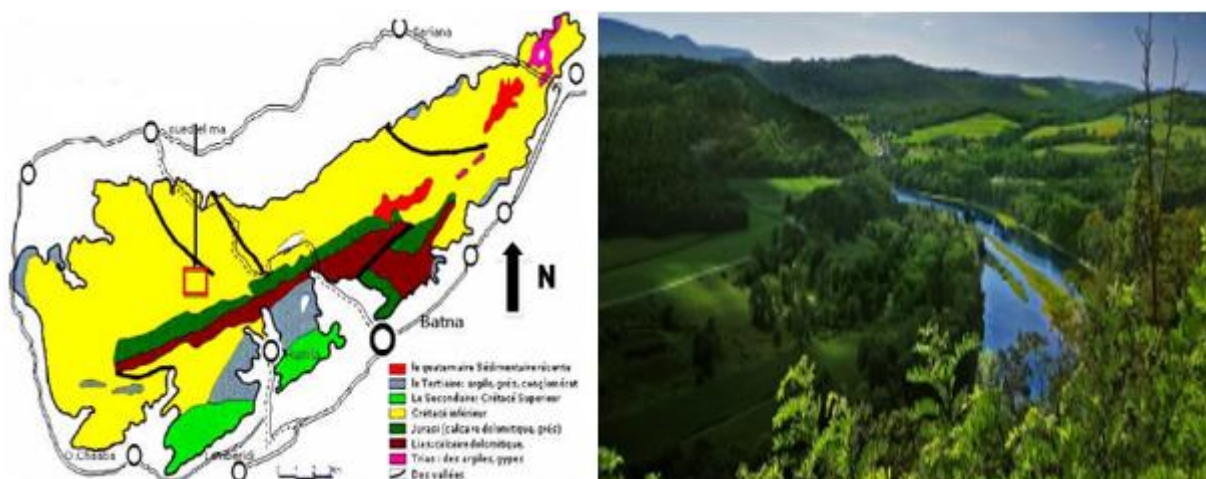


Figure 22: Carte de Géologie et une photo du Parc National de Belezma (Bitam et al 2012).

IV. 2. 1. 2. Récolte de la plante du genre

La plante *Astragalus armatus* willd a été récoltée dans la région du parc national de Belezema de la wilaya de Batna au mois de juin 2018. La récolte de la plante a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. L'identification botanique de la plante étudiée a été réalisée par Monsieur KABOUCHE Kamel.

IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Elle est utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications. Ainsi les analyses sur couche mince (CCM) permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Les plaques utilisées durant la réalisation de ce travail sont des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kieselgel 60 F254, Merck 250 µm (20 × 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié qui constitue la phase mobile. Cette dernière est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant révélation par un mélange d'acides (acide sulfurique 4 ml et acide acétique 80 ml et d'eau 16ml) ou une solution de la vanilline sulfurique (0.5 g de la vanilline, dissous dans 100 ml du méthanol, plus 1 ml d'acide sulfurique). Cela permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suite aux différentes séparations chromatographiques.

IV.3. 2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

La chromatographie sur colonne ouverte a été utilisée pour séparer et purifier les composantes de l'extrait d'acétate d'éthyle. La taille et le diamètre de la colonne, les conditions d'élution, le débit, la pression et le volume des sous-fractions recueillies ont été établis sur la base d'analyse par CCM et la masse de l'échantillon à étudier.

La phase stationnaire utilisée dans cette étude pour la CC est le gel de silice en phase normale Kieselgel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

IV. 3.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative est effectuée à l'aide d'un appareillage du laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Institut de chimie de l'université de Constantine-1, constituée d'une chaîne chromatographique type Shimadzu LC8 muni d'un détecteur UV-Visible à longueur d'onde variable et équipé d'une colonne de type phase inverse (silice greffée C18), avec un diamètre de 2,1 cm et 50 cm de longueur.

Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient
- Système de solvants : H₂O-ACN
- Débit = 7 ml/min
- Température = 28 °C
- Détection : λ = 205 et 254 nm.

IV. 4. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV. 4. 1. Spectroscopie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-500. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données Topspin 2.1 sont appliqués. Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré CD₃OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétra méthyl silane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

IV. 4. 2. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (NICOLET évolution 100). Grâce à son monochromateur, le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, un lecteur de microplaque de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode, des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'exploration de l'activité antioxydante.

IV. 5. Etude phytochimique de *Astragalus armatus* Willd

IV. 5.1. Extraction de la plante par macération à froid

Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les deux parties racinaire et aérienne (plante entière) (900 g) ont été découpées puis macérées pendant 48 heures à température ambiante par un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/Eau : 70 : 30 V/V) (4 x 5 litres). Puis fractionnées par extraction liquide/liquide successives au moyen de trois solvants à polarité croissante, chloroforme (3 x 350 ml), acétate d'éthyle (3 x 350 ml) et *n*-butanol (3 x 350 ml). Ceci a permis d'obtenir les masses suivantes : 3,5g pour l'extrait chloroformique, 4g pour l'extrait d'acétate d'éthyle, et 24,1 g pour l'extrait butanolique, Le protocole suivi figure dans les photos ci-dessous (Fig. 23 ; 24).



Figure 23 : Les différentes étapes de macération, de filtration et d'évaporation de l'extrait hydroalcoolique de la plante *Astragalus armatus* willd.

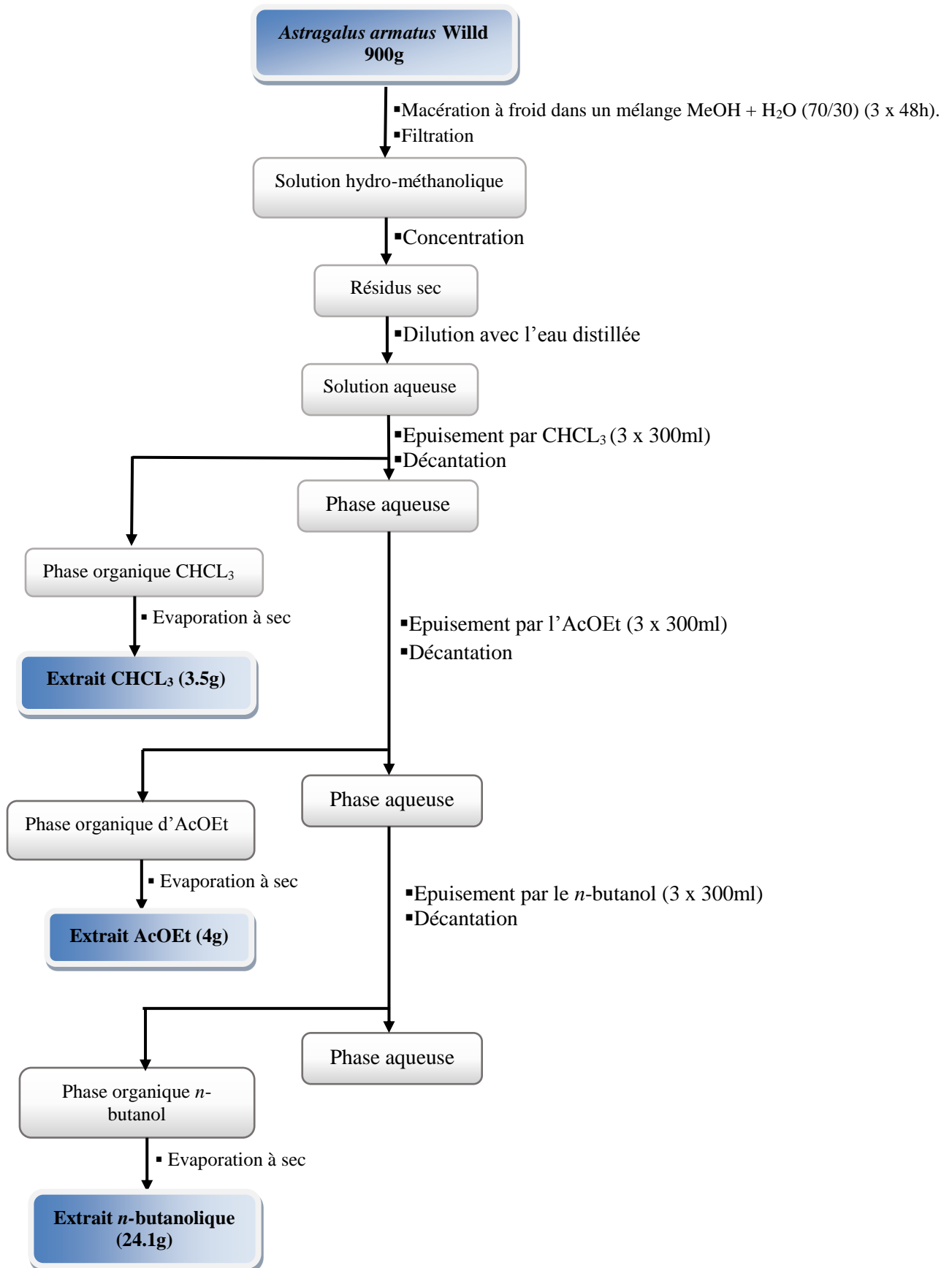


Figure 24 : Différentes étapes de l'extraction de la plante *Astragalus armatus* Willd.

IV. 5. 2. Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, montrent la richesse prévisible de l'extrait d'acétate d'éthyle en métabolites secondaires comparativement aux autres extraits, Chloroformique et butanolique (Fig. 25).

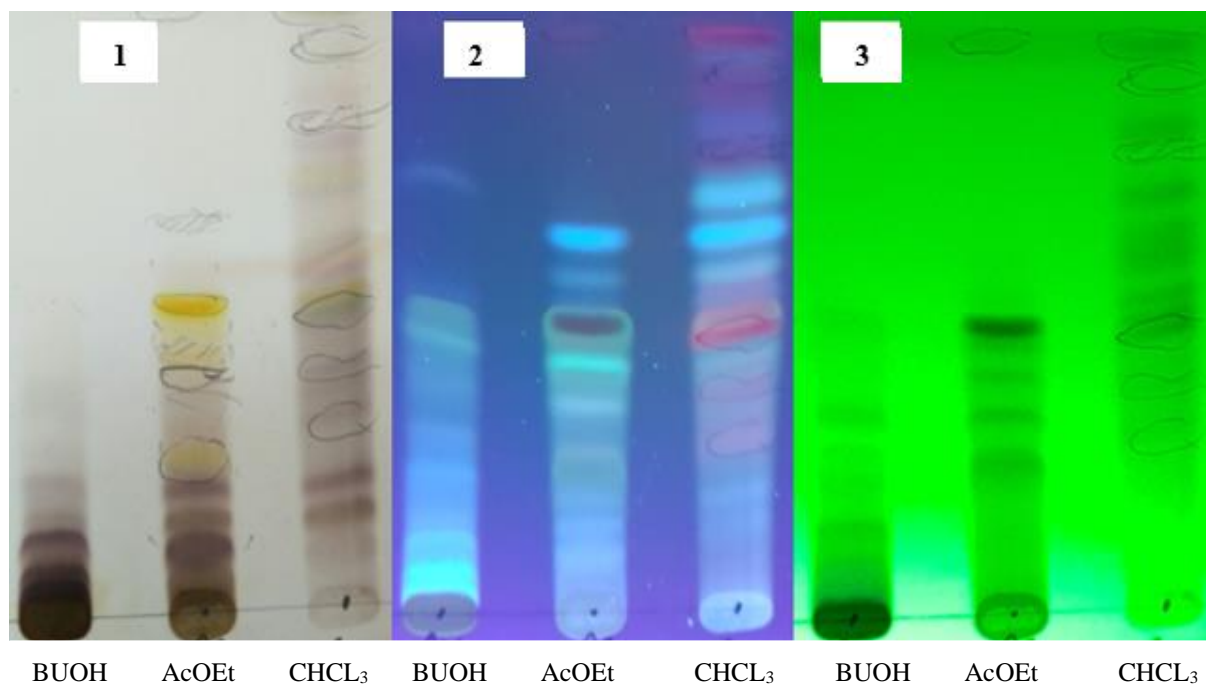


Figure 25 : plaque CCM après révélation. 2 : plaque CCM sous la lampe UV 365. 3 : plaque CCM sous la lampe UV 254.

L'extrait d'acétate d'éthyle (4 g) est chromatographié sur une colonne de gel de silice en phase normale éluée avec un gradient de CHCl₃/ MeOH [100 :0 à 0 :100]. Des fractions de 50 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans le CHCl₃/ MeOH [95 :5] et [80 :20] pour donner 243 fractions (tableau 5).

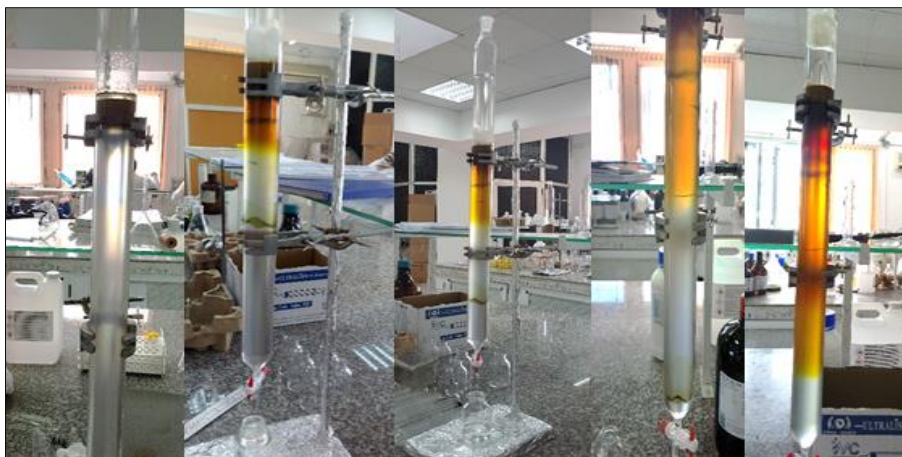


Figure 26 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice.

Tableau 5: Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice normale.

Eluant	Fractions collectées
CHCl ₃ / MeOH (100/ 0)	1-40
CHCl ₃ / MeOH (99/1)	41-77
CHCl ₃ / MeOH (97/3)	78-112
CHCl ₃ / MeOH (94 /6)	113-158
CHCl ₃ / MeOH (90 /10)	159-182
CHCl ₃ / MeOH (85/ 15)	183-208
CHCl ₃ / MeOH (80 /10)	209-230
CHCl ₃ / MeOH (70/30)	231-237
CHCl ₃ / MeOH (0/100)	238-243

La fraction 44 présente un produit majoritaire **Aa1** (Fig. 26) dont 24 mg de ce composé ont été isolés par une recristallisation dans le MeOH.

Cependant, la fraction 94 a été purifiée avec une simple précipitation aussi dans le méthanol pour donner 2.2 mg de **Aa2**.

Les fractions (136-137-138) ont été purifiées par chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale éluee par un mélange isocratique [80 :20]. (Fig. 27).



Figure 27 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction (136-137-138).

Ensuite la sous fraction (136) a fait l'objet d'une purification par CLHP semi-préparative dans un gradient de 10% à 70% MeCN/H₂O pendant 40 min. Elle a permis l'isolement du composé **Aa3** (6,7 mg, $t_r = 22,0$ min).

IV. 6. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

Notre étude a porté sur l'étude de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes par dosage spectrophotométrique des extraits chloroformique, butanolique méthanolique et acétate d'éthyl de notre plante *Astragalus armatus* willd.

IV. 6 .1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été évaluée en utilisant le reactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de dosage sur microplaque décrite par **Muller et al., (2010)**.

Vingt microlitres de chaque extrait de notre plante (1 mg/ml) ont été mélangés avec 100 μ l dilué au 1/10 Réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé et 75 μ l de solution de carbonate de sodium à 7,5 % (Na₂CO₃) dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Après 2 h d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm dans le Lecteur de microplaque. Le blanc est parallèlement préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Une gamme d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g). Toutes les manipulations sont réalisées en triple.

IV. 6. 2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification en flavonoïdes des extraits est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium décrit par **Topçu et al., (2007)** cette méthode est basée sur la formation d'un complexe stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Pour ce faire, 130 µl de MeOH ont été ajoutés à 50 µl de l'extrait, 10 µl de potassium d'acétate (CH₃COOK). Après cinq minutes 10 µl de nitrate d'aluminium ont été additionnés au mélange précédent. Après l'incubation pendant 40 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 415 nm contre un blanc.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits d'*Astragalus armatus* Willd ont été calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g d'extrait.

IV. 7. Evaluation des activités antioxydantes de l'espèce du genre *Astragalus armatus* Willd

Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer les capacités totales du potentiel antioxydant des extraits méthanolique, chloroformique l'extrait acétate d'éthyle ainsi que le produit **Aa1** isolé à partir de l'extrait acétate d'éthyle.

La mise en évidence du potentiel antioxydant a été réalisée par cinq tests complémentaires à savoir

- L'activité anti-radicalaire pour le radical libre DPPH•.
- L'activité anti-radicalaire pour le radical-cation ABTS⁺•.
- Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC.
- Le pouvoir réducteur de fer Reducing Power.
- Phénanthroline.

Les résultats, sauf pour le dosage de Phénanthroline, CUPRAC et Pouvoir réducteur, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (CI₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards (le BHA et le BHT).

L'indice CI₅₀ se définit comme étant la concentration nécessaire de l'antioxydant pour piéger 50% de radicaux DPPH•/ABTS⁺• alors que A_{0,5} correspond à la concentration de l'antioxydant pour laquelle l'absorbance vaut 0,5. Ces deux indices sont donnés en µg/ml de milieu réactionnel, du coup la capacité antioxydante d'un échantillon est d'autant plus élevée que son CI₅₀ ou A_{0,5} est petit.

IV. 7. 1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

La méthode appliquée pour mesurer une l'activité anti-radicalaire libre est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH qui a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par **Blois, 1958** avec une légère modification (**Öztürk et al., 2011**). Le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

Un volume de 40 μ l de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, ainsi que le BHA et le BHT, ont été additionnés à 160 μ l d'une solution méthanolique de DPPH (0,1mM) préalablement déposée dans chacun des puits d'une microplaque à 96 puits. Un témoin négatif est préparé en parallèle en remplaçant les 40 μ l d'échantillon par du méthanol. Suite à une incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant une trentaine de minutes, l'absorbance est mesurée à 517 nm. On note que les tests sont pratiqués en triplicata

Le pourcentage de l'activité de piégeage du radical DPPH est calculé selon la formule suivante :

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

Où A DPPH est l'absorbance de la solution DPPH, et A Extrait est l'absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

IV. 7. 2. Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+})

L'activité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été mesurée Selon le protocole décrit par **Re et al., (1999)** avec des volumes ajustés pour une manipulation sur microplaque de 96 puits.

Le radical cation ABTS^{•+} a été préparé à partir de l'ABTS^{•+} (7 mM) et du persulfate de potassium K₂S₂O₈ (2,45 mM), ces deux produits sont mélangés en solution aqueuse. Le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est ensuite diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,7±0,025 à 734 nm avant son usage.

Pour cela, 40 μ l d'échantillon de chaque concentration est déposé en triplicata sur les quelles 160 μ l de solution fraîchement préparée sont ajoutés. Cette opération est aussi valable pour les deux standards employés. Un blanc est parallèlement préparé suivant le même protocole tout en remplaçant l'échantillon testé par le méthanol. Après 10 minutes d'incubation l'absorbance est mesurée à 734 nm.

L'activité de piégeage du radical ABTS^{•+} est calculée en tant que pourcentage de décoloration de radical cation ABTS^{•+} selon cette équation :

$$AA (\%) = [1 - (A \text{ Extrait} / A \text{ blanc})] \times 100$$

IV. 7. 3. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

La méthode utilisée pour mesurer la réduction du cuivre est celle de CUPRAC, décrite par Apak et al., (2004). Elle consiste à déposer 40 µl des échantillons à concentrations décroissantes en veillant à ce que l'opération soit reproduite de façon triple. Par la suite, chaque puits reçoit 60 µl du tampon d'acétate d'ammonium (AC-NH₄) (1M, PH 7), 50 µl de la solution aqueuse du Chlorure de cuivre (II) (CuCl₂, 2H₂O) (10 mM) et 50 µl de la solution méthanolique de la néocuproïne (7,5 mM), Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur de microplaque, puis incubé durant une heure. L'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaque.

Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV. 7. 4. Test de l'activité de phénanthroline

Szydlowska-Czerniaka (2008) a décrit la méthode de dosage de l'activité antioxydante de phénanthroline. Cette activité est basée sur la réduction préalable de Fe³⁺ en Fe²⁺ par le chlorure ferrique et le 1,10-Phénanthroline. Les ions Fe²⁺ donnent avec la 1-10-phénanthroline, un ion complexe rouge orangé contenant trois molécules de 1, 10-phénanthroline pour un ion Fe²⁺.

10 µl d'échantillon de chaque concentration sont introduits dans 3 puits alignées sur les quelles 50 µl chlorure de fer FeCl₃ (0.2%) puis 30 µl de Phénanthroline (0.5%) et 110µl de MeOH sont additionnés. La plaque est incubée par la suite à l'obscurité pendant 20 min à 30°C.

L'absorbance est enregistrée à 510 nm. Le BHT est utilisé comme standard. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV. 7. 5. Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

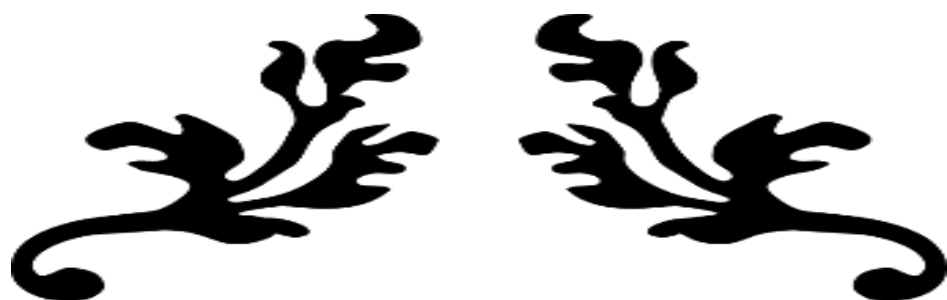
Oyaizu (1986) détermine la méthode de l'activité de réduction de l'ion ferrique. La solution des extraits à différentes concentrations (10 µl) a été déposée dans chaque puits d'une

microplaque de 96 puits. Puis 40 μ l du tampon phosphate et 50 μ l de $K_3Fe(CN)_6$ sont additionnés l'un après l'autre. Par la suite, les mélanges sont incubés à l'étuve à 50°C pendant vingt minutes. Au bout de l'incubation, 50 μ l de TCA, 40 μ l de H_2O et 10 μ l de $FeCl_3$ sont rajoutés au milieu réactionnel successivement. On note que chaque dépôt faisait l'objet de trois répétitions

Un blanc est parallèlement préparé suivant les mêmes volumes tout en mettant du méthanol à la place de l'échantillon testé. L'enregistrement des absorbances est effectué à une longueur d'onde de 700 nm. L'activité réductrice est ensuite calculée à $A = 0,5$.

IV. 8. Analyses statistiques

Toutes les données obtenues à partir des activités étaient les moyennes de trois analyses. Les données ont été enregistrées en tant que moyenne \pm déviation standard (SD). Les valeurs d' $CI_{50}/A_{0,5}$ ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Origine Pro 8. Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.



Troisième partie :

Résultats et discussion



VII.1 Identification des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle

VII.1. 1. Détermination structurale du composé Aa1

Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune, la fluorescence noir sombre à 365 nm et le profil de son spectre UV enregistré dans le MeOH (Fig. 28) sont caractéristiques d'un flavonol, avec des maxima d'absorption à 371 nm (Bande I) et 254 nm (Bande II).

L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de 51 nm pour la bande I avec augmentation de l'intensité lumineuse (Tableau 7), indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. (Mabry et al., 1970). L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle la présence d'un OH libre en position 7. L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 21 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7. Le déplacement bathochrome de 56 nm de la bande I, observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$), indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre d' AlCl_3 , laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Ces données permettent de proposer au composé **Aa1**, la structure partielle suivante :

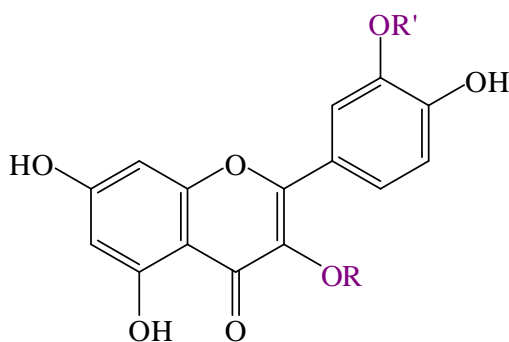
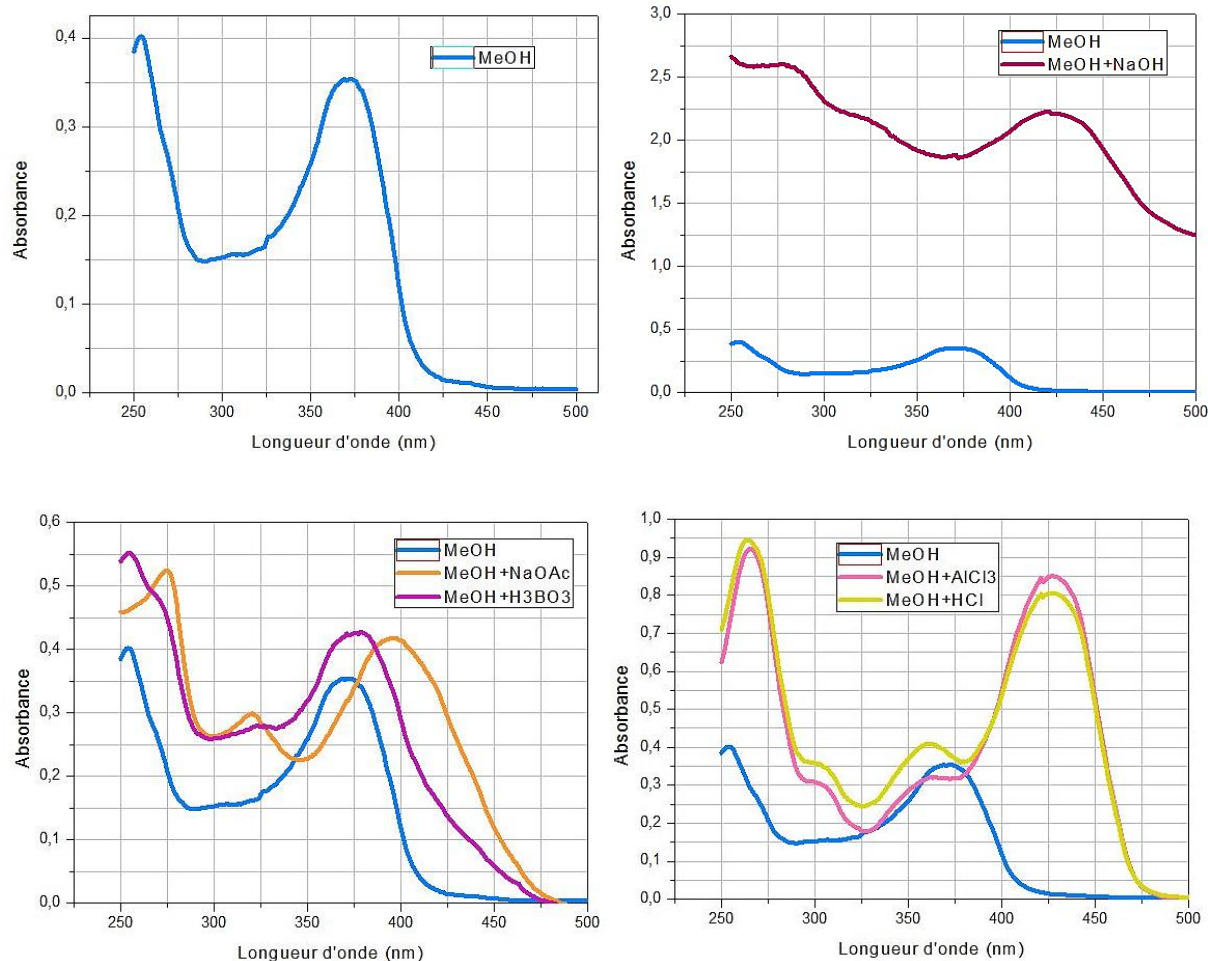


Figure 28 : La structure partielle du composé **Aa1**.

Tableau 6: Données spectrales UV du composé Aa1.

Solvants-réactifs	λ_{\max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	371	254	
NaOH	422	278	325
AlCl ₃	426	265	
AlCl ₃ + HCl	427		
NaOAc	396	275	
NaOAc + H ₃ BO ₃	376	265	

**Figure 29 :** La série spectrale UV de la fraction Aa1.

L'analyse structurale de spectre de RMN ^1H (Fig. 31) du composé **Aa1** révèle : Deux signaux à δ_{H} 6,42 et δ_{H} 6,20 d'intégration 1H chacun sous forme de doublet. La valeur des constantes de couplage entre ces protons ($J = 2$ Hz) indique que le couplage est de type méta correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonol.

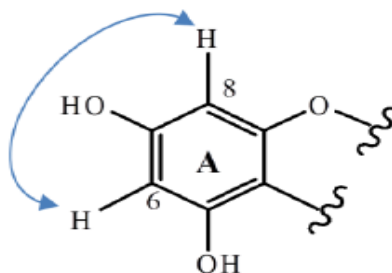


Figure 30 : Corrélation COSY entre H- 6 et H-8 du cycle A.

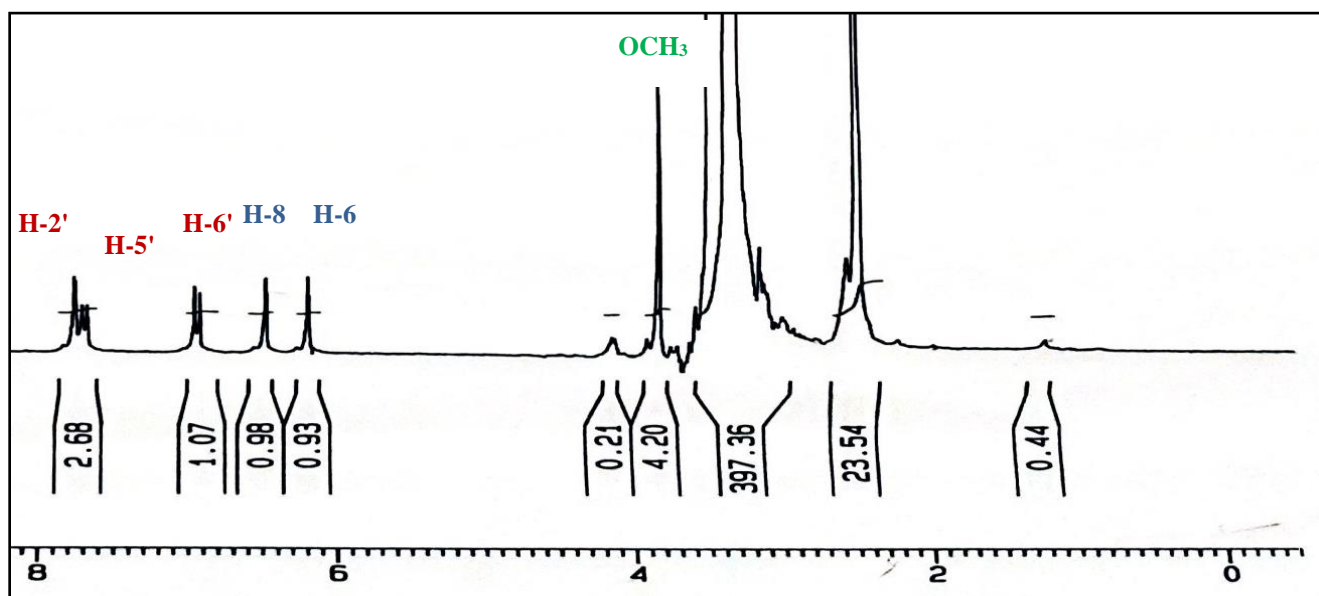


Figure 31: Spectre de RMN ^1H du composé **Aa1**.

Trois protons aromatiques à δ_{H} 6,93 (*d*, $J = 2$ Hz), 6,89 (*d*, $J = 8,4$ Hz) et 7,74 (*dd*, $J = 8,4 ; 2$ Hz), dont les constantes de couplage attestent qu'ils forment un système ABX à trois protons caractéristiques d'un noyau aromatique 1',3',4'-trisubstitué, qui est le cycle B du flavonol. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-5' et H-6' (Fig. 31).

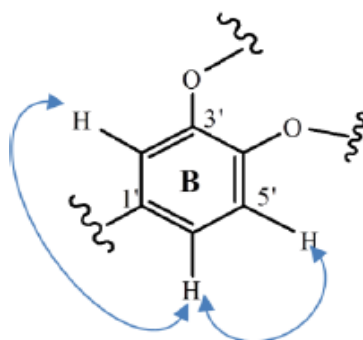


Figure 32 : Corrélation COSY entre H- 2', H-5' et H-6' du cycle B.

Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,83$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH_3). Ce dernier ne pourrait être qu'en position 3' d'après les données UV.

La comparaison des déplacements chimiques obtenus avec les données spectroscopiques trouvées dans la littérature (Cao et al.,2009) permet d'assigner pour le composé **Aa1** la structure de L'isorhamnétine :

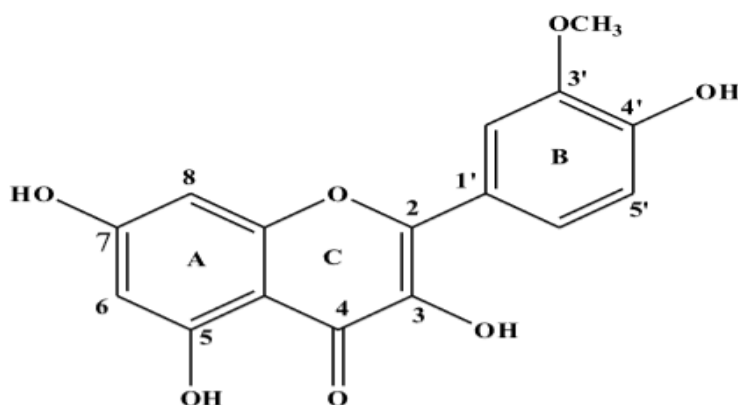


Figure 33 : structure du composé **Aa1** : Isorhamnétine

VII. 1. 2. Détermination structurale du composé **Aa3**

Ce composé **Aa3** obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, montre aussi une fluorescence violette sombre sous la lampe UV à 365 nm. Son spectre UV (Fig. 35) enregistré dans le méthanol présente deux maxima d'absorption : la bande I à 356 nm correspondant au cycle B et la bande II à 254 nm attribuable au cycle A d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (3-OR).

L'ajout du NaOH induit un déplacement bathochrome de la bande I de 54 nm avec augmentation de l'intensité lumineuse (tableau 8), indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 325 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7. Le déplacement bathochrome de la bande II de 18 nm, après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol, confirme la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de la bande I de 45 nm, observé après addition de AlCl₃+ HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5.

Pas de déplacement hypsochrome de la bande I, en comparant les spectres AlCl₃ + HCl et AlCl₃, ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Ces données permettent de proposer au composé **Aa3**, la structure partielle suivante :

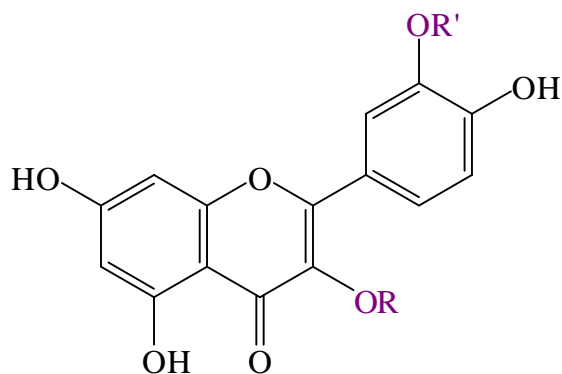


Figure 34 : La structure partielle du composé **Aa3**.

Tableau 7: données spectrales UV du composé Aa3

Solvants-réactifs	λ_{\max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	356	254	
NaOH	410	268	325
AlCl ₃	403	263	
AlCl ₃ + HCl	401	268	
NaOAc	406	272	
NaOAc + H ₃ BO ₃	364	268	

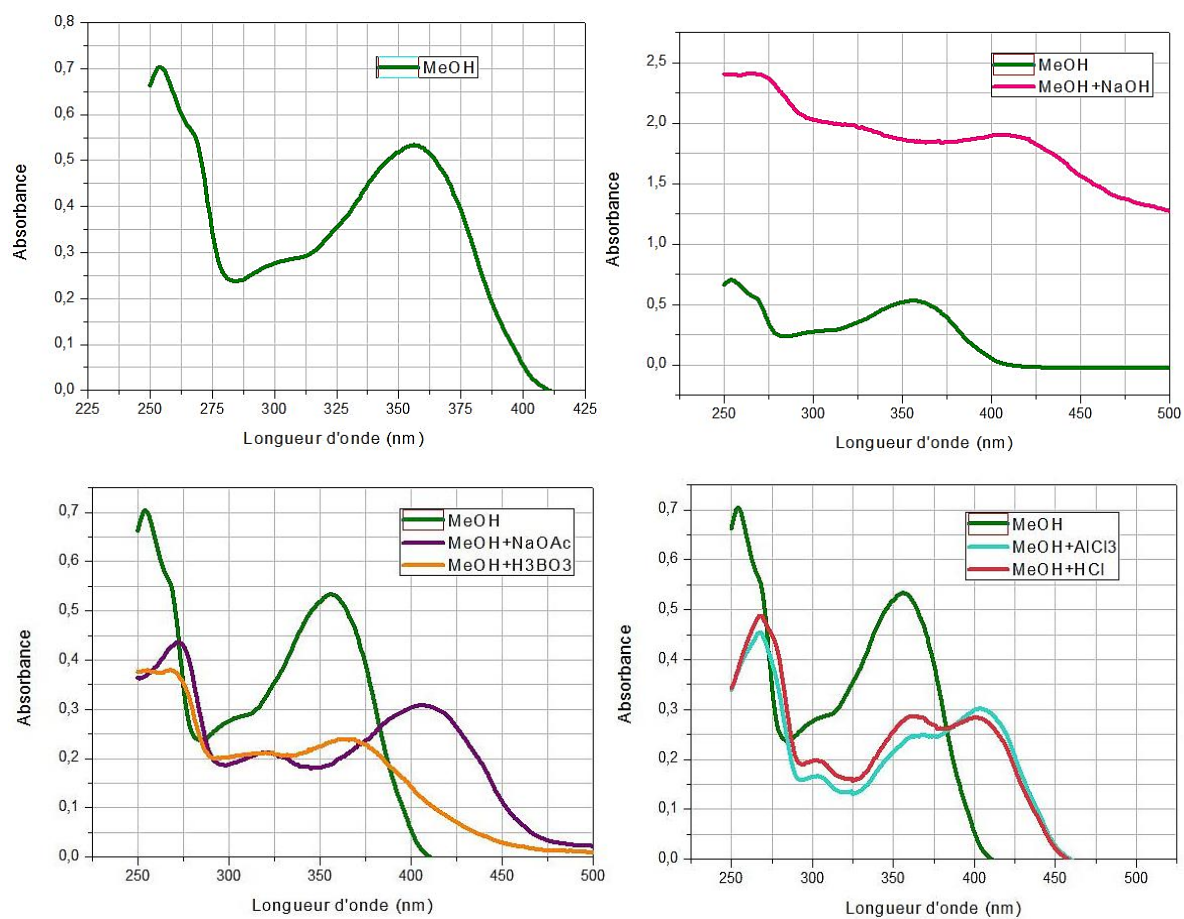


Figure 35 : Série spectrale UV de la fraction Aa3.

Le spectre RMN ¹³C (Fig. 36) révèle la présence de 28 signaux correspondant aux 15 carbones aromatiques, 12 carbones osidiques et un méthoxyle.

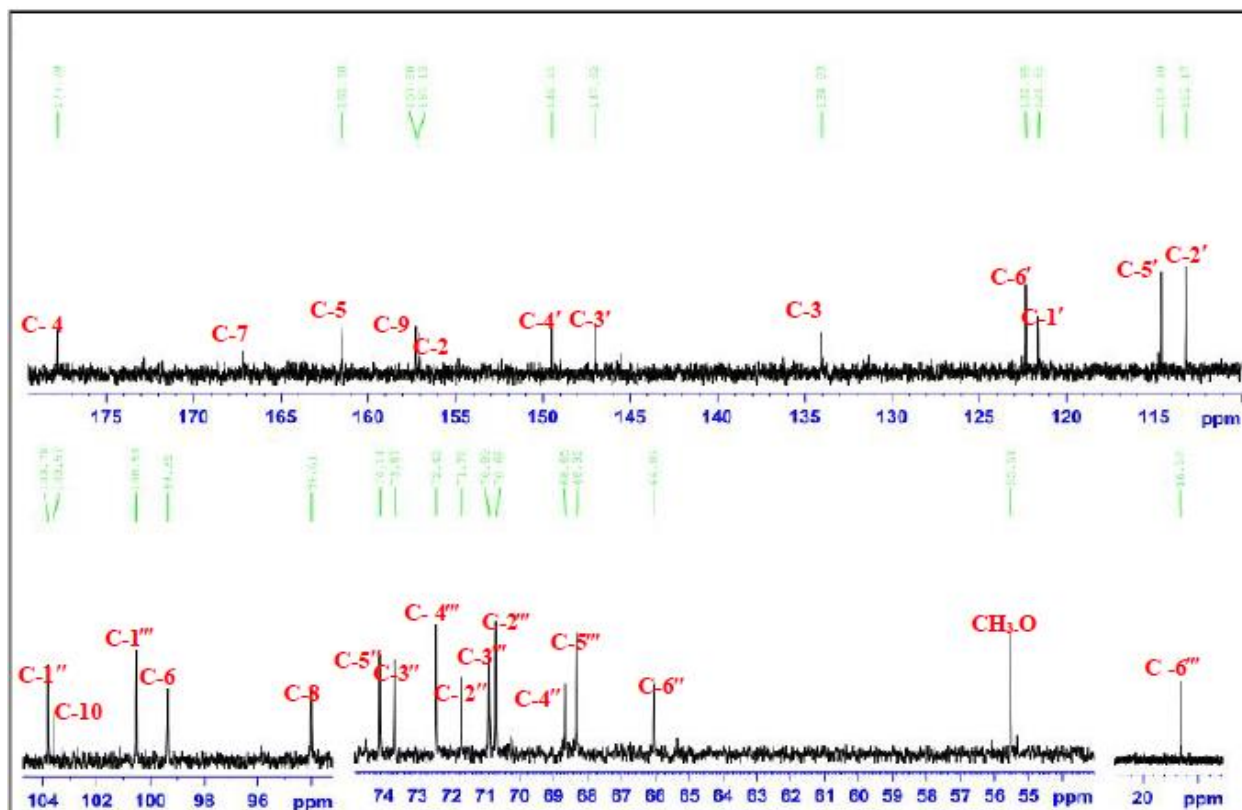


Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Aa3**.

Le spectre de RMN- ^1H du composé **Aa3** (fig. 37) présente des similitudes avec celui du composé **Aa1**. Il permet de mettre en évidence :

- la présence de substituants hydroxyles en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification des protons H-6 et H-8 du cycle A à δ_{H} 6,23(*d*, $J = 1,9$ Hz) et 6,43 ppm (*d*, $J = 1,9$ Hz).
- les signaux de trois protons aromatiques à δ_{H} 8,04 ppm (*d*, $J = 1,9$ Hz), 7,62 ppm (*d*, $J = 8,4- 1,9$ Hz), 6,93 ppm (*d*, $J = 8,4$ Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.
- un singulet intégrant pour 3H à δ_{H} 3,98 ppm, caractéristique d'un groupement méthoxyle.

Il s'agit donc de l'aglycone isorhamnétine déjà élucidé dans le cas du composé **Aa1**.

Le spectre de RMN ^1H montre, en plus des signaux de l'isorhamnétine, deux protons anomériques à δ_{H} 5,25 ppm (*d*, $J = 7,8$ Hz) et 4,55 ppm (*d*, $J = 1,3$ Hz) révélant la présence de deux unités osidiques.

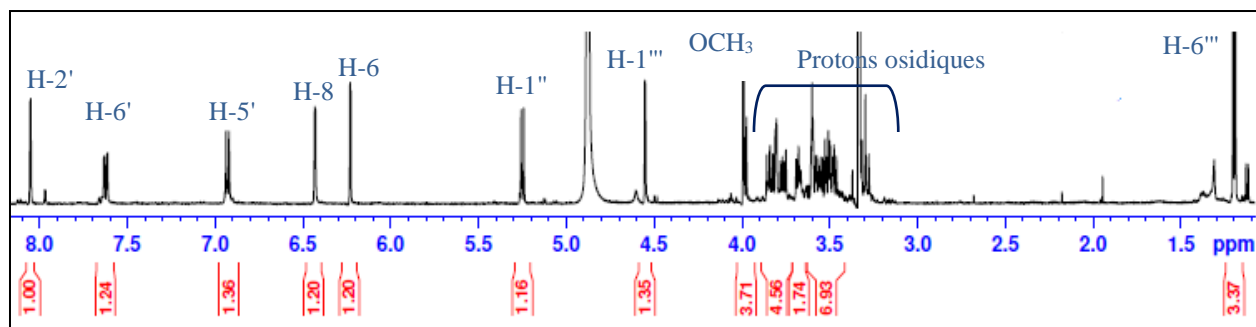


Figure 37 : Spectre de RMN ^1H du composé **Aa3**.

L'analyse des spectres COSY (Fig. 38) et HSQC (Fig. 39) permet d'identifier les deux sucres comme étant :

- ✓ un β -D-galactopyranose à partir de l'anomère à 5,25 ppm,
- ✓ un α -L-rhamnopyranose à partir de l'anomère à 4,55 ppm, caractérisées par son méthyl doublet à 1,18 ppm (d, $J = 6,2$ Hz, H- 6''').

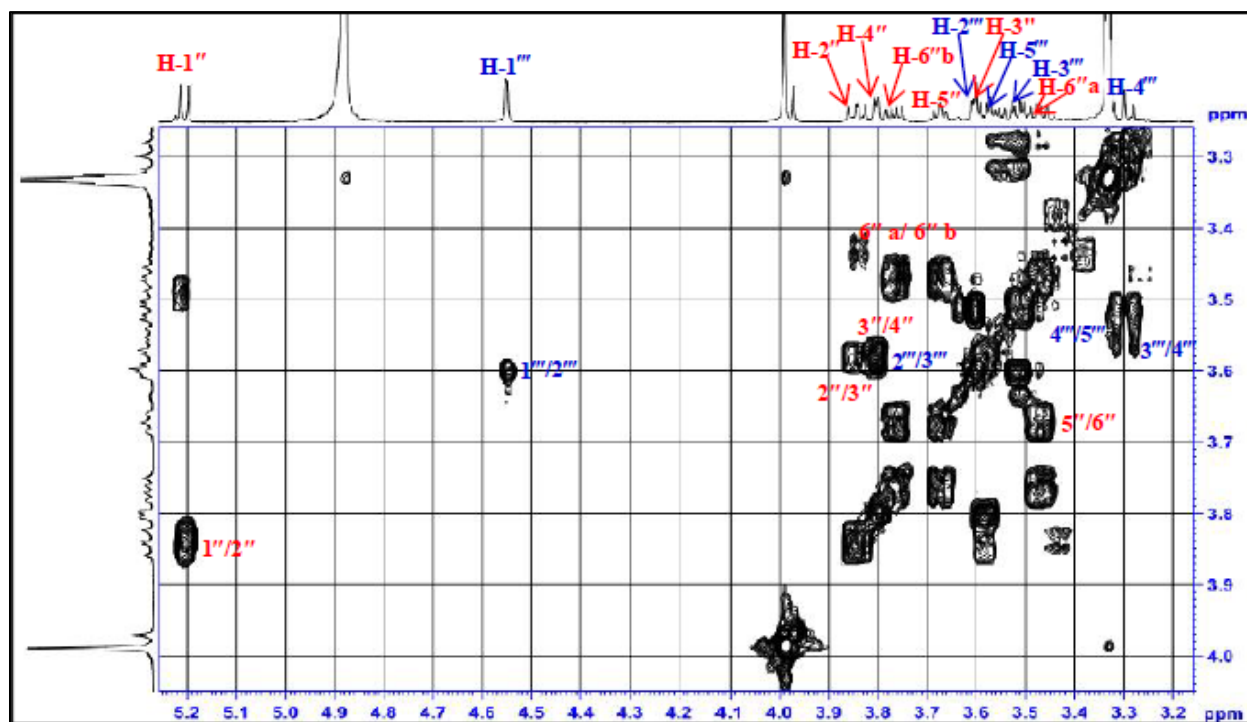


Figure 38 : Spectre COSY de la partie sucres du composé **Aa3**.

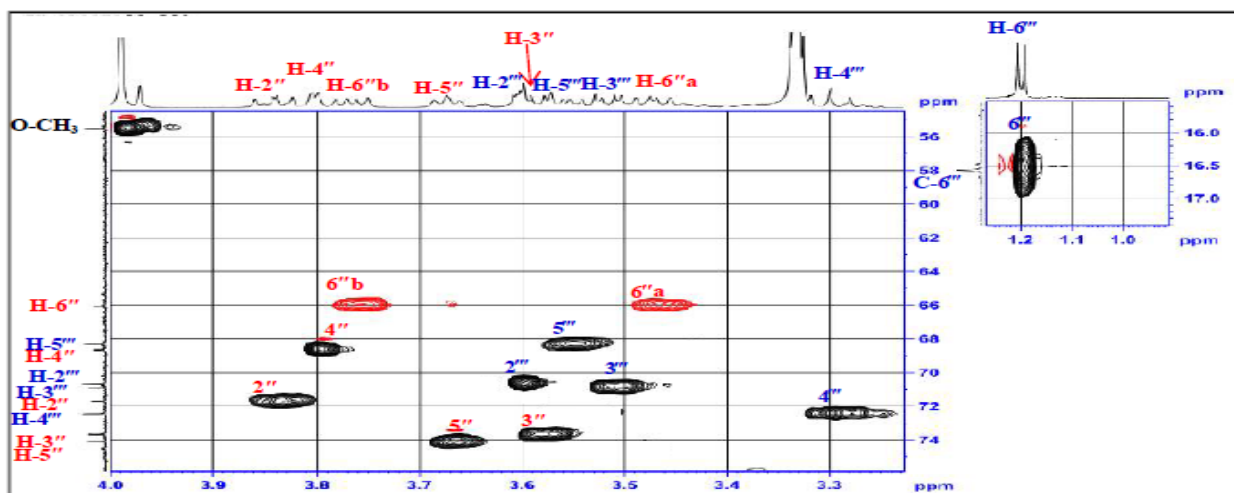


Figure 39 : Spectre HSQC de la partie sucres du composé Aa3.

Le spectre HMBC (Fig. 40 et 41) montre des corrélations H-C entre :

- ✓ Le carbone C-3' résonant à 147 ppm et les protons du méthoxyle correspondants au signal à 3,99 ppm.
- ✓ Le carbone C-3 et le proton anomérique H-1'' du galactose, les protons H-6'' du galactose, et le carbone C-1''' du rhamnose et inversement entre le carbone C-6'' du galactose (dont le déplacement chimique déblindé à 66,0 ppm indique qu'il porte un substituant OR) et le proton H-1''' du rhamnose mettant en évidence la liaison ou l'enchaînement diosidique α -rhamnopyranosyl-(1→6)- β -galactopyranosyl en position 3 de la génine.

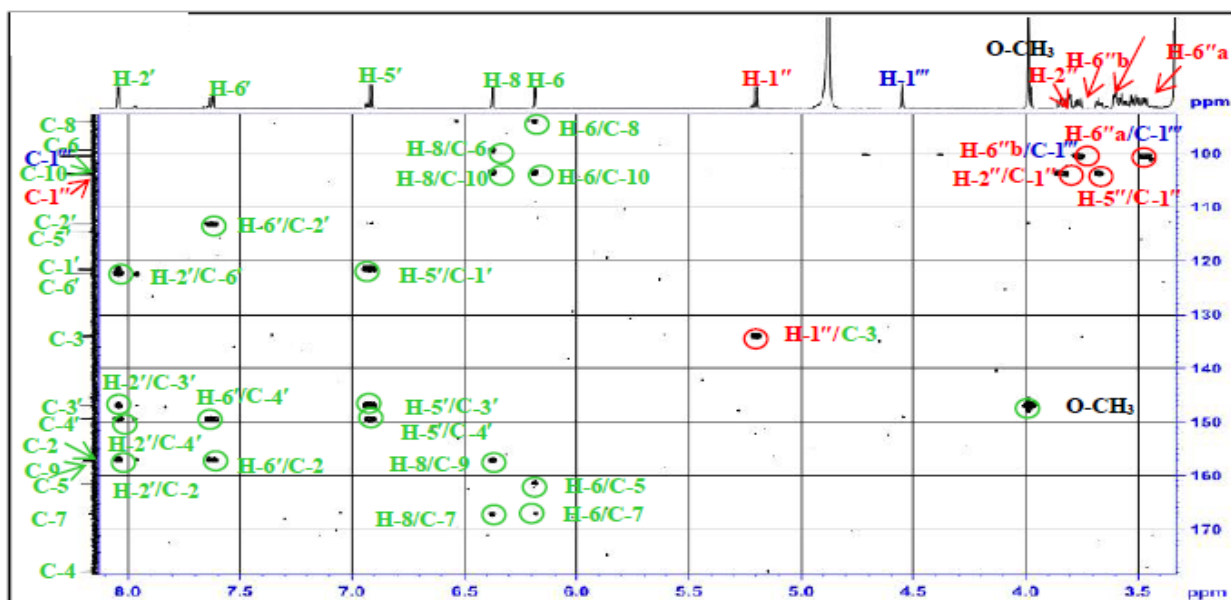


Figure 40 : Spectre HMBC de la partie sucres du composé Aa3

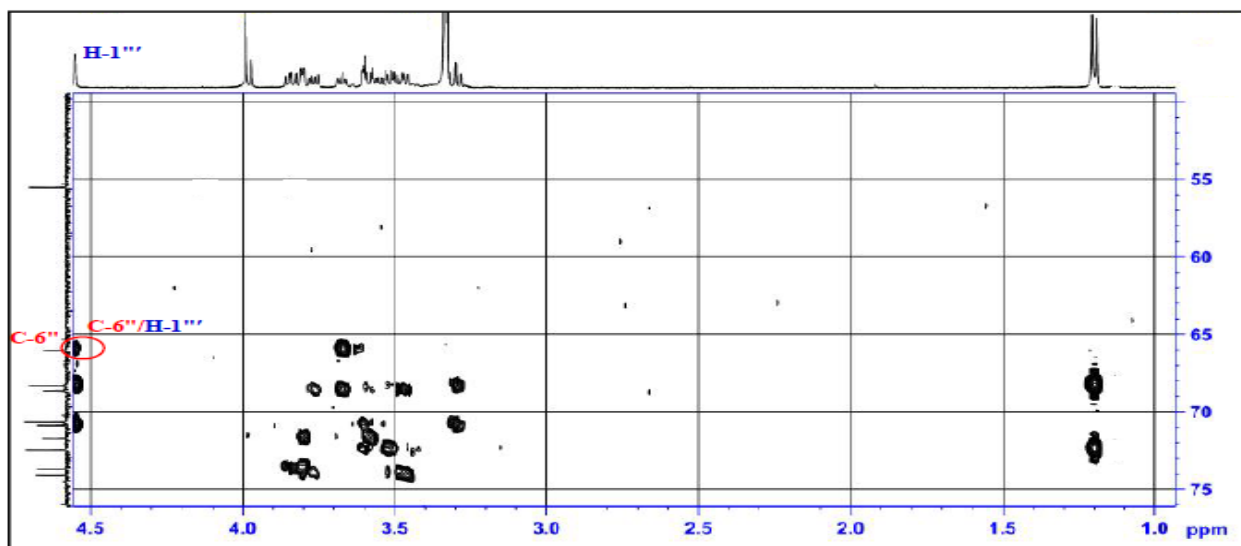


Figure 41 : Spectre HMBC du composé Aa3 (partie II : δC entre 55 et 75 ppm).

L'analyse des spectres de RMN 1H , ^{13}C , COSY et HMBC permet d'identifier le composé **Aa3** comme étant 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) - β D galactopyranosyl] isorhamnétine (de l'isorhamnétine 3-*O*-robinobioside) isolé antérieurement des espèces *Aerva javanica* (Amaranthaceae) (N. A. M et al., 1990) et *Bupleurum spinosum* L. (Apiaceae). (Bencheraiet et al., 2012).

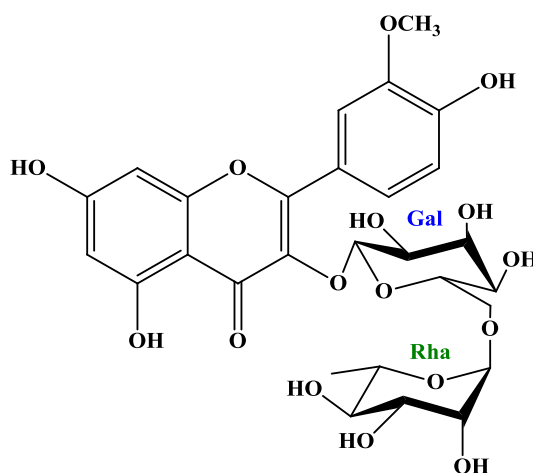


Figure 42 : structure du composé Aa3 : L'isorhamnétine 3-*O*-robinobioside

VII. 1. 3. Détermination structurale du composé Aa2

La composé **Aa2** est isolé sous forme d'une poudre blanche, présente sur CCM des taches invisibles à la lumière UV et se colorent en mauve après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre RMN ^1H de ce composé **Aa2** (Fig. 43) montre des signaux à champ fort sous forme multiplet, doublet et singulets d'intégration 3H chacun, résonant dans une région allant de 0,60 à 1,3 ppm, caractéristiques de protons méthyliques. Il montre aussi un signal sous forme doublet large d'intégration 1H à 5,40 ppm caractéristique d'un proton oléfinique, ainsi qu'un signal multiplet d'intégration 1H repéré à 3,51 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxydé.

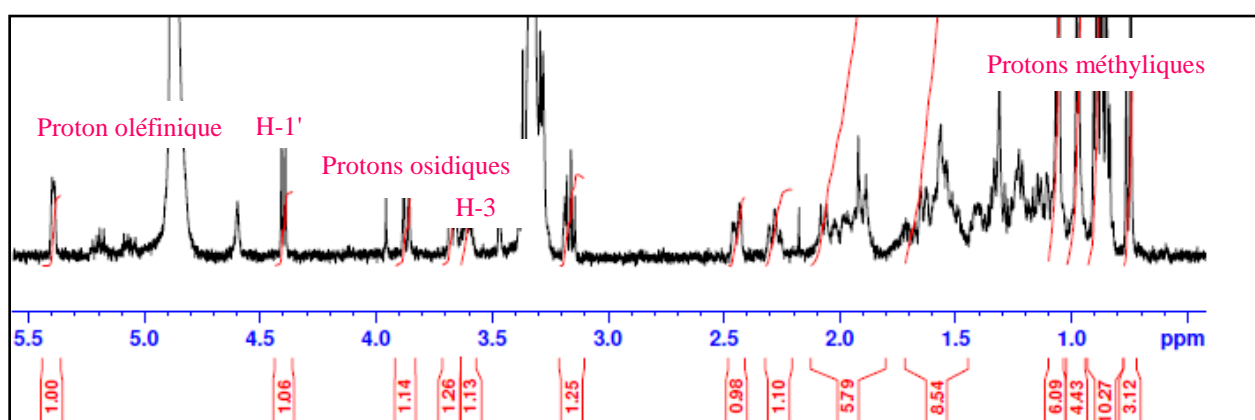


Figure 43 : Spectre de RMN ^1H du composé **Aa2**.

Le spectre de RMN ^1H révèle clairement aussi la présence de :

- ✓ Un signal caractéristique d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à 4,40 ppm.
- ✓ D'autres signaux sont enregistrés dans la zone des protons osidiques, entre 3 et 4 ppm indiquant des fonctions oxygénées sur la génine.

Ce premier constat permet d'avancer pour notre composé un squelette stéroïdique (phytostérol) avec une unité osidique. L'identification structurale complète de cette molécule nécessite d'autres méthodes d'analyses comme résonance magnétique nucléaire bidimensionnel RMN 2D.

VIII. 2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

La quantification des polyphénols totaux est réalisée par une méthode à base de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique ; lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est mesurée à 765 nm, et est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits des végétaux. (Boizot et chaprpentier, 2006). Cependant, une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits après l'addition de la solution de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3$). Cette coloration révèle la présence des flavonoïdes des extraits analysés.

Les résultats du dosage révèlent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes ($96,87 \pm 1,91 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait), par contre l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols totaux ($91,25 \pm 4,82 \mu\text{g/mg}$ d'extrait).

La teneur totale en composés phénoliques pour l'extrait chloroformique et acétate d'éthyle est de l'ordre de 25,27 et 26,35 ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) respectivement. Ces valeurs sont proches de celle obtenue par (Yin et al., 2009). Qui ont obtenus une teneur de l'ordre de $26,13 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$ d'extrait éthanolique de l'*Astragalus membranaceus*.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la teneur en composés phénoliques. De nombreuses études ont montré que les facteurs géographiques, climatiques, génétiques, niveau de maturité à la récolte, la période de stockage et la technique d'extraction employée ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et Mosase 2001).

Ces résultats obtenus se conforment avec au virage colorimétrique observé au moment où l'on avait déposé les échantillons (fig. 44 et 45).

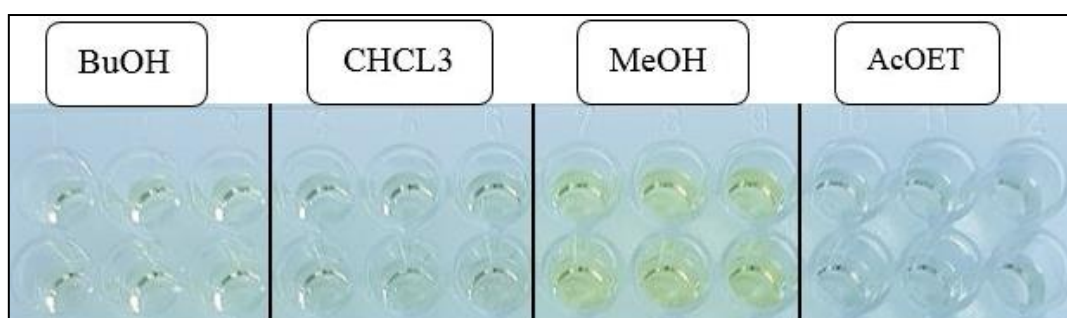


Figure 44 : Photo prises lors du dosage de flavonoïdes totaux.

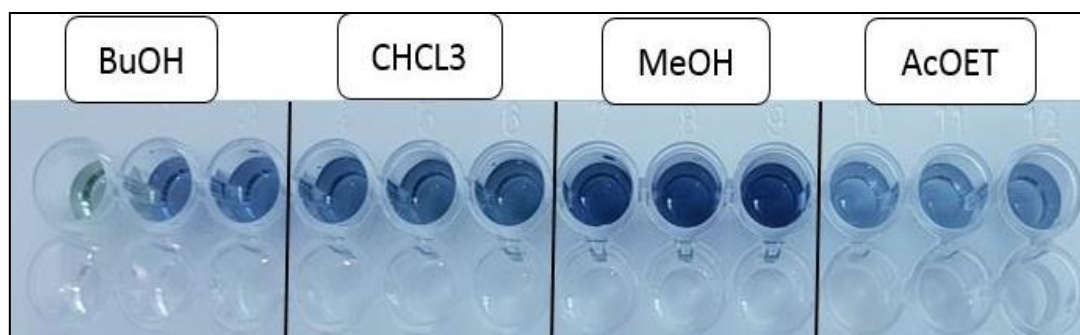


Figure 45 : Photo prises lors du dosage de polyphénols totaux.

VII.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante des extraits. Tenant compte de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydant peut être mesuré quantitativement d'une façon bien précise (Cristina *et al.*, 2009). Une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon.

La combinaison des réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydant de l'échantillon à tester est nécessaire et vivement conseillé (Cristina *et al.*, 2009).

Donc il nous a fallu une combinaison de cinq méthodes complémentaires basées sur deux mécanismes d'action, effet du piégeage de radicaux différents (DPPH, ABTS) et une activité réductrice du fer (pouvoir réducteur, test de phénanthroline) et du cuivre (CUPRAC). La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

Nous présentons ci-dessous, les résultats des différentes activités antioxydantes des extraits d'*Astragalus armatus* Willd ainsi que le composé **Aa1**.

VIII.3. 1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH

Le radical DPPH[•] Est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

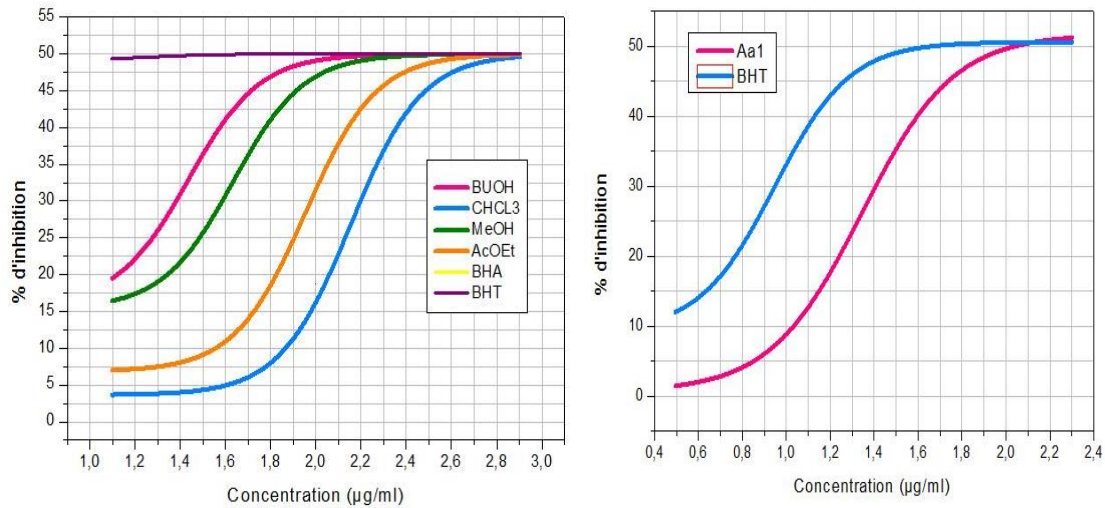


Figure 46 : Courbes des pourcentages d’inhibition du radical DPPH.

D’après les résultats des (Fig. 47) on remarque que tous les extraits ainsi que **Aa1** ont exhibés des effets scavenging contre le radical DPPH.

En effet, l’extrait butanolique de *A. armatus* Willd montre l’activité la plus élevée avec une CI_{50} de 47,62 µg/ml, suivie de l’extrait chloroformique, **Aa1** et méthanolique avec une CI_{50} de 50,46, 64.54 et 89.06 µg/ml respectivement.

Par contre l’extrait acétate d’éthyle présente une faible capacité de piégeage du radical DPPH avec une CI_{50} de 238,60 µg/ml.

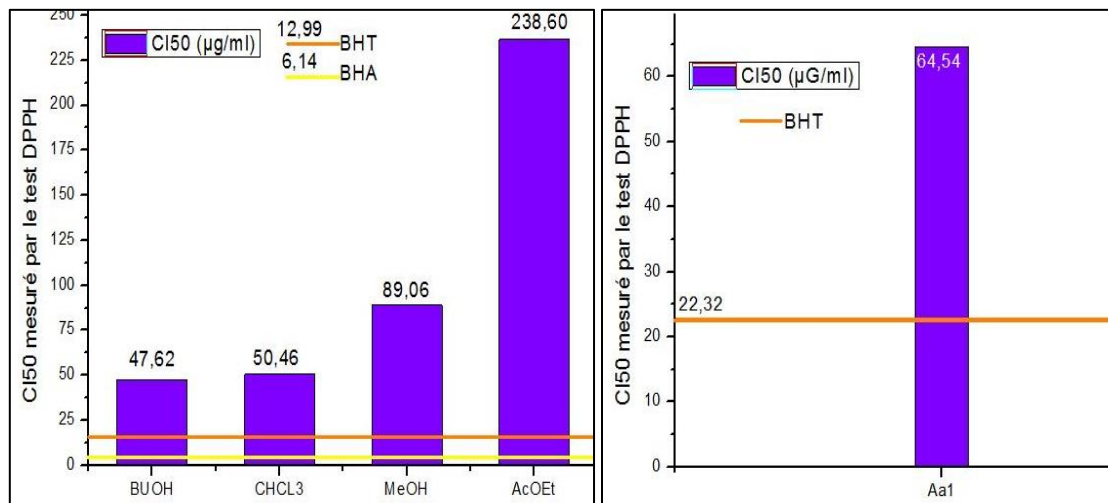


Figure 47 : Les CI_{50} des échantillons testés classées par ordre croissant DPPH.

Les CI₅₀ de la BHT et BHA sont respectivement de l'ordre 12.99 et 6.14 µg/ml, elles sont inférieures à celle des deux plantes. Donc, elles présentent une grande activité antiradicalaire contre le DPPH.

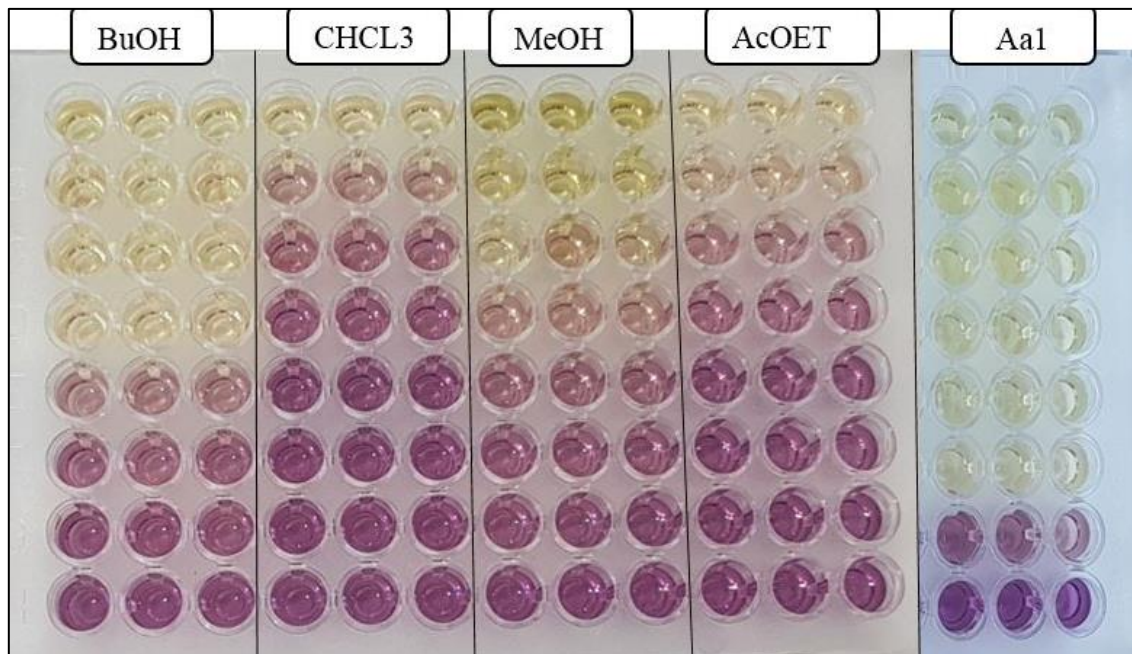


Figure 48 : Photos prise lors de dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.

Notre extrait brut méthanolique a montré une activité antiradicalaire nettement supérieure à celles des extraits aqueux et méthanolique obtenues par **Adigüzel et al., (2009)** pour leur étude portant sur plusieurs espèces d'*Astragalus* (Fabaceae) avec des CI₅₀ oscillant entre 68,8 et 400,4 µg/ml.

Ce même extrait a également montré une activité antioxydante presque deux fois supérieure à celle trouvée pour l'extrait éthanolique de l'espèce *Astragalus complanta* (**Naghiloo et al., 2012**).

VI. 3. 2. Test de l'activité scavenger du radical l'ABTS

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre ABTS. Dans ce test, l'ABTS est oxydé par les antioxydants à son radical ABTS•+, qui a une couleur intense. La génération de ce dernier, pour l'évaluation de l'activité anti-oxydant est importante avant l'ajout des échantillons afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une sur estimation de la capacité antioxydante (**Katalinic et al., 2006**).

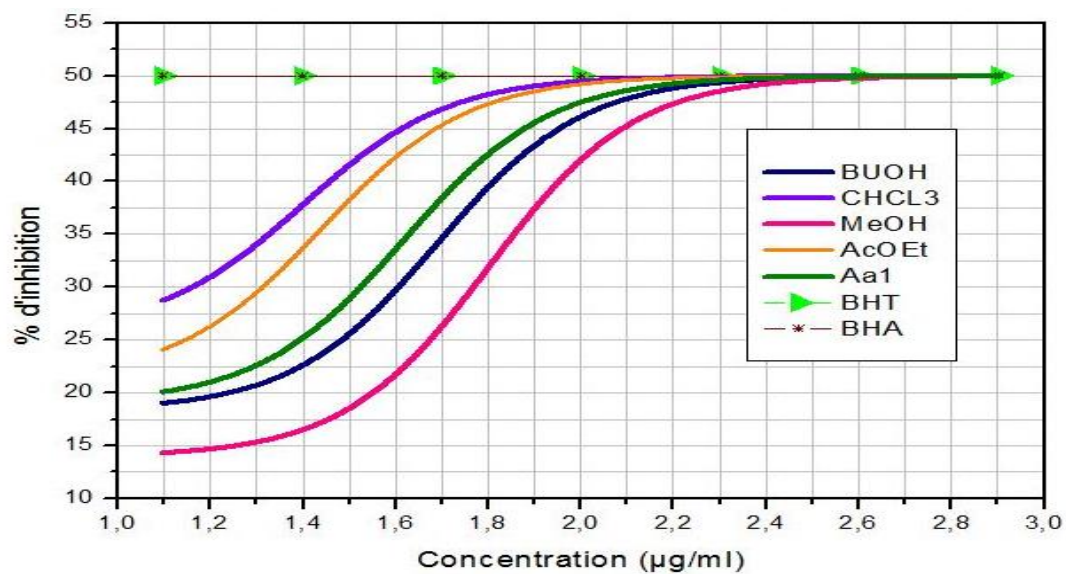


Figure 49 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons (ABTS).

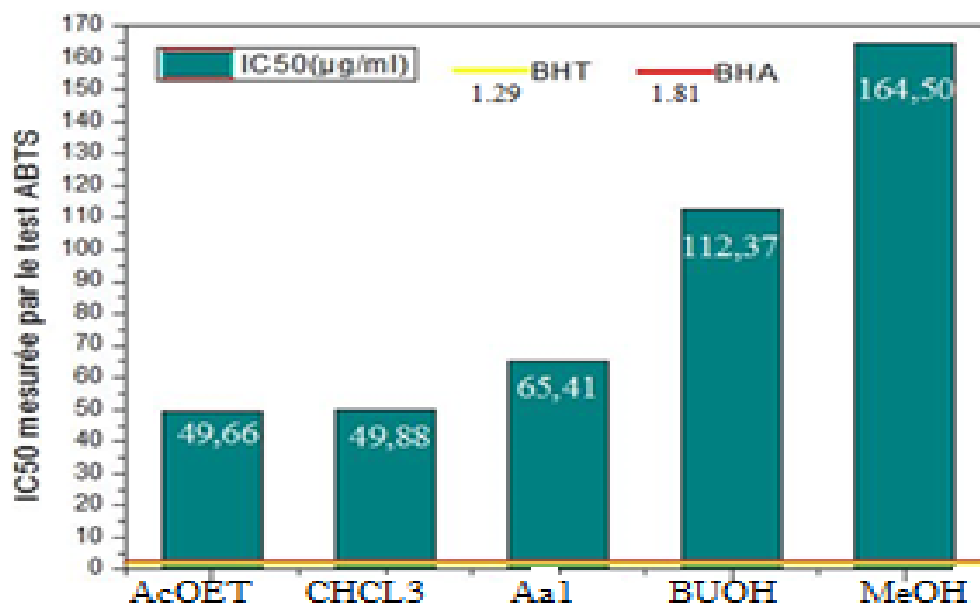


Figure 50 : Les CI50 des échantillons testés classés par ordre croissant ABTS.

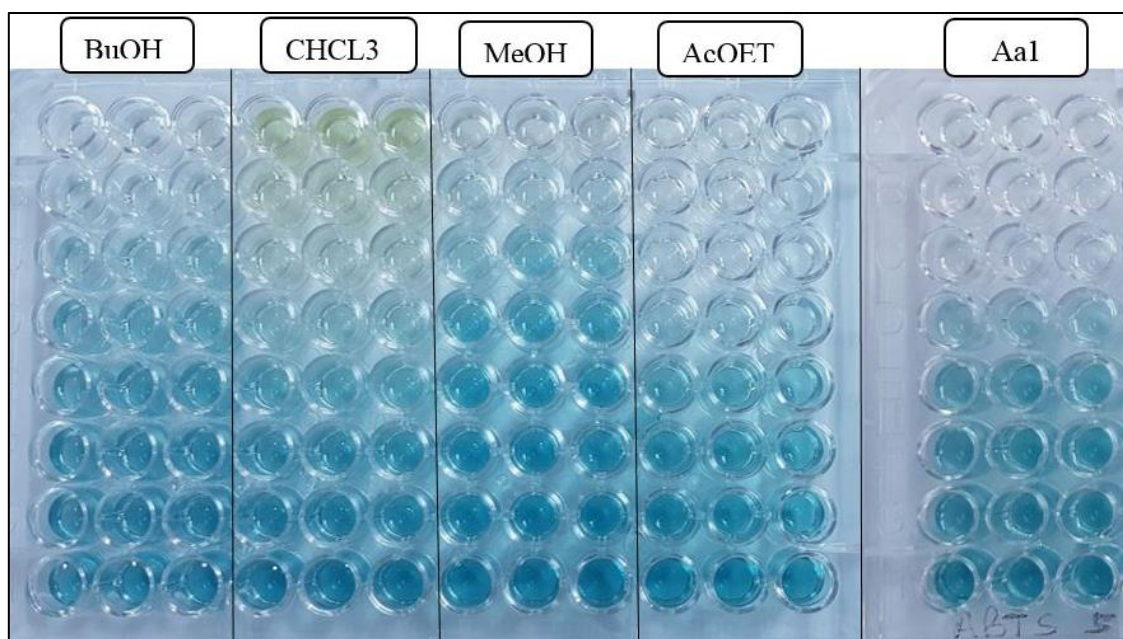


Figure 51 : Photo prise lors de dosage de l'activité du piégeage de radical ABTS +•.

Les valeurs des CI_{50} qui sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante sont en accord avec ces observations (Fig. 51).

L'extrait de l'acétate d'éthyle ainsi que d'extrait chloroformique exhibent des CI_{50} semblable de l'ordre de 49,66 et 49,88 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, ceux-ci révèlent que ces deux extraits possèdent une propriété antioxydante modérée par rapport aux deux autres extraits butanolique ($CI_{50} = 112,37 \mu\text{g/ml}$) et méthanolique (164,5 $\mu\text{g/ml}$) qui ont une activité antioxydante faible.

Le standard BHA utilisé présente les pourcentages d'inhibition les plus importants de l'ordre de 95 % et un CI_{50} égale à 1,81 $\mu\text{g/ml}$, possédant l'activité la plus importante entre les échantillons testés.

Il est à signaler que l'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle des gousses de l'espèce *Astragalus armatus* s'est manifestée très active comparativement à notre extrait acétate d'éthyle avec une valeur d' CI_{50} de $11,30 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (Labeled *et al.*, 2016).

VI.1.3.3. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

Le dosage du CUPRAC est basé sur la mesure de l'absorbance à 450 nm, après la formation d'un complexe stable entre les ions néocuproïne et le cuivre (I). Ce complexe est produit par la réduction des ions du cuivre (II) par les antioxydants. L'antioxydant puissant présente l'absorbance la plus élevée. Par conséquent, les valeurs de $A_{0,5}$ correspondant à la

concentration de 0,50 d'absorbance ont été calculées pour comparer les données de cette activité.

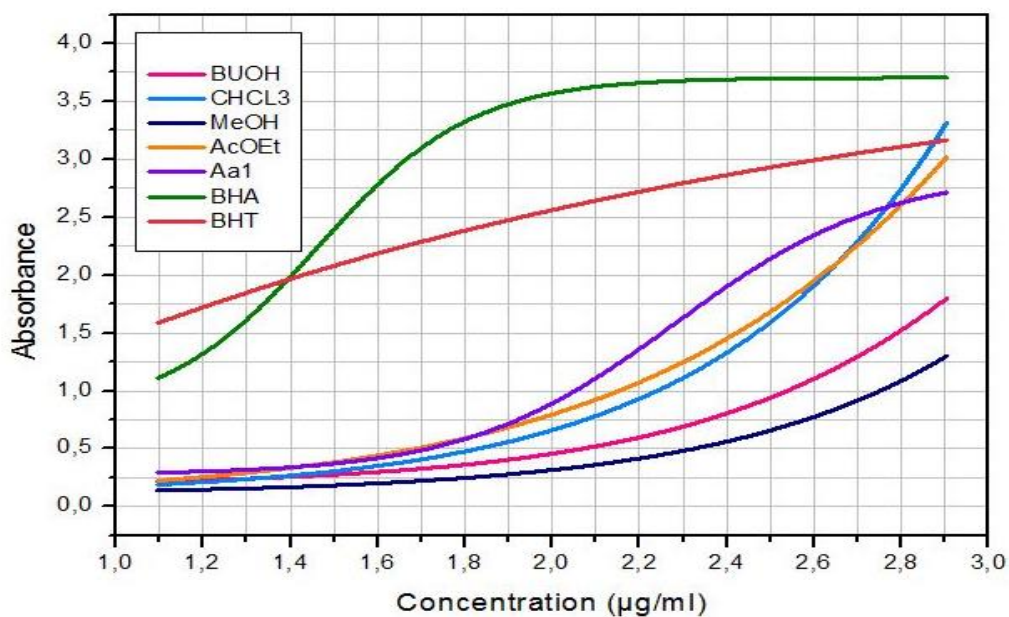


Figure 52 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons (CUPRAC).

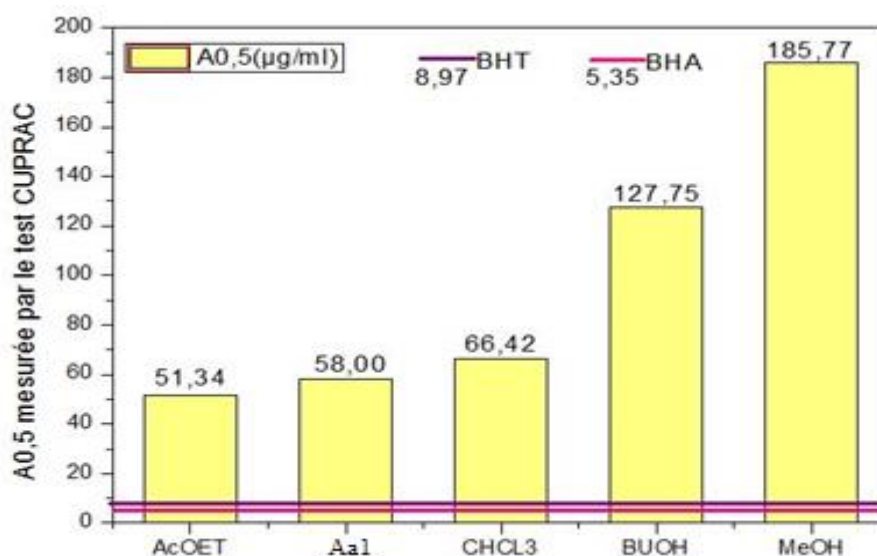


Figure 53 : Les A0.5 des échantillons testés classés par ordre croissant CUPRAC.

L'activité CUPRAC indique une relation inverse entre les A_{0,5} et la capacité antioxydante des échantillons testés. La figure ci-dessous illustre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test.

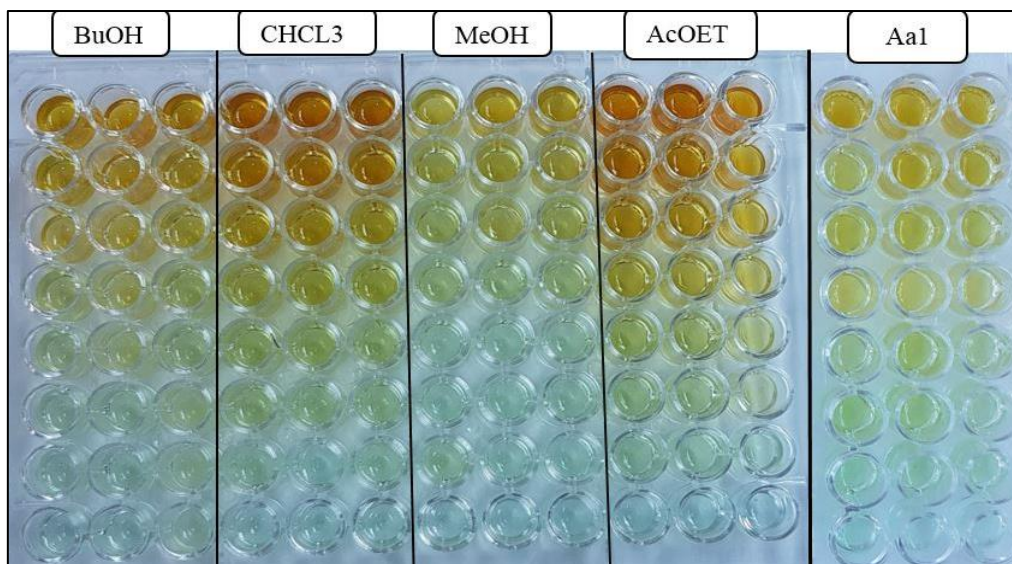


Figure 54 : photo prise lors de dosage de l'activité réductrice de l'ion cuivrique (CUPRAC).

Il ressort de ces résultats, que l'extrait d'acétate d'éthyle et le produit **Aa1** soient les deux échantillons les plus actifs avec une absorbance proche $A_{0,5}$ ($= 51,34$ et $58 \mu\text{g/ml}$ respective), malgré cela ils demeurent moins actifs que le BHT, suivie par l'extrait chloroformique avec une $A_{0,5}$ égales à $66,42$ inférieurs à celle du standard BHT (7 fois). Néanmoins, les extraits butanolique et méthanolique ont montrés une activité réductrice faible par rapport à celle des deux standards BHA et BHT.

D'après nos résultats, l'extrait d'acétate d'éthyle paraît le plus actif par rapport aux autres extraits sur la réduction du de l'ion cuivrique (CUPRAC). Cette constatation concorde avec celle obtenue par (**Labed et al., 2016**) sur l'extrait d'acétate d'éthyle des gousses de *Astragalus armatus* avec ($A_{0,5} = 50,6 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$).

VI. 3. 4. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

Comme son nom l'indique, L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (**Oyaizu et al., 1986**).

L'aptitude d'un échantillon de donner un électron reflète son pouvoir antioxydant, et la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron (**Gholivand et al., 2010**).

L'analyse statistique des résultats manifestent une relation proportionnelle entre les absorbances des échantillons et leurs concentrations respectives. Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est important.

Les courbes des absorbances en fonction des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) ont permis de mettre en évidence la propriété antioxydante réductrice des échantillons et du standard (Fig. 55).

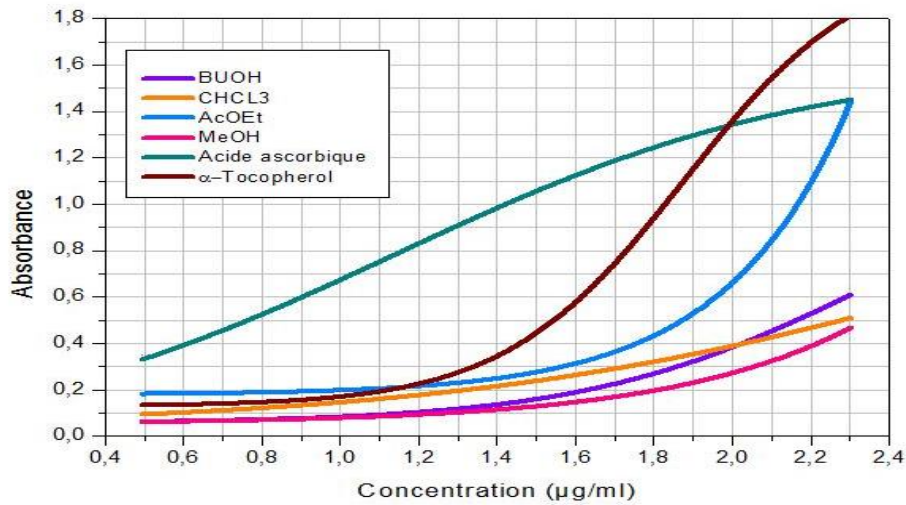


Figure 55 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (pouvoir réducteur).

Les résultats des concentrations réductrices sont obtenus grâce au logiciel Origin Pro 8 ont été classées par ordre croissant exprimés en $A_{0,5}$.

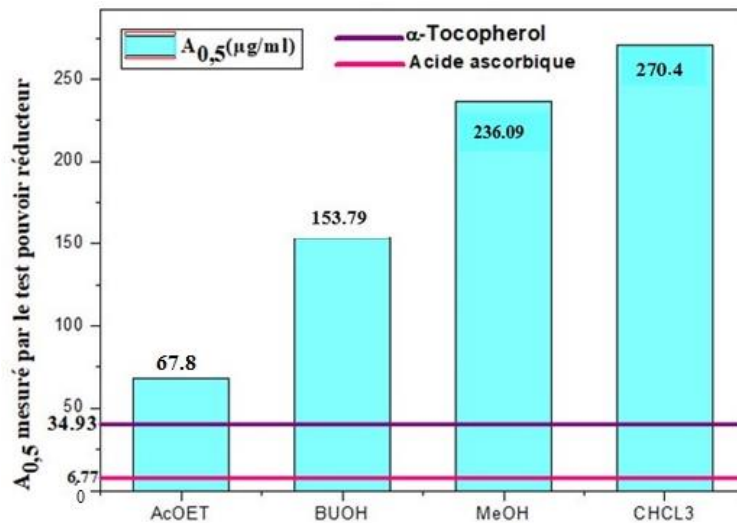


Figure 56 : Les $A_{0,5}$ des échantillons testés classés par ordre croissant (pouvoir réducteur).

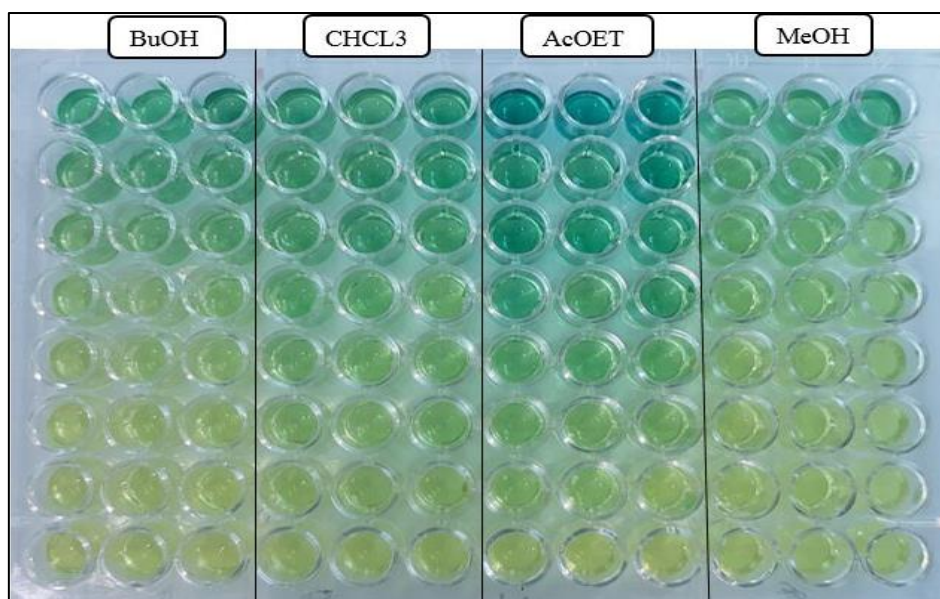


Figure 57 : Photos prises lors du dosage de l'activité réductrice (Pouvoir réducteur).

L'extrait de l'acétate d'éthyle a exhibé un très bon potentiel antioxydant avec une valeur de $A_{0,5} = 67,8 \mu\text{g/ml}$, mais relativement plus faible par rapport à l' α -tocophérol et à l'acide ascorbique dont les valeurs $A_{0,5}$ sont de l'ordre de 34,93 et 6,77 $\mu\text{g/ml}$ respectivement (Fig. 56). En général, les résultats obtenus ont permis de classer les extraits et les standards en fonction de leur $A_{0,5}$ comme suit : Acide ascorbique > l' α -tocophérol > extrait acétate d'éthyle > extrait butanolique > extrait chloroformique.

Nos résultats de l'activité réductrice de l'ion ferrique sont moins importants relativement à celle de *Astragalus membranaceus* qui représente une $A_{0,5}$ de l'ordre de $26,13 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$. (Yin *et al.*, 2009).

VI. 3. 5. Test de phénanthroline

Le dosage de l'activité réductrice du fer par Phénanthroline est déterminé par spectrophotométrie d'absorption moléculaire, après complexation par l'orthophénanthroline ou la 1-10-phénanthroline avec le fer ferreux, donne un ion complexe rouge orangé contenant trois molécules de 1-10-phénanthroline pour un ion Fe^{2+} .

Les $A_{0,5}$ sont déterminées graphiquement à partir des droites de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations, tracées par le logiciel Origin Pro 8 (Fig. 58).

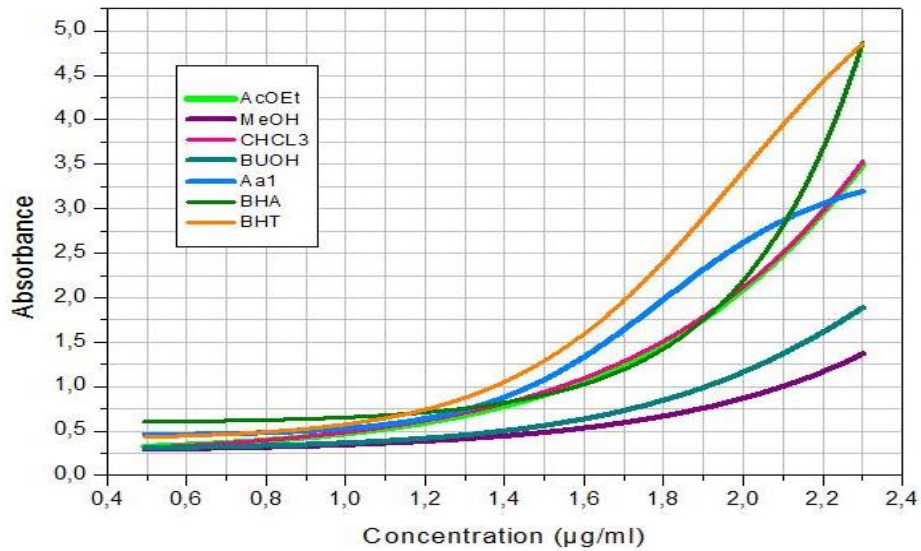


Figure 58 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Phénanthroline).

Les valeurs d' $A_{0,5}$ obtenu grâce au logiciel OriginPro8 ont été classées par ordre croissant sous forme d'un histogramme (Fig. 59).

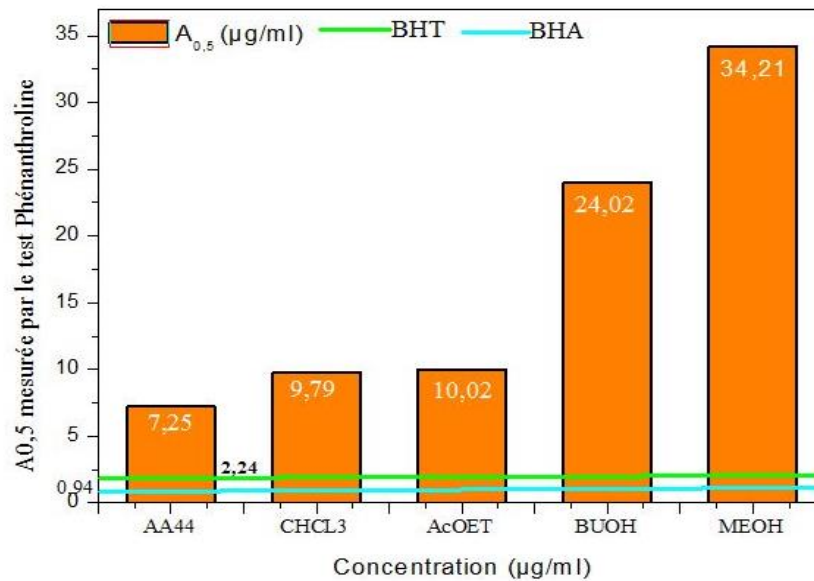


Figure 59 : Les $A_{0,5}$ des échantillons testés classés par ordre croissant (Phénanthroline).

Les résultats obtenus pour cette activité sont en concordance avec les observations (Fig. 56).

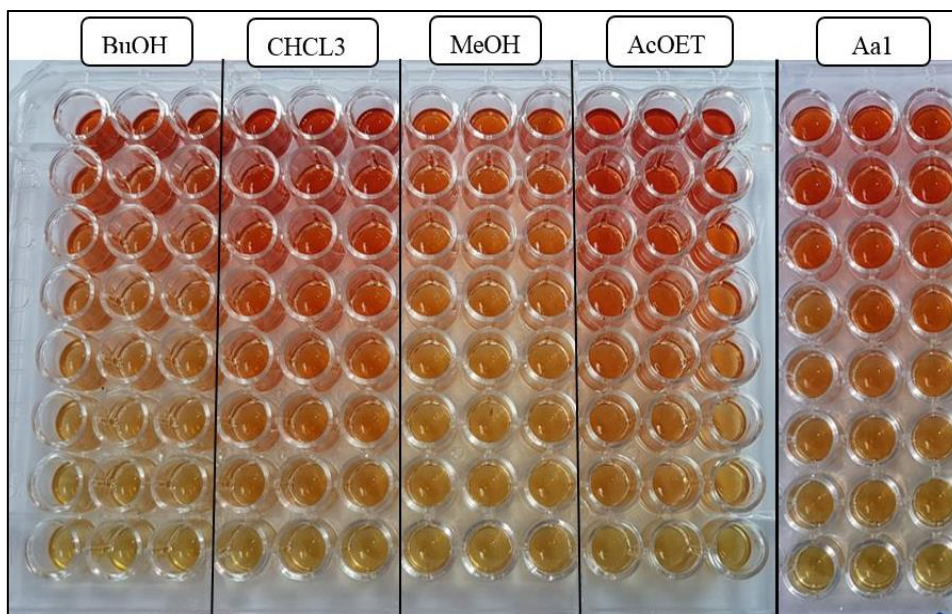
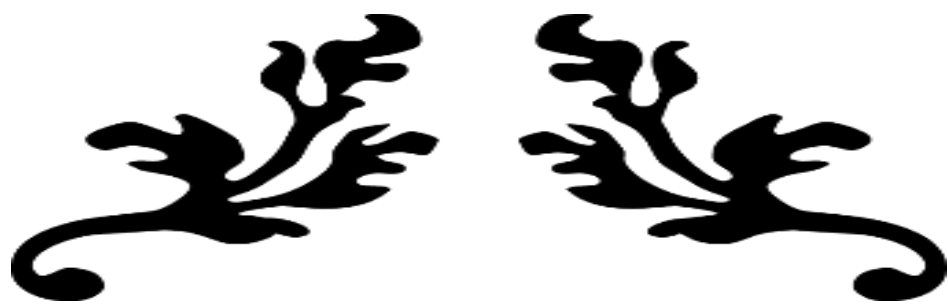


Figure 60 : photo prise lors du dosage de l'activité de phénanthroline.

Le produit **Aa1** exerce la plus grande activité réductrice des échantillons étudiés. Suivi par l'extrait chloroformique et d'acétate d'éthyle avec une $A_{0,5}$ de l'ordre de 9,79 et 10,02 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. La concentration à $A_{0,5}$ pour l'extrait butanolique et méthanolique s'avère moins intéressant que celui des autres extraits ainsi que le produit **Aa1** issue de l'extrait acétate d'éthyle.

Les standards BHA et BHT présentent la concentration la plus importante. A forte concentration, le produit **Aa1** montre une activité 3 fois moins importante que le BHT ($A_{0,5}$ égales à 7,15 $\mu\text{g/ml}$). Cependant, l'extrait chloroformique et l'extrait d'acétate d'éthyle sont moins actifs et présentent une propriété réductrice similaire et 5 fois moins importantes de celle de BHT. D'un autre côté, les données enregistrées avec les extraits butanolique et méthanolique ont mis en évidence des valeurs de $A_{0,5}$ très loin de celle du BHT estimées à 24,02 et 34,21 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.



Conclusion



Conclusion

Ce présent travail porte sur l'investigation phytochimique et biologique d'une plante du genre *Astragalus* appartenant à la famille des Fabaceae. Cette dernière est connue par sa richesse en métabolites secondaires, les triterpènes, les flavonoïdes, isoflavonoïdes, les saponosides et alcaloïdes doués d'activités biologiques prometteuses.

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Astragalus armatus* Willd a permis d'isoler trois composés naturels dont deux flavonoïdes (**Aa1** et **Aa3**) et un phytostérol (**Aa2**),

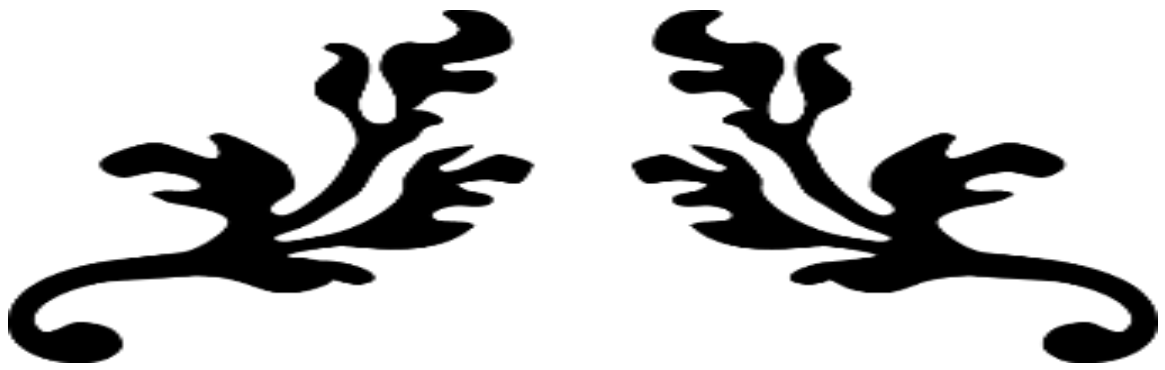
L'isolement et la purification de ces composés **Aa1- Aa3** a été essentiellement fondée sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques (CC, CCM et HPLC) utilisant deux supports (silice normale et silice greffée RP-18).

- ✓ **Isorhamnetine (Aa1).**
- ✓ **Isorhamnetine 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) - β D galactopyranosyl] (Aa3).**
- ✓ **Phytostérol (Aa2).**

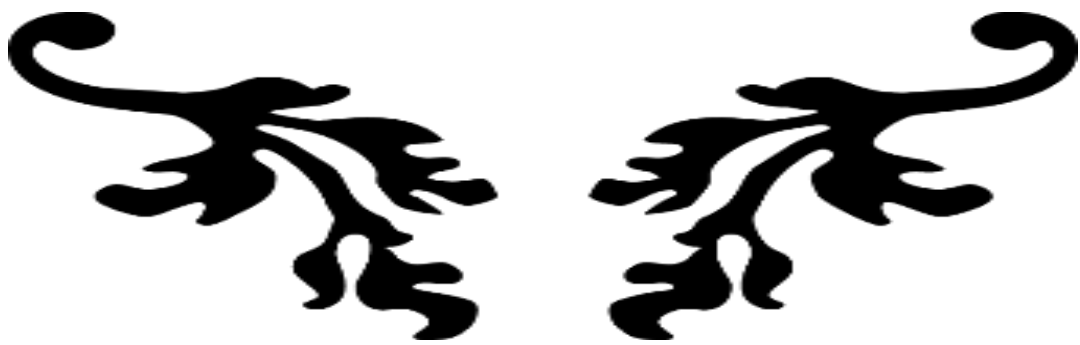
Les structures des produits isolés ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D ^1H et ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), UV et par comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antioxydante de l'extrait chloroformique, butanolique, méthanolique et acétate d'éthyle, ainsi que le produit isolé **Aa1**, de l'espèce *Astragalus armatus* Willd a été évaluée *in vitro* à différents échèles par l'application de plusieurs tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, ainsi que le test de pouvoir réducteur, et de la phénanthroline. Cette activité est liée en grande partie à la composition de l'extrait en composés phénoliques, particulièrement flavoniques.

Ainsi, des études complémentaires restent souhaitables pour approfondir les résultats obtenus et déterminer les principes actifs au niveau des autres extraits. D'autres perspectives pourraient être également envisagées par la recherche de nouvelles molécules ainsi que d'autres activités biologiques.



Références bibliographiques



-A-

Adigüzel, A., Oskemen, M., Özkan, H., Açar, G., güllüce, M., Şahin, F., 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of astragalus species growing in the eastern Anatolia region of turkey. *Turk j biol*, 33: 65-71. Doi:10.3906/biy-0805-1.

Aganga, AA., Mosase, K., 2001. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim Feed Sci Technol*, 91 :107–13.

Alabdul, MA., 2005. *Etude chimique de deux Caryocar de guyane et d'un Guioa de nouvelle calédonie*. Thèse de Doctorat, Université de Reims, France.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food. Chem*, 52: 7970–7981.

b. Ozyurek, M.; Guculu, K.; Apak, R. The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, 30: 644-652.

Avunduk, S., Mitaine-Offer, A.-C., Alankuş-Çalışkan, Ö., Miyamoto, T., Senol, S.G., Lacaille-Dubois, M.-A., 2007. Triterpene glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. *J. Nat. Prod*, 71: 141–145.

-B-

Bado, B. V., 2002. *Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation. Université Laval, Québec.197 p.

Banks, H. et Lewis, G. P., 2008. Phylogenetically informative pollen structures of 'caesalpinoid' pollen (Caesalpinioideae DC., Cercidoideae LPWG, Detarioideae Burmeist., Dialioideae LPWG, and Duparquetioideae LPWG: Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*,1-28. Doi: 10.1093/botlinnean/boy005/4969225.

- Bedir, E., Pugh, N., Çalış, İ., Pasco, D. S., Khan, I. A., 2000.** Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species. *Biol. Pharm. Bull*, 23: 834–837.
- Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2013.** Secondary metabolites of *Astragalus cruciatus* link. and their chemotaxonomic significance. *Rec Nat Prod*, 7 : 105–113.
- Bellakhdar, J., 1997,** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, *Ibis Press*, Paris, France.
- Bencheraiet, R., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Jay, M., 2012.** Flavonol 3-*O*-Glycosides from Three Algerian *Bupleurum* Species. *Rec. Nat. Prod*, 6: 171–174.
- Beniston, NT. WS., 1984.** *Flore d'Algérie*. Entreprise Nationale du Livre. Alger, 81p.
- Birt, DF., Hendrich, S., Wang, W., 2001.** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*. 90 :157-177.
- Bitam, R., 2012.** *Inventaire des ressources médicinales et aromatiques dans la région de Djerma- Batna par la méthode systématique*. Université El Hadj Lakhdar Batna Algérie - Master II en biologie spécialité en biodiversité et changements globaux.
- Blois, M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617, 181: 1119-1200.
- Boldyrev, A., 1993.** Does carnosine possess direct antioxidant activity. *Int. J. Biochem*, 25, 8: 1101-1107.
- Bonnet, C., Alamigeon, F., Micheels, P., 2010.** Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. *Edition Eyrolles*, 14p.
- Boual, Z., Pierre, G., Delattre, C., Benaoun, F., Petit, E., Gardarin, C., Michaud, P., & El Hadj, M.D.O., 2015.** Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5, 1: 10-18.

- Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, G.M., 1998.** Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compound. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379: 381–390.
- Bozin, B., Mimica, D., B., Ljiljana, S., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M., 2008.** Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl *s.l.* and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules*, 13: 2058-2068. DOI: 10.3390/molecules13092058.
- Brand, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- Brencic, A., Winans, S.C., 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69:155-194.
- Breteler, F., 1999.** *A revision of prioria, including Gossweilerodendron, Kingiodendron, Oxystigma, and Pterygopodium (Leguminosae-Caesalpinioideae-Detarieae) with emphasis on Africa.* Wageningen Agricultural University Papers, 99-3.
- Bruneau, A. et al., 2008.** Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. This paper is one of a selection of papers published in the Special Issue on Systematics Research. *Botany*, 86, 7: 697-718. Doi: 10.1139/B08-058.
- Bruneau, A., Klitgaard, B.B., Prenner, G., Fougere-Danezan, M., 2014.** Floral Evolution in the Detarieae (Leguminosae): Phylogenetic Evidence for Labile Floral Development in an Early-Diverging Legume Lineage. *International Journal of Plant Sciences*, 175, 4 : 392-417.
- Bruneton, J., 1999.** *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales.* 3ème édition, Technique & Documentation, Paris. Doi : 10.1086/675574.
- Bruneton, J., 2009.** *Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales,* 4e éd, Tec & Doc-Éditions médicales internationales, Paris.
- Byng, J. W. et al., 2016.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 1-20.

-C-

Çakılcıoğlu, U., Türkoğlu I., 2010. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *J. Ethnopharmacol*, 132: 165–175.

Çalış, İ., Sticher O., 1996. *Triterpene saponins from plants of the flora of Turkey*. In: Waller, C. R., Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins used in traditional medicine advances in experimental medicine and biology*. Plenum, New York, 404, 485–500.

Calis, I., Sticher, O., 1996. *Triterpene Saponins from Plants of the Flora of Turkey*. In: *Saponins Used in Traditional Medicine Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 404, Waller, C.R., amasaki, K. Y; (Eds.), Plenum, New York, pp: 485-500.

Çalış, İ., Yürüker, A., Tas–demir, D., Wright, A. D., Sticher, O., Luo, Y. D., Pezzuto, J. M., 1997. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophrurius*. *Planta Med*, 63: 183–186.

Campos, A.M., Escobar, J., Lissi, E.A., 1996. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 7: 43-49.

Cano, N., Barnoud D., Schneider S., Vasson M-P., Hasselmann M., Leverve X., 2006. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Edition Springer, p 255.

Cao, X., Wei, Y., Ito, Y., 2009. Preparative isolation of isorhamnetin from *Stigma maydis* using high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*, 32 : 2732–2780.

Cavin, A., 1999. *Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire* : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, p 241.

Chaturvedula, VSP., Prakash I., 2013. Flavonoids from *Astragalus propinquus*. *J Chem Pharm Res*, 5:261–265.

Childs, R.E., Badsky, W.G., 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid as chromogen. *Biochemistry Journal*, 145 : 93–103.

Christophe, P., Christophe, S., 2011, *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Edition Springer, 84p.

Compant, S., Clement C, Sessitsch A: 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizoand endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects forutilization. *Soil Biol Biochem*, 42: 669-678.

Cronquist, A., 1988. *The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2nd edition, The New York Botanical Garden*, New York.

Cullimore, J. V., Ranjeva, R., Bono, J. J., 2001, Perception of lipo chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*, 6: 24-30.

-D-

Dart, P.J., 1977. *Infection and development of leguminous nodules. in A treatise on dinitrogen fixation*, Section III, Hady K.W.S (de) John Willey and Sons, New York, 367-472.

Davies, KJ., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem*, 262 :9895-9901.

De La Estrella, M. et al., 2018. A new phylogeny-based tribal classification of subfamily Detarioideae, an early branching clade of florally diverse tropical arborescent legumes. *Scientific Reports*, 8, 1: 1-14. Doi: 10.1038/s41598-018-24687-3.

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31–63.

Delattre, J., Beaudoux, J. L., Bonnefont-Rousselot.,2005. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*. Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris, p 14,93,94.

Dewick, P. M., 2002. *Medicinal natural products A biosynthetic approach*. 2ème Ed. wiley.

Dixon, R.A., Pasinetti, M.G., 2010. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiol*, 154: 453-7.

Doyle, J.J., 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci*, 3, 473-478.

Dupont, F; Guignard, J.L. 2012. *Botanique : les familles de plantes*, 15eme édition, Edi. Elsevier Masson SAS, Espagne. 300p.

Dupont, F., Guignard, J.-L., 2016. *Angiospermes ou Plantes à ovaires*, Botanique, p. 77-103. Doi : 10.1016/b978-2-294-74117-3.00009-8.

-E-

El rhaffari, L., Zaid, A., 2002. *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée*. Actes du 4ème congrès Européen d’Ethnopharmacologie : *origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes*. 295-304.

Engler, A., Prantl, K., 1889. *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. 1st edition, Wilhelm Engelmann, Leipzig.

-F-

Fathiazad, F., Khosropanah, M. K., Movafeghi, A., 2010. Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb. *Nat. Prod. Res*, 24: 1069–1078.

Favier, A., 2003. *Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L’actualité chimique, 108-115.

Ferchichi, A., 2006. Workshop International, *diversité des fabaceae fourragères et de leurs symbiotes*. Alger, Academic Publication. 39, 51-75.

-G-

Gaidi, G., Correira, M., Chauffert, B., Beltramo, J. L., Wagner, M., Lacaille-Dubois, M. A., 2002. Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. *Planta Med*, 68: 70–72.

Gariboldi, P., Verotta L., Nicastro, G., Tatò, M., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Abdallah R. M., Toaima S. M., 1995. Cycloartane triterpène glycosides from *Astragalus trigonus*. *Phytochemistry*, 40, 1755–1760.

Gatin, C.L., 1965. *Dictionnaire de botanique*. Edi. Kraus Reprint, Paris, 84.

Gauthier, C., 2006. *Glycosidation de triterpène pentacyclique de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux*. Thèse de Doctorat. Université du Québec., Canada.

Gauthier, C., 2008. *Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono- et bidesmosidique*. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Canada.

Ghedira, K., Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 2005, 3, 4 : 162-169.

Gholivand, BM., Rahimi-Nasrabadi, M, Batooli, H., Ebrahimabadi, A. H., 2010. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanolextracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 24–28.

Gokkuş, A., Koc, A., 2001. *Range Management*. Ataturk University, Agriculture Faculty Publication No. 228.

Goodarzi, M.T., Zal, F., Malakooti M., Safari, M.R., Sadeghian, S., 2006. Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.* 44 : 41–45.

Goudable, J., Favier, A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11 : 115-120.

Graham, P. H. et Vance, C. P. (2003) « Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use », *Plant Physiology*, 131, p. 872-877. Doi: 10.1104/pp.017004.872.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 ,1, 1–93. Doi :10.1016/j. mam.2005.07.008.

Gülcemal, D., M, Milena., Napolitano, A., Karayıldırım., T, Bedir Erdal, Alankuş-Çalışkana, Ö., Piacente, S., 2013. Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochemistry*, 86:184–194.

Gülşen, T., Müjde, A., Mehmet E., D., Öztürk. M., 2012. Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal. Methods*, 5: 495–504. DOI 10.1007/s12161-011-9275-4.

Gwilym, B. H. L., 2018. Phylogenetically informative pollen structures of ‘caesalpinoid’ pollen (Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae and Duparquetioideae: Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, XX: 1-28.

-H-

Halbwirth, H., 2010. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2 : 595–621. Doi :10.3390/ijms11020595.

Hans, W. K., 2007. *1000 Plantes aromatiques et médicinales*. TERR: 229.

Hayashi, K., Huang, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., 1997. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. *Planta Med.* 63, 2: 102-105.

Heloizy, K., Freitas, G., Fatibello-Filho, O., 2010. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin. *Talanta*, 81:1102-1108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.004>.

Hermes-Lima, M., 2005. *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals*, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and A daptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.

Heywood, V.H., 1996. *Flowering Plants of the World*. 3th edition, Oxford University

Hostettmann, K; Marston, A., 1995. Chemistry and Pharmacology of natural products Saponins: Cambridge university press. 117.

Hostettmann, K., Marston, A.,1995. Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins. Cambridge University Press, 117. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>.

Huang, X., Liu, Y., Song, FR., Liu, Z., Liu, S., 2009. Studies on principal components and antioxidant activity of different Radix Astragali samples using highperformance liquid chromatography/electrospray ionization multiple- stage tandem mass spectrometry. *Talanta*, 78 : 1090–1101.

-I-

Ichai, C., Quintard, H., Orban, J-C., 2011. *Désordres métaboliques et reanimation*. Springer, 427-439.

Igor, Passi, L.B., 2002. *Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxyloïdes, lam (Rutaceae)*. Thèse de pharmacie, Bamako, p 133

Isaev, M. I., Gorovits M. B., Abubakirov, N. K., 1989. Progress in the chemistry of the cycloartanes. *Khim. Prir. Soedin*, 25, 131–147.

Iserin, P.,2001. *Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins*. Edition Larousse/VUEF, Paris, pp 68.

-J-

Jacob, L., 2007. *L'insuffisance rénale aiguë*. Edition Springer, 88p.

Jia, C., ya L., Li-Qiong Y., Yan-Zhong L., Zhi-Biao N., Kun G., 2012. Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected Astragalus adsurgens. *Food Chemistry*, 131, 546–551.

Judd, W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. Stevens P., 2002. *Botanique systématique*.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. (2002). Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. *Systematics and Geography of Plants*, 72, 1: 242-243.

-K-

Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S., 2008. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*, 22, 5, 567–577. Doi :10.1002/ptr.2283

Kass, E. et Wink, M., 1996. Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on rbcL sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 5: 365–378. (DOI 10.1016/0305-1978(96)00032-4).

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550–557.

Khalfallah, A., Karioti, A., Berrehal D., Kabouche, A., Lucci, M., Kabouche, Z., Bilia, A., 2011. Flavonoid triglycosides from *Astragalus armatus*. *Planta Med* 77: 47. DOI: 10.1055/s-0031-1282531.

Khalfallah., A, Karioti, A., Berrehal, D., Kabouche, A., Lucci, M., Bilia, AR., Kabouche, Z., 2014. A new flavonol triglycoside and other flavonol glycosides from *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae). *Rec Nat Prod.* 8: 12–18.

Khushbraktova, Z. A., Agzamova, M. A., Syrov, N. V., Radchenko N. V., Mirsalikhova, N. M., Umarova, F. T., 1994. Influence of cycloartanes from plants of the genus *Astragalus* and their synthetic analogs on the contractive function of the myocardium and the activity of Na, K-ATPase. *Khim. Prir. Soedin*, 4: 510–514.

-L-

Labed, A., Ferhat, M., Labed-Zouad, I., Kaplaner, E., Zerizer, S., Voutquenne-Nazabadioko, L., Alabdul Magid, A., Semra, Z., Kabouche, A., Kabouche Z, et al., 2016. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. *Pharm Biol.* 54: 3026–3032.

Lacaille-Dubois, M. A., 2000. *Biologically and Pharmacologically active saponins from plants: recent advances in Saponins in Food, Feed stuffs and Medicinal plants.* Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 205.

- Lacaille-Dubois, M., A., 2005. Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-Ur-Rahman (Ed.). *Stud. Nat. Prod. Chem*, 32: 209–246.
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H., 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2: 363–386.
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H., 2000. In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry. *Elsevier Amsterdam*, 21: 633–687.
- Lavin, M., Doyle, J. J., Palmer, J. D., 1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-dna inverted repeat in the leguminosae subfamily papilionoideae. *Evolution*, 44, 2: 390-402. Doi: 10.1111/j.1558-5646.1990.tb05207. x.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2010. The molecular basis of working
Lerouge P, Roche et Faucher C. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344: 781-4.
- Lev E., 2002. Reconstructed materia of the Medieval and Ottoman Al-sham. *J. Ethnopharmacol.* 80, 167–179.
- Leverve, X., 2009. *Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 44: 5, 219–224. Doi: 10.1016/j.cnd.2009.09.001.
- Lewis, G. P. et al., 2013. A linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context -A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, 89: 76-84. doi: 10.1016/J.SAJB.2013.06.005.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Li, G.-Z., Zhang, S.-H., Liu, Z. & Jin, L.-X., 2007. *Acta Cryst.* E63, m210.

Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., Zhang, Y., Wang, T., 2014. A review of recent research progress on the Astragalus genus. *Molecules*, 19: 18850–18880.

Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.H., Wang, R., 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 26: 285–94.

Liston, A., & Wheeler, J. A., 1991. The phylogenetic position of the genus Astragalus (Fabaceae) evidence from the chloroplast gene rpoC1 and rpoC2. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22: 377-388.

Liu X., Wang M., Wu H., Zhao X., Li H., 1994. Isolation of astragalin and its immunological activities. *Nat. Prod. Res. Dev*, 6: 23–31.

Long, S. R., 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell*, 8: 1885-1898.

Lock, J.M., Simpson, K., 1991. Legumes of West Asia, a checklist. Royal Botanical Gardens, Kew.

LPWG, T. L. P. W. G. et al., 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66: 44-77. Doi: 10.5061/dryad.61pd6.

-M-

Mabberley, D. J., 1997. *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants*, Cambridge University Press.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag, New York.

Martin, P., 2013. *Les familles des plantes à fleurs d'Europe : botanique systématique et utilitaire*. 2^{ème}. presse universitaire de Namur.

Maxted, S., Bennett, N., 2001. Legume Diversity in the Mediterranean Region. mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125 : 288–306.

Medart J., 2009. Manuel pratique de nutrition : L'alimentation préventive et curative. Editions De Boeck Supérieur, 49p.

Middleton, E Jr., Kandaswami, C., Theoharides, TC., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *pharmacological reviews*, 52: 673–751.

Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J., 2001. Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit- Rev- Plant- Sci*, 20, 373-394.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Michael, J.D., Vimala, G., Anthony, M., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407–412.

Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., Hrdina, R. (2010). *Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 6, 963–975. Doi/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010.

Mladinka, P., Zatloukalova, L., Filipsky, T., Hrdina R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49: 963–975.

Motta, F., 1962. In *Nel mondo della Natura-Encyclopedia di Scienze Naturali*; Ed., p. 222-224.

Muanda, F.N., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., Younos, C., 2009. *Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts*. ECAM, doi:10.1093/nep109/: 1-8.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., V. Böhm, V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992–999.



N. A. M, Saleh., Mansour, R. M. A., Markham, K. R., 1990. An acylated isorhamnetin glycoside from *Aerva javanica*. *Phytochemistry* 29, 1344–1345.

Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S. and Dadpour, M. R., 2012. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. *BioImpacts*, 2, 105-109.

Nalbantsoy, A., Nesil T., Erden, S., Çalış, İ., Bedir E., 2011. Adjuvant effects of Astragalus saponins macrophyllsaponin B and astragaloside VII. *J. Ethnopharmacol.*, 134, 897–903.

Niu, Y, Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W., & Yu, L. (2011). Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bg. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *Food Chemistry*, 128, 620–626.

Niu, Y., Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W., & Yu, L., 2011. Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bg. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *Food Chemistry*, 128, 620–626.



Ouali, K., Trea, F., Toumi, L., Bairi A., Maurel, D., Guellati, M. A., 2007. L'hespéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations foetales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér*, 5, 204–209.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 : 307–315.

Ozenda P., 1977. *Flore et végétation du Sahara*. 2^{ème} édition. Edi. CNRS. Paris, 630p.

Ozenda, P., 1991. *Flore et végétation du Sahara*. In: CNRS (Ed.), Paris, France.

Ozenda, P., 2004. *Flore du Sahara*. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 622 pp.

Özipek, M., Dönmez, A. A., Çalış, İ., Brun R., Rüedi P., Tasdemir D., 2005. Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. *Phytochemistry*, 66 : 1168–1173.

Öztürk, M., Kolak, U., Topcu, G., Oksuz, S., Choudhary, M. I., 2011. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radicalscavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, 126: 31-38.

Özyürek, M., Kubilay G., Tütem, E., Kevser S. B., Erol, E.S., Esinçelik, B.S., Yildiz, L., Karaman, S., Apak. R., 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Critical Review*, 3, 2439.

-P-

Papazian, L., Roch, A., 2008. *Le syndrome de détresse respiratoire aiguë*, Edition Springer, 153p.

Park, J. A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K. W., Lee, S. K., 1997. Activation of capase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of gensenosides Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121 : 73–81.

Paul, G., Victor, C., Pierre C., Andre G., Pierre, S., 1836. *Le Bon Jardinier encyclopédie horticole*. Tome 2. 152 éditions, Edi Société Nationale d’Horticulture de France-Paris.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, WJ., 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*; 64: 180-201.

Pelt, V. R., 2001. *Forest Giants of North America*. Seattle: University of Washington Press.

Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 7: 1035–1042.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O., 1999. L’évaluation du stress oxydatif d’un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 ,5 : 45-48.

Pincemail, J., Defraigne, J., 2003. Le CoEnzyme Q ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur. Poumons*, 18, 2 : 55-60.é

Piquet, M-A., Et Hebuterne, X., 2007. *Nutrition en pathologie digestive*. Edition Wolters Kluwer France, p 93.

Podlech, D., 1986. Taxonomic and phytogeographical problems in astragalus of the old world and south-west Asia. proceedings of the royal society of edinburgh. Section B. Biological Sciences, 89 : 37–43. Dio : 10.1017/s0269727000008885.

Poirier, J., 2004. *L’indispensable pour vivre en santé*, Edition Merlin, 72p.

Polat, E., Bedir, E., Perrone, A., Piacente, S., Alankus-Caliskan, O., 2010. Triterpenoid saponins from *Astragalus wiedemannianus* Fischer. *Phytochemistry*, 71: 658–662.

Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 : 25-39.

-Q-

Quezel, P., Santa, S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. In: CNRS (Ed.), Vol. 1–2. Paris. France.

-R-

Radwan, M. M., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Toaima, S. M., Kingston, D., G. I., 2004. Kahiricosides II-V, Cycloartane Glycosides from an Egyptian Collection of *Astragalus kahiricus*. *Phytochemistry*, 65: 2909–2913.

Ramos, S., 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *Nutritional biochemistry*, 18: 427–442.

Retsky, K.L., Chen, K., Zeind, J., Frei, B., 1999. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radica Biology and Medicine*., 26, 1-2: 90-98.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 4: 152–159. Doi:10.1016/s1360-1385(97)01018-2.

Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol Med*, 26, 9-10 :1231-7.

Rufer, C. E., Kulling, S. E., 2006. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2926–2931.

-S-

Sanderson, M. J., Wojciechowski, M. F., 1996, Diversification rates in a temperate legume clade: Are there “so many species” of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 83, 11: 1488-1502. Doi: 10.1002/j.1537-2197.1996.tb13942. x.

Savran, T., Gulcemal, D., Masullo, M, Karayi“ldi“ri“m T, Polat E, Piacente S, Alankus-Caliskan O., 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus erinaceus*. *Rec Nat Prod*, 6: 230–236.

Scherson, R. A., Vidal, R; Sanderson, M. J. 2008. Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *American Journal of Botany*, 95, 8: 1030-1039. doi: 10.3732/ajb.0800017.

Schulze, P. C., Jun, Y., Tomosaburo, T., al. 2004. Hyperglycemia Promotes Oxidative Stress through Inhibition of Thioredoxin Function by Thioredoxin-Interacting Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 29: 30369–30374.

Sherwin, E.R., 1990. In: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (Eds.), *Food Additives*. Marcel, D; Inc., New York, p139.

Simee, D. F., Verbiscar, A. J., 1995. Effects of plant derived polysaccharides and toxicology of *Astragalus*. *Phytother. Res*, 11, 411–418.

Skerman, P. J., 1982. *Les légumineuses fourragères tropicales*. Collections de la FAO, n°2, Italie. Rome.

Sparg, S. G., Light, M. E., Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol*, 94, 219–243.

Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod, D., 2004. Botanique.

Spichiger, R.E., Savolainen, V. V., Murielle, F., Jeanmonod, D., 2004. Systématique des plantes à fleurs : *Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales*. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Sun, L. M., Wang, X. L., Deng, W. L., Ding, L. S., & Peng, S. L. (2011). Chemical constituents from *Astragalus ernestii*, Chinese. *Journal of Natural Medicines*, 9, 38–41.

Szydłowska-Czeraniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. 2008 Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76: 899-905.

-T-

Tang, W., Eisenbrand, G., 1992. *Chinese drugs of plant origin*; Springer-Verlag Ed.: 191–197.

The Angiosperm Phylogeny Group, A.P.G., 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 85: 531-553.

Thorne, R.F., 1992 b. Classification and geography of the flowering plants. *Bot. Rev.*, 58: 225-348.

Thorne, R.F., 1992. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*, 13, 2: 365-389.

Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Endo, Y., Tamaki, N., Sanbe, T., Murakami, J., Yamamoto, T., Morita, M., 2009. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 80: 1799–1808.

Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.

Trabut, L., 1935. *Flore du nord de l'Afrique. Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique*, Alger : La typo-litho et Jules Carbonel Réunies 37–271.

-V-

Voisin, A., 1987. *Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19ème siècle*. Le Sahara, 1er, 100, 25–28.

-W-

Watrous, K.M., Cane J.H., 2011. Breeding biology of the thread stalk milkvetch, *Astragalus filipes* (Fabaceae), with a review of the genus. *American Midland Naturalist*, 165, 2: 225–240.

White, F., 1983. *The vegetation of Africa. Natural resources research 20*. UNESCO, Paris.

Wichtl, M., Anton, R., 2003. *Plantes thérapeutiques : Traditions, pratique officinale, science et thérapeutique*. 3ème édition, Technique & Documentation, Paris, pp 14-16, 407-413, 614-616.

Williams, M. C., 1981. Nitro compounds in foreign species of *Astragalus*. *Weed Sci*, 9, 261–269.

Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.

Woodman, O. L, Chan Elsa, CH., 2004. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 786-790.

-X-

Xu, Y. C., Leung, S. W. S., Yeung, D. K. Y., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., & Man, R. Y. K., 2007. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, 68, 8, 1179–1188. Doi:10.1016/j. phytochem.2007.02.013.

-Y-

Yahara, S., Kohjyouma, M., Kohoda, H., 2000. Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*, *Phytochemistry*, 53: 469-471.

Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F., 2001. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal Sci*, 17, 5 :599-604.

Yeşilada, E., Bedir, E., Çalış, İ., Takaishi, Y., Ohmoto, Y., 2005. Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on in vitro cytokine release. *J. Ethnopharmacol*, 96: 71–77.

Yin, Y., Heo, S.I., Jung, M.J., Wang, M.H., 2009. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Various Sections of *Astragalus membranaceus*, *Agris*, 40, 1, 1-5.

-Z-

Zarre S., Azani, N., 2013. Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus*: a review. *Proceedings. Biological Sciences*, 3: 1–6.

Zheng Zhong CAO, Yuan CAO, Yi Jun YI, Yong Ping WU, Zong Kang Lendu LI, Owen NL.1998. A new isoflavone glucoside from *Astragalus membranaceus*. *Chin. Cheml. Lett*, 9: 537–538.

Zimmerman, E., et al., 2017. Floral evolution and phylogeny of the dialioideae, a diverse subfamily of tropical legumes. *American Journal of Botany*, 104, 7: 1019-1041. Doi: 10.3732/ajb.1600436.

Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique de plantes médicinales *Astragalus armatus* Willd appartenant à la famille Fabaceae, ainsi que l'évaluation d'activité antioxydante des extraits végétaux, et le produit isolé Aa1.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (CCM, CC et CLHP) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) de 3 métabolites secondaires dont 2 composés de nature flavonoïdique et un phytostérol.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits ainsi du composé Aa1 est réalisée par cinq méthodes incluant : DPPH, ABTS, CUPRAC, ainsi que le test de pouvoir réducteur, et de la phénanthroline.

Les résultats des différents tests de l'activité anti-oxydante montrent que tous les extraits ainsi que le produit isolé **l'Isorhamnetine (Aa1)** ont réagi comme des anti-oxydants.

Mots clés : Fabaceae, *Astragalus armatus* willd, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN, UV, Activité antioxydante.

Abstract

This research is focused on the phytochemical investigation of the medicinal plant *Astragalus armatus* Willd belonging to the Fabaceae family and the evaluation of the anti-oxidant activity of crude extracts and isolated compound Aa1.

This work allowed the isolation by chromatographic methods (CCM, CC and HPLC), and the characterization by spectroscopic analysis (NMR 1D and 2D and UV IR) of 3 secondary metabolites including 2 flavonoids and one phytostérol

The evaluation of the antioxidant activity of the extracts as well as isolated compound was carried out by five methods including DPPH, ABTS free radical scavenging assay, ferric reducing antioxidant power, CUPRAC assay, and phénanthroline assay.

The results of the anti-oxidant activity show that all extracts and isolated product **Isorhamnetin (Aa1)** act as anti-oxidants

Key words: Fabaceae, *Astragalus armatus* willd, Chromatography, Flavonoids, RMN, UV, Antioxidant activity.

ملخص

تم تكريس دراستنا للتحقيق الكيميائي والبيولوجي للنبات بأكمله من فصيلة *Astragalus armatus* Willd التي تنتمي لعائلة Fabaceae . سمحت عمليات فصل وتنقية كسور إيثيل الأسيتات بعزل ثلاثة مركبات بما في ذلك فلافونويدات (Aa1 و Aa3) و فيتوستيرول (Aa2) تم تحديد التوضيح الهيكلي لهذه المركبات باستخدام طرق التحليل الطيفي UV-Vis ، أحادي وثنائي الأبعاد الرنين النووي المغناطيسي (1H, 13C, COZY ، HSQC ، HMBC) وبالمقارنة مع المعطيات الأدبية الخاصة بالموضوع أظهرت المستخلصات النباتية بالإضافة إلى المركب المعزول Aa1 قدرة كبيرة مضادة للأكسدة عن طريق طرق DPPH و ABTS و CUPRAC ، كذلك اختبار pouvoir réducteur واختبار Phénanthroline.

النتائج التي تم الحصول عليها واعدة للغاية لاستخدام هذا النبات في الطب الحديث.

الكلمات المفتاحية: *Astragalus armatus* Willd, Fabaceae ، كروماتوغرافية، الفلافونويد ، الرنين المغناطيسي النووي 1 و 2 D، الأشعة فوق البنفسجية ، نشاط مضادات الأكسدة.

Année universitaire :
2018/2019

Présenté par :
CHERABI SABRINA & BENZAID OUMEIMA

Investigation phytochimique et activité antioxydante de la plante médicinale algérienne *Astragalus armatus* Willd (Fabaceae)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique de plantes médicinales *Astragalus armatus* Willd appartenant à la famille Fabaceae, ainsi que l'évaluation d'activité antioxydante des extraits végétaux, et le produit isolé Aa1.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (CCM, CC et CLHP) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) de 3 métabolites secondaires dont 2 composés de nature flavonoïdique et un phytostérol.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits ainsi du composé Aa1 est réalisée par cinq méthodes incluant : DPPH, ABTS, CUPRAC, ainsi que le test de pouvoir réducteur, et de la phénanthroline.

Les résultats des différents tests de l'activité anti-oxydante montrent que tous les extraits ainsi que les produit isolé l'**Isorhamnetine (Aa1)** ont réagi comme des anti-oxydants.

Mots clés : Fabaceae, *Astragalus armatus* willd, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN, UV, Activité antioxydante.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	TENIOU Soumia	MAA- UFM Constantine.
Rapporteur :	BOUTAGHANE Nima	MCA - UFM Constantine.
Examineur :	MOSBAH Asma	MCA - UFM Constantine.

Date de soutenance : 02/07/2019