



République Algérienne Démocratique et populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI

CONSTANTINE 1

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE**

MÉMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Master en science de la nature et de la vie

Spécialité : Biochimie appliquée

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante
de la plante *Medicago Truncatula* : Etude d'article
scientifique**

Présenté par :

soutenu le : 19/10/2020

Bensid Abir

Mokhnache Hadjer

Devant le jury composé de :

Président : Dr. TENIOU Soumia

Maitre assistante A UFM-Constantine1.

Encadreur : Dr. MEDOUKALI Imane

Maitre de conférences B UFM-Constantine1.

Examineur : Dr. GUENDOUZE Assia

Maitre de conférences B UFM-Constantine1.

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Nous remercions notre bon Dieu, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur de mémoire Mme MEDOUKALI Imane, Docteur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à l'université des Frères Mentouri Constantine, qui nous a guidé dans notre travail, Merci de nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très patiente avec nous, Merci d'avoir votre expérience à notre profit, Merci de tout cœur .

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Nous vous en sommes très reconnaissants et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

A Dr. TENIOU S, Trouvez ici l'expression de nos respectueuses gratitude et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury. Veuillez accepter cher maître toute notre reconnaissance.

Nous remercions également l'examinatrice de ce mémoire, Madame GUENDOUZE A, Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.

En fin nos remerciements à tous ceux qui ont aidé à l'élaboration de ce mémoire du pré ou du loin.

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

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie **Ma mère Samia** qui m'apporté son appui durant toutes mes années d'études, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. Je prie Dieu pour qu'il vous accorde santé et une longue vie.*

*Merci **Mama** sans toi je ne serai pas arrivée jusque-là.*

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

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

*À mes chers frères : **Mustapha et Mohamed.***

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

*À mes chers amis : **Aicha, Lokmane, Hanifa, Assia, Hadjer, Ismail.** Qui ont partagées avec moi tous les moments de joie et de bonheur, je vous remercie pour votre amitié et votre soutien.*

*À tout le membre de ma famille **Marmi, Bensid,** et surtout à mes chères cousines **Lina, Soundes, Fadi, Chaima. Amira, Beissen.***

À tous ceux que J'aime. Je dédie ce travail

Abir. B

Dédicaces

Avec joie fierté et respect je dédie ce modeste travail :

À celle qui m'a donnée la vie qui s'est sacrifié pour mon bonheur et ma réussite à ma mère :

Cherifa

*À mon père qui a été mon ombre durant toutes les années des études qui a veillé à me donner l'aide à m'encourager et à me protéger : **Miloud***

*À mes adorables sœurs **Meriem** et **Batoul** et mon frère **Ismail** que ce travail soit un exemple pour vous à suivre et vous incite à mieux faire.*

*À mon âme sœur **Aïcha** pour son immense amour son soutien son affection et les conseils qui n'a cessé de m'apporter.*

*À mes grandes parents : **Fatima** et **Hada** .Recevez une profonde gratitude ici.*

*À mes chers amies : **Abir**, **Yasser**, **Hanine**. Qui ont partagées avec moi tous les moments de joie et de bonheur je vous remercie pour votre amétier et votre soutien.*

*À tout le membre de ma famille **Mokhnache** et **Ould bey**, et surtout à mes chères tantes **Dalila Hanifa**, **Sonia**, **Assia** , **Sabria** . **Soultana**, **Rachida**.*

A tous ceux que J'aime

Je dédie ce travail

Hadjer. M

Liste des abréviations**Liste des Figures****Liste des tableaux****Introduction..... 01****1 ère Partie : Recherche bibliographique****Chapitre I. Généralités**

1. Famille des <i>Fabaceae</i>	03
2. Présentation du genre <i>Medicago</i>	04
2.1. Taxonomie.....	04
2.2. Aire de répartition du genre <i>Medicago</i>	05
2.3. Espèces spontanées du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	05
3. Présentation de l'espèce étudiée (<i>M. truncatula</i>).....	06
3.1. Description botanique.....	06
3.2. Position systématique.....	07
3.3. Aire de répartition.....	07
3.4. <i>M. truncatula</i> plante modèle.....	07
3.5. Substances du métabolisme secondaire.....	08
a. Flavonoïdes.....	08
b. Saponines.....	08
3.6. Intérêts de <i>M. truncatula</i>	09
a. Intérêt phytochimique.....	09
b. Intérêt thérapeutique.....	09
c. Intérêt génétique.....	10
d. Intérêt agronomique.....	10

Chapitre II. Les composés phénoliques

1. Classification des composés phénoliques.....	11
1.1. Flavonoïdes.....	12
1.1.1. Structure chimique des flavonoïdes.....	12
1.1.2. Classification des flavonoïdes.....	13
a. Flavonols.....	13
b. Isoflavonoïdes.....	13
c. Flavanones.....	13

d. Anthocyanes.....	14
1.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	14
1.1.4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes.....	14
1.2. Saponines.....	16
1.2.1. Propriétés physicochimiques des saponines.....	16
1.2.2. Saponines triterpéniques.....	16
1.2.3. Saponines stéroïdiques.....	16
1.2.4. Propriétés pharmacologiques des saponines.....	16
Chapitre III. Stress oxydant et activités antioxydantes	
1. Stress oxydant.....	18
2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	18
2.1. Antioxydants et systèmes de défense.....	19
2.2. Antioxydants enzymatiques.....	20
2.3. Antioxydants non enzymatiques.....	21
3. Antioxydants de synthèse.....	22
4. Conséquence du stress oxydatif.....	23
5. Quelques activités biologiques antioxydantes.....	23
5.1. Piégeage du radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	24
5.2. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	24
5.3. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS•+.....	25
5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (pouvoir réducteur).....	25
5.5. L'activité de phénanthroline.....	26

2^{ème} partie : Etude expérimentale

Chapitre I. Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal.....	26
1.1. Germination des graines de <i>M. truncatula</i>	26
1.2. Suivi des pots.....	30
1.3. Récolte des plantes.....	31
1.4. Préparation de la poudre végétale.....	31

3^{ème} partie : Etude d'article scientifique

1. Matériel et méthodes.....	34
1.1. Matériel végétal.....	34

1.1.1. Isolement, purification et identification des dérivés de l'apigénine.....	34
1.2. Isolement du plasma humain.....	35
1.3. Biomarqueurs du stress oxydatif.....	35
1.3.1. Mesure de la peroxydation plasmatique des lipides.....	35
1.3.2. Mesure du groupe carbonyle.....	35
1.3.3. Détermination du groupe thiol.....	35
1.4. Paramètres de coagulation.....	35
1.5. L'analyse des données.....	35
3. Résultats et discussion.....	36
4. Conclusion.....	40
Conclusion générale.....	41
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

1O2	Oxygène singulet
ABTS•+	3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTT	Temps de thromboplastine partielle activée
BHA	Butyl-hydroxy-anisole
BHT	Butyl-hydroxy-toluène carboxylase/oxygénase L
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxydant Capacity
Cm	Centimètre
°C	Degré celsius
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydraxyl
EDTA	Acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique
ERO	Espèces oxygénées réactives
ESI	L'ionisation par électronébulisation
é-	Electron
Fe2SO4	Sulfate ferrique
H2SO4	Acide sulfurique
H2o2	Peroxyde d'hydrogène
H3PO4	Acide phosphorique
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
m/z	Rapport masse /charge
NO•	Monoxyde d'azote
nm	Nanomètre
O2•	Anion superoxyde
•OH	Radical hydroxyle
ONOO-	Ion peroxydinitrite
PT	Temps de prothrombine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TT	Temps de thrombine

Liste des figures

Figure 01. Carte de répartition géographique des Fabacées (en rouge).....	03
Figure 02. Origine géographique des <i>Medicago</i>	05
Figure 03. La Plante <i>Medicago Truncatula</i>	07
Figure 04. Les différentes classes des composés phénoliques.....	11
Figure 05. Structure du Flavone.....	12
Figure 06. Structure des isoflavones.....	13
Figure 07. Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes.....	18
Figure 08. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèce réactives de l'oxygène.....	19
Figure 09. Les défenses antioxydantes : complémentarité entre système non enzymatique et enzymatique.....	20
Figure 10. Structure chimique de BHA et BHT.....	23
Figure 11. Equation de radical DPPH transformé en DPPH.....	24
Figure 12. Formation et piégeage du radical ABTS • + par un antioxydant donneur de H•.....	25
Figure 13. Schéma sur la réaction de test FRAP (ferric reducing antioxydant power).....	26
Figure 14. Localités géographiques des 10 accessions de l'espèce <i>M. truncatula</i> dans le Nord Algérien.....	27
Figure 15. Les graines de la plante <i>Medicago truncatula</i>	29
Figure 16. Le développement des graines de <i>M.truncatula</i> dans la plaque alvéolée après 15 jours.....	29
Figure 17. Les 10 plantes de <i>M.Truncatula</i> cultivées en serre dans des pots.....	30
Figure 18. La photo a été prise lors de l'arrosage d'une plante sept jours après la cultivation.....	30
Figure 19. Les plantes de <i>M.truncatula</i> après 8 semaines de développement.....	31
Figure 20. Le Matériel utilisé lors de la récupération des parties aériennes des plantes <i>M. truncatula</i>	31

Figure 21. Les différentes étapes des récupérations des parties aériennes de la plante <i>M.Truncatula</i> (A-stérilisation, B- coupure, C-rinçage avec l'eau distillée, D- séchages à l'air libre, E-broyage).....	32
Figure 22. Structures de dérivés d'apigénine isolés des parties aériennes de <i>Medicago truncatula</i>	36
Figure 23. L'effet de l'apigénine et de sept de ses dérivés (composés 1 - 5) sur la peroxydation des lipides plasmatiques induit par H ₂ O ₂ / Fe.....	37
Figure 24. L'effet de l'apigénine et de sept de ses dérivés (composés 1- 5) sur la carbonylation des protéines plasmatiques induite par H ₂ O ₂ / Fe.....	37
Figure 25. L'effet de l'apigénine et de sept de ses dérivés (composés 1 - 5) au niveau des groupes thiol dans les protéines plasmatiques traitées Par H ₂ O ₂ / Fe.....	38
Figure 26. L'effet de l'apigénine et de sept de ses dérivés (composés 1 - 7) sur l'activité de coagulation du plasma humain (APTT (A), PT (B) et TT (C)).....	38

Liste des tableaux

Tableau 01. Espèces annuelles et pérennes du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	05
Tableau 02. La répartition de saponines à travers les différentes parties de <i>M. Truncatula</i>	09
Tableau 03. Origines géographiques des 10 accessions étudiées, avec les paramètres éco- géographiques correspondants.....	28
Tableau04. Une comparaison de l'effet de l'apigénine et de ses dérivés (composés 1 - 5) sur les biomarqueurs du stress oxydatif dans le plasma traité avec H ₂ O ₂ / Fe et coagulation	39

Introduction générale

La région méditerranéenne d'une manière générale, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes médicinales (*Anthoula., 2003*). Ces plantes ont été traditionnellement employées pour la prolongation de la durée de conservation des aliments (*Wang et al., 2010*).

Durant ces deux dernières décennies, la recherche en phytothérapie devient une des plus grandes préoccupations scientifiques (*Niyahnjike et al., 2005*). Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou traiter diverses maladies. Selon des études pharmacologiques plus de 1200 plantes utilisées à travers le monde, en médecine traditionnelle, pour leurs activités biologiques (*Bisht et al., 2010*).

Ces maladies sont à l'origine du stress oxydatif et sont dues généralement à la production excessive des espèces d'oxygène (ERO) et qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule ; les lipides, les protéines et les acides nucléiques (*Valko et al., 2006*). Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (*Aruoma., 2003*). De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires, qui sont largement utilisés, comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques, Mais essentiellement antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif (*Bourgaud et al., 2001 ; Kar., 2007*).

Les antioxydants sont des molécules naturelles ou synthétisées présents dans les aliments en vue, notamment : les espèces, le climat et les pratiques agricoles. Ils sont naturellement présents à très variable concentrations dans les fruits et les légumes (*Bazinet., 2015*). Les antioxydants jouent un rôle majeur dans la protection contre les dommages oxydatifs moléculaires (*Evans., 2007*).

En effet, les plantes représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs tels que les alcaloïdes, les acides phénolique, les flavonoïdes, les hétérosides, les saponines, les coumarines (*Lafon., 1991*). Ces composés ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en pharmacie et en cosmétologie (*Bahorun et al., 1996*).

La flore algérienne, l'une des plus riches du bassin méditerranéen, recèle de nombreuses espèces végétales aux vertus thérapeutiques et organoleptiques. Parmi celles-ci, les plantes de la famille des (*Fabaceae*) inclut des espèces végétales médicinales bien connues possédant diverses propriétés biologiques (*Mai et al., 2001*). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier *Medicago truncatula*, une plante modèle qui a beaucoup de caractères et qui est riche en composés chimiques qui lui donnant des propriétés exceptionnelles (*Faid et al., 1995 ; Hsieh, 2000 ; Michal et al., 2009*). Permettant ainsi de protéger l'organisme contre les endommagements oxydatifs et nombreuses maladies (*Bruneton., 2009*).

Dans ce mémoire, nous exposerons un récapitulatif des données bibliographiques existantes ainsi que les principaux résultats d'étude expérimentale récente concernant l'activité antioxydante des parties aériennes de la plante *M. truncatula*.

Notre travail a été devisé en trois parties : Dans un premier temps, de ce mémoire nous proposerons une étude bibliographique, qui regroupe 3 chapitres :

- Le premier chapitre basé principalement sur des notions sur la plante de *M.truncatula*.
- Le deuxième chapitre sera consacré à un aperçu théorique sur les métabolites secondaires notamment, les flavonoïdes et les saponines.
- Le troisième chapitre s'intéresse au stress oxydant, les différents systèmes antioxydants et une présentation générale de quelques tests de la capacité antioxydante.
- La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée aux travaux personnels.
- La troisième partie de ce mémoire englobe une étude expérimentale d'article scientifique traitant le même sujet dans nos recherches. Et on termine à la fin par une conclusion générale.

Première partie
Recherche
bibliographique

Chapitre I

Généralités

1. Famille des *Fabaceae*

La luzerne tronquée ou *Medicago truncatula* appartient à la famille des *Fabaceae* (légumineuses) qui constituent la troisième famille la plus importante du monde végétal (environ 12000 espèces) après les Astéracées et les Orchidacées.

Les *Fabaceae*, au sens large, sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales (*Gilbert et al., 1952 ; 1953 ; 1954*). (Figure 01)



Figure 01. Carte de répartition géographique des *Fabaceae* (en rouge)
(*Heywood., 1996*).

Les trois sous-familles des *Fabaceae* sont :

- Sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papillonacée.
- Sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière.
- Sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon.

On observe normalement la présence de nodules fixateurs de l'azote atmosphérique sur les racines chez les *Papilionoideae* et les *Mimosoideae* alors qu'ils sont absents chez la plupart des *Caesalpinioideae* (*Raven et al., 2000*).

Ces nodosités sont le résultat d'une symbiose entre des bactéries fixatrices d'azote, les *Rhizobiums* et ces différentes espèces de légumineuses. C'est pourquoi elles peuvent se développer sur des sols pauvres en azote et l'enrichir en engrais vert.

Les légumineuses sont également capables, comme la plupart des plantes sauvages ou cultivées, de s'associer à des champignons symbiotiques pour former des endomycorhizes (*Gianinazzi., 1996 ; Harrison., 1997*).

Une particularité métabolique des Fabaceae est la présence d'une hémoprotéine fixatrice de dioxygène, la leghémoglobine (ou LegHb), très proche de l'hémoglobine. Cette protéine se trouve dans les nodules des racines et permet de fixer l'oxygène pour former un milieu anaérobie favorable au développement de *Rhizobium*. Dans les applications pharmaceutiques, de très nombreuses préparations (baumes, gommes, sirops, insecticides) sont faits à partir de Fabaceae papilionacées (*Harrier et al., 1995*).

De plus, les Légumineuses présentent d'autres spécificités biologiques, par exemple concernant leurs interactions avec des pathogènes et des ravageurs (insectes, nématodes), l'architecture de la plante, la formation de graines protéagineuses, la production de métabolites secondaires spécifiques (isoflavonoïdes impliqués dans la signalisation symbiotique, dans les réactions de défense, et présentant aussi un grand intérêt pharmaceutique (*Dixon., 1999*).

Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale : protéagineux tels que le pois, la féverole, le haricot, le pois chiche, les lentilles ; oléoprotéagineux comme le soja et l'arachide ; et fourrages tels que la luzerne et le trèfle (*Etienne-Pascal et al., 2001*).

2. Présentation du genre *Medicago*

Selon *Fournier (1961)*, le terme "*Medicago*", vient du mot latin "*Medica*" ou «herbes de Médic», il fut modifié par Dale champs en 1587, et devient : *Medicago*. Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie (région allant du Nord-Ouest de l'Iran à l'Azerbaïdjan) (*Medoukali., 2016*).

2.1. Taxonomie

Le genre *Medicago* appartient à la tribu *trifolieae* (famille de *fabaceae*), sous –famille de *papilionoideae*, il est proche des genres *Melilotus* et *Trigonella* (*Lesins et Lesins., 1979*). Ce genre comprend la principale culture fourragère largement cultivée et les espèces de mauvaises herbes *M. sativa* L. (luzerne) et l'espèce modèle de légumineuses *M. truncatula* Gaertn (*Sadeghian et HesamzadehHejazi., 2014*).

Ce dernier comporte un grand nombre d'espèces annuelles et pérennes, Géographiquement, elles ne se distribuent pas de la même manière. Les espèces annuelles sont cantonnées particulièrement dans la région méditerranéenne. Par contre, les espèces pérennes sont à large distribution et se localisent plutôt à l'Est de la Méditerranée et principalement au Centre et à l'Ouest asiatique.

2.2. Aire de répartition du genre *Medicago*

Les luzernes annuelles ont parfois des distributions très limitées. Elles se retrouvent dans tous les étages bioclimatiques : de l'humide au saharien. Certaines espèces sont à large spectre de répartition, d'autres ont une distribution spatiale plus délimitée. *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes.

Les *Medicago* pérennes se rencontrent essentiellement sur les rives nord de la Méditerranée. S'étendent jusqu'en Asie centrale ; quelques formes spontanées sont localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas Nord-Africain (*Medoukali., 2016*). (**Figure 02**)

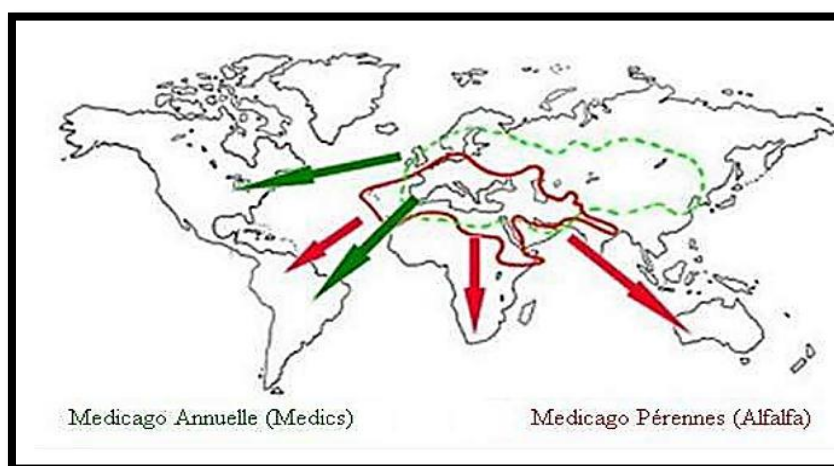


Figure 02. Origine géographique des *Medicago* (*Delalande et al., 2007*).

2.3. Espèces spontanée du genre *Medicago* rencontrées en Algérie

Le genre *Medicago* est représenté par de nombreuses espèces spontanées dont les plus importantes sont :

Tableau 01. Espèces annuelles et pérennes du genre *Medicago* rencontrées en Algérie (*Hireche., 2006*).

Espèces	Caractéristique et aire de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	Plante vivace rencontré un peu partout.
<i>M. falcate</i>	Plante vivace très résistante au froid.
<i>M. lupulina</i>	dite lupiline ou minette : plante annuelle ou bisannuelle.
<i>M. scundiflora</i>	Plante annuelle ou bisannuelle.
<i>M. scutellata</i>	dite luzerne à écusson : plante annuelle, se rencontre sur les sols argileux du Telle.

<i>M. orbicularis</i>	Plante annuelle du pâturage de Telle.
<i>M. echuris</i>	Plante annuelle, elle est assez commune dans les pâturages de Telle (constantinois).
<i>M. ciliaris</i>	rencontré surtout dans les pâturages et praires du Telle à sol semi salin.
<i>M. truncatula</i>	Plante annuelle très commune dans Telle.
<i>M. littoralis</i>	Plante annuelle, elle est abonde sur les dunes et les littoral et de l'intérieure. elles constituent des pâturages de bonne qualité.
<i>M. murex</i>	Plante annuelle commune dans tout le territoire algérien.
<i>M. minima</i>	Plante annuelle, est souvent rencontré sur les sols pauvres.
<i>M. Arabica</i>	Plante annuelle.
<i>M. lanciniata</i>	Plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	Plante annuelle.

3. Présentation de l'espèce d'étude *M. truncatula*

M. truncatula est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes (*Adel Amar., 2016*), appelée communément Luzerne tronquée ou encore luzerne sauvage, fait partie des luzernes annuelles surnommées « Medic » appartenant à l'ordre des fabales et à la famille des légumineuses (ou Fabaceae) (*choi et al., 2004 ; Doyle et Luckow., 2003*). Un proche parent de la culture fourragère premium *Medicago sativa* L (*Dixon et al., 1995 ; Dixon et al., 2003*).

3.1. Description botanique

M. truncatula est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées. Les gousses sont cylindriques, en forme de vrilles, glabres, très dures, les spires jointives des gousses portent des épines recourbées, souvent perpendiculaires au plan de spires. Les graines ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (*Lesins et Lesins., 1979 ; Prospero et al., 1995*). (Figure 03)

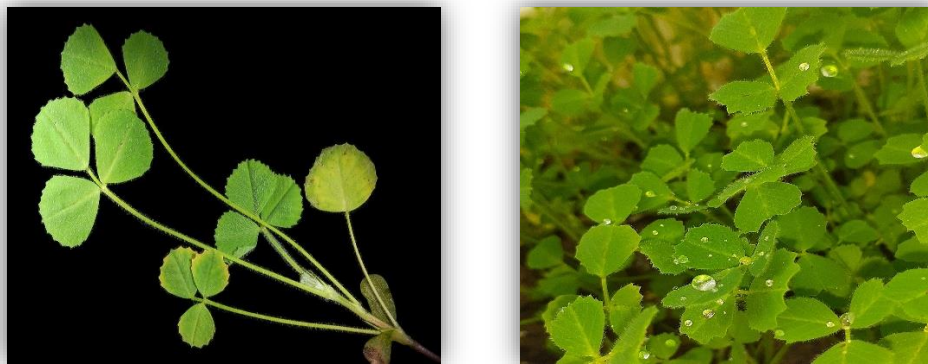


Figure 03. La Plante *Medicago truncatula* .

3.2. Position systématique

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabla*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *papilionoideae*

Tribu: *Trifolieae*

Genre: *Medicago*

Espèce: *Medicago truncatula*

3.3. Aire de répartition

Cette espèce est localisée dans la flore du pourtour méditerranéen et principalement dans les zones de moyennes altitudes (relativement froides). Ainsi, *M. truncatula* est abondante en Algérie (*Abdelguerfi., 1978*).

3.4. *M. truncatula* plante modèle

M. truncatula (luzerne tronquée) a été proposée comme plante modèle depuis les années 90 (*Barker et al., 1990 ; Frugoli et Harris., 2001*). Cette espèce est étroitement apparentée à une importante légumineuse fourragère qui constituent des cultures destinées à l'alimentation humaine ou animale (*Djemel et al., 2005*). La luzerne tronquée, a été choisie comme espèce modèle pour les études génomiques en vue de son petit génome diploïde, son temps de génération court, son auto fécondité, et haute efficacité de transformation (*Cook., 1999 ; Watson et al., 2003*).

De plus, elle présente une grande syntonie avec beaucoup de légumineuses cultivées tels que le pois et la luzerne pérenne (*Zhu et al., 2005*). Permettant ainsi le transfert des acquis sur cette plante modèle vers ces légumineuses. *M. truncatula* est un excellent modèle en raison de ses nombreux atouts aux niveaux de la biologie, de la génétique et des différents outils génomiques qu'elle offre (*Huguet et Prospéri., 1996 ; Young et al., 1996*).

M. truncatula, initialement développée comme plante modèle pour les études de symbiose entre les rhizobactéries fixatrices d'azote et légumineuses, a maintenant été développée comme modèle pour des études sur aspects de la biologie végétale (*Rose., 2008*), y compris le développement foliaire composé (*Wang et al., 2013*). Développement des fleurs et régulation du temps de floraison (*Benloch et al., 2003 ; Weller et al., 2015*). Interactions avec les bactéries, les champignons et les insectes (*Harrison et al., 2002 ; Chen et al., 2017*), et tolérance à la sécheresse (*Badri et al., 2011 ; Liu et al., 2016*). Sans surprise, *M. truncatula* a également été utilisée comme plante modèle pour les études sur les plantes du métabolisme secondaire. Toutes ces caractéristiques ont contribué à choisir *M. truncatula* comme légumineuse modèle (*Cook., 1999*).

3.5. Substances du métabolisme secondaire

a. Flavonoïdes

M. truncatula produit des membres de toutes classes de flavonoïdes trouvés dans les plantes, c'est-à-dire les isoflavones (la formononétine, medicarpin, génistéine et biochanine A), anthocyanidines (cyanidine), les proanthocyanidines (le polymère d'épicatéchine), flavanones (naringénine), flavonols (quercétine et myricétine), et les flavones (apigénine, chrysoeriol, tricéine et lutéoline). (*Chenggang et al., 2018*).

b. Saponines

M. truncatula est également riche en saponines triterpénoïdes, dont beaucoup peuvent être spécifiques à cette espèce (*Huffman et al., 2002 ; Mertens et al., 2016*). Elle est maintenant devenue l'usine modèle de choix pour les études sur la biosynthèse des saponines. (*Chenggang et al., 2018*).

Tableau 02. La répartition des saponines à travers les différentes parties de *M. Truncatula*.

Les composés de saponines	Partie aérienne	Les racines
Les glycosides d'acide zanique	×	
Les glycosides de Bayogénine		×
Les glycosides de hédéragénine		×
Les glycosides de soya asaponine B		×
Les glycosides d'acide médicagène	×	
soja saponine B	×	

3.6. Intérêts de *M. truncatula*

a. Intérêt phytochimique

En plus de sa valeur en tant que système modèle pour les études sur la fixation symbiotique de l'azote, *M. truncatula* est récemment devenue un organisme de choix pour la dissection de voies complexes du métabolisme secondaire. (*Chenggang et al., 2018*).

M. truncatula produit de nombreux métabolites secondaires qui sont principalement distribués dans les légumineuses, ce qui en fait une indispensable usine modèle pour des études sur ces métabolites. En plus à leur rôle de composés antimicrobiens (*Tanaka et al., 2002 ; Mukneetal., 2011*), et d'inducteurs de gènes de nodulation rhizobiale (*Kosslak et al., 1987 ; Pueppke et al., 1998*), il y a une longue histoire d'intérêt pour la biosynthèse des isoflavonoïdes répandus dans les légumineuses mais manquant dans les plantes modèles *Arabidopsis* et riz (*Dixon et al., 1999*).

b. Intérêt thérapeutique

Les isoflavonoïdes ayant des rôles fonctionnels dans la maladie et les interactions de défense dans les plantes (*Dixon., 1986 ; Dixon, L.W., 2003 ; Weisskopf et al., 2006*). Ils ont également pertinence pour la santé humaine avec les isoflavonoïdes décrits comme présentant des propriétés œstrogéniques, anti-angiogéniques, antioxydantes et anti-cancérogènes (*Dixon et*

al., 2002). Ainsi qu'être impliqué dans la prévention des troubles Post-ménopausiques et les maladies cardiovasculaires. (*Cornwell et al.*, 2004).

Les saponines d'origine végétale sont considérées faire partie des systèmes de défense contre les agents pathogènes et les herbivores. Les saponines ont également des avantages potentiels pour la santé humaine, et les plantes contenant des saponines sont utilisées depuis longtemps en médecine traditionnelle (*Chenggang et al.*, 2018). Ils ont été documentés comme possédant des propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-nutritionnelles et anti-insectes et contribuent au développement des plantes et la défense contre les agents pathogènes (*Moses et al.*, 2014). Les saponines ont été signalé comme causant des ballonnements, réduisant ainsi la digestibilité des protéines (*Francis et al.*, 2002).

c. Intérêt génétique

M.truncatula forme de petites graines permettant leur culture dans des tubes à essais. Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries rhizobiales et le séquençage du génome de la souche de référence de *S.meliloti* 1021 a été achevé (*Capela et al.*, 2001). Elle est facilement transformée par *Agrobacterium rhizogen* *A.tumefasciens* (*Boisson et al.*, 2001). Cette espèce a permis d'identifier un grand nombre de gènes reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés, et leur expression étudiée (*Gamas et al.*, 1996 ; *Ane et al.*, 2002 ; *Amor et al.*, 2003 ; *Lévy et al.*, 2004).

d. Intérêt agronomique

Notre espèce d'étude possède un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche et pour la suppression ou la diminution de l'épandage d'engrais azotés. Son intérêt est étroitement lié à sa capacité à ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèce de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, qu'il serait souhaitable d'introduire dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousses), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies (*Prosperi et al.*, 1993).

Chapitre II

Les composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. La relation entre le métabolisme phénolique et le programme général de développement de l'organisme végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances.

Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité et c'est pour cela, ils ont plusieurs activités selon leur voie. (*Bahorun., 1997*).

1. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols naturels sont des molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols (**Figure 04**). Les plus importants sont les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (*Yvon Gervaise., 2004*).

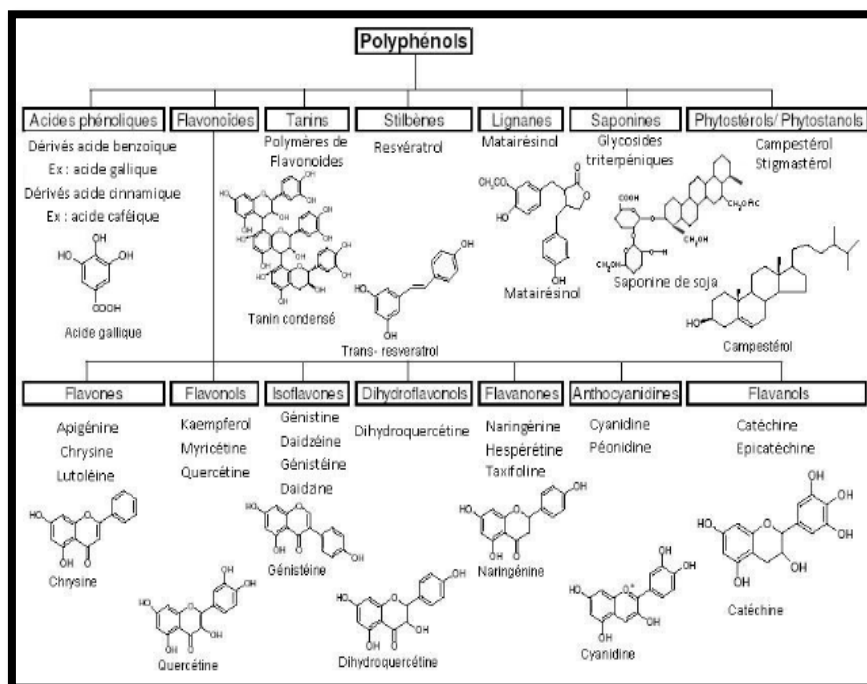


Figure 04. Les différentes classes des composés phénoliques (*Yvon Gervaise., 2004*).

1.1. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes) (*Chevallier., 2008*). Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles. Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (*Riberau-Gayon., 1968*). Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-Phenyl Chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (*Heller et al., 1998*). (Figure 05)

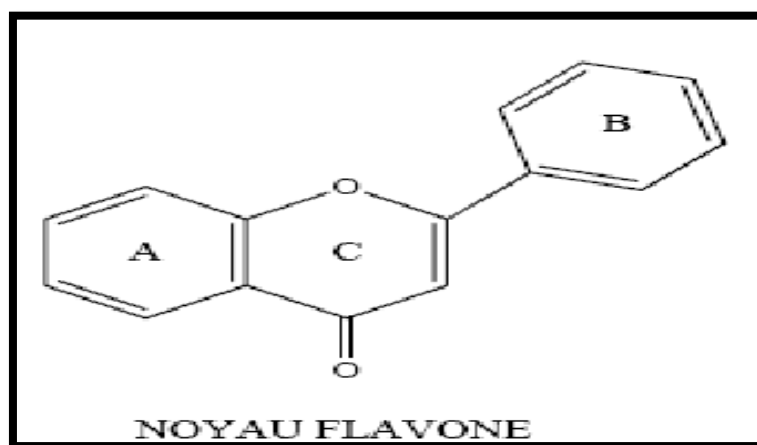


Figure 05. Structure du Flavone (*Bruneton., 1993 ; Elicoh-Middleton., 2000*).

1.1.1. Structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés de génines, sur lesquelles sont greffés un ou plusieurs oses : D-glucose, L-rahmnose, glucorhamnose, galactose, arabinose, etc... La liaison génine-ose existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du génine ou des ose(s) (*Macheix et al., 2005*). Les positions des substituants hydroxylés et méthoxylés des génines peuvent être très diverses. On obtient ainsi des O-hétérosides et des C-hétérosides ayant chacun des structures qui leur sont propres. Les C-hétérosides semblent intéressants en thérapeutique. La rupture de la liaison Génine-Ose est plus difficile dans le cas des C-hétérosides que dans celui des Ohétérosides (*Macheix et al., 2005*).

1.1.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont classés en plusieurs classes différentes :

a. Flavones

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune. Parmi les flavonols les plus répandus, on trouve le kaempférol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3',4', 5, 7), ces deux flavonols sont incolores ; le myricétol et l'isorhamétol (*Higdon., 2004*).

b. isoflavonoïdes

Les isoflavones font partie de la famille des flavonoïdes (génistéine-5-7-4-trihydroxyisoflavone, biochanine A, daidzéine-7-4-dihydro-isoflavone, formononétrie), ils sont formés par l'oxydation et l'élimination d'une molécule d'eau d'une flavone. Selon leur formule chimique, il existe une douzaine de types structuraux, mais le squelette principal reste la même (les 3 phenylchromane). Ils se présentent presque exclusivement dans la famille des Fabaceae (*Braden et al., 1967*). (**figure 06**).

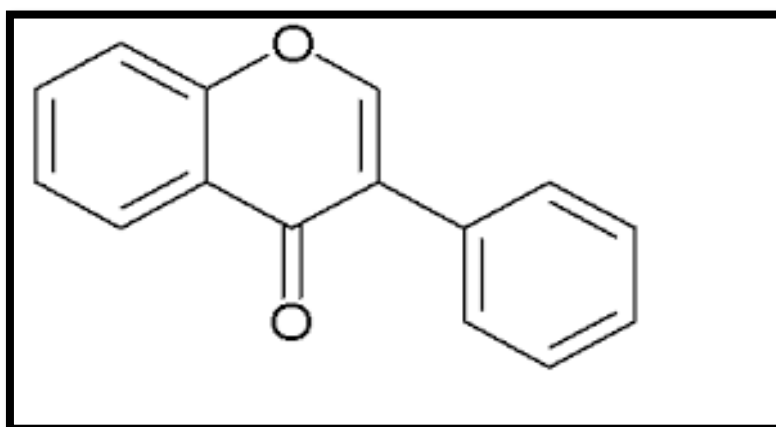


Figure 06. Structure des isoflavones (*Giulia et al., 1999*).

c. Flavanones

Ces composés ne comportent pas de groupements OH en position 3 et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citrons, orange et qui sont la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose) et l'héspéridine (*Higdon., 2004*).

d. Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (*Chevallier., 2008*).

1.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en naringénine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner l'apigénine ou le dihydroflavonol.

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase se métabolise en flavonol ou en anthocyanes, en présence de dihydroflavonol réductase se métabolise en tanins condensés (*Ono et al., 2006 ; Seeram et al., 2006*).

1.1.4. Propriété antioxydante des flavonoïdes

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (*Rice-Evans et al., 1996*), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène.

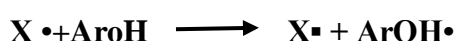
L'activité anti-radicalaire peut être évaluée par radiolyse pulsée, par l'étude spectrométrique du piégeage de radicaux colorés tels que le 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•+).

• Mécanismes d'action

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont été décrits :

- Piégeage direct des radicaux libres

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés (X) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène



Le radical aryloxyde formé est stabilisé par résonance. L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique. Mais, il peut continuer à évoluer selon plusieurs processus (dimérisation, dismutation, recombinaison avec d'autres radicaux, réduction en molécule

parent, oxydation en quinone) soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules. L'activité anti radicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes (*Van Acker et al., 1996*).

- Chélation des ions métalliques (Fe³⁺, Cu⁺)

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives. Par ailleurs, la complexation des flavonoïdes par des métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation (*Afanas et al., 2001*).

- Inhibition d'enzyme

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase...). La régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' α tocophérol (*Rice-Evans et al., 1996*).

• Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (*Aliaga., 2004 ; Sroka., 2005*) Il s'agit de :

-Présence d'une fonction catéchol sur le cycle B

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

-Présence d'un motif énone dans le cycle C

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

-Présence de groupement hydroxyle en position 3

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence

d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones (*Heim., 2002*).

D'autre part, plus le degré d'hydroxylation du flavonoïde est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé (*Cao., 1997*). De même, la polymérisation de flavonoïde peut améliorer, comme dans le cas des polymères de rutine (*Kurisawa., 2003*) ou des procyanidines (*Lotito., 2000*), ou conserver les activités anti radicalaires.

1.2. Saponines

Ce sont des composés naturels dont la structure est d'hétérosides (glucides), de stérols ou de triterpènes, très abondants dans les végétaux. Les saponines sont des substances tensio-actives, qui forment des solutions colloïdales et font apparaître de la mousse comme le savon (en latin : *sapo* signifie savon) (*Cheeke et al., 2005*).

1.2.1. Propriétés physicochimiques des saponines

Les saponines sont formées par deux parties :

- Une partie osidique comprenant une, deux à trois chaînes de sucres ; parmi les sucres les plus connus et qui sont attachés aux génines des saponines on cite, le D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-ribose, D-rhannose et l'acide uronique, l'acide Dglucuronique.
- Une partie aglycone dont on distingue deux classes, les saponines triterpéniques et les saponines stéroïdiques (*Cheeke et al., 2005*).

1.2.2. Saponines triterpéniques

La plupart des saponines végétales appartiennent à cette classe. Elles sont très abondantes chez les dicotylédones. La majorité des génines triterpéniques sont des molécules pentacycliques : oleanane, ursane, hopane et plus rarement tétracyclique : lanostane. (*Güclü-Ustundag et al., 2007*).

1.2.3. Saponines stéroïdiques

Les composés de cette classe sont principalement présents chez les monocotylédones. Ils sont classés en hétérosides de spirostanales, hétérosides de furostanols et hétérosides d'amines Stéroïdiques (pseudo-alcaloïdes) (*Alexander., 2009*).

1.2.4. Propriétés pharmacologiques des saponines

Les saponines jouent un rôle pharmacologique très important. Elles sont caractérisées par leur fort pouvoir hémolytique lié à la nature de la génine et du nombre des unités osidiques. Elles sont connues par leur action anti-fongique qui est plus efficace chez les saponines à génine

stéroïdiques que les saponines à génine triterpénique. La majorité des saponines possèdent des propriétés cytotoxiques et anti-tumorales. Elles sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, surtout les poissons.

Chapitre III

Stress oxydant et activités antioxydantes

1. Stress oxydant

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leur destruction par des systèmes de défense antioxydantes (*Christophe et al., 2011 ; Papazian et al., 2008*). La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées réactives (ERO) tels que les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle, le peroxyde d'oxygène singulet). Dans les conditions physiologiquement normales, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produit en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de système de défense adaptative (vitamine, enzyme, oligoéléments) qui permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydante /antioxydante 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., 2009*).

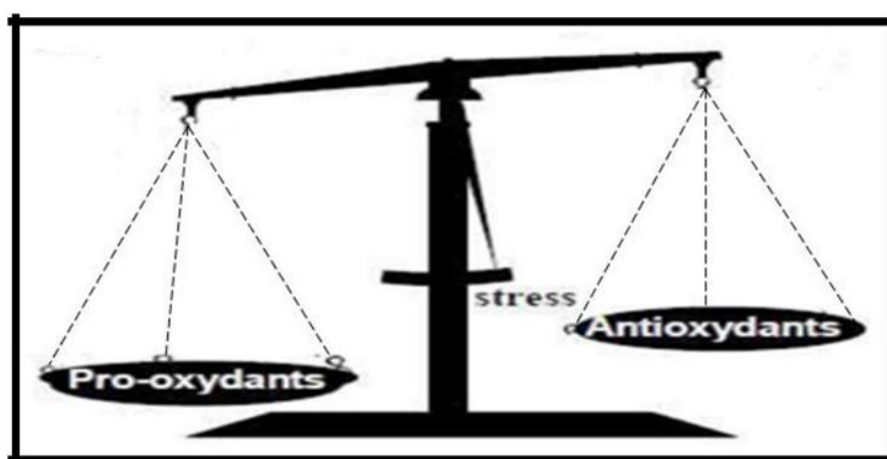


Figure 07. Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (*Favier., 2006*).

2. 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 circonstance, 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 leurs 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 ($O_2^{\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle ($\bullet OH$), ainsi que le monoxyde d'azote ($NO\bullet$) et son dérivé : le peroxynitrite ($ONOO^-$) (**Figure 08**).

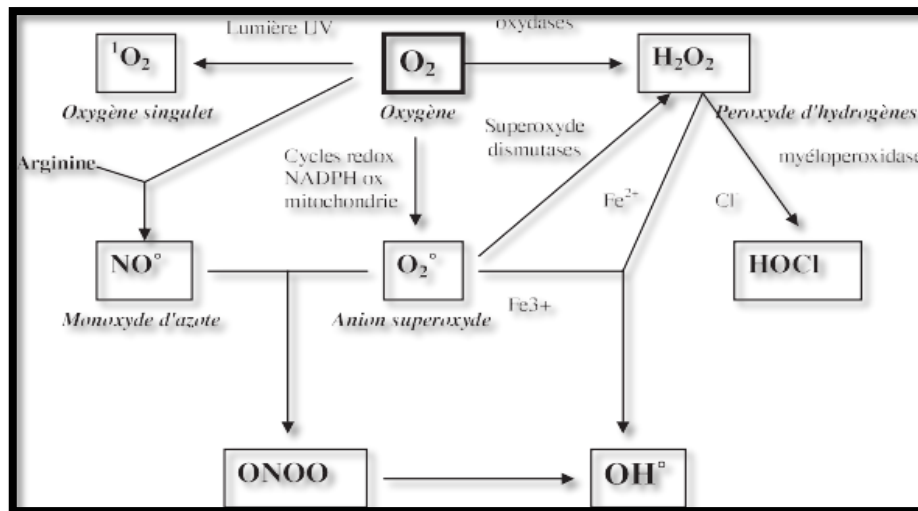


Figure 08. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèce réactives de l'oxygène (*Favier et al., 2003*).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, tels 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*).

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 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 super

oxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase et les peroxyredoxines (*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. (**Figure 09**)

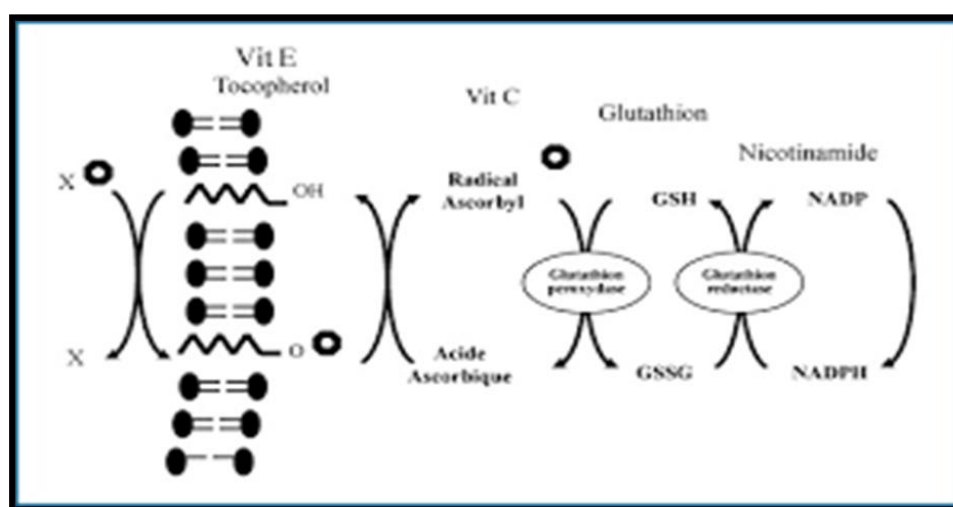


Figure 09. Les défenses antioxydantes : complémentarité entre système non enzymatique et enzymatique (*Leverve., 2009*).

2.2. Antioxydants enzymatiques

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

- **Catalase** : Catalyse la dismutation de l' H_2O_2 pour donner $2H_2O$. 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*).

- **Superoxyde dismutase** : Est une des rares enzymes capables d'avoir un radical substrat, en l'occurrence l'anion superoxyde. La superoxyde dismutase transforme les radicaux superoxydes ($O_2 \bullet^-$) 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*).

- **Glutathion peroxydase** : Catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène (*Levrant 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*).

- **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 thiorédoxine-inter acting 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*).

2.3. Antioxydants non enzymatiques

- **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*).

- **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 induit par les radicaux libres (*Yoshida et al., 1993 ; Kaiser et al., 1990*).

- **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*).

- **Caroténoïdes** : Agissent en tant qu'antioxydant en bloquant les radicaux libres. Leurs potentiels antioxydants 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 ses eux-mêmes régénérés par la vitamine C (*Hermes., 2005*).

-**Flavonoïdes** : Les relations structures 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*).

-**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*).

-**Coumarines** : Sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, super oxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celle signalées pour les flavonoïdes (*Igor., 2002*).

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), (**figure 10**) 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 toxiques.

Le BHA et BHT ont été suspecté d'être responsables de lésions hépatiques et de la carcinogénèse (*sherwin., 1990 ; wichi., 1988*).

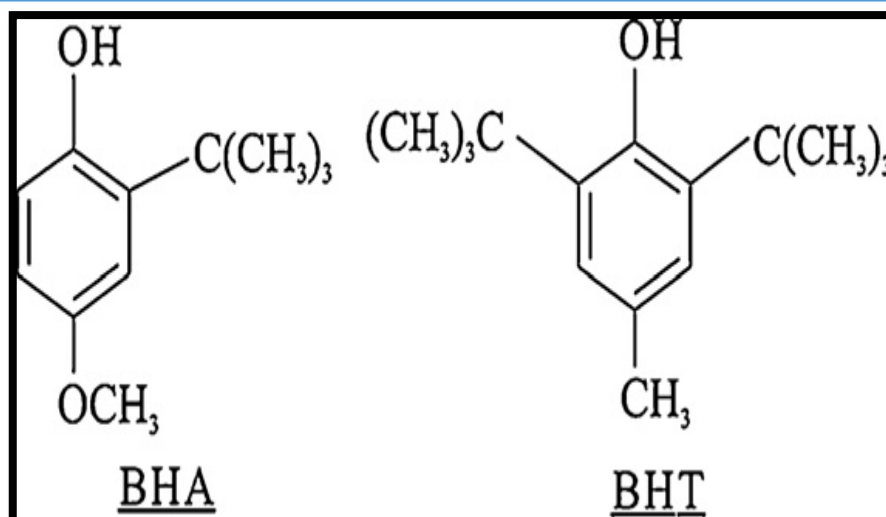


Figure 10. Structure chimique de BHA et BHT (*Heloizy et al., 2010*).

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'adhésions. 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...) (*Pincemil et Defraigne., 2003 ; Favier., 2003*).

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 temps employé. Par conséquent, une approche avec plusieurs tests pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus informatif et même nécessaires (*Gulcen., 2012*).

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

Le composé chimique 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH*) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés 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 (**figure11**). 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 mesuré 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 affectant également l'absorbance du DPPH. (*Huang et al., 2005*).

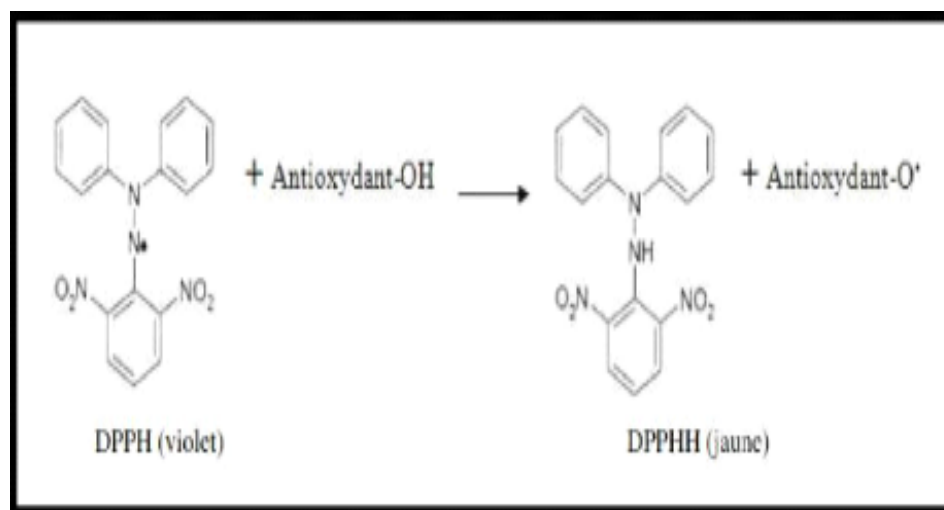


Figure 11. Équation de radical DPPH transformé en DPPH (*Talbi et al., 2015*).

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

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxydant 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, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanines, ainsi que pour des thiols et les antioxydants synthétiques, les vitamines C et E.

(*ozyurek 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 Cu^{2+} -Nc qui absorbe à 450 nm (*Apac et al., 2011*) (*Apac et al., 2004*).

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

L'acide 2,2'-azinobis-(3éthylbenzothiazoline-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 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., 1996 ; Childs et Badsky., 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*).

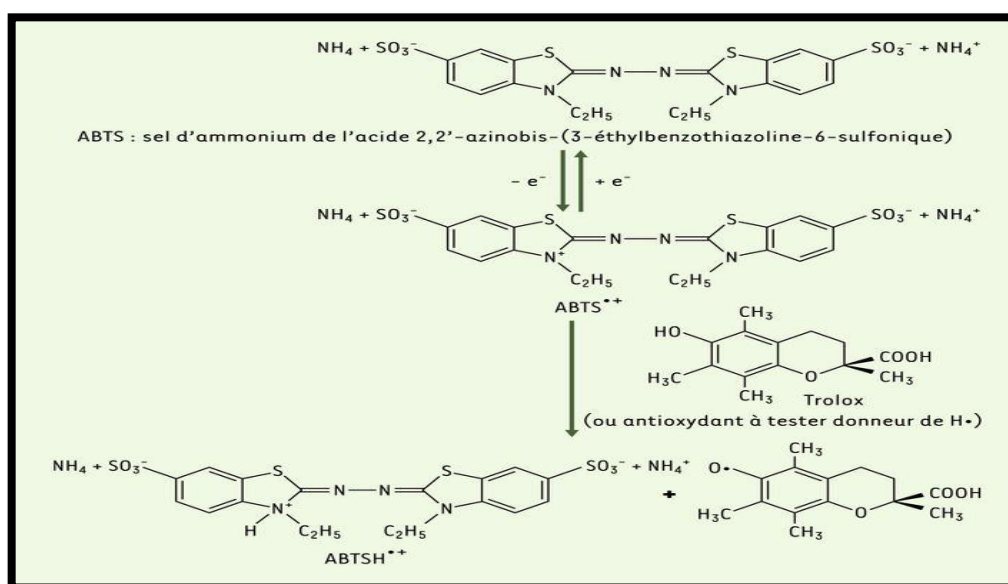


Figure 12. Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (*Lien., 1999*).

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 (*Oyaz., 1986*). La présence des reductants provoque dans les extraits 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*).

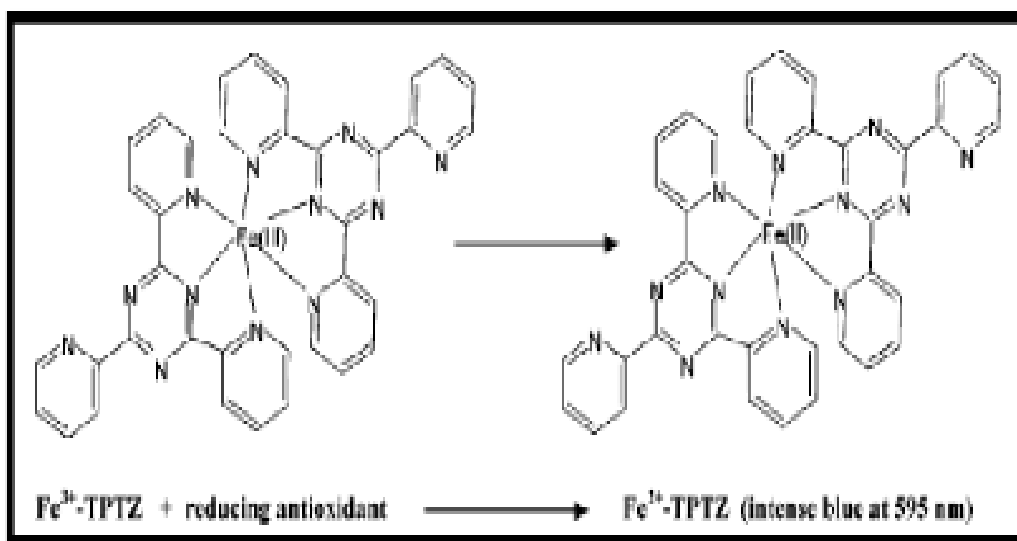


Figure 13. Schéma sur la réaction de test FRAP (ferric reducing antioxidant power) (*Prior et al., 2005*).

5.5. L'activité de phénanthroline

Phénanthroline-1-10, ou orthophénanthroline constitue une famille de composés organiques 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 tels 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 pâle pour être détectable et le virage associé à la réduction passe du quasi incolore au rouge (*Szydłowska., 2008*).

Deuxième partie
Etude expérimentale

Ce travail a pour but de rechercher et de mettre en évidence l'activité antioxydante présente dans la plante *M. truncatula* en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes modèles endémiques. Mais compte tenu des conditions globales du virus Corona Covid 19, notre prochain travail ne peut pas être terminé, du ce fait nous étions satisfaits du travail théorique en choisissant un article scientifique traitant le même sujet dans nos recherches.

1. Matériel végétal

Dix échantillons de *M. truncatula*, ont été utilisés pour ces travaux. Les graines nous ont été ramenées par Dr. MEDOUKALI Imane qui a réalisé le processus de recherche et de collecte dans différents régions de l'Algérie.



Figure 14. Localités géographiques des 10 accessions de l'espèce *M. truncatula* dans le Nord Algérien.

Tableau 3. Origines géographiques des 10 accessions étudiées, avec les paramètres éco-géographiques correspondants.

N°	REGION	PROVENANCE	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM	CLIMAT
Mt2	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1	HH
Mt5	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32	HH
Mt6	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E	462	0,4	31,3	HH
Mt9	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E	626	8,4	30,1	HH
Mt12	Bourdj bouarriridj	air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E	495	0,2	31,1	SH
Mt13	Bourdj bouarriridj	-	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E	420	1,2	33,1	SH
Mt14	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506	0,2	30,9	H
Mt18	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9	HH
Mt25	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1	H
Mt27	Sétif	Centre-ville	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E	473	0,3	31,7	H

ALT : Altitude, LAT : Latitude, LON : Longitude, Pm : La pluviométrie moyenne ; Tm : La température minimale du mois le plus froid ; TM : La température maximale, HH : Hyper-humide, H : Humide, SH : Subhumide, SS : Semi sec.

1.1. Germination des graines de *M. truncatula*

Concernant la germination, les graines de *M. truncatula* sont placées dans des tubes eppendorf contenant l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) pendant 8 minutes. Elles sont ensuite rincées 4 fois à l'eau distillée. Au dernier rinçage les graines sont gardées dans l'eau pendant une nuit pour l'imbibition pour lever leur dormance et permettre ainsi une meilleure synchronisation de leur germination.



Figure 15. Les graines de la plante *Medicago truncatula*.

Le lendemain, une fois les graines se gonflent, elles sont transférées dans une plaque de semis alvéolée pendant 15 jours pour les expériences après l'émergence de la radicule. Le tégument se fend et la radicule émerge et s'oriente vers le milieu (sol). Puis, la tigelle émerge et s'allonge vers le haut (le ciel).

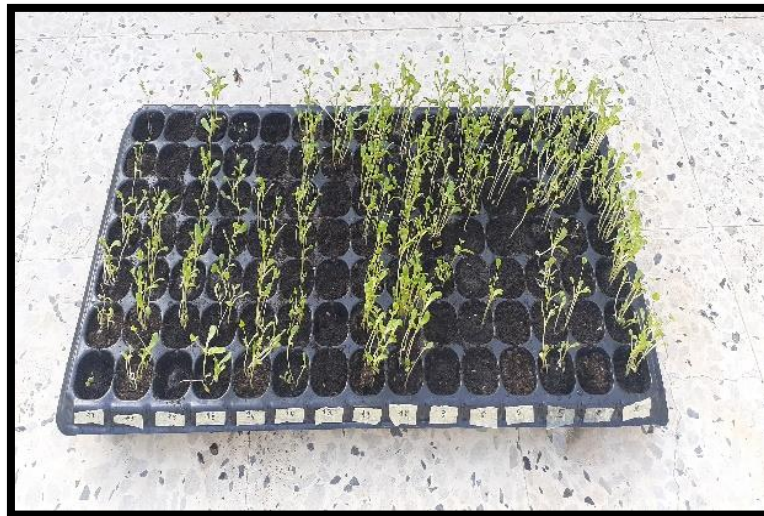


Figure 16. Le développement des graines de *M. truncatula* dans la plaque alvéolée après 15 jours.

Les plantes sont cultivées en serre dans des pots (Ø : 17cm) en présence de terreau (La température est de 25°C). L'irrigation a été faite chaque 2 jour avec l'eau de robinet.



Figure 17. Les 10 plantes de *M. Truncatula* cultivées en serre dans des pots.



Figure 18. La photo a été prise lors de l'arrosage d'une plante sept jours après la cultivation.

1.2. Suivi des pots

On a observé un développement clair des plantes dans chacun des pots plus précisément dans les pots (2, 12, 13, 14, 25) dans lesquels on a enregistré un nombre élevé des fleurs de grande taille. Nous avons continué à arroser les plantes jusqu'à l'obtention d'un bon rendement suffisant pour faire notre expérience.



Figure 19. Les plantes de *M. truncatula* après 8 semaines de développement.

1.3. Récolte des plantes

Les parties aériennes de la plante ont été récoltées au mois d'Avril 2020 après 12 semaines de développement pendant la période de floraison. La récolte des plantes a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.



Figure 20. Le Matériel utilisé lors de la récupération des parties aériennes des plantes *M. truncatula*.

1.4. Préparation de la poudre végétale

Les plantes utilisées dans cette étude ont subi un nettoyage et lavage à l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'impuretés, puis séchées à l'air libre pendant 7 semaines, ensuite broyées à l'aide d'un mortier et pilon afin de pouvoir récupérer des poudres fines et homogènes. Les poudres des plantes obtenues ont été conservées chacune dans des flacons en verre au réfrigérateur jusqu'à utilisation.



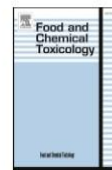
Figure 21. Les différentes étapes de récupération des parties aériennes de la plante *M. Truncatula* (A-Stérilisation, B- Coupure, C-Rinçage avec l'eau distillée, D- Séchage à l'air libre, E-Broyage).

Troisième partie
Etude d'article
scientifique



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

A comparison of the effects of apigenin and seven of its derivatives on selected biomarkers of oxidative stress and coagulation *in vitro*

Iwona Kowalska^a, Weronika Adach^b, Anna Stochmal^a, Beata Olas^{b,*}^a Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, 24-100, Pulawy, Poland^b Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 90 236, Łódź, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Apigenin
Oxidative stress
Coagulation

ABSTRACT

Apigenin is a phenolic compound widely present in many fruits, vegetables and herbs. Its name originates from *Apium*: a genus of the Apiaceae. The aim of the present study was to determine the antioxidant or pro-oxidant properties of apigenin and seven of its derivatives, isolated from the aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula*) and common wheat (*Triticum aestivum*), in human plasma treated with a hydroxyl radical donor (OH[•]) *in vitro*. It also examines their influence on the parameters of coagulation. The compounds were found to demonstrate different effects on oxidative stress and coagulation which may be related to differences in their structure. In particular, apigenin 7-O-(2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1 → 3))-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2)-O-β-D-glucopyranoside demonstrates both antioxidant and anticoagulant activities, and may offer the most promise for the prevention and treatment of cardiovascular disorders of all the phenolic compounds tested so far.

1. Introduction

Apigenin is a natural phenolic compound whose name originates from the *Apium* genus of the Apiaceae family. It is known to be present in many fruits, vegetables and herbs, and can be readily isolated from chamomile, celery, parsley, thyme, onions, green tea and wheat sprouts (Zhu et al., 2015; Bak et al., 2016; Zhou et al., 2016). It displays a wide spectrum of biological properties, including anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer (Kaur et al., 2008; Bao et al., 2013; Hu et al., 2014; Banerjee and Mandal, 2015; Bian et al., 2017). In addition, apigenin has also been found to possess low intrinsic toxicity and anti-oxidative potential (Gupta et al., 2001; Shukla and Gupta, 2010).

The aim of the present study was to determine the antioxidant or prooxidant properties of apigenin and seven of its derivatives, five isolated from the aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula* – Fig. 1A) and two from common wheat (*Triticum aestivum* – Fig. 1B), *in vitro* in human plasma treated with a hydroxyl radical donor (OH[•]) – H₂O₂/Fe. The effectiveness of seven tested compounds was determined by measuring the level of lipid peroxidation based on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration, and carbonyl and thiol group levels. As changes in coagulation are often correlated with oxidative stress, and hence with the development of cardiovascular disorders (Nowak et al., 2010), a second aim of the study was to determine the influence of apigenin and its derivatives on selected parameters of

coagulation in human plasma: activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT).

M. truncatula, colloquially known as barrel medic due to the shape of the pod, is an annual plant commonly grown in Australia. It is an economically-important crop produced for animal feed, human nutrition and the industrial processing of concentrates due to its well-balanced amino acid composition (Djemel et al., 2005). It also produces a range of secondary metabolites that serve various functions in the plant. Together, all these features make *M. truncatula* a model plant for the study of members of the Fabaceae family (Cook, 1999). Two classes of secondary metabolites produced by *M. truncatula* are of particular interest. The first is that of the triterpene saponins, primarily medicagenic acid, zanhic acid glycosides, soyasapogenol B and soyasapogenol E glycosides (Kapusta et al., 2005a,b); the second are various flavones, such as apigenin, luteolin, chrysoeriol and tricetin derivatives, and flavonols, such as quercetin, laricitrin and myricetin derivatives (Kowalska et al., 2007).

T. aestivum also produces a wide variety of secondary metabolites, many of which are of nutraceutical and pharmaceutical importance (Haig, 2001; Dinelli et al., 2009). The content of flavonoids, typically luteolin and apigenin glycosides, as well as benzoxazinoids and phenolic acids, in the grain and aerial parts have been found to vary between different wheat varieties (Liu et al., 2010; Kowalska et al., 2014, 2019; Kowalska and Kowalczyk, 2019). These compounds have been

* Corresponding author.

E-mail address: beata.olas@biol.uni.lodz.pl (B. Olas).<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111016>Received 16 October 2019; Accepted 30 November 2019
0278-6915/ Published by Elsevier Ltd.

Une comparaison des effets de l'apigénine et de sept de ses dérivés sur des biomarqueurs sélectionnés du stress oxydatif et de la coagulation in vitro.

L'apigénine (ou apigénol) est un composé chimique de la famille des flavones, une sous classe des flavonoïdes, Il est connu pour être présent dans de nombreux fruits, légumes et herbes. Il présente également des propriétés biologiques ; anti-inflammatoires ; antioxydantes ; antigénotoxiques ; antimicrobiennes et anti-cancéreux.

-Le but de la présente étude était de déterminer les propriétés antioxydantes ou prooxydantes de l'apigénine et de cinq de ses dérivés, isolés des parties aériennes du baril medic (*M. truncatula*) in vitro dans le plasma humain traité avec un donneur de radical hydroxyle (OH•).

-Un deuxième objectif était de déterminer l'influence de l'apigénine et de ses dérivés sur certains paramètres de coagulation dans le plasma humain.

Deux classes de métabolites secondaires produits par *M. truncatula* présentent un intérêt particulier. Ces composés ont été démontrés des propriétés antioxydantes et bénéfiques pour la santé. Dont l'activité antioxydante dépend fortement de la structure chimique.

Diverses études ont examiné la relation entre l'activité biologique des composés phénoliques et la position et le nombre de groupes fonctionnels qui leur sont attachés. L'activité radicalaire des glycosides acylés semble dépendre du type de résidu sucre attaché à l'aglycone, ainsi que du nombre de fragments sucre.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

M. truncatula, a été sélectionnée dans la collection du département de biochimie et de qualité des cultures, institut des sciences du sol et de la culture des plantes, Le critère de sélection était qu'elle s'agissait de plante dans lesquelles des dérivés d'apigénine sont synthétisés.

1.1.1. Isolement, purification et identification des dérivés de l'apigénine

Après la cultivation des plantes. Les parties aériennes ont été récoltées au début de floraison puis congelées, lyophilisées seulement en poudre et utilisées pour l'extraction.

L'extrait brut a été appliqué sur un 6 cm × 10 cm, 40–63 µm LiChroprep RP-18 préparatif colonne. La fraction phénolique a été éluée avec 40% de MeOH et les composés ont ensuite été purifié sur un RP-18 2 cm × 50 cm, 40–63 µm colonne de verre utilisant un système isocratique (MeCN-1% H3PO4). Les cinq composés individuels résultants (1 à 5) ont montré des spectres d'absorption

caractéristique des glycosides d'apigénine. Leurs structures ont été établies par les techniques spectrométriques et spectroscopiques (ESI-MS / MS et RMN).

1.2. Isolement du plasma humain

Le plasma humain a été obtenu auprès de six hommes et femmes non-fumeurs qui étaient des donneurs réguliers d'une banque de sang et d'un centre médical. Les échantillons de sang ont été collectés dans une solution CPD (citrate / phosphate / dextrose ; 9: 1; v / v sang / CPD) ou Solution CPDA (citrate / phosphate / dextrose / adénine ; 8,5: 1; v / v ; sang / CPDA).

Le plasma sanguin a été isolé par centrifugation différentielle. Les échantillons de plasma ont été divisés en deux groupes. Le premier a été incubé avec l'apigénine ou ses dérivés (composés 1 à 5) à des concentrations finales de 1 à 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (30 min, 37 ° C ; pour les paramètres hémostatiques). Le deuxième groupe a été pré-incubé avec l'apigénine ou ses dérivés (composés 1 à 5) à des concentrations finales de 1-50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (cinq minutes, 37 ° C ; pour les paramètres du stress oxydatif), puis traité avec 4,7 mM H₂O₂ / 3,8 mM Fe₂SO₄ / 2,5 mM EDTA (25 min à 37 ° C). La concentration protéique des échantillons testés a été déterminée par mesurer l'absorbance à 280 nm.

1.3. Biomarqueurs du stress oxydatif

1.3.1. Mesure de la peroxydation plasmatisque des lipides

La lipoperoxydation plasmatisque était quantifiée en mesurant la concentration de TBARS en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 156\ 000\ \text{M}$).

1.3.2. Mesure du groupe carbonyle

1.3.3. Détermination du groupe thiol

La teneur en groupe thiol dans les protéines plasmatiques a été déterminée en mesurant l'absorbance à 412 nm avec 5,5'-dithio-bis- (acide 2-nitrobenzoïque).

1.4. Paramètres de coagulation

Le temps de prothrombine (PT), le temps de thrombine (TT) et le temps de thromboplastine partielle activée (APTT).

1.5. Analyse des données

Afin d'éliminer les données incertaines, plusieurs tests ont été utilisés pour effectuer des analyses statistiques. Le test Q-Dixon, test de Shapiro-Wilk, test de Levene, le test ANOVA, le test de comparaisons multiples de Tukey ou test de Kruskal-wallis.

2. Résultats et discussion

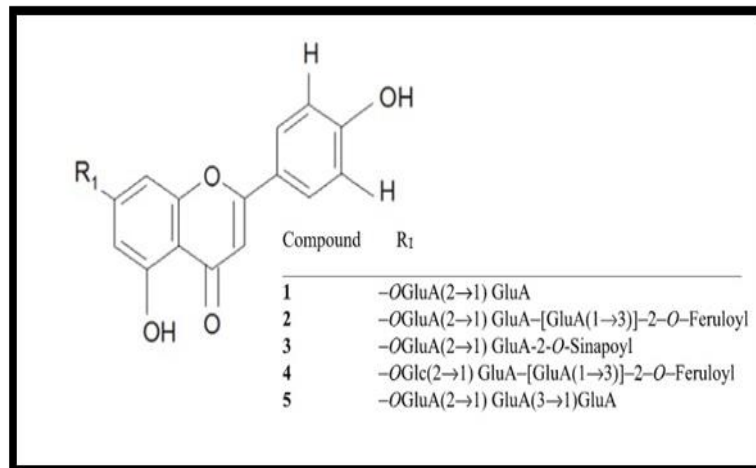


Figure22. Structures de dérivés d'apigénine isolés des parties aériennes de *M. truncatula*.

Après la séparation par chromatographie liquide basse pression et purification sur une colonne semi-préparative C18, cinq dérivés de l'apigénine ont été identifiés dans les parties aériennes de *M. truncatula* (**Figure22**), qui ont tous donné un pic caractéristique pour l'apigénine à m/z 269 pour ESI-MS / MS. L'analyse spectroscopique identifiée deux unités d'acide uronique fixées à l'apigénine de la 7-O- [β -D-glucuronopyranosyl- (1 \rightarrow 2) -O- β -D-glucuronopyranoside] apigénine; deux unités d'acide uronique liées à l'apigénine de la 7-O- [2'-O-sinapoyl- β -Dglucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2) -O- β -D-glucuronopyranoside] apigénine, avec acylation de la chaîne de sucre avec l'acide sinapique; trois acide uronique unités attachées à l'apigénine du 7-O- {2-O-féruoyl- [β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 3)] - O- β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2) -O- β -D-glucuronopyranoside }, avec acylation par l'acide férulique; deux unités d'acide uronique attaché à l'apigénine du 7-O- {2'-O-féruoyl- [β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 3)] - β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2) -O- β -D-glucopyranoside}; avec acylation de l'acide férulique et six carbones caractéristique d'un glucose unité; trois unités d'acide uronique liées à l'apigénine du 7-O- [β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 3) -O- β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2) -O- β -Dglucuronopyranoside]. De plus, les concentrations des composés phénoliques ($\leq 50 \mu\text{g} / \text{mL}$) testé dans cette étude .Ceux-ci, correspondent aux concentrations physiologiques de composés phénoliques disponibles après administration orale.

Sur les cinq dérivés testés de l'apigénine, trois (composés 1, 2, 4) ont permis la réduction de la peroxydation des lipides plasmatiques induite par $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}$ à toutes les concentrations testées. Les deux autres dérivés (composés 3, 5) ont également inhibé la peroxydation lipidique.

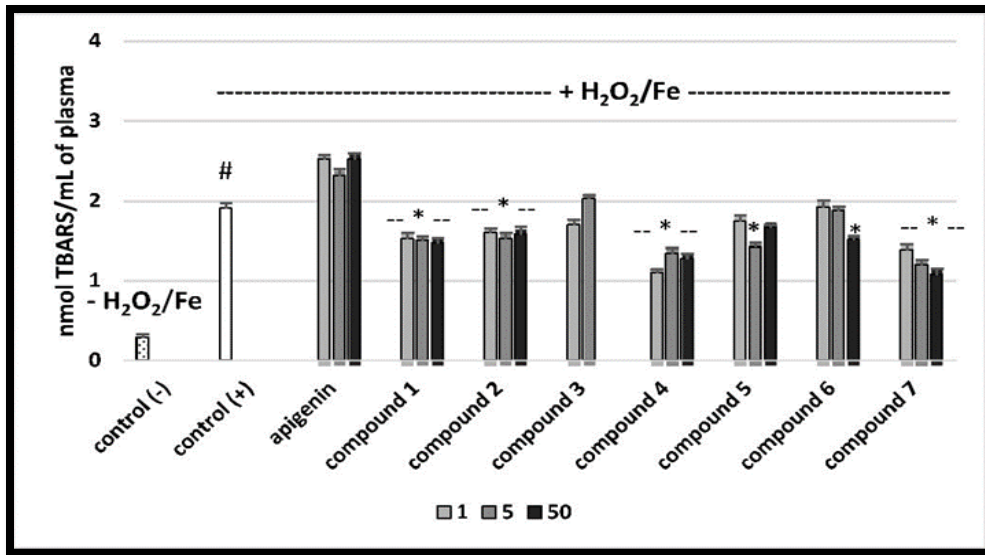


Figure 23. L'effet de l'apigénine et de cinq de ses dérivés (composés 1 - 5) sur la peroxydation des lipides plasmatiques induit par H₂O₂/Fe.

La carbonylation des protéines plasmatiques induite par H₂O₂/Fe était significativement Inhibée par l'apigénine et ses dérivés 1, 2, 3, 4 à toutes les concentrations utilisées.

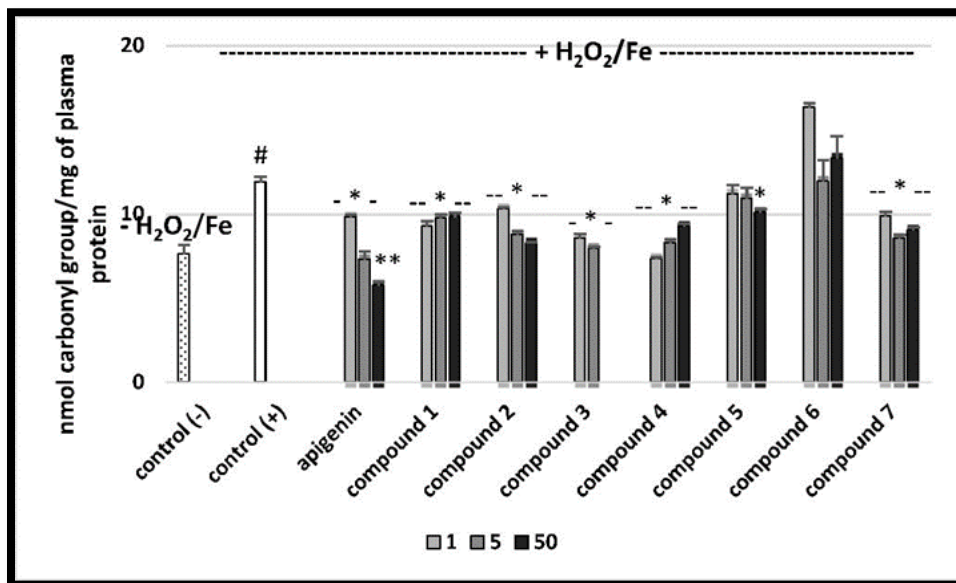


Figure 24. L'effet de l'apigénine et de cinq de ses dérivés (composés 1- 5) sur la carbonylation des protéines plasmatiques induite par H₂O₂/Fe.

Dans ce modèle in vitro, seuls l'apigénine et son dérivé 1 et 4, à toutes les concentrations utilisées, ont augmenté les taux de groupes thiol.

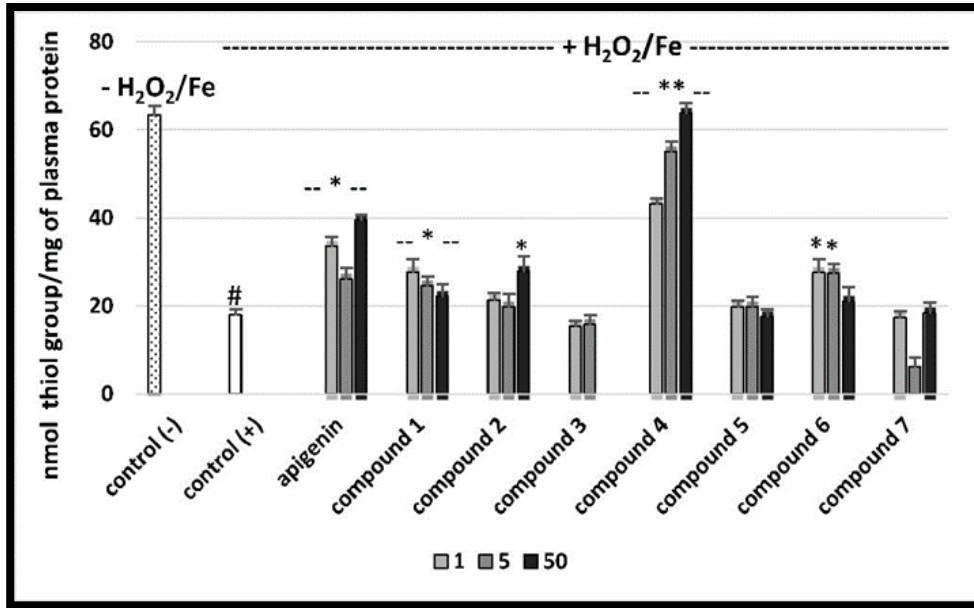


Figure 25. L'effet de l'apigénine et de cinq de ses dérivés (composés 1 - 5) au niveau des groupes thiol dans les protéines plasmatiques traitées Par H₂O₂ / Fe.

Ni l'apigénine ni aucun des cinq dérivés testés n'ont été trouvés pour influencer le PT ou le TT du plasma humain à l'une des concentrations testées (1 à 50 µg / mL). De plus, seul le composé 4 (1-50 µg /mL) a changé le niveau d'APTT.

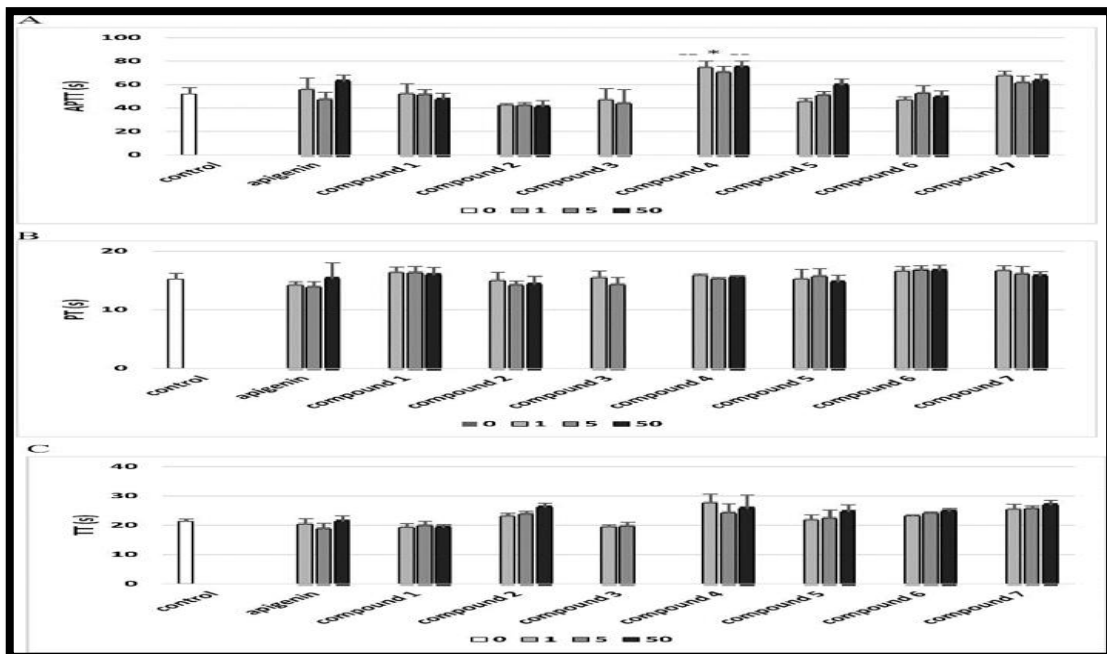


Figure 26. L'effet de l'apigénine et de cinq de ses dérivés (composés 1 - 5) sur l'activité de coagulation du plasma humain (APTT (A), PT (B) et TT (C)).

Le composé 4 , un dérivé acylé avec l'acide férulique et une unité de glucose, non seulement a démontré le plus grand antioxydant ,mais a également montré un potentiel anticoagulant grâce à la présence d'acide férulique qui réduit considérablement les dommages des radicaux libres dans les systèmes cellulaires neuronaux, et que l'acide férulique atténue considérablement le stress oxydatif induit par les radicaux peroxy et hydroxyle dans les synaptosomes systèmes membranaires à un degré plus élevé que cinnamique, coumarique et acides vanilliques.

Le composé 2, un dérivé acylé avec l'acide sinapique, s'est avéré inhibent la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines. L'acide sinapique est connu pour démontrer une activité de piégeage du peroxy-nitrite et peut jouer un rôle dans la défense cellulaire contre les maladies impliquant les radicaux libres et s'est également avérée inhiber fortement la formation de 3-nitrotyrosine dans les protéines. Le composé 1 n'a démontré qu'un potentiel antioxydant.

Tableau 04. Une comparaison de l'effet de l'apigénine et de ses dérivés (composés 1 - 5) sur les biomarqueurs du stress oxydatif dans le plasma traité avec H₂O₂ / Fe et coagulation.

Composés	Biomarqueurs du stress oxydatif			Paramètres du coagulation
	Inhibition de la peroxydation lipidique	Inhibition de la carbonylation des protéines	Inhibition de groupe thiol	APTT
Apigénine	Pas d'effet	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Pas d'effet
Composé 1	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Pas d'effet
Composé 2	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Pas d'effet	Pas d'effet
Composé 3	Pas d'effet	Effet positive (potentiel antioxydant)	Pas d'effet	Pas d'effet
Composé 4	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel antioxydant)	Effet positive (potentiel anticoagulant)
Composé 5	Effet positive (potentiel antioxydant)	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet

3. Conclusion

Le présent travail est le premier à caractériser l'influence de l'apigénine et de cinq de ses dérivés sur le stress oxydatif et le processus de coagulation in vitro. Parmi les composés testés, le composé 4, à savoir 7-O- {2'-O-féruoyl- [β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 3)] - β -D- glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2) -O- β -D-glucoopyranoside: il s'est avéré exercer à la fois des activités antioxydantes et anticoagulantes qui jouent un rôle bénéfique dans la prévention et le traitement des troubles cardiovasculaires.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail porte sur l'investigation phytochimique et biologique d'une plante du genre *Medicago* appartenant à la famille des *fabaceae* (légumineuses). C'est une culture économiquement importante produite pour l'alimentation animale, la nutrition humaine en raison de sa composition en acides aminés bien équilibrée.

Cette dernière est connue par sa richesse en métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les proanthocyanidines, flavanones, flavonols, les flavones et les saponines triterpénoïdes, qui remplissent diverses fonctions dans la plante, doués d'activités biologiques prometteuses. Ensemble, toutes ces caractéristiques font *M. truncatula* une plante modèle par excellence.

Les polyphénols végétaux constituent le plus grand groupe d'antioxydants. Des milliers de composés différents ont été déjà isolés et leurs structures ont été élucidées, mais de nouveaux constituants sont toujours en cours de découverte. Les données scientifiques indiquent que les polyphénols sont puissants piègeurs de radicaux libres qui peuvent agir comme réducteurs ou singulet des extincteurs à oxygène. Parmi ceux-ci les composés flavonoïdes ont fait l'objet de recherches les plus approfondies pour l'identification des structures chargées et l'amélioration des propriétés antioxydantes.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante, par piégeage de différents radicaux, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle).

Selon les derniers travaux, les chercheurs ont trouvés que *M. truncatula* possède non seulement l'activité antioxydante mais également d'autres activités tels que l'activité anti-cancérogène; l'activité anticoagulante; l'activité anti-angiogénique impliqué dans la prévention des troubles post-ménopausiques et les maladies cardio-vasculaires.

Références

Bibliographiques

-A-

Aliaga C., Lissi A E. 2004. Comparison of the free radical scavenger activities of and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.* 82: 1668-1673p.

Abdeguerfi A. 1978. Contribution à l'étude écologique des luzernes annuelles en algérie. These magister algérie. 116p.

Afanas R., Eva I B., Ostrakhovitch E A., Mikhal R., Chik E V., Ibragimova G A., Korkina LG. 2001. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology.* 61(6) : 677-684p.

Alexander J., Atli Auðunsson G., Benford D., Cockburn A., Dogliotti J, Di Domenico A. 2009. Saponins in madhuca longifolia L. as undesirable substances in animal Feed. *The EFSA Journal.* 979:1-36p.

Anthoula A. 2003. Plantes Aromatiques & Médicinales ; Ministère de l'agriculture ; Direction des Etudes et de La Coordination antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res,* 9(20) : 523 – 524p.

Apak,R., Guclu K., Ozyruk M., Karademir S E. 2004. Novel total antioxydant capacity index for dietary polyphenols and vitamine C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : CUPRAC method, *J.Agric. Food.Chem,* 52 : 7970-7981p.

Aruoma O I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential.

-B-

Badri M., Chardon F., Huguet T., Aouani M E. 2011. Quantitative trait loci associated with drought tolerance in the model legume *Medicago truncatula*. *Euphytica* 181:415p.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J C. and Pinkas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung,* 46: 1086 1089p.

Bahorun T. 1997. Substances naturelles actives: La flore mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, mauritius. 83-85p.

Braden A., Hart N K et Lamberton J A. 1967. Oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aus J Agric Res.* 18:355-348p.

- Barker D G.** 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics.
- Belbachir K A.** 2019. Etude phytochimique et l'activité antioxydante de la plante *Eucalyptus camaldulensis*. Centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain- Temouchent.
- Benlloch R., Navarro C., Beltrán J., Cañas L A.** 2003. Floral development of the model legume *medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sex plant Reprod* 15:231–241p.
- Bisht K., Wagner K H., Bulmer A C.** 2010. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*. Vol.278 (1) :88-100p.
- Boldyrev A.** 1993. Does carnosine possess direct antioxydant activity. *Int .J. Biochem*, 25, 8 : 1101-1107p.
- Boisson D., Chabaud M., Rosenberg C., David G., Barker.** 2001. *Agrobacterium rhizogenes* transformed Roots of *Medicago truncatula* for the study of Nitrogen –Fixing and endomycorrhizal symbiotic association.
- Blois M S.** 1958. Antioxydant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 4617 181: 1119-1200p.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi Set Gontier E.** 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; *Plant Science* 161, p: 839-851p.
- Bourbonnais R., Leech D., Paice G M.** 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with model compound. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379 : 381-390p.
- Bonnet C., Alamigeon F., Micheels P.** 2010. Guide complet des soins esthétique : du coté de ma vie. Edition Eyrolles, 14p.
- Bran W., Cuvelier M E., Berset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensmited-Wissenschaft und technologie*, 28 :25-30p.
- Bruneton J.** 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales 4ème édition .Technique et Documentation .Paris, 1269 p.

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

Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J., Bothe G., Ampe F., Batut J., Boistrad P., Becker A., Boutry M., Cadieu E., Dreano S., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Kahn D., Kiss E., Lelaure V., Masuy D., Pohl T., Portetelle D., Puhler A., Purnelle B., Ramsperger U., Renard C., Thebault P., Vandebol M., weidner S., Galibert F. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the national academy of science of the united states of america*, 98(17) : 9877-9882p.

Chen T., Duan L., Zhou B., Yu H., Zhu H., Cao Y., Zhang Z. 2017. Interplay of pathogen induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula*. *Front Microbiol* 8:973p.

Chenggang Liu., Chan Man Ha., Richard A., Dixon. 2018. Functional genomics in the study of Metabolic Pathways in *Medicago truncatula*: An overview. *Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*, vol. 1822: 315-337p. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1822.

Cheeke P R., OTERO R. 2005. *Yucca*, *Quillaja* may have role in animal nutrition. *Feedstuffs*. 3: 11-14p.

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 :93-103p.

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

Choi H K., Mun J H., kim D J., Zhu H., Baek J M., Mudge J., Roe B., Ellis N., Doyle J., kiss G B., Young N D and Cook D R. 2004. Estimating genome conservation between corp and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294p.

Choi Y., Noh D., Cho S. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of Propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*. 39: 756–61p.

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

Cao G., Sofic E., Prior R L. 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids : Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22 (5) : 749-760p.

Cavin A. 1999. Investigation phytochimique de trois plantes indosésiennes aux propriétés antioxydant et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées). *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Opropea enneanda* (annonacées). thèse de doctorat, Lausanne, 241p.

Cook D R. 1999. *Medicago truncatula* a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 301-304p.

Cornwel T I W., Cohick I., Raskin. 2004. Dietary phytoestrogens and health, *Phytochemistry* 65: 995–1016p.

-D-

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

Dellatre J., Beaudoux J L., Bonnefont –Rousselot. 2005. Radicaux libres ET stress oxydant: aspects biologique ET pathologiques. Edition Lavoisier TEC and DOC edition médicales internationales, paris, 14, 93,94p.

Delalande M., Geene S., Hughes S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani M E., prosperi J M. 2007. Wild accessions/populations. *Medicago truncatula* handbook, 1-27p.

Dixon R A., Steele C L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* 4:394–400p.

Dixon R A. 1986. The phytoalexin response: eliciting, signaling and control of host gene expression, *Biol. Rev.* 61 239–291p.

Dixon R A., Ferreira D. 2002. Genistein, *Phytochemistry* 60 205–211p.

Dixon R A., Paiva N L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *plant Cell* 7:1085–1097p.

Dixon R A., Sumner L W. 2003. Legume natural products: understanding and 131:878–885p.

Dixon R A. 1999. Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. In: *Comprehensive natural products chemistry*. Sankawa U, ed. Oxford: Elsevier, vol. 1: 773-823p.

Djemel N., Guedon D., Lechevalier A., Salon C., Miquel M., Prosperi J M., rochat C., Boutin., J P. 2005. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 557-566p.

Doyle J J., Luckow M A. 2003. The rest of the iceberg .Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology* 131: 900-910p.

-E-

Etienne-Pascal J., Véronique C., Jérôme G., Philippe T., Charles R., David B., thierry H., Jean D., Pascal. 2001. La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives .Laboratoire de biologie moléculaire des relations plantes-micro-organismes (LBMRPM), CNRS-Inra, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France.1-10p.

Evans J L. 2007. Antioxydants : do they have a role in the treatment of insulin resistance. *Indian Journal Medical Research*. Vol. 125(12) : 355-372p.

-F-

Faid M., Bakhy K., Anhad M., Tantaoui- Elaraki A. 1995. Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon.J *Journal of Food Protection*. 5: 473-578p.

Favier A. 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-155p.

Francis G., Kerem Z., Makkar H P., and Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88, 587–605p.

Frugoli J., Harris J. 2001. *Medicago truncatula* on the Move! *Plant Cell online* 13: 458–463p.

-G-

Gamas P., Niebel F D C., Lescure N., Cullimore J V. 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes unduced during root nodule development. *Mol plant Microbe Interact*, 9 :233-242p.

Gianinazzi-pearson V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8: 1871-83p.

Gilbert G et Boutique R. 1954. Mimosaceae et papillionaceae, in *Flore du congo belge* edu Ruanda Urundi. Édit. Bruxelles. *Jard. Bot.* 30p.

Goudable J., Favier A. 1997. Radicaux libre oxygénés et antioxydant. Nutrition Clinique et métabolisme, 11:115-120p.

Güclü-Ustundag O., Mazza G. 2007. Saponins : properties, applications and processing. Crit. Rev. Food Sci. 47(3): 231 – 258p.

-H-

Harrier L A., Whi P W., Sutherlan J D., Sprent J. 1995. A comparison of nodulating and non-nodulating african species of Acacia using morphological and rnomolecular markers.' In Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Newton éd. Kluwer Academic Publishers Dordrech V Boston/London. 483p.

Harrison M J. 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. Trends Plant Sci, 2: 54-6p.

Harrison M J., Dewbre GR., Liu J. 2002. A phosphate transporter from Medicago truncatula involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell 14:2413–2429p.

Heywood V H. 1996. Flowering Plants of the World. Oxford: third edition oxford University Press. 141p.

Heller R., Esmault R., Lance C. 1998. Physiologie Végétale. 6eme édition. Dunod, Paris.290p.

Heim K E., Tagliaferro A R., Bobilya D J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry. 13(10) : 572-584p.

Heloizy K., Freitas G., Fatibello-Filho O. 2010. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHT) and butylated hydroxytoluene (BHT) electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin. Talanta, 81 :1102-1108p.
<http://doi.org/10.2016/j.talanta.2010.02.004>.

Hermes-lima M. 2005. Oxydation in biology and biochemistry : role of free radicals , in K B. Story (ED).Function Metabolism : régulation and daptation. Hoboken , NJ : Wiley-Liss, 319-368p.

Hireche Y. 2006. Réponse de la Luzerne (Medicago sativa L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Mémoire de Magister. Université d'EL-Hadj Lakhdar, Batna.

Hsieh P. 2000. Antimicrobial effect of cinnamon extract. *Taiwanese. J Agric chem Food Sci.* 38:184–193p.

Huguet T., Prosperi J M. 1996. *Medicago truncatula*: a legume model-plant. *Cahiers options méditerranéennes*, 18: 171-175p.

Huhman D V., Sumner L W. 2002. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* 59:347–360p.

-I-

Ichai C., Quintrad H., Orban J C. 2011. *Desordres métabolique ET reanimation.* Springer, 427-439p.

Igor., passi L B. 2002. *Etude des activités biologique de fagora zanthoxyloides , lam (rutaceae).* Thèse de pharmacie , Bamako, 133p.

-J-

Jacob L. 2007. *L'insuffisance rénale aigue.* Edition springer, 88p.

-K-

Kosslak R M., Bookland R., Barkei J., Paaren H E., Appelbaum E R. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7428–7432p.

Kurisawa M., Chung J E., Uyama H., Kobayashi S. 2003. Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly (rutin). *Biomacromolecules.* 4 (5) : 1394-1399p.

-L-

Lesins K A., Lesins I. 1979. *Genus Medicago (leguminosae): A taxogenetic study study .dr .w* junk bv publishers, The Hague –Boston-London.

Liu L., Zhang Z., Dong J., Wang T. 2016. Overexpression of *MtWRKY76* increases both salt and drought tolerance in *Medicago truncatula*. *Environ Exp Bot* 123:50–58p.

Leverve X. 2009. Stress oxydant ET antioxidants? *Cahiers de nutrition ET de Diététique.* 44: 5, Doi: 10.2016/j.SAJIB.2013.06.005. 219-224p.

Lien EJ., Ren S ., Bui HH., Wang R. 1999. Quantitative structure –activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic boil Med*, 26: 285-94p.

Lotito S B., Actis-Goretta L., Renart M L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H H., Steinberg F M., Keen C L., Fraga C G. 2000. Influence of Oligomer Chain Length On the Antioxidant Activity of Procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276 (3) : 945-951p.

-M-

Mai, L P., Gu-Ñritte, F Ĩ., Dumontet V., Tri, M.V., Hill, B., Thoison, O., Gu-Ñnard D. and S Ñvenet, T. 2001. Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *J. Nat. Prod*, 64: 1162-1168p.

Macheix J., Fleuriet A et Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 68-74p.

Medoukali I. 2016. Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie : diversité morphologique, biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri, Constantine.

Medrat J. 2009. Manuel pratique de nutrition : l'alimentation préventive et curative. Editions de boeck supérieur, 49p.

Messioughi A. 2015. Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa*.L : importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques. Thèse du garde de docteur de l'université BADJI Mokhtar – Annaba 310-314p.

Mertens J., Pollier J., Vanden Bossche R., Lopez-Vidriero I., Franco-Zorrilla J., Moossens A. 2016. The bHLH transcription factors TSAR1 and TSAR2 regulate triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 170:194–210p.

Micha1 J., Piotr K., Pawe1 R., Marek F., Maciej S. 2009. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 847–853p.

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. *Clinicals Science*, 84: 407-412p.

Moses T., Papadopoulou K K., and Osbourn A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 439–462. doi: 10.3109/10409238.953628.

Mukne AP., Viswanathan V., Phadatare AG. 2011. Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacogn Rev* 5:13–18p.

-N-

Niyah njike G., Watcho P., Nguelefack T B., Kamanyi A. 2005. Hypoglycaemic activity of the leaves of *Bersamaengleriana* in rats. *Afr J Trad. Vol.* 2(3): 215-221p.

-O-

Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., Nakayama T. 2006. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* 45:133-43p.

Oyaizu M. 1986. Studies on products of brownig reaction : antioxidative activité of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese journal of nutrition*, 44 : 307-315p.

Ozyurek, M., Kubilay G., Tutem E., Kevser S B., Erol E S., Esincelik B S., Yildiz L., Karaman, S., Apak R. 2011. Acomprehensive review of CUPRAC methodology. *Critical Review*, 3, 2439.

-P-

Papazian L., Roch A. 2008. Le syndrome de détresse respiratoire aigue, edition springer, 153p.

Poirier J. 2004. Indispensable pour vivre en santé. Edition merlin, 72p.

Prosperi JM., Isabelle O., Angevain M., Génier G., Nansat P. 1993. Diversité génétique conservation ET utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. *Laboratoire de ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes*, 4:1-5p.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J O. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour médecin. *Vaisseaux, Coeur. Poumons*, 18, 2: 55-60p.

Pincemail J., Defraigne J. 2003. Le coenzyme Q ou ubiquinone: UN antioxidant particulier. *Vaisseaux, Coeur. Poumons*, 18, 2: 55-60p.

Pietta P G. 2000. Flavonoids as antioxydants. *Juournal of natural products* 63, 7: 1035-1042p.

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

Prosperi J M., Guy P., Genier G., Angevain M. 1995. Les luzernes ou le genre medicago. In : *Ressources génétique des plante fourragères et à gazon*. INRA Edition.

Pueppke S G., Bolaños-Vásquez M C., Werner D., Bec-Ferté M P., Promé J C., krishnan H B. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol* 117:599–606p.

-R-

Raven P., Evert R., Eichlorn S. 2000. *Biologie végétale*. 6ème Edition de Boeck, paris.111p.

Retsky K L., Chen K., Zeind J., Frei B. 1999. Inhibition of copper-induced LDL oxydation by vitamine C is associated with decreased copper bnding to LDL and 2-oxo-histidi formation. *Free radica biology and medicine.*, 26, 1-2 : 90-98p.

Ribereau-Gayon P. 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod.paris. 166p.

Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (7) : 933-956p.

Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. 1997. Antioxydant properties of phenolic compound. *Trends in plant science*, 2,4 : 152-159. Doi : 10.1016/s1360-1385(97)01018-2.

Rose R J. 2008. *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct Plant Biol* 35:253–264p.

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

-S-

Sadeghian S., HesamzedeH Hejazi S M. 2014 .Cytogenetic studies in some species of *Medicago L.* in Iran.*European Journal of biology*, 73(1):21-30p.

Schulze P C., Jun Y., Tomosaburo T. 2004. Hyperglycemia Promotes Oxidative Stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin –interacting protein .*the journal of biological Chemistry*, New York, 139p.

Sherwin E R. 1990. In: Branen, A L., Davidson P M., Salminen S (Eds). *Food additives*. Marcel, D; inc., New York, 139p.

Seeram N., Henning S., Zhang Y., Suchard M., Li Z., Heber D. 2006. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine or up to 48 hours. *J. Nutr.* 136 (10) : 2481-5p.

Sroka Z. 2005. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C.* 60(11-12) : 833-843p.

-T-

Tanaka H., Sato M., Fujiwara S., Hirata M., Etoh H., Takeuchi H. 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina 57ariegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 35:494–498p.

-U-

Udvardi M K., Tabata S., Parniske M., stougaard J. 2005. Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends Plant sci*, 10: 222-228p.

-V-

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40p.

Van Acker S., Van Den Berg D., Tromp M., Griffioen D., Van Bennekom W., Van Der Vijgh W., Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (3) : 331-342p.

-W-

Wang H F., Yih K H., and Huang K F. 2010. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 18, №1, pp. 24-33p.

Wang Y., Chen R. 2013. Regulation of compound leaf development. *Plants (Basel)* 3:1–17p.

Watson B S., Asirvatham W S., Wang L., Sumner L W. 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol.*, 131, 1104-1123p.

Weisskopf L., Abou-Mansour E., Fromin N., Tomasi N., Santelia D., Edelkott I., Neumann G., Aragno M., Tabacchi R., Martinoia E. 2006. White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition, *Plant Cell Environ.* 29: 919–927p.

Weller J L., Ortega R. 2015. Genetic control of flowering time in legumes. *Front plant Sci*6:207.

-Y-

Young N D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *annu Rev Phytopathol*, 34: 479-501.

Yvon Gervaise M. 2004. Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits, Euroforum, Paris, 10p.

-Z-

Zhu H., Choi H K., Cook D R., Shoemaker R C. 2005. Bridging Model and crop legumes through comparative Genomics. *Plant physiology*, 137: 1189-1196p.

Annexes

A comparison of the effects of apigenin and seven of its derivatives on selected biomarkers of oxidative stress and coagulation *in vitro*.

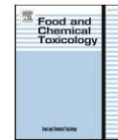
ARTICLE IN PRESS

Food and Chemical Toxicology xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

A comparison of the effects of apigenin and seven of its derivatives on selected biomarkers of oxidative stress and coagulation *in vitro*

Iwona Kowalska^a, Weronika Adach^b, Anna Stochmal^a, Beata Olas^{b,*}^a Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, 24-100, Pulawy, Poland^b Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 90-236, Łódź, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Apigenin
Oxidative stress
Coagulation

ABSTRACT

Apigenin is a phenolic compound widely present in many fruits, vegetables and herbs. Its name originates from *Apium*: a genus of the Apiaceae. The aim of the present study was to determine the antioxidant or pro-oxidant properties of apigenin and seven of its derivatives, isolated from the aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula*) and common wheat (*Triticum aestivum*), in human plasma treated with a hydroxyl radical donor (OH[•]) *in vitro*. It also examines their influence on the parameters of coagulation. The compounds were found to demonstrate different effects on oxidative stress and coagulation which may be related to differences in their structure. In particular, apigenin 7-O-(2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1 → 3))-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2)-O-β-D-glucopyranoside demonstrates both antioxidant and anticoagulant activities, and may offer the most promise for the prevention and treatment of cardiovascular disorders of all the phenolic compounds tested so far.

1. Introduction

Apigenin is a natural phenolic compound whose name originates from the *Apium* genus of the *Apiaceae* family. It is known to be present in many fruits, vegetables and herbs, and can be readily isolated from chamomile, celery, parsley, thyme, onions, green tea and wheat sprouts (Zhu et al., 2015; Bak et al., 2016; Zhou et al., 2016). It displays a wide spectrum of biological properties, including anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer (Kaur et al., 2008; Bao et al., 2013; Hu et al., 2014; Banerjee and Mandal, 2015; Bian et al., 2017). In addition, apigenin has also been found to possess low intrinsic toxicity and antioxidative potential (Gupta et al., 2001; Shukla and Gupta, 2010).

The aim of the present study was to determine the antioxidant or prooxidant properties of apigenin and seven of its derivatives, five isolated from the aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula* – Fig. 1A) and two from common wheat (*Triticum aestivum*– Fig. 1B), *in vitro* in human plasma treated with a hydroxyl radical donor (OH[•]) – H₂O₂/Fe. The effectiveness of seven tested compounds was determined by measuring the level of lipid peroxidation based on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration, and carbonyl and thiol group levels. As changes in coagulation are often correlated with oxidative stress, and hence with the development of cardiovascular disorders (Nowak et al., 2010), a second aim of the study was to determine the influence of apigenin and its derivatives on selected parameters of

coagulation in human plasma: activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT).

M. truncatula, colloquially known as barrel medic due to the shape of the pod, is an annual plant commonly grown in Australia. It is an economically-important crop produced for animal feed, human nutrition and the industrial processing of concentrates due to its well-balanced amino acid composition (Djemel et al., 2005). It also produces a range of secondary metabolites that serve various functions in the plant. Together, all these features make *M. truncatula* a model plant for the study of members of the Fabaceae family (Cook, 1999). Two classes of secondary metabolites produced by *M. truncatula* are of particular interest. The first is that of the triterpene saponins, primarily medicagenic acid, zanhic acid glycosides, soyasapogenol B and soyasapogenol E glycosides (Kapusta et al., 2005a,b); the second are various flavones, such as apigenin, luteolin, chrysoeriol and tricrin derivatives, and flavonols, such as quercetin, laricitrin and myricetin derivatives (Kowalska et al., 2007).

T. aestivum also produces a wide variety of secondary metabolites, many of which are of nutraceutical and pharmaceutical importance (Haig, 2001; Dinelli et al., 2009). The content of flavonoids, typically luteolin and apigenin glycosides, as well as benzoxazinoids and phenolic acids, in the grain and aerial parts have been found to vary between different wheat varieties (Liu et al., 2010; Kowalska et al., 2014, 2019; Kowalska and Kowalczyk, 2019). These compounds have been

* Corresponding author.

E-mail address: beata.olas@biol.uni.lodz.pl (B. Olas).<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111016>Received 16 October 2019; Accepted 30 November 2019
0278-6915/ Published by Elsevier Ltd.

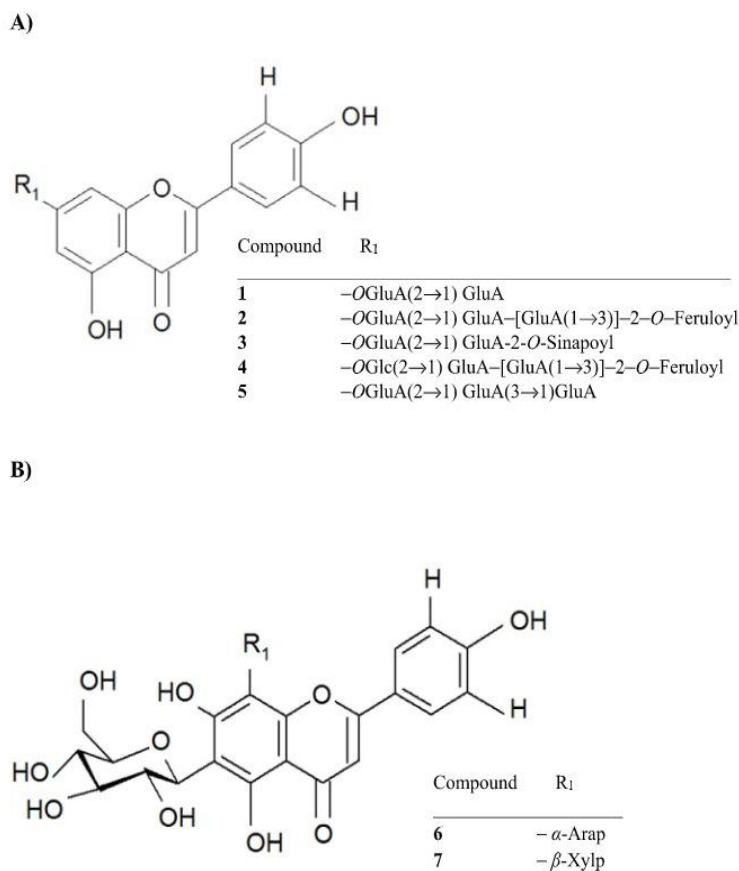


Fig. 1. Structures of apigenin derivatives isolated from the aerial parts of *Medicago truncatula* (A) and *Triticum aestivum* (B).

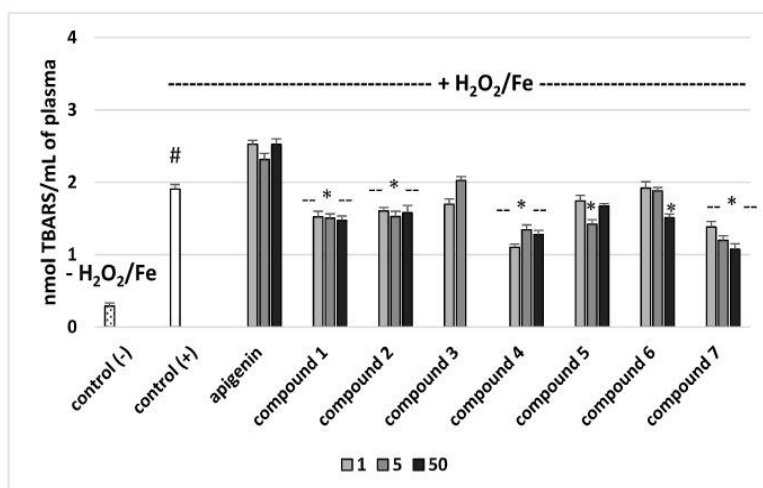


Fig. 2. The effects of apigenin and seven of its derivatives (compounds 1–7) on plasma lipid peroxidation induced by H₂O₂/Fe. Data represent mean ± S.E. of six healthy volunteers. *Control negative* refers to plasma not treated with H₂O₂/Fe, and *control positive* to plasma treated with H₂O₂/Fe. *p < 0.05 (vs. control positive), #p < 0.05 (between control negative and control positive).

found to demonstrate antioxidant and health-promoting properties (Craig, 1999; Kowalska et al., 2014, 2019), with their antioxidant activity strongly depending on chemical structure (Rice-Evans et al., 1996; Burda and Oleszek, 2001). Various studies have examined the relationship between the biological activity of phenolic compounds and the position and number of functional groups attached to them

(Trouillas et al., 2004; Aparicio, 2010). The free radical activity of acylated glycosides appears to depend on the type of the sugar residue attached to aglycone, as well as the number of sugar moieties (Olech et al., 2012).

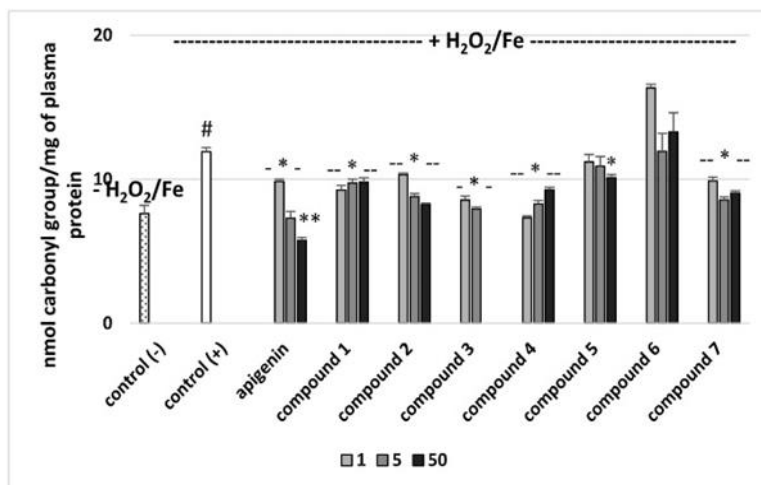


Fig. 3. The effects of apigenin and seven of its derivatives (compounds 1–7) on plasma protein carbonylation induced by H_2O_2/Fe . Data represent mean \pm S.E. of six healthy volunteers. Control negative refers to plasma not treated with H_2O_2/Fe , and control positive to plasma treated with H_2O_2/Fe . * $p < 0.05$ (vs. control positive), ** $p < 0.01$ (vs. control positive), # $p < 0.05$ (between control negative and control positive).

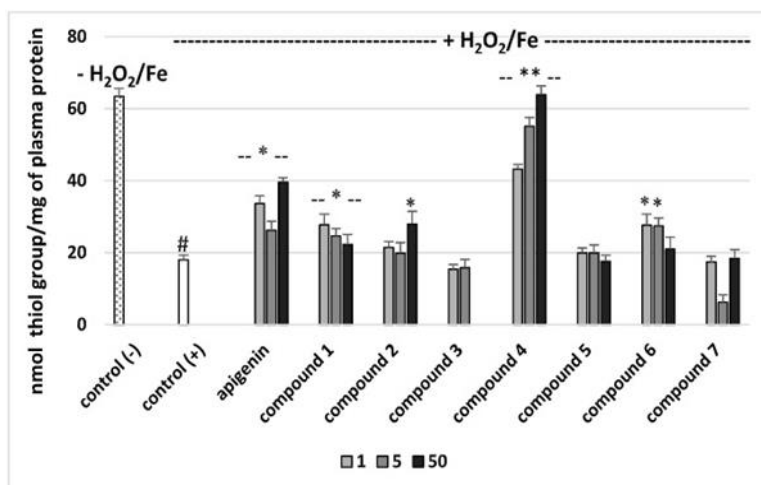


Fig. 4. The effects of apigenin and seven of its derivatives (compounds 1–7) on the level of thiol groups in plasma protein treated with H_2O_2/Fe . Data represent mean \pm S.E. of six healthy volunteers. Control negative refers to plasma not treated with H_2O_2/Fe , and control positive to plasma treated with H_2O_2/Fe . * $p < 0.05$ (vs. control positive), ** $p < 0.01$ (vs. control positive), # $p < 0.05$ (between control negative and control positive).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), thiobarbituric acid (TBA) and H_2O_2 were purchased from Sigma (St. Louis, MO., USA). Other used analytical grade reagents were provided by commercial suppliers including POCh, (Poland), Acros (Poland) and Chempur (Poland). Analytical grade methanol, acetonitrile, 85% orthophosphoric acid and chloroform were purchased from J. T. Baker (The Netherlands). TLC on cellulose plates (25DC – Alufilien 20 cm \times 20 cm cellulose) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Plant material

Medicago truncatula, *Medicago sativa* and *Triticum aestivum* were selected from the collection of the Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, Pulawy. The selection criterion was that they were plants in which apigenin derivatives are synthesized.

7-O-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside] apigenin (compound 1) was reported for the first time in the leaves of *Perilla ocimoides* (Yoshida et al., 1993). Its presence was since confirmed

in the aerial parts of *Medicago sativa* (Stochmal et al., 2001) and *Medicago truncatula* (Kowalska et al., 2007). 7-O-[2-O-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside apigenin (compound 2) was first identified in the aerial parts of *Medicago sativa* (Stochmal et al., 2001) and was later isolated and identified in the aerial parts of *Medicago truncatula* (Kowalska et al., 2007). 7-O-[2'-O-sinapoyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside] apigenin (compound 3); 7-O-[2'-O-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranoside apigenin (compound 4) and 7-O-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside] apigenin (compound 5) were reported for the first time in the aerial parts of *Medicago truncatula* (Kowalska et al., 2007). Isoschaftoside (apigenin 6-C- α -arabinopyranoside 8-C- β -glucopyranoside) (compound 6) was reported for the first time in wheat (Dinelli et al., 2011) and its presence was confirmed in the aerial parts of *Triticum aestivum* L. (Kowalska et al., 2014). Apigenin 6-C- β -xylopyranoside 8-C- β -glucopyranoside (compound 7) was reported for the first time in *Triticum durum* (Cavaliere et al., 2005) and its presence was confirmed in the aerial parts of *Triticum aestivum* L. (Kowalska et al., 2014).

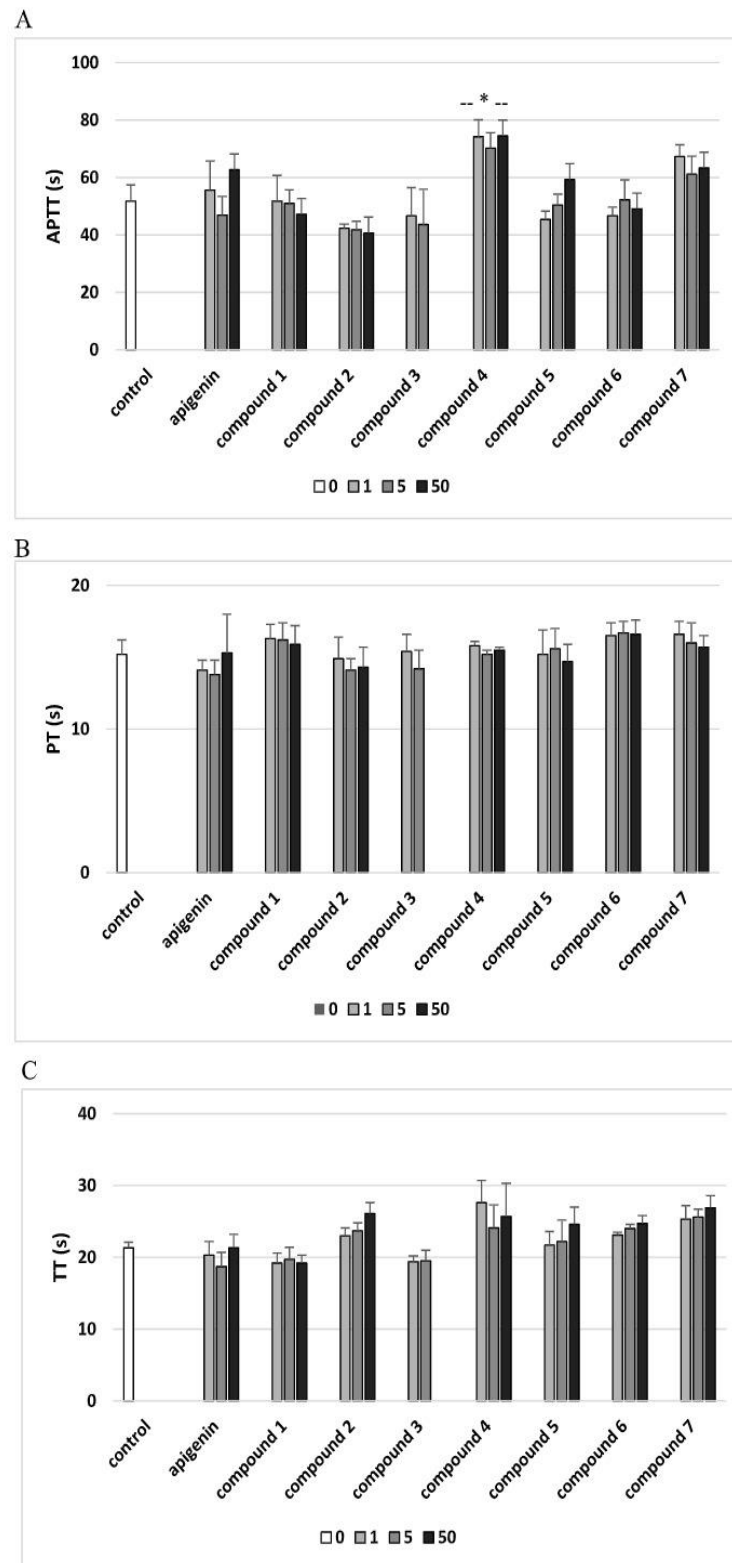


Fig. 5. The effects of apigenin and seven of its derivatives (compounds 1-7) on the coagulation activity of human plasma (APTT (A), PT (B) and TT (C)). Data represent mean \pm S.E. of six healthy volunteers. * $p < 0.05$ (vs. control positive), ** $p < 0.01$ (vs. control positive), # $p < 0.05$ (between control negative and control positive).

Table 1
A comparison of the effects of apigenin and its derivatives (compounds 1–7) (tested concentration of 5 µg/mL) on biomarkers of oxidative stress in plasma treated with H₂O₂/Fe and coagulation.

Compound	Biomarkers of oxidative stress			Parameter of coagulation	
	Inhibition of lipid peroxidation	Inhibition of protein carbonylation	Inhibition of thiol oxidation	APTT	
Apigenin	No effect	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	
Compound 1	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	
Compound 2	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	No effect	
Compound 3	No effect	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	No effect	
Compound 4	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (anticoagulant potential)	
Compound 5	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	No effect	No effect	
Compound 6	No effect	No effect	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	
Compound 7	Positive effect (antioxidative potential)	Positive effect (antioxidative potential)	No effect	No effect	

2.2.1. Isolation, purification and identification of barrel medic (*Medicago truncatula* Geatr.) apigenin derivatives

M. truncatula seeds (variety A17 Jemalong) were obtained from Dr. XianZhi He, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore. The plants were cultivated in an experimental field of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Pulawy, Poland. The aerial parts were harvested at the beginning of flowering, and then frozen, lyophilized, finely powdered and used for extraction.

The apigenin derivatives (compounds 1–5) were isolated according to previously-developed procedures for barrel medic (Kowalska et al., 2007). Briefly, the crude extract was applied to a 6 cm × 10 cm, 40–63 µm LiChroprep RP-18 (Merck, Warsaw, Poland) preparative column. The phenolic fraction was eluted with 40% MeOH, and the compounds were then purified on a 2 cm × 50 cm, 40–63 µm RP-18 glass column using an isocratic system (MeCN-1% H₃PO₄). The resulting five individual compounds (1–5) showed absorption spectra characteristic of apigenin glycosides. Their structures were established by spectrometric and spectroscopic (ESI-MS/MS and NMR) techniques. Mass spectra and NMR data have been described previously: compound 1 – Yoshida et al. (1993); compound 2 – Stochmal et al. (2001); compounds 3–5 – Kowalska et al. (2007).

2.2.2. Isolation, purification and identification of wheat (*Triticum aestivum* L.) apigenin derivatives

Triticum aestivum L. seeds (variety Legenda) were obtained from Genebank, Zentralinstitute für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (Gatersleben, Germany). The plants were cultivated in an experimental field of the Department of Systems and Economics of Crop Production, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute in Pulawy, Poland. The aerial parts were harvested at flag leaf sheath opening, i.e. BBCH stage 47; they were then frozen, lyophilized, finely powdered and subjected to extraction.

The two apigenin derivatives (compounds 6 and 7) were isolated according to Kowalska et al. (2014). Briefly, the aerial parts were defatted with chloroform and their content extracted with 70% methanol. The crude extract was fractionated using vacuum liquid chromatography. The fraction washed out with 40% MeOH was loaded onto a preparative column (4 cm × 50 cm, 40–63 µm LiChroprep RP-18, Merck, Darmstadt, Germany). The obtained compounds were then further purified on a C18 glass column (2 cm × 50 cm, 25–40 µm, Merck, Darmstadt, Germany) using an isocratic system (methanol/1% H₃PO₄). Two pure apigenin derivatives were isolated.

The masses of the purified compounds were determined by direct infusion electrospray high resolution (Q-TOF) mass spectrometry (HRESI-MS), using a SYNAPT G2-S HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). NMR spectra were acquired in 650 µL of tetra-deuteriomethanol (MeOH-d₄) at 25 °C or dimethyl sulfoxide-d₆ (DMSO-d₆) at 70 °C on a Bruker Avance III HD 500 MHz instrument (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) (Kowalska et al., 2014). Detailed mass spectra and NMR data for compound 6 are given in Dinelli et al. (2011) and for compound 7 in Cavaliere et al. (2005).

2.3. Stock solutions

Stock solutions of apigenin and its derivatives (compounds 1–7) were prepared in 50% DMSO for biological activity testing. The final concentration of DMSO in these solutions was lower than 0.05%, and its effects were determined in all experiments.

2.4. Human plasma isolation

Human blood or plasma were obtained from six non-smoking men and women who were regular donors of a blood bank (Lodz, Poland) and a Medical Center (Lodz, Poland). The blood samples were collected into CPD solution (citrate/phosphate/dextrose; 9:1; v/v blood/CPD) or

CPDA solution (citrate/phosphate/dextrose/adenine; 8.5:1; v/v; blood/CPDA). None of the donors had taken any medication, any addictive substances such as tobacco or alcohol, or any antioxidant supplementation. The analysis was performed according to the guidelines of the Helsinki Declaration for Human Research, and approved by the Committee on the Ethics of Research in Human Experimentation, University of Lodz (resolution No. 7/KBBN-UŁ/III/2018).

The blood plasma was isolated by differential centrifugation as described earlier (Lis et al., 2018). The plasma samples were divided into two groups. The first was incubated with apigenin or its derivatives (compounds 1–7) at final concentrations of 1–50 µg/mL (30 min, 37 °C; for hemostatic parameters). The second group was pre-incubated with apigenin or its derivatives (compounds 1–7) at final concentrations of 1–50 µg/mL (five minutes, 37 °C; for parameters of oxidative stress), and then treated with 4.7 mM H₂O₂/3.8 mM Fe₂SO₄/2.5 mM EDTA (25 min at 37 °C).

The protein concentration of the tested samples was determined by measuring the absorbance at 280 nm as described by Whitaker and Granum (1980).

2.5. Biomarkers of oxidative stress

2.5.1. Plasma lipid peroxidation measurement

Plasma lipid peroxidation was quantified by measuring TBARS concentration. TBARS concentration was calculated using the molar extinction coefficient ($\epsilon = 156,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as described previously (Wachowicz, 1984; Olas et al., 2018).

2.5.2. Carbonyl group measurement

The level of carbonyl groups in plasma proteins was determined according to Levine et al. (1990), Bartosz (2008) and Olas et al. (2018).

2.5.3. Thiol group determination

The thiol group content in plasma proteins was determined by measuring the absorbance at 412 nm with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) in a SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG LABTECH, Germany). The method is described in more detail elsewhere (Ando and Steiner, 1973a,b; Bartosz, 2008; Olas et al., 2018).

2.6. Parameters of coagulation

The prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) were determined coagulometrically using a model K-3002 Optic Coagulation Analyser (Kselmed, Grudziadz, Poland), according to Malinowska et al. (2012).

2.7. Data analysis

Several tests were used to carry out statistical analysis. In order to eliminate uncertain data, the Q-Dixon test was performed. All values are expressed as mean \pm S.E. The obtained results were tested with the Shapiro-Wilk test to confirm normality and Levene's test for equality of variance. Statistically significant differences were identified by applying the ANOVA test; p-values below 0.05 were regarded as significant. This was followed by Tukey's multiple comparisons test or the Kruskal-Wallis test.

3. Results and discussion

Oxidative stress induces changes in the structure and function of plasma and other hemostatic elements, and is often associated with the presence of cardiovascular disease (Nowak et al., 2010). Phenolic compounds, *inter alia* flavonoids, offer effective protection against damage related to oxidative stress and sometimes confer anticoagulant benefits. Although some papers describe the biological actions of apigenin, including its effects on oxidative stress (Bian et al., 2017), no

papers have examined the effects of apigenin on the components of hemostasis, for example human plasma. Therefore, the present study examines the effect of apigenin and seven of its derivatives on the coagulation process and oxidative stress in plasma treated with H₂O₂/Fe *in vitro*.

Following separation by low-pressure liquid chromatography and purification on a semipreparative C18 column, two individual apigenin derivatives were isolated from the methanolic *T. aestivum* extracts. These were identified on the basis of their ESI-MS/MS and NMR analyses as isoschaftoside (apigenin 6-C- α -arabinopyranoside 8-C- β -glucopyranoside – compound 6) and apigenin 6-C- β -xylopyranoside 8-C- β -glucopyranoside (compound 7) (Fig. 1B) (Cavaliere et al., 2005; Dinelli et al., 2011); the two compounds differ with regard to the type of sugar substituted in the 6C position. The most common type of flavonoid found in *T. aestivum* and other grasses are flavones, particularly the C-glycosyl-flavones (Zagoskina et al., 2005). Olenichenko et al. (2006) identified the presence of fifteen phenolic compounds in *T. aestivum*; most of which (90%) were flavonoids such as C-glycosides of two flavones (apigenin and luteolin) and their O-derivatives.

Five other apigenin derivatives were identified in the aerial parts of barrel medic (Fig. 1A), all of which gave a peak characteristic for apigenin at m/z 269 for ESI-MS/MS. The spectroscopic analysis identified two uronic acid units attached to the apigenin of 7-O-[β -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside] apigenin; two uronic acid units attached to the apigenin of 7-O-[2'-O-sinapoyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside] apigenin, with acylation of the sugar chain with sinapic acid; three uronic acid units attached to the apigenin of 7-O-{2-O-feruloyl-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside}, with acylation by ferulic acid; two uronic acid units attached to the apigenin of 7-O-{2'-O-feruloyl-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranoside}; acylation with ferulic acid and six carbons characteristic of a glucose unit; three uronic acid units attached to the apigenin of 7-O-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopyranoside].

A study of apigenin derivatives isolated from wheat, with rutin as a standard, identified weak antioxidant properties for isoschaftoside (apigenin 6-C- α -arabinopyranoside 8-C- β -glucopyranoside) but not for apigenin 6-C- β -xylopyranoside 8-C- β -glucopyranoside (Kowalska et al., 2014). The study was based on thin-layer chromatography-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical testing (TLC-DPPH) with image processing.

In addition, the concentrations of the phenolic compounds ($\leq 50 \mu\text{g/mL}$) tested in the present *in vitro* study with human plasma, these being apigenin and its derivatives, correspond with the physiological concentrations of phenolic compounds available after oral administration (Manach et al., 2004, 2005). Of the seven tested derivatives of apigenin, four (compounds 1, 2, 4 and 7) reduced plasma lipid peroxidation induced by H₂O₂/Fe at all tested concentrations (1–50 µg/mL); for example, when applied at the highest concentration (50 µg/mL), compound 7 significantly inhibited this process by about 40% compared to the positive control (Fig. 2). The remaining three derivatives (compounds 3, 5 and 6) also inhibited lipid peroxidation; however, these changes were not statistically significant (Fig. 1).

Plasma protein carbonylation induced by H₂O₂/Fe was significantly inhibited by apigenin and derivatives 1, 2, 3, 4 and 7 at all used concentrations. The greatest inhibitory effects, about 50% reduction compared to positive controls, were observed for the highest concentration, i.e. 50 µg/mL (Fig. 3). In contrast, compound 6 did not appear to have any effect on the level of carbonyl groups in the treated human plasma at any tested concentration (1, 5 or 50 µg/mL) (Fig. 3). In this *in vitro* model, only apigenin and derivatives 1 and 4, at all used concentrations, increased the levels of thiol groups (Fig. 4).

Neither apigenin nor any of the tested seven derivatives were found to influence the PT or the TT of human plasma at any of the tested

concentrations (1–50 µg/mL). In addition, only compound 4 (1–50 µg/mL) changed the APTT level (Fig. 5).

Table 1 compares the *in vitro* antioxidant and anticoagulant potential apigenin with those of its seven derivatives at a concentration of 5 µg/mL. Of these, compound 4, an acylated derivative with ferulic acid and a glucose unit, not only demonstrated the greatest antioxidant potential, as indicated by TBARS, carbonyl group and thiol group assays, but also displayed anticoagulant potential. Kanski et al. (2002) found the presence of ferulic acid to greatly reduce free radical damage in neuronal cell systems, and that ferulic acid significantly eases peroxyl- and hydroxyl radical-induced oxidative stress in synaptosomal membrane systems to a greater degree than cinnamic, coumaric and vanillic acids.

Compound 2, a derivative acylated with sinapic acid, was found to inhibit lipid peroxidation and protein carbonylation. Sinapic acid is known to demonstrate peroxynitrite scavenging activity and can play a role in cellular defense against diseases involving free radicals (Niwa et al., 1999; Zou et al., 2002), and has also been found to strongly inhibit the formation of 3-nitrotyrosine in proteins (Niwa et al., 1999). Compound 1 only demonstrated antioxidant potential. While compounds 1, 2, 4, 5 and 7 inhibit lipid peroxidation, apigenin itself does not, as indicated by our present findings based on biomarkers of oxidative stress and coagulation in plasma.

The present work is the first to characterize the influence of apigenin and seven of its derivatives on the oxidative stress and coagulation process *in vitro*; the results indicate that the tested phenolic compounds have different influences on these processes which may be attributed to differences in their chemical structure. Of the tested compounds, the most promise may be offered by compound 4, i.e. 7-O- $\{2'$ -O-feruloyl- $\}[\beta$ -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranoside); it was found to exert both antioxidant and anticoagulant activities which play beneficial roles in the prevention and treatment of cardiovascular disorders.

Funding sources

This work was supported by the National Science Center in Poland (project no. 2011/01/D/NZ9/04684).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We would like to offer our special thanks to Anna Król (student, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz) for skilled technical assistance, Łukasz Pecio MSc (Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, Pulawy) for performing NMR analyses and Krzysztof Jończyk PhD (Department of Systems and Economics of Crop Production, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, Pulawy) for providing wheat plant material.

References

- Ando, Y., Steiner, M., 1973a. Sulfhydryl and disulfide groups of platelet membranes I. Determination of sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 26–37.
- Ando, Y., Steiner, M., 1973b. Sulfhydryl and disulfide groups of platelet membranes II. Determination of disulfide groups. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 38–44.
- Aparicio, S., 2010. A systematic computational study on flavonoids. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2017–2038.
- Bak, M.J., Gupta, S.D., Wahler, J., Suh, N., 2016. Role of dietary bioactive natural products in estrogen receptor-positive breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 40–41, 170–191.
- Banerjee, K., Mandal, M., 2015. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. *Redox Biol.* 5, 153–162.
- Bao, Y.Y., Zhou, S.H., Fan, J., Wang, Q.Y., 2013. Anticancer mechanism of apigenin and the implications of GLUT-1 expression in head and neck cancers. *Future Oncol.* 9, 1353–1364.
- Bartosz, G., 2008. *Druga Twarz Tlenu*. PWN, Warszawa, pp. 99–120 1.7.
- Bian, M., Zhang, Y., Du, X., Xu, J., Cui, J., Gu, J., Zhu, W., Zhang, T., Chen, Y., 2017. Apigenin-7-digluconide protects retinas against bright light-induced photoreceptor degeneration through the inhibition of retinal oxidative stress and inflammation. *Brain Res.* 1663, 141–150.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774–2779.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A., 2005. Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3143–3158.
- Cook, D.R., 1999. *Medicago truncatula* - a model in the making!. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 301–304.
- Craig, W.J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 491S–499S.
- Dinelli, G., Carretero, A.S., Di Silvestro, R., Marotti, L., Fu, S., Benedettelli, S., Ghiselli, L., Gutierrez, A.F., 2009. Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 7229–7240.
- Dinelli, G., Segura-Carretero, A., Di Silvestro, A., Marotti, L., Arráz-Román, D., Benedettelli, S., Ghiselli, L., Fernandez-Gutierrez, A., 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 7670–7681.
- Djemel, N., Guedon, D., Lechevalier, A., Salon, C., Miquel, M., Proserpi, J.M., Rochat, C., Boutin, J.P., 2005. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 557–566.
- Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2001. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 914–920.
- Haig, T., 2001. Application of hyphenated chromatography-mass spectrometry techniques to plant allelopathy research. *J. Chem. Ecol.* 27, 2363–2396.
- Hu, X.Y., Liang, J.Y., Guo, X.J., Liu, L., Guo, Y.B., 2014. 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi^m$)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 146–153.
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D.A., 2002. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxyl radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: structure-activity studies. *J. Nutr. Biochem.* 13, 273–281.
- Kapusta, I., Janda, B., Stochmal, A., Oleszek, W., 2005. Determination of saponins in aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula*) by liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7654–7660.
- Kapusta, I., Stochmal, A., Perrone, A., Piacente, S., Pizzi, C., Oleszek, W., 2005. Triterpene saponins from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2164–2170.
- Kaur, P., Shukla, S., Gupta, S., 2008. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an *in vitro* and *in vivo* study. *Carcinogenesis* 29, 2210–2217.
- Kowalska, I., Jedrejek, D., Jończyk, K., Stochmal, A., 2019. UPLC-PDA-ESI-MS analysis and TLC-DPPH- activity of wheat varieties. *Acta Chromatogr.* <https://doi.org/10.1556/1326.2017.00416>.
- Kowalska, I., Kowalczyk, M., 2019. Determination of benzoxazinoids in spring and winter varieties of wheat using ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Acta Chromatogr.* <https://doi.org/10.1556/1326.2018.00418>.
- Kowalska, I., Pecio, L., Cieśla, L., Oleszek, W., Stochmal, A., 2014. Isolation, chemical characterization, and free radical scavenging activity of phenolics from *Triticum aestivum* L. aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11200–11208.
- Kowalska, I., Stochmal, A., Kapusta, I., Janda, B., Pizzi, C., Piacente, S., Oleszek, W., 2007. Flavonoids from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2645–2652.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Lis, B., Jedrejek, D., Stochmal, A., Olas, B., 2018. Assessment of effects of phenolic fractions from leaves and petals of dandelion in selected components of hemostasis. *Food Res. Int.* 107, 605–612.
- Liu, Q., Qiu, Y., Beta, T., 2010. Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9235–9241.
- Malinowska, J., Kołodziejczyk-Czepas, J., Moniuszko-Szajwaj, B., Kowalska, I., Oleszek, W., Stochmal, A., Olas, B., 2012. Phenolic fractions from *Trifolium pallidum* and *Trifolium scabrum* aerial parts in human plasma protect against changes induced by hyperhomocysteinemia. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4023–4027.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remsey, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remsey, C., 2005. Bioavailability and bioactivity of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230–242.

- Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., Osawa, T., 1999. Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein *in vitro*. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 459, 43–46.
- Nowak, P., Olas, B., Wachowicz, B., 2010. Oxidative stress and haemostasis. Postep. Biochem. 56, 239–247.
- Olas, B., Zuchowski, J., Lis, B., Skalski, B., Kontek, B., Grabarczyk, L., Stochmal, A., 2018. Comparative chemical composition, antioxidant and anticoagulant properties of phenolic fraction (a rich in non-acylated and acylated flavonoids and non-polar compounds) and non-polar fraction from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson fruits. Food Chem. 247, 39–45.
- Olech, M., Komsta, L., Nowak, R., Cieśla, Ł., Waksmundzka-Hajnos, M., 2012. Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. Food Chem. 132, 549–553.
- Olenichenko, N.A., Ossipov, V.I., Zagorskina, N.V., 2006. Effect of cold hardening on the phenolic complex of winter wheat leaves. Russ. J. Plant Physiol. 53, 495–500.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20, 933–956.
- Shukla, S., Gupta, S., 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. Pharm. Res. 27, 962–978.
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizzi, C., De Riccardis, F., Leitz, R., Oleszek, W., 2001. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. I. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. J. Agric. Food Chem. 49, 753–758.
- Trouillas, P., Fagnère, C., Lazzaroni, R., Calliste, C., Marfak, A., Duroux, J.L., 2004. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. Food Chem. 88, 571–582.
- Wachowicz, B., 1984. Adenine nucleotides in thrombocytes of birds. Cell Biochem. Funct. 2, 167–170.
- Whitaker, J.R., Granum, P.E., 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. Anal. Biochem. 109, 156–159.
- Yoshida, K., Kameda, K., Kondo, T., 1993. Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*. Phytochemistry 33, 917–919.
- Zagorskina, N.V., Olenichenko, N.A., Iunvėi, Ch, Zhivukhina, E.A., 2005. Formation of phenol compounds in various cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Priklad Biokhim. Mikrobiol. 41, 113–116.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Chen, Y.M., Li, H.B., 2016. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. Nutrients 8, 515.
- Zhu, Y., Wu, J., Li, S., Wang, X., Liang, Z., Xu, X., Xu, X., Hu, Z., Lin, Y., Chen, H., et al., 2015. Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. Mol. Med. Rep. 11, 1004–1008.
- Zou, Y., Kim, A.R., Kim, J.E., Choi, J.S., Chung, H.Y., 2002. Peroxynitrite scavenging ability of sinapic acid isolated from *Brassica juncea*. J. Agric. Food Chem. 50, 5884–5890.

Résumés

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Medicago truncatula*, appartenant à la famille des *Fabaceae* ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des parties aériennes de la plante.

Cette espèce est étroitement apparentée à une importante légumineuse fourragère qui constitue des cultures destinées à l'alimentation animale et la nutrition humaine. *M. Truncatula* possède plusieurs intérêts : intérêt phytochimique, thérapeutique, génétique, écologique et agronomique. L'ensemble de toutes ces caractéristiques font *M. truncatula* une excellente plante modèle. En plus de sa valeur en tant que système modèle pour les études sur la fixation symbiotique de l'azote, *M. truncatula* est récemment devenue un organisme de choix pour la dissection de voies complexes du métabolisme secondaire.

Deux classes de métabolites secondaires produits par *M. truncatula* présentent un intérêt particulier. Le premier est celui des saponines triterpéniques ; les seconds sont divers flavones. Ces composés ont été démontré des propriétés antioxydantes et bénéfiques pour la santé.

Les polyphénols végétaux constituent le plus grand groupe d'antioxydants. Les données scientifiques indiquent que les polyphénols sont puissants piègeurs de radicaux libres qui peuvent agir comme réducteurs ou singulet des extincteurs à oxygène. Parmi ceux-ci les composés flavonoïdes ont fait l'objet de recherches les plus approfondies pour l'identification des structures chargées et l'amélioration des propriétés antioxydantes.

Mots clés : activité antioxydante, *Medicago truncatula*, flavonoïdes, saponines, phytochimie, stress oxydant.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical study of the *Medicago truncatula* species, belonging to the Fabaceae family, as well as the evaluation of the antioxidant activity of the aerial parts of the plant.

This species is closely related to an important forage legume which constitutes crops for animal feed and human nutrition. *M. Truncatula* has several interests: phytochemical, therapeutic, genetic, ecological and agronomic interest. All these characteristics together make *M. truncatula* an excellent model plant. In addition to its value as a model system for fixation studies A nitrogen symbiotic, *M. truncatula* has recently become an organism of choice for the dissection of complex secondary metabolic pathways. Two classes of secondary metabolites produced by *M. truncatula* are of particular interest. The first is that of triterpene saponins ; the second are various flavones.

These compounds have been shown to have antioxidant and health benefits. The largest group of antioxidants are plant polyphenols. Scientific evidence indicates that polyphenols are potent free radical scavengers which can act as reducers or singlet of oxygen extinguishers. Of these the flavonoid compounds have been the subject of the most extensive research for the identification of charged structures and the enhancement of antioxidant properties.

Key words : antioxidant activity, *Medicago truncatula*, flavonoids, saponins, phytochemistry, oxidative stress.

ملخص

هذا العمل مخصص للدراسة الكيميائية النباتية لأنواع *Medicago truncatula*، التي تنتمي إلى عائلة *Fabaceae*، وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة للأجزاء الهوائية من النبات.

يرتبط هذا النوع ارتباطاً وثيقاً ببقوليات علفية مهمة تشكل محاصيل لتغذية الحيوانات وتغذية الإنسان. لدى *M. Truncatula* العديد من الاهتمامات: الكيمياء النباتية، العلاجية، الوراثة، البيئية، الفائدة الزراعية، كل هذه الخصائص مجتمعة تجعل *M. truncatula* نموذجاً ممتازاً للنباتات بالإضافة إلى قيمتها كنظام نمذجي لدراسات التثبيت تكافلي النيتروجين، أصبح *M. truncatula* مؤخرًا كائنًا مفضلًا لتشريح مسارات التمثيل الغذائي الثانوية المعقدة.

هناك فئتان من المستقلبات الثانوية التي تنتجها *M. truncatula* ذات أهمية خاصة. الأول هو صابونين تراينيريبيين. والثاني أنواع مختلفة من الفلافون. وقد ثبت أن هذه المركبات لها فوائد صحية ومضادة للأكسدة.

أكبر مجموعة من مضادات الأكسدة هي البوليفينول النباتي. تشير الدلائل العلمية إلى أن البوليفينول عبارة عن مواد قمامة قوية للجذور الحرة والتي يمكن أن تعمل كمخفضات أو مفردة لطفائيات الأكسجين. من بين هذه المركبات كانت مركبات الفلافونويد موضوعاً للبحث الأكثر شمولاً لتحديد الهياكل المشحونة وتعزيز خصائص مضادات الأكسدة.

الكلمات الرئيسية: نشاط مضادات الأكسدة، *M. truncatula*، الفلافونويد، الصابونين، الكيمياء النباتية، الإجهاد التأكسدي.

