

Université Ferhat Abbas – Setif 1  
Faculte Des Sciences De La  
Nature Et De La Vie



جامعة فرحات عباس 1  
سطيف  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie et Physiologie Animale

N° ..... /SNV/2024

**THESE**

Présentée par

**BELLEBCIR Leila**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Filière : **BIOLOGIE**

Spécialité : **PHYSIOLOGIE ANIMALE**

**THÈME**

**Etude phytochimique, pharmaco-toxicologique des extraits  
flavonoïdiques De l'*Astragalus gombo* Coss & Dur Ex Bunge**

Soutenue publiquement le ...../...../.....

Devant le Jury :

President

**KHENNOUF Seddik**

**Pr. UFA Sétif 1**

Directeur

**ABIDLI Nacira**

**Pr. ENS Alger**

Examineurs

**DAHAMNA Saliha**

**Pr. UFA Sétif 1**

**REBAI Redouane**

**MCA. UMK Biskra**

**DEGHIMA Amirouche**

**MCA. UMK Biskra**

Laboratoire de Génétique, Biotechnologie et Valorisation de Bio-ressources (LGBVB)

2023/2024

## Remerciements

### الحمد لله الذي بنعمته تم الصالحات

Avant tout, je tiens à exprimer ma gratitude à DIEU, le Tout-Puissant, pour m'avoir donné le courage, la patience et la persévérance de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Madame le Professeur ABIDLI Nacira, qui a accepté de me prendre en charge et m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés pour parfaire ce travail, ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa patience, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche.

Merci tout d'abord aux membres de jury et qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr KHENNOUF Seddik, Professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif I, pour avoir accepté de diriger le jury de soutenance.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Madame le Professeur DAHAMNA Saliha pour ses précieux conseils et son aide, ainsi que pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury, Dr Deghima et Dr Rebai, maîtres de conférences à l'Université de Biskra, pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères et ma profonde gratitude vont tout particulièrement au Professeur NASRI Moncef pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie (LGEM) à l'Institut Supérieur des Biotechnologies de Sfax (ISBS). Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour ses précieux conseils. Je remercie également tous les membres de son équipe, en particulier le Dr HAJJI Mohamed, le Dr BEKHAIRIA Intidhar et l'ingénieur AYAD Djihan.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux Drs MOUADA A et Mansar R. du Laboratoire d'Anapathologie, ainsi qu'à tous les techniciens, en particulier le chef de service Benabdallah Nadjet, du laboratoire de biochimie de l'hôpital d'obstétrique, de gynécologie et de pédiatrie de Biskra, pour leur aide inestimable dans la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Je remercie également le Dr Khelil, médecin responsable du laboratoire de biochimie de l'hôpital public Hakim Saadane de Biskra. Je le remercie d'avoir assuré la réalisation de tous les tests biologiques et d'avoir facilité le contact avec les donneurs de sang et les volontaires.

Je tiens à exprimer ma pleine gratitude au Deghiche-Diab Nacima (MRA) Chercheur en Bioressources et Protection des Plantes au Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA) ; pour l'identification des plantes, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur soutien, surtout dans les moments difficiles de la thèse.

Je voudrais exprimer ma sincère gratitude à mes parents pour leurs prières, leurs soutiens et leurs appréciations. Merci mes frères et sœurs.

Enfin, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude à mon mari, "Fateh", qui est toujours à mes côtés, me soutenant et me motivant. Surtout dans les moments difficiles. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude, pleine d'amour et de douceur, à mes anges « IYAD, ISHAK et YAKOUB, que Dieu les préserve.

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## الملخص

تعتبر نبتة *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge من النباتات المستوطنة في المناطق القاحلة وشبه القاحلة في الجزائر. ويستخدمه السكان المحليون عادة في الطب التقليدي للسعات الثعابين والعقارب لهذا السبب كان اهتمامنا بدراسة الفيلة (هو تصغير لكلمة فول نسبة الى جرابه التي تشبه جراب الفول)، لوجود منتجات فعالة تعمل ضد التسمم؛ الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على إمكانات مضادات الأكسدة لهذا النوع في المختبر، وبالتالي استكشاف ومقارنة الأنشطة البيولوجية للأجزاء المحضرة في المختبر، مثل النشاط المضاد للتخثر والنشاط المضاد للتكاثر (اختبار الجدوى MTT)، وكذلك لتقييم التأثير الفرماكولوجي (الصيدلاني) واستغلال قوتها المضادة للأكسدة الفعالة في تحفيز الجهاز الشبكي البطاني (SRE) وضد السمية الكبدية التي يسببها الدوكسوروبيسين في الجسم الحي في الفئران.

حيث تم في هذه الدراسة، الحصول على المستخلصات العضوية للجزء الهوائي باستخدام النقع في مزيج من الميثانول/الماء بنسبة 20/80 ومستخلص آخر باستخدام النقع في الماء فقط AQAg. كما تم استخدام الميثانول، والبيوتانول، وأسيئات الإيثيل لتجزئة المستخلص الخام الأول بالتجزئة السائلة - السائلة. وقد اعتمدنا على عدة تقنيات منها التحليل بطرق القياس الطيفي والكروماتوجرافي LC-ESI-MS، وتم احصاء 25 مركبا نشطا بيولوجيا في جميع المستخلصات معظمها عبارة عن فلافونويدات وأحماض هيدروكسي سيناميك. الى جانب استخدام عدة طرق في المختبر وداخل الجسم الحي وخارجه لتقييم نشاط مضاد الأكسدة، فأظهر المستخلص AEAg أفضل قدرة اختزال في جميع الاختبارات المنجزة، يليه جزء NBAG. تم تقييم النشاط البلعمي بتقنية اختبار إزالة الكربون واختباران للتخثر (TQ) و (TP). اشارت نتائج اختبار نشاط البلعمة في الدراسة الحالية إلى أن كلا الجزأين (AEAg و NBAG) يعززان نشاط البلعمة عن طريق تحفيز الجهاز الشبكي البطاني (SRE) بطريقة تعتمد على الجرعة، حيث أن جزء أسيئات الإيثيل يعزز الجهاز بشكل أفضل من n- البيوتانول. كما أظهرت نتائج اختبار نشاط مضاد التخثر أنه يمكن تنشيط سلسلة التخثر بواسطة AQAg و NBAG و AEAg. عند اختبار جزء AEAg للتأكد من السمية الخلوية (MTT) ضد خلايا Mcf7 و HeLa السرطانية، اثبت انه يمتلك تأثيرا معتبرا مازادا للسرطان بتركيز مثبط عند  $108,8 \pm 1,8$  et  $168,4 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ ،  $\text{Cl}_{50}$ ، على التوالي، كما أشارت النتائج إلى أن الخلايا السرطانية أكثر حساسية للمستخلص AEAg من الخلايا السليمة لخلايا الكبد الطبيعية للفأر (AmI12). ونتيجة لذلك، أظهر AEAg مؤشر انتقائية كبير (SI) لخلايا الكبد الطبيعية للفأر AmI12. اما تقنية الوسم المشترك DAPI / AO فكشفت عن تأثير مهم للمستخلص في موت الخلايا المبرمج بشكل كبير.

النتائج التي تم تحقيقها في المختبر *in vitro* شجعتنا كثيرا في اختبار الجزء AEAg اتجاه السمية الحادة وكذلك مدى التأثير الوقائي الكبدى لـ AEAg ضد السمية الكبدية الناجمة عن إعطاء جرعة الدكسوريسين (15 مجم / كجم من IP) داخل الصفاق للفئران من سلالة Balb/c حيث أنها تسببت في تسمم كبدى ملحوظ. وقد ظهر هذا الخلل في زيادة كبيرة جدا ( $p < 0.001$ ) في إنزيمات الكبد (ALT و AST) و LDH، وزيادة في MDA الكبدى يتبعها انخفاض كبير جدا ( $P < 0.001$ ) في مستويات الجلوتاثيون الكبدى وإنزيم CAT و GPx.

أثبتت الدراسة الحالية فعالية المستخلص AEAg في وقاية خلايا الكبد من هجمات الجذور الحرة الناجمة عن تحريض الدكسوريسين للفئران التي تتلقى علاج مسبق بالمستخلص اسيتات الايتيل في خفض أو القضاء على الإجهاد التاكسدي الحاد مما يمنع حدوث خلل في الكبد ويحافظ على حالة الأكسدة والاختزال المتوازنة في العصارة الخلوية وفي خلايا الكبد.

توصلت نتائج هذه الدراسة أن النوع النباتي من فصيلة البقوليات الفيلة، وخاصة المستخلص AEAg انه يتمتع بالقدرة على استخدامه كمصدر جديد للجزيئات النشطة بيولوجيا ذات خصائص منبهة للمناعة ومضادة لتكاثر الخلايا السرطانية، بالإضافة إلى كونها أحد مضادات الأكسدة الطبيعية.

الكلمات المفتاحية *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge: المركب الفينولي، تحليل LC-ESI-MS، مضادات الأكسدة، مضادات التخثر، البلعمة، اختبار MTT، موت الخلايا المبرمج، الدكسوريسين، التأثير الوقائي للكبد.

## **Abstract**

The arid and semi-arid regions of Algeria are home to the endemic species *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge, a plant widely utilized in traditional medicine for treating snake and scorpion stings. This study focused on the extraction of the plant's aerial part using an 80/20 methanol/water mixture and water (AQAg), subsequently fractionating the initial crude extract with methanol, n-butanol (NBAg), and ethyl acetate (AEAg). Analysis via LC-ESI-MS revealed that all fractions contained 25 compound, predominantly flavonoids and hydroxycinnamic acids. Remarkably, AEA g exhibited superior antioxidant activity compared to the positive control, BHA, demonstrating the highest reducing capacity across all conducted assays, closely followed by the NBA g fraction. Both AEA g and NBA g fractions notably increased phagocytic activity, augmenting the reticuloendothelial system. Additionally, these fractions displayed the capability to trigger the coagulation cascade in an anticoagulant activity test. Upon evaluating the AEA g fraction's cytotoxicity against HeLa and Mcf-7 cells, it became apparent that cancer cells displayed greater susceptibility to the fraction than healthy cells, indicating a significant selectivity index (SI) for Aml12 mice normal liver cells. Moreover, combined DAPI/AO staining revealed a pronounced apoptotic effect. Investigating AEA g's protective effects against doxorubicin-induced oxidative stress in Balb/c mice revealed that doxorubicin administration intraperitoneally (15 mg/kg i.p.) induced severe hepatotoxicity. This was evidenced by increased hepatic MDA levels, decreased hepatic reduced glutathione levels, reduced CAT and GPx enzyme activity, and a highly significant ( $p < 0.001$ ) rise in liver enzymes (ALAT and ASAT) and LDH. However, AEA g pretreatment protected mice from doxorubicin-induced ROS aggression in hepatocytes, averting liver malfunction and maintaining a balanced redox state within the cytosol and hepatocytes. In summary, this investigation highlights the potential of *A. gombo*, particularly the AEA g fraction, as a promising source of bioactive compounds with antioxidant, immunostimulant, and antiproliferative properties.

**Keywords:** *Astragalus gombo*, phenolic compound, LC-ESI-MS analysis, antioxidant, anticoagulant, phagocytic, MTT test, apoptosis, doxorubicin, hypato-toxicity.

## Résumé

Les régions arides et semi-arides de l'Algérie abritent l'espèce endémique *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge, une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les piqûres de serpents et de scorpions. Cette étude s'est concentrée sur l'extraction de la partie aérienne de la plante à l'aide d'un mélange méthanol/eau 80/20 et d'eau (AQAg), suivie du fractionnement de l'extrait brut initial avec du méthanol, du n-butanol (NBAg) et de l'acétate d'éthyle (AEAg). L'analyse par LC-ESI-MS a révélé que toutes les fractions contenaient 25 composés, principalement des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques.

Remarquablement, AEAg a présenté une activité antioxydante supérieure au témoin positif, le BHA, démontrant le plus fort pouvoir réducteur dans tous les tests réalisés, suivi de près par la fraction NBAg. Les fractions AEAg et NBAg ont notablement renforcé l'activité phagocytaire, augmentant le système réticuloendothélial. De plus, ces fractions ont montré la capacité de déclencher la cascade de coagulation dans un test d'activité anticoagulante.

Lors de l'évaluation de la cytotoxicité de la fraction AEAg contre les cellules HeLa et MCF-7, il est apparu que les cellules cancéreuses étaient plus sensibles à la fraction que les cellules saines, indiquant un indice de sélectivité significatif (IS) pour les cellules hépatiques normales de souris Aml12. De plus, la coloration combinée DAPI/AO a révélé un effet apoptotique prononcé. L'étude des effets protecteurs de l'AEAg contre le stress oxydant induit par la doxorubicine chez les souris Balb/c a révélé que l'administration intrapéritonéale de doxorubicine (15 mg/kg i.p.) entraînait une hépatotoxicité sévère. Cela s'est traduit par une augmentation des niveaux hépatiques de MDA, une diminution des niveaux hépatiques de glutathion réduit, une réduction de l'activité des enzymes CAT et GPx, et une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) des enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) et de la LDH. Cependant, le prétraitement à l'AEAg a protégé les souris de l'agression induite par la doxorubicine sur les hépatocytes, prévenant ainsi un dysfonctionnement hépatique et maintenant un état redox équilibré dans le cytosol et les hépatocytes. En résumé, cette étude met en lumière le potentiel d'*A. gombo*, en particulier de la fraction AEAg, en tant que source prometteuse de composés bioactifs aux propriétés antioxydantes, immunostimulantes, et antiprolifératives.

**Mots clé :** *Astragalus gombo*, composés phénoliques, analyse LC-ESI-MS, l'activité antioxydante, phagocytaire et anticoagulante, test MTT, apoptose, doxorubicine, hépatoprotecteur.

## Liste des Figures

Figure 1. Squelette générale des flavonoïdes selon la numérotation classique.....	14
Figure 2. Structures des squelettes des différentes classes des flavonoïdes. ....	15
Figure 3. Acides hydroxybenzoïques (Macheix <i>et al.</i> , 2006) .....	15
Figure 4. Acides hydroxycinnamiques. (Macheix <i>et al.</i> , 2006) .....	16
Figure 5. Schéma représentant les changements morphologiques induits lors de l'apoptose. (Hermetet, 2015) .....	23
Figure 6. La structure chimique de la doxorubicine.....	24
Figure 7. a : Touffes d' <i>A. gombo</i> ; b : Tiges des feuilles et des fleurs ; c : Gousses couvertes de poils fins et laineux. ....	29
Figure 8. Protocole d'extraction de flavonoïdes via : 1 par fractionnement des phases ; 2 : Extrait brut aqueux. ....	34
Figure 9. Principe chimique du teste MTT. ....	41
Figure 10. Schéma récapitulatif du protocole expérimental. ....	45
Figure 11. Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1µg/ml) pour le dosage des protéines. ....	49
Figure 12. (A): Courbe d'étalonnage du radical DPPH par le contrôle positif la quercétine, (B) : Pouvoir antioxydant réducteur du fer du BHA ; (C) : l'activité chélatrice envers le fer ferreux par rapport au contrôle positif l'EDTA. ....	66
Figure 13. Effet des fractions AEAg et NBAG sur l'activité phagocytaire de groupes de souris. ....	68
Figure 14. Effet des fractions AEAg et NBAG sur la demi-vie des particules de carbone colloïdale dans le sang des souris.....	70
Figure 15. Temps de prothrombine des extraits d' <i>A.gombo</i> . ....	73
Figure 16. Temps de céphaline Kaolin des extraits d' <i>A.gombo</i> . ....	74
Figure 17. Effet cytotoxique de la fraction AEAg à différentes concentrations sur les lignées cellulaires cancéreuses. ....	77
Figure 18. Apoptose induite par la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>Astragalus gombo</i> dans les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et du col de l'utérus (Hela).. ....	83
Figure 19. Apoptose induite par la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>Astragalus gombo</i> dans les cellules hépatiques de souris normales.....	84
Figure 20. Évolution du poids corporel des souris mâles Balb/c traitées par la fraction AEAg de la partie aérienne <i>A. gombo</i> . ....	89
Figure 21. Variation de l'activité enzymatique des transaminases ALAT (UI/L). ....	90
Figure 22. Variation de l'activité enzymatique des transaminases ASAT (UI/L). ....	91
Figure 23. Variation de l'activité enzymatique des transaminases LDH (UI/L).....	92
Figure 24. Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>A. gombo</i> . 250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique, le taux de malondialdéhyde (MDA). ....	94
Figure 25. Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>A. gombo</i> (AEAg) 250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique, le taux de glutathion réduit (GSH) (nmol GSH/mg prot). ....	95
Figure 26. Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>A. gombo</i> (AEAg) 250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique. (A) : Glutathion peroxydase (GPx). (B) Activité de catalase (CAT).....	98
Figure 27. (A) : Coupe histologique du foie groupe témoin ; (B) groupe traité par AEAg ( 250 mg/kg p.c) pendant 15 jours: ....	101
Figure 28. Coupe histologique du foie groupe traité par DOX. ....	103
Figure 29. Coupe histologique du foie groupe co-traité (DOX/AEAg). ....	105

## Liste des Tableaux

Tableau 1. Certaines pathologies liées au stress oxydatif .....	8
Tableau 2. Classification botanique de l'espèce <i>Astragalus gombo</i> Coss et Dur EX Bunge. ....	29
Tableau 3. Travaux antérieurs, activités pharmacologiques sur le genre <i>Astragalus</i> . ....	31
Tableau 4. Répartition des groupes des souris selon les doses injectées des fractions préparées. ....	39
Tableau 5. Rendement de l'Extrait aqueux AQAg et de différentes fractions de l' <i>Astragalus gombo</i> . ....	54
Tableau 6. Rendements, teneurs des polyphénols. ....	56
Tableau 7. Identification des acides phénoliques dans les fractions méthanolique, l'acétate d'éthyle et de n-butanol d' <i>A. gombo</i> par analyse LC-ESI-MS. ....	59
Tableau 8. Identification des flavonoïdes dans les fractions méthanolique, l'acétate d'éthyle et de n-butanol d' <i>A. gombo</i> par analyse LC-ESI-MS. ....	61
Tableau 9. Propriétés antioxydantes des extraits /fractions de la partie aérienne d' <i>A. gombo</i> . ....	62
Tableau 10. Coefficient de corrélation de Pearson entre les teneurs en composés phénoliques dans divers extraits et leurs IC50 correspondants pour les activités antioxydantes. ....	65
Tableau 11. Cytotoxicité et indice de sélectivité de la fraction acétate d'éthyle. ....	79



## Liste des abréviations

<b>AEAg</b>	Acétate d'éthyle <i>A.gombo</i>
<b>ALAT</b>	Alanine aminotransférase
<b>AML12</b>	Les cellules hépatiques de souris normales
<b>AO</b>	Acridine orange
<b>AQAg</b>	Aqueux <i>A.gombo</i>
<b>ASAT</b>	Aspartate aminotransférase
<b>BCL2 (Bax)</b>	protéine pro-apoptotique
<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé
<b>caspase</b>	Protéase spécifique de l'aspartate de cystéine
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCIF</b>	capacité chélatrice des ions ferreux
<b>CI50</b>	Concentration inhibitrice de 50 % d'activité
<b>(Cyt C)</b>	cytochrome C
<b>(CYP 450)</b>	cytochrome P450
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole, hydrochloride
<b>d'IFN</b>	interféron gamma
<b>d'IL-12</b>	L'interleukine
<b>d'IL-2</b>	L'interleukine
<b>DPPH</b>	2,2-Diphenyl-1 picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
<b>EROs</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>Fas</b>	Ligand Fas
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>Gpx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion (forme réduite)
<b>GSSH</b>	Glutathion (forme oxydée)
<b>HeLa</b>	Les cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>IS</b>	Indice de selectivité
<b>LC-ESI-MS</b>	chromatographique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse

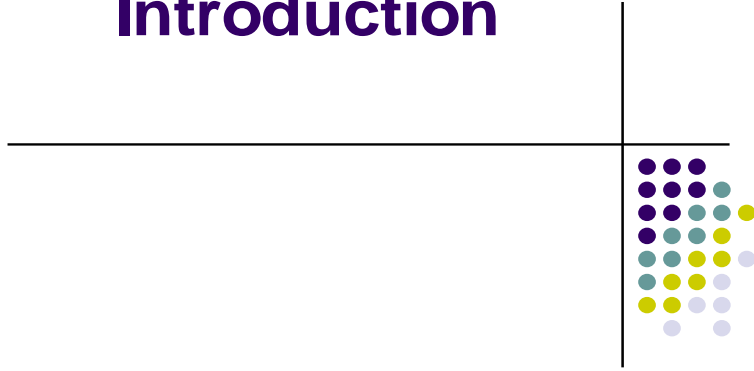
<b>LDH</b>	lactate déshydrogénase
<b>LSECs</b>	les cellules endothéliales sinusoidales
<b>MCF-7</b>	Les cellules d'adénocarcinome du sein
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>MEAg</b>	Fraction méthanolique d' <i>A.gombo</i>
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
<b>NBAg</b>	Fraction n-butanol d' <i>A.gombo</i>
<b>NF-kB</b>	facteur nucléaire kappa B
<b>P53</b>	ou TP53 : tumor protein 53
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid reactive substances
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TCK</b>	les temps de coagulation céphaline-Kaolin
<b>TP</b>	Temps de prothrombine

# Table des Matières

Introduction	1
1. Le stress oxydant	4
1.1. LES RADICAUX LIBRES	4
1.1.1. Production endogène des radicaux libres	4
1.1.2. Production exogène des radicaux libres	5
1.3. ROLE PATHOLOGIQUE DES ESPECES ACTIVES DE L'OXYGENE	6
1.3.1. PEROXYDATION LIPIDIQUE	6
1.3.2. OXYDATION DE L'ADN	6
1.3.3. OXYDATION DES PROTEINES	7
1.5. Les défenses antioxydantes	8
1.5.1. Systèmes antioxydants endogènes	8
1.5.1.1. Les antioxydants non enzymatiques	10
2.1. GENERALITES	13
2.2. CLASSIFICATION DES POLYPHENOLS	14
2.2.1. Les flavonoïdes	14
2.3. LA BIOACCESSIBILITE ET LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS	16
2.3.1. La biodisponibilité	16
2.3.2. La bioaccessibilité	17
2.4. COMPOSES PHENOLIQUES ET SANTE	17
2.4.1. Effet antioxydant	17
2.4.2. Effet anticancéreux	18
2.4.3. Effets anti-inflammatoires et immunologiques	18
2.4.4. Effets cardiovasculaires et anticoagulants	19
2.4.5. Effet hépato-protecteur	20
3. Cancer et doxorubicine	21
3.1. GENERALITE SUR LE CANCER	21
3.2. Définition du cancer	21
3.3. Définition de l'apoptose	22
3.4. DOXORUBICINE	24
3.4.1. Pharmacocénitique et pharmacodynamique de la doxorubicine	25
3.4.1.1. Pharmacocinétique de la doxorubicine	25
3.4.1.2. Pharmacodynamique de la doxorubicine	26
3.4.2. Toxicité de la doxorubicine	26
4. Les fabacées	27
4.1. Généralité	27
4.2. Le genre <i>Astragalus</i>	28
4.3. <i>Astragalus gombo</i> Coss. & Dur L. Ex-Bunge	28
4.3.1. CLASSIFICATION BOTANIQUE	29
4.4. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DU GENRE ASTRAGALUS	30
4.4.1. Usage et importance des astragales	30
4.4.2. Composition chimiques d'astragales	30
1. Matériel	32
1.1. Matériel végétal	32
1.2. Animaux	32
1.3. Prélèvement et préparation du Plasma Pauvre en Plaquettaire (PPP)	32
1.4. Lignées cellulaires cancéreuse et saines	32
2. Méthodes	33
2.1. EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES ET DOSAGE	33
2.1.1. Préparation des fractions	33
2.1.2. Extrait brut aqueux	33
2.2. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES	35
2.2.1. Détermination des polyphénols totaux (TPT)	35
2.2.2. Détermination des flavonoïdes totaux (TFT)	35

2.2.3. Détermination des tanins condensés (TTT) -----	35
2.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (LC-ESI-MS) -----	36
2.4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE -----	37
2.4.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH-----	37
2.4.2. Pouvoir réducteur du fer -----	37
2.4.3. Chélation de fer-----	38
2.5. L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE-----	38
2.6. ACTIVITE ANTICOAGULANTE-----	39
2.7. EVALUATION DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE <i>IN VITRO</i> : LA FRACTION D'ACETATE D'ETHYLE -----	41
1. Evaluation de l'activité toxique <i>in vivo</i> de la fraction acétate d'éthyle -----	43
1.1. EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUË-----	43
1.2. EFFET PROTECTEUR DE LA FRACTION ACETATE D'ETHYLE SUR L'HEPATOTOXICITE INDUITE PAR LA DOXORUBICINE CHEZ LES SOURIS-----	43
1.2.1. Choix de la dose -----	43
1.2.2. Procédure expérimentale -----	43
1.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons (sang et organes ; sérums et homogénats) -----	46
1.3. DOSAGE DES PARAMETRES ENZYMATIQUES ET BIOCHIMIQUES -----	46
2. Effet antioxydant <i>in vivo</i> de la fraction d'acétate d'éthyle d' <i>A. gombo</i> -----	48
2.1. DOSAGE DES PROTEINES TISSULAIRE -----	48
2.2. DOSAGE DES SUBSTANCES REACTIVES DE L'ACIDE THIOBARBITURIQUE (TBARS)-----	49
2.3. DOSAGE DU GLUTATHION REDUIT (GSH)-----	50
2.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES -----	51
2.4.1. Dosage de l'activité glutathion peroxydase (GPx) -----	51
2.4.2. Dosage de l'activité catalase (CAT) -----	51
3. Technique histologique -----	52
3.1. FIXATION DES ECHANTILLONS -----	52
3.1.1. Déshydratation -----	52
3.1.2. Inclusion-----	52
3.2. PREPARATION DES COUPES -----	53
3.3. COLORATION -----	53
2.8. L'ANALYSE STATISTIQUE-----	54
1.1. Rendements et dosage colorimétriques des extraits d' <i>A. gombo</i> -----	54
1.2. IDENTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES D' <i>A. GOMBO</i> PAR ANALYSE LC-ESI-MS. -----	57
2.1.1 CAPACITE DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH -----	62
2.1.2 POUVOIR REDUCTEUR DU FER-----	63
2.1.3 CAPACITES DE CHELATION DES IONS FERREUX-----	64
2.2. Evaluation de l'activité immunomodulatrice -----	67
2.2.1. INDICE PHAGOCYTAIRE K-----	67
2.3. Evaluation de l'activité anticoagulante -----	72
2.3.1. EVALUATION DU POUVOIR ANTICOAGULANT DE LA VOIE EXOGENE TP-----	72
2.3.2. EVALUATION DU POUVOIR ANTICOAGULANT DE LA VOIE ENDOGENE TCK -----	73
2.4. Evaluation de l'activité antiproliférative et cytotoxique <i>in vitro</i> -----	76
2.4.1. MARQUAGE D'APOPTOSE PAR LA METHODE : COLORATION DES CELLULES VIVANTES/MORTES PAR DAPI/ ACRIDINE ORANGE-----	82
Chapitre 3-----	87
Exploration de l'effet protecteur de la fraction d'acétate d'éthyle-----	87
d' <i>A. gombo</i> contre l'hépatotoxicité induite par la doxorubicine chez les souris Balb/c-----	87
3.3. L'effet du traitement sur les paramètres du stress oxydant MDA et GSH-----	94
3.4. L'effet du traitement sur l'activité des enzymes hépatiques (GPx et CAT)-----	97
3.5. Étude histopathologique -----	Error! Bookmark not defined.

# Introduction



Le Sahara algérien, le deuxième plus grand désert du monde, est caractérisé par un écosystème soumis à des conditions sévères et contraignantes, qui favorisent des processus d'adaptation efficaces (Fontaine, 2005). Les plantes sahariennes sont dotées de mécanismes qui les poussent à produire davantage de composés bioactifs en réponse à un stress biotique ou abiotique (Ozenda, 2004 ; Ould El hadj *et al.*, 2003). Les substances bioactives, également connues sous le nom de métabolites secondaires, ont un large éventail de fonctions pour les plantes, telles que la résistance au stress, la communication intercellulaire et la régulation de la fructification et du développement (Teyeb *et al.*, 2011 ; Calatayud *et al.*, 2013). Les composés bioactifs ont des conséquences bénéfiques pour la santé humaine. Aujourd'hui, ces substances sont à la pointe de la recherche de nouveaux produits pharmaceutiques.

Le stress oxydant est défini comme une circonstance anormale qui traverse nos cellules suite à un déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants (Delattre *et al.*, 2005). Les radicaux libres sont à l'origine du phénomène naturel d'oxydation cellulaire. Ils constituent un ensemble de molécules chimiquement réactives hautement instables, responsables du stress oxydant, qui ne peut être neutralisé que par des antioxydants. Notre organisme a des mécanismes naturels pour neutraliser les radicaux libres, tels que la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase/réductase (Coulidiati *et al.*, 2023 ; Payet, 2023). Mais lorsque ces mécanismes sont dépassés (infection, maladies, vieillissement, cigarette), les radicaux libres peuvent endommager les cellules (Valko *et al.*, 2007 ; Coulidiati *et al.*, 2023).

Les antioxydants sont des substances qui peuvent aider à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Ils sont considérés comme des traitements potentiels de divers problèmes de santé (Wang *et al.*, 2017 ; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Actuellement, les antioxydants synthétiques, tels que le BHA et le BHT, sont utilisés comme additifs alimentaires. Cependant, ces molécules synthétiques peuvent avoir des effets secondaires néfastes. Par conséquent, il est important de développer de nouvelles substances biologiques antioxydantes efficaces (Amoussa *et al.*, 2015).

En effet, les gens s'intéressent de plus en plus aux remèdes naturels, et les plantes offrent un large éventail de composés bioactifs ayant des effets thérapeutiques potentiels. Au cours de ces deux décennies, l'intérêt pour les composés chimiques des différentes espèces du genre *Astragalus* a considérablement augmenté (Niknam et Ebrahimzadeh, 2002 ; Podlech, 2008 ; Li *et*

*al.*, 2014 ; Shahrajabian., 2019). De nombreuses études ethnobotaniques ont été portées sur ce genre dans le monde, mais peu de données sont fournies sur les propriétés médicinales de ses espèces (Li *et al.*, 2014 ; Amiri *et al.*, 2020 ; Chamandy, 2022). L'histoire de ces espèces remonte à 2000-3000 ans, ou elles étaient utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise comme stimulant de l'immunité depuis près de 2000 ans (Li *et al.*, 2014 ; Shahrajabian *et al.*, 2019).

Par ailleurs, le genre *Astragalus* a été l'objet de nombreuses études chimiques, qui ont révélé la présence de nombreux composés bioactifs, tels que les polysaccharides, les flavonoïdes et les saponines (Wang *et al.*, 2013 ; Benchadi *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014 ; Khalfallah *et al.*, 2014 ; Maamria *et al.*, 2015 ; Shahrajabian., 2019 ; Chamandy *et al.*, 2021 ; Lekmine *et al.*, 2022).

Ces études ont également révélé diverses activités biologiques et pharmacologiques potentielles de ces composés (Labed *et al.*, 2016 ; Jaradat *et al.*, 2017 ; Salem *et al.*, 2020 ; Lekmine *et al.*, 202), notamment des effets antiprolifératifs, cytotoxiques et immunomodulateurs (Zhang *et al.*, 2012 ; Ibrahim *et al.*, 2013 ; Nikbakht-Brujeni *et al.*, 2013 ; Sunil *et al.*, 2019 ; Salem *et al.*, 2020; Kalaycı *et al.*, 2023), y compris des propriétés chimioprotectrices et hépatoprotectrices signalées (Soliman *et al.*, 2013 ; Foudah *et al.*, 2017 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2018, Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

Plusieurs travaux récents, ont étudiées l'activités anticancéreuses, montrant l'effet protecteur et anti-prolifératif des flavonoïdes et des acides phénoliques sur des lignées cellulaires cancéreuses (Forgo *et al.*, 2012 ; Guon et Chung, 2016 ; Awad *et al.*, 2017 ; Alagawany *et al.*, 2017 ; Benarba et Pandiella, 2018 ; Diallo, 2019). Expérimentalement, l'activité des polyphénols est souvent étudiée *in vitro*, sans tenir compte les propriétés potentielles des métabolites des substances naturelles dans les tissus et le sang. Il est essentiel de se concentrer sur l'évaluation des effets biologiques des polyphénols *in vivo*.

Nous nous sommes intéressés à l'*Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge en raison de son utilisation traditionnelle pour traiter les morsures de serpents et de scorpions (El Rhaffari *et Zaid*, 2002 ; Teyeb *et al.*, 2011). Nous pensons que cela est dû à la présence de produits actifs dans l'*A.gombo* qui agissent contre l'envenimation. Une dizaine d'espèces d'astragales (Fabacées)

endémiques sont présentes dans le Sahara algérien, dont *A. gombo*, ou Feila, du nom arabe Foul (haricots), qui fait référence à la forme de sa gousse (Ozenda, 2004).

Le but de ce travail est de mettre en évidence le potentiel antioxydant de cette espèce *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Il vise également à explorer et comparer les propriétés biologiques et pharmaco-toxique des fractions préparées, notamment l'activité anticancéreuse (test de viabilité MTT), apoptotique *in vitro*, et le pouvoir antioxydant de la fraction AEAg d'*A.gombo* contre la toxicité hépatique provoquée par la doxorubicine *in vivo*. Un autre objectif pharmacologique est d'explorer l'activité phagocytaire et anticoagulante d'*A.gombo*.

A ce jour, aucune étude scientifique n'a démontré l'effet biologique et pharmaco-toxique des composés phénoliques d'*A. gombo*. Ainsi, compte tenu du manque d'informations sur les propriétés thérapeutiques de cette espèce, originaire de la commune d'Elhadjeb (Biskra, Algérie), de la valeur croissante accordée à la flore Algérienne, en particulier aux plantes endémiques (Saharienne), et de la recherche permanente de nouveaux produits dérivés des plantes médicinales, l'étude actuelle a été menée.

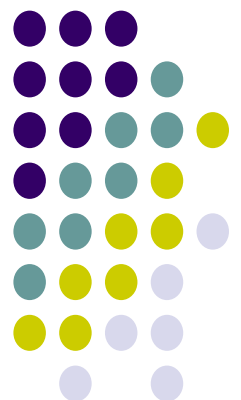
Cette étude s'articule autour de trois axes principaux.

- Dans le premier axe : Nous avons analysé les composés phénoliques de la partie aérienne d'*A. gombo* ; dosage colorimétrique (polyphénols, flavonoïdes et tanins) et analyse chromatographique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS).
- Dans le second axe, nous avons évalué le pouvoir antioxydant, l'activité phagocytaire, anticoagulante et anticancéreuse des fractions sélectionnées.
- Dans le troisième axe, l'étude s'est concentrée sur l'effet hépato-protecteur de la fraction d'acétate d'éthyle d'*Astragalus gombo* contre l'hépatotoxicité aigüe du doxorubicine et le stress oxydant généré par ce dernier (un agent chimiothérapeutique).



# Etude Bibliographique

---



## 1. Le stress oxydant

### 1.1. Les radicaux libres

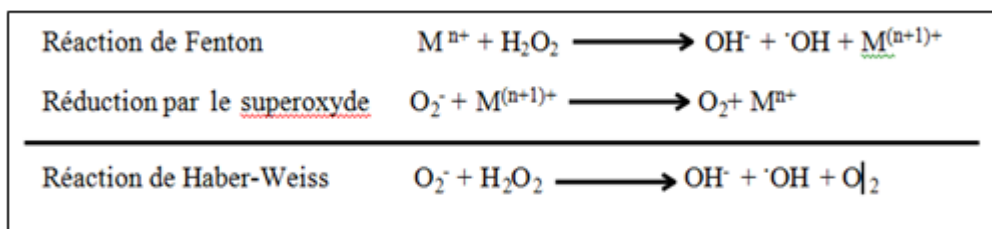
Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec des molécules plus stables pour coupler son électron. Il peut soit capter un électron (agissant comme un oxydant), soit en céder un (agissant comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation d'une chaîne de nouveaux radicaux, ce qui explique que la génération d'un premier radical libre puisse causer des dommages importants à une cellule (Boulila, 2016).

Les EORs comprennent non seulement des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ( $O^{2-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) et le radical peroxyde  $ROO\cdot$ , mais aussi des dérivés non radicaux tels que l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les hydroperoxydes  $ROOH$ . Parmi les espèces radicalaires, les plus intéressantes sont les formes activées de l'oxygène. La réactivité particulière de l'oxygène est due à la structure biradicalaire de la molécule d' $O_2$ , qui leur permet d'accepter facilement des électrons célibataires (Valko et *al.*, 2007 ; Payet, 2023). Les radicaux libres sont produits par des mécanismes endogènes et exogènes.

#### 1.1.1. Production endogène des radicaux libres

Pendant le transport des électrons dans la chaîne respiratoire des cellules aérobies, la respiration oxydative est la principale source d'énergie. L'acétyl-coenzyme A provenant du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides entre dans le cycle de KREBS pour une oxydation complète du résidu acétyle en  $CO_2 + H_2O$ . Les électrons sont acheminés sous la forme de coenzymes réduits ( $FADH_2$ ,  $NADH$ ,  $NADPH$ ), qui transmettent leur pouvoir réducteur aux transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, permettant ainsi la synthèse de l'ATP (Milane, 2004). L'étape finale de la chaîne respiratoire mitochondriale est la synthèse de l'eau à partir de l'oxygène. Une réduction partielle de l' $O_2$  peut se produire pour 1 à 2 % de l'oxygène moléculaire, ce qui conduit à la formation de radicaux libres oxygénés : l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et surtout l'anion superoxyde ( $O^{2-}$ ), ce dernier réagissant avec les protons du milieu pour donner du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Gill et Tuteja, 2011).

Les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène sont des espèces oxygénées relativement peu réactives en elles-mêmes, mais leur toxicité repose sur leur capacité à générer un radical hydroxyle (OH) hautement réactif. Cette génération est catalysée par des métaux de transition tels que le cuivre et le fer. Tout d'abord, l'O<sub>2</sub> réduit un ion métallique, qui peut ensuite être oxydé par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, via la réaction de Fenton. La somme de ces deux réactions, appelée réaction de Haber-Weiss, aboutit à la formation de –OH.



### 1.1.2. Production exogène des radicaux libres

L'exposome est l'ensemble des influences externes qui peuvent affecter la santé d'une personne. Il comprend un large panel de défis oxydant, qui sont des substances pouvant endommager les cellules et les tissus. Les défis oxydants peuvent être directs, comme la fumée de cigarette, ou la pollution environnementale ; des agents toxiques comme l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), présents dans notre environnement (suie, goudron, polluants industriels), participent à la génération de radicaux libres, et sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés dans les alvéoles pulmonaires (Kebieche, 2009). Les UV et les rayonnements ionisants induisent la formation de radicaux libres (O<sup>2.-</sup>, OH) et de molécules génératrices de radicaux libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les médicaments et leurs métabolites, les solvants chimiques, les métaux lourds (plomb, mercure, cadmium, fer et arsenic) ou des voies d'exposition plus discrètes comme l'alimentation (viandes fumées, huiles usagées, graisses et alcool) (Sies, 2019).

## 1.2. Stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production de substances réactives contenant de l'oxygène, appelées radicaux libres, et la capacité de l'organisme à neutraliser leurs effets néfastes à l'aide d'antioxydants (Diallo, 2019; Chamandy, 2021). L'incapacité du système de défense de l'organisme à détoxifier ces radicaux est trop néfaste pour l'organisme, entraînant des séquelles

génétiques, cellulaires et immunitaires. En effet, lorsque la production de radicaux libres augmente de façon excessive, ou que les mécanismes de défense antioxydants sont affaiblis, un excès de radicaux libres peut provoquer des dommages cellulaires et une dégradation des tissus (ADN, lipides, protéines et glucides) (Favier, 2003, Diallo, 2019).

### **1.3. Rôle pathologique des espèces actives de l'oxygène**

#### **1.3.1. Peroxydation lipidique**

Les lipides sont les premières cibles des EROs, en particulier ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation, en raison de leur haut degré d'instabilité. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques, eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides induit des modifications de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Favier, 2003 ; Bkhairia, 2015). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), d'autres composés réactifs aux thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Favier, 2003 ; Bkhairia, 2015).

Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial en agissant directement sur la protéine UCP (uncoupling protein) et pourrait ainsi réduire la production d'EROs mitochondriaux. Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production d'EROs.

#### **1.3.2. Oxydation de l'ADN**

L'ADN est une macromolécule contenant l'information génétique. Qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, il est aussi une cible majeure des EROs. Les radicaux  $O_2^{\bullet-}$  et  $OH^{\bullet}$  provoquent des dommages importants à l'ADN et des mutations qui modifient l'information génétique. Ces mutations peuvent perturber la lecture du génome, la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction, ce qui peut avoir des conséquences graves pour la cellule. Lorsque les systèmes de réparation ne peuvent pas agir, l'ADN cellulaire est transcrit avec des anomalies. L'ADN mitochondrial est plus sensible que l'ADN nucléaire car, à la différence de ce dernier, il n'est pas complexé par des histones (Payet, 2023). En effet, le génome mitochondrial est 10 fois plus sensible au stress oxydant que le génome nucléaire (Haleng et al., 2007). Les mitochondries sont considérées comme l'une des plus importantes

voies de génération d'EROs, car ces organites sont la cible de la toxicité des radicaux libres (Favier, 2003; Pincemail *et al.*, 2009).

### 1.3.3. Oxydation des protéines

Par rapport à l'oxydation des lipides, les protéines sont également sensibles à l'oxydation des EROs. Cette oxydation conduit à l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par des cations métalliques tels que  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ , qui ont le pouvoir de rompre les liaisons peptidiques et de modifier la chaîne protéique, entraînant ainsi des modifications structurelles des protéines avec des conséquences majeures (perte de la fonction catalytique, sensibilité accrue aux protéases (Haleng *et al.*, 2007 ; Pincemail *et al.*, 2009). En effet, les parties les plus sensibles aux radicaux libres sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, auxquels le radical OH s'ajoute, interférant avec la conformation de la protéine. Sur les acides aminés contenant un atome de soufre, comme la cystéine et la méthionine, l'oxydation par des dérivés oxygénés conduit à la formation de ponts disulfures, agrégeant ainsi plusieurs molécules de protéines (Favier, 2003 ; Ghorbel *et al.*, 2021).

## 1.4. Maladies liés au stress oxydant

Des diverses anomalies pathologiques sont liées aux déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et la capacité des systèmes antioxydants à les neutraliser, ce que l'on appelle le stress oxydant. Le stress oxydant peut endommager les cellules et les tissus, il est impliqué dans le processus normal de vieillissement ce qui peut contribuer au développement et à la progression de diverses maladies, notamment le cancer (Valko *et al.*, 2004 ; Diallo, 2019). L'augmentation des EROs et par conséquent de la signalisation intracellulaire stimule la tumorigenèse (Aggarwal *et al.*, 2019 ; Payet, 2023). Le rôle des EROs dans la signalisation leur permet de jouer un rôle dans des processus majeurs tels que l'inflammation. Le stress oxydatif contribue également dans la défense contre les agents infectieux, la formation d'auto-anticorps, l'immunosuppression et les malformations fœtales. Les EROs sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques, tels que la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Dans ces situations pathologiques, comme le diabète, le stress oxydatif résulte de désordres nutritionnels ou métaboliques secondaires à la pathologie de départ (Krim *et al.*, 2013 ; Chamandy, 2021 ; Payet, 2023 )

**Tableau 1.** Certaines pathologies liées au stress oxydatif (Chamandy, 2021).

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

### **1.5. Les défenses antioxydantes**

Le maintien de niveaux non toxiques d'EROs est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à faible concentration, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et donc de retarder ou d'empêcher leur oxydation. Toute déficience ou dysfonctionnement de ce système entraîne des dommages cellulaires.

Notre organisme est doté de deux systèmes antioxydants, enzymatiques et non enzymatiques, dans l'ordre des antioxydants endogènes, et d'autres d'origine exogène (Engwa, 2018).

#### **1.5.1. Systèmes antioxydants endogènes**

##### **1.5.1.1. Système antioxydant enzymatique**

L'organisme dispose de plusieurs molécules enzymatiques majeures qui peuvent neutraliser les radicaux libres (EROs). Ce système est réputé être la première ligne de défense de notre corps face aux EROs. Ces molécules comprennent :

### ✓ Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme exerce sa fonction antioxydante en dismutant l'anion superoxy de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Santos-Sánchez *et al.*, 2019), conformément à la réaction suivante :



Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif. Selon le type d'ion métallique requis comme cofacteur par la SOD, il existe plusieurs formes de SOD. Chez l'homme, il existe trois isozymes de la SOD (Haleng *et al.*, 2007 ; Santos-Sánchez *et al.*, 2019): **SOD 1** est localisée dans le cytosol de la cellule et contient des ions cuivre et zinc, **SOD 2**, est localisée dans les mitochondries et contient des ions manganèse ou fer, **SOD 3**, est située à l'extérieur de la cellule et contient également des ions cuivre et zinc.

### ✓ La catalase

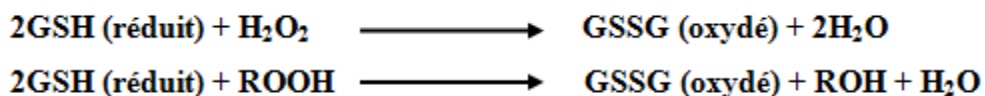
La catalase utilise le fer ou le manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pour générer de l'eau et de l'oxygène moléculaire, ce qui complète le processus de détoxification initié par la SOD. Cette enzyme est principalement localisée dans les peroxysomes (Engwa, 2018). Elle convertit deux molécules de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ .



La catalase est une enzyme abondante dans le foie et les globules rouges. La catalase et d'autres enzymes antioxydantes ont été identifiées comme des biomarqueurs du stress oxydatif dans divers organes ; par exemple, chez les rats diabétiques induits par la streptozotocine, les niveaux hépatiques de ces enzymes sont significativement réduits, bien qu'un traitement avec diverses plantes puisse inverser cet effet (Birben *et al.*, 2012).

### ✓ Les glutathions peroxydases (GPx)

Une enzyme cofacteur du sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Son rôle est de dégrader les peroxydes organiques (ROOH) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).



Cette enzyme a besoin de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons. Le glutathion disulfite (GSSG) qui en résulte est encore réduit par la glutathion réductase (GR), qui utilise le NADPH en tant que donneur d'électrons. Le rapport GSH/GSSG est l'indice de l'état d'oxydation cellulaire (Haleng *et al.*, 2007 ; Engwa, 2018).

Cette réaction est particulièrement importante pour la protection des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires, où l'enzyme fait partie du système de défense antioxydant de la cellule (Aguilar *et al.*, 2016). La GPx est synthétisée dans les reins et le foie, et d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolysé hépatique peuvent modifier sa concentration (Haleng *et al.*, 2007 ; Engwa, 2018).

#### 1.5.1.1.1. Les antioxydants non enzymatiques

Présentent deux types de défences. Le premier est endogène, produit par l'organisme, capable de neutraliser un seul radical libre par molécule, tels que les thiols (SH) comme le glutathion (GSH), l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. Le second type est exogène, comme les vitamines E (tocophérols), C (acide ascorbique) ou les caroténoïdes et les polyphénols, apportés par l'alimentation, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou en ions stables (Favier, 2003).

##### a. Les antioxydants non-enzymatiques endogènes

- ✓ De nombreuses protéines extra- et intracellulaires de liaison aux métaux (MBP) sont reconnues comme des antioxydants endogènes protecteurs, présents dans tous les fluides corporels : liquide céphalo-rachidien, liquide synovial et plasma. Ces protéines jouent un rôle important dans la protection des cellules, car elles sont capables de chélater le fer ou le cuivre. Il s'agit de la métallothionéine (MT), de l'albumine (ALB), de la céruloplasmine, de la ferritine, de la lactoferrine, de la transferrine et de la myoglobine. La transferrine, la ferritine et la lactoferrine sont de puissants chélateurs du fer qui peuvent inhiber les radicaux libres dans la réaction de Fenton. La myoglobine est une métalloprotéine composée d'une chaîne de globine et d'une partie hémique. La myoglobine est avant tout un piègeur efficace de NO, liant le NO



à l'hémoglobine (Hb) pour former un complexe Hb-NO ou nitrosylhémoglobine. Certaines protéines peuvent également agir comme piègeurs d'espèces réactives : par exemple, l'ALB et la MT, qui se lient aux ions cuivre et fer libres, sont capables de piéger les radicaux hydroxyles (Rochette, 2008 ; Mironczuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

- ✓ Glutathion réduit (GSH) est un antioxydant hydrosoluble présent dans les cellules en concentrations élevées dans le noyau, les mitochondries et le cytoplasme (Nimse et Pal, 2015). Deux molécules de glutathion réduites (GSH) sont combinées dans cette réaction pour former une molécule oxydée, le glutathion disulfide GSSG. La régénération du GSH à partir du GSSG a lieu principalement grâce à l'intervention de la glutathion réductase et consomme une molécule de NADPH. Dans la plupart des tissus, le NADPH provient de la voie des pentoses phosphates, mais dans le muscle squelettique, il provient de l'isocitrate déshydrogénase. La vitamine C et vitamine E ne peuvent fonctionner correctement sans glutathion. En outre, la combinaison des vitamines C et E avec le glutathion réduit la peroxydation des lipides.

#### **b. Les antioxydants non-enzymatiques exogènes**

##### ✓ **La vitamine C (Acide ascorbique)**

La vitamine C a pour rôle de prévenir l'oxydation des LDL produite par différents systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Elle passe, lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyle) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Shahidi *et al.*, 1992). Ses fonctions sont très variées : elle contribue au bon fonctionnement du système immunitaire, intervient dans la synthèse du collagène et des globules rouges, ainsi que dans les mécanismes du métabolisme du fer.

##### ✓ **La vitamine E**

La vitamine E est le nom générique de toutes les molécules ayant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E est constituée de quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , dont l'activité antioxydante varie. L'alphatocophérol ( $\alpha$ -TocH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols, leur caractère hydrophobe leur permettant de s'insérer dans les membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en

coopérant avec les radicaux peroxydes (ROO-) pour former un radical tocophéryle, ce qui empêche la propagation de la peroxydation lipidique (Milane, 2004). Si l' $\alpha$ -tocophérol est le plus abondant, le  $\gamma$ -tocophérol semble être le plus efficace à cet égard.

### ✓ **Le sélénium**

Le sélénium est un des composants de la glutathion peroxydase, une enzyme qui a un rôle antioxydant intracellulaire, proche de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est crucial dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet détoxifiant est responsable des effets anticancéreux et anti-âge attribués au sélénium (Wolters *et al.*, 2006).

### ✓ **Les polyphénols**

Les polyphénols sont largement représentés dans le règne végétal et constituent l'une des classes les plus importantes de métabolites secondaires. Les polyphénols comprennent une multitude de structures chimiques, allant de molécules simples telles que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés tels que les tanins condensés (Bruneton, 1999). Les antioxydants les plus connus que l'on trouve dans les fruits et légumes appartiennent à la grande famille des polyphénols. Grâce à leurs propriétés antioxydantes, les polyphénols jouent un rôle dans la prévention de diverses pathologies liées au stress oxydatif et au vieillissement cellulaire, telles que les maladies cardiovasculaires et dégénératives, l'ostéoporose, etc. (Kilani-Jaziri *et al.*, 2017 ; Gulcin, 2020).

### ✓ **Autres antioxydants à faible poids moléculaire**

L'acide urique et l'albumine sont les deux principaux antioxydants dans le plasma humain (Aguilar *et al.*, 2016).

La mélatonine est un composé de faible poids moléculaire classé comme indol. Elle a la capacité de piéger les radicaux libres et de prévenir leur formation (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

Les polyamines (PA) telles que la spermidine, la spermine et la putrescine sont des amines biogènes aux propriétés antioxydantes. Elles protègent les membranes cellulaires du peroxyde d'hydrogène, des superoxydes et des radicaux peroxydes (Deghima, 2021).

Le coenzyme Q est une substance antioxydante liposoluble de synthèse endogène. Il est également présent dans toutes les membranes et son pouvoir protecteur s'étend aux lipides, aux protéines et à l'ADN.

La bilirubine a montré un fort potentiel antioxydants contre les radicaux peroxy dans les milieux polaires (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

## 2. Les polyphénols

### 2.1. Généralités

Les composés phénoliques (polyphénols) sont des métabolites secondaires synthétisés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles (-OH) présents dans toutes les parties des végétaux (Macheix *et al.*, 2006). Les polyphénols constituent une très grande famille de molécules, comprenant plusieurs classes de composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les phénols simples et les acides phénoliques, dont plus de 9000 composés répertoriés (Hopkins, 2003 ; Vuolo *et al.*, 2019). L'immense diversité structurale des composés phénoliques, leur confère une biodiversité fonctionnelle telles que ;

Les composés phénoliques sont connus pour leurs rôles dans la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine, la fertilité, la pigmentation, et la signalisation hormonale dans la résistance des végétaux (Nitsch et Nitsch, 1961). Les cellules végétales répondent aux stimuli environnementaux en synthétisant des métabolites secondaires qui peuvent les protéger des agents agressifs lorsque la plante est soumise à une blessure mécanique. Ces réactions conduisent à la formation de tissu cicatriciel résistant aux infections au site de la plaie (Amiot *et al.*, 1990 ; Macheix *et al.*, 2006).

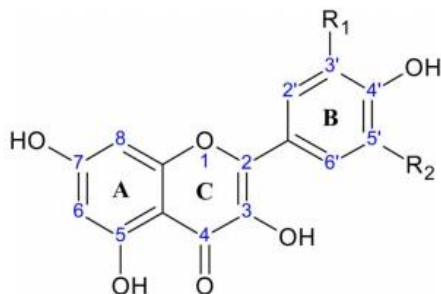
Les polyphénols sont des molécules responsables du brunissement, impliquées dans les sensations d'astringence et d'amertume. Les industries agroalimentaires recommandent fortement leurs propriétés qualitatives ; ce sont aussi des molécules aromatiques et colorées (flavanones, anthocianes, tanins, etc.) qui influencent fortement les caractéristiques organoleptiques des produits; les polyphénols peuvent avoir un impact sur la conservation des produits, notamment les produits cosmétiques, alimentaires ou pharmaceutiques, qui doivent être aussi parfaitement conservés que possible tout au long de leur cycle de vie (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

## 2.2. Classification des polyphénols

Deux grandes classes sont distinguées ; les flavonoïdes dont les principaux composés sont : les proanthocyanidines, isoflavonones, anthocyanines, flavanols, flavanones et flavones et les non flavonoïdes tels que (xanthone, lignanes, acides phénoliques et stilbènes (Hoffmann, 2003).

### 2.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus grande classe de composés phénoliques du règne végétal, avec plus de 8 000 composés identifiés jusqu'au 2019. La structure de base d'un flavonoïde consiste en deux anneaux en C<sub>6</sub> (A et B) liés par une chaîne latérale en C<sub>3</sub> pour former l'anneau en C (hétérocycle), ce qui est principalement responsable de la variété des classes de flavonoïdes. Ces molécules existent sous forme d'hétérosides (Vuolo *et al.*, 2019), dont certains présentent un intérêt particulier grâce à leurs propriétés dans des domaines aussi variés que la cosmétique, l'agroalimentaire ou la pharmacologie.



**Figure 1.** Squelette général des flavonoïdes selon la numérotation classique.

Cycle A et B : Deux noyaux aromatiques, Cycle C : hétérocycle central de type pyrane (Hassan, 2020)

Les flavonoïdes se trouvent dans une variété d'aliments d'origine végétale, notamment les fruits, les légumes, les céréales, les légumineuses, les herbes et les épices. Ils contribuent non seulement à la couleur des aliments, mais aussi à leurs propriétés antioxydantes et à leurs effets potentiels sur la santé y compris les **anthocyanes**, **flavones** (la lutéoline et l'apigénine), **flavanols** (quercétine, la kaempférol et la myricétine), **flavanes** et les **isoflavones** (la génistéine et la daidzéine) (Robbins, 2003). Il est intéressant de noter que chaque classe de flavonoïdes a des propriétés et des effets potentiels sur la santé qui leur sont propres. Par exemple, les anthocyanes sont souvent associés à des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, tandis que les isoflavones peuvent avoir des effets

bénéfiques sur la santé hormonale. Cependant, il est important de souligner que les effets précis des flavonoïdes sur la santé humaine sont encore en cours de recherche et de compréhension.

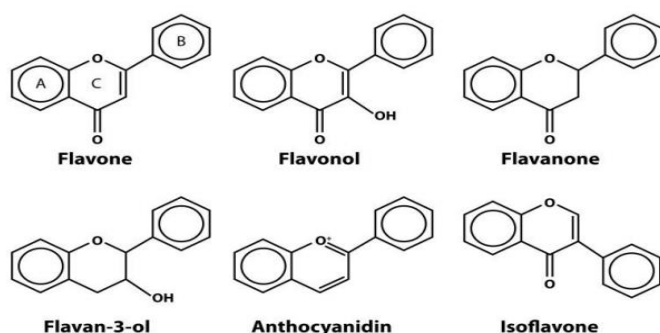


Figure 2. Structures des squelettes des différentes classes des flavonoïdes. (Deghima, 2021)

### 2.2.2. Les acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Représentent environ un tiers des phénols alimentaires. Les acides phénoliques sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, et sont présents dans toutes les plantes, avec une origine commune dans la phénylanine (Robbins, 2003). Ils constituent un sous-groupe de composés phénoliques et jouent un rôle important dans la physiologie des plantes. Les acides phénoliques sont divisés en deux groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Guignard, 1974).

#### 2.2.2.1. Les acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub>. Ils sont particulièrement fréquents chez les gymnospermes et les angiospermes. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (Bruneton, 1999 ; Macheix *et al.*, 2006). Les principaux acides hydroxybenzoïques comprennent : acide *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique (Vuolo *et al.*, 2019).

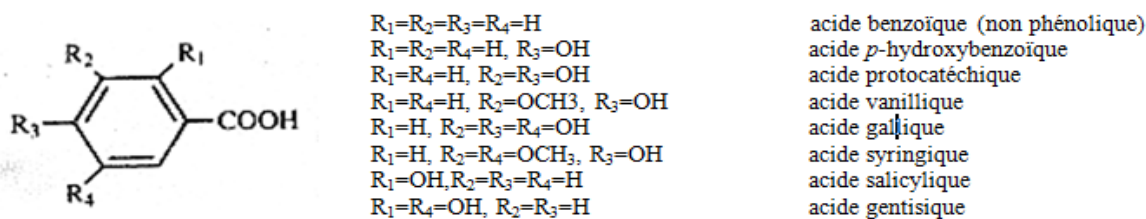
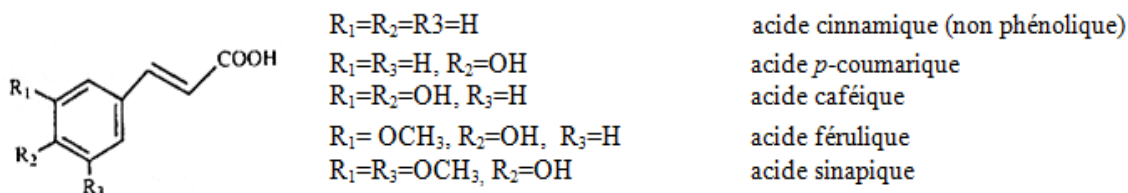


Figure 3. Acides hydroxybenzoïques (Macheix *et al.*, 2006)

### 2.2.2.2. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques constituent une classe très importante de composés phénoliques que l'on trouve dans de nombreux aliments d'origine végétale, avec une variété de substitutions possibles sur le cycle aromatique, conduisant à la formation de différents composés. Ils peuvent être présents dans les plantes sous forme libre, c'est-à-dire sous leur forme d'acides phénoliques libres, ou sous forme liée, où ils sont généralement liés à des structures plus complexes telles que les tanins et les polymères phénoliques (Robbins, 2003).

Quelques exemples d'acides hydroxycinnamiques couramment trouvés dans les plantes : acide caféique, férulique, sinapique et p-coumarique (Macheix *et al.*, 2006).



**Figure 4.** Acides hydroxycinnamiques. (Macheix *et al.*, 2006)

Les acides hydroxycinnamiques sont réputés pour leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens et autres effets bénéfiques sur la santé humaine (Ekiert *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2018 ; Lekmine *et al.*, 2021). Ils sont également impliqués dans la défense des plantes contre les infections, les prédateurs et les stress environnementaux (Guignard, 1974 ; Richeter, 1993).

## 2.3. La bioaccessibilité et la biodisponibilité des polyphénols

La bioaccessibilité et la biodisponibilité des polyphénols sont deux concepts importants pour comprendre comment ces composés sont absorbés et utilisés par le corps humain.

### 2.3.1. La biodisponibilité

La biodisponibilité fait référence à la quantité de polyphénols (molécules bioactives) qui atteignent la circulation sanguine et peuvent être utilisés par les tissus et les organes du corps pour exercer une action biologique. (Borel, 2014 ; Hu *et al.*, 2017 ; Santos *et al.*, 2019). Bien que les composés phénoliques aient une forte activité antioxydante ou une autre activité biologique *in vitro*, ils n'ont qu'une faible activité biologique *in vivo* en raison de leur faible biodisponibilité (D'Archivio *et al.*,

2010). Elle dépend de plusieurs facteurs, tels que la capacité de transport à travers l'entérocyte, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang, et enfin la capacité de sécrétion biliaire (Rhouma-Martin, 2013 ; Tigrine, 2014). Certains polyphénols sont mieux absorbés que d'autres, et leur biodisponibilité peut varier considérablement. La quercétine, par exemple, a une demi-vie d'absorption de 52 min, une demi-vie de distribution de 228 min et une élimination de 1008 min (Rhouma-Martin, 2013).

### **2.3.2. La bioaccessibilité**

Se réfère à la fraction de polyphénols libérés de la matrice alimentaire pendant la digestion et disponibles pour l'absorption par les intestins. Les polyphénols sont généralement présents sous forme de glycosides, liés à différents sucres et esters. Au cours de la digestion, les enzymes intestinales (intestin grêle) et la microflore bactérienne (gros intestin) peuvent libérer les polyphénols en les hydrolysant, ce qui les rend bioaccessibles (Deghima., 2021). La bioaccessibilité des polyphénols glycosidiques ou esterifiées est généralement plus faible que celle des polyphénols de forme non glycosylée ou non estérifiée (Borel, 2014). Cependant, la libération des polyphénols dépend de nombreux facteurs, que Borel en 2014 résume comme suit ;

Type de polyphénol (formes de stockage) ; Structure chimique; État de santé de l'individu ; Matrice alimentaire et préparation et cuisson des aliments.

## **2.4. Composés phénoliques et santé**

Il convient de noter que les études sur les polyphénols sont toujours en cours et que les effets peuvent varier en fonction de divers facteurs tels que leurs structures chimiques, leur biodisponibilité, leurs concentrations, leur interaction avec d'autres nutriments et leur métabolisme dans l'organisme. Les études montrent que les polyphénols peuvent avoir de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine.

### **2.4.1. Effet antioxydant**

Effectivement, Le pouvoir antioxydant des polyphénols, en particulier des flavonoïdes, est lié à leurs propriétés redox, les polyphénols sont capables de neutraliser les radicaux libres et de protéger les cellules et les tissus contre les dommages oxydatifs, soit en transférant un atome d'hydrogène et/ou d'électron de leurs groupes hydroxyles, soit en chélatant des métaux (fer et cuivre) qui sont d'une importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires. Ils sont également de bons inhibiteurs

des enzymes responsables de la production de radicaux libres d'une manière directe en inhibant la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthase (Engwa, 2018).

#### **2.4.2. Effet anticancéreux**

La diversité de la famille des antioxydants, et principalement celle des polyphénols, reflète les différentes actions physiologiques qu'ils sont susceptibles d'initier : induction de l'apoptose, contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires, modulation du système immunitaire. A cet égard, les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses en interférant avec leur cycle cellulaire et induire leur apoptose en bloquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Kondeva-Burdina *et al.* , 2018 ; Ali *et al.*, 2018 ; Ahmad *et al.*, 2018 ; Chamandy, 2021).

En outre, les flavonoïdes peuvent aider à protéger les cellules normales contre les dommages causés à l'ADN par les substances cancérigènes (Ahmad *et al.*, 2018 ; Srivastava *et al.*, 2019). Certaines de ces molécules semblent, de plus, pouvoir agir en synergie avec les antitumoraux conventionnels. Il a été démontré que la consommation prolongée d'aliments riches en composés végétaux bioactifs tels que les flavonoïdes réduit le risque de cancer (Sahreen *et al.*, 2010 ; Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

#### **2.4.3. Effets anti-inflammatoires et immunologiques**

L'inflammation est une réponse immunitaire naturelle de l'organisme qui se développe suite à une lésion tissulaire. Elle est la première ligne de défense de l'organisme contre les agents agresseurs (Chamandy, 2021). Les composés phénoliques ont des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils peuvent moduler le fonctionnement du système immunitaire (Bedir *et al.*, 2000 ; Aslanipour *et al.* , 2017 ; Deghima, 2021). En effet, les flavonoïdes de l'Astragale ont la capacité de stimuler le système immunitaire de différentes manières, et contribuent également à la synthèse des immunoglobulines et à la stimulation des macrophages dans l'organisme. Ils peuvent également jouer un rôle dans l'activation des cellules tueuses naturelles et des lymphocytes T, qui sont responsables de l'élimination des agents pathogènes (Wang, 1989). Les flavonoïdes peuvent donc contribuer à réduire l'inflammation, en bloquant la production de cytokines pro-inflammatoires et en activant les cytokines anti-inflammatoires (Bedir *et al.*, 2000 ; Sunil *et al.*, 2019 ; Chamandy, 2021).

Les extraits de plantes peuvent avoir un effet anti-inflammatoire avec peu ou pas d'effets secondaires ; ils peuvent intervenir à différents stades du processus inflammatoire, en inhibant la



formation de cytokines et d'eicosanoïdes, en empêchant la cascade des réactions inflammatoires ou en diminuant l'irritation et l'exfoliation excessive (Oguntibeju, 2018).

À titre d'exemple, les flavonoïdes et les acides phénoliques modulent les niveaux d'expression de diverses cytokines (Gautam et Jachak, 2009). La lutéoline et la quercétine inhibent la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules RAW 264.7 stimulées par des LPS, tandis que l'apigénine inhibe la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8. En effet les flavonoïdes contribuent à la gestion de l'inflammation chronique et à la prévention de maladies inflammatoires telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Chamandy, 2021).

#### **2.4.4. Effets cardiovasculaires et anticoagulants**

Actuellement, les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de décès dans le monde entier. Cette maladie est principalement due à une coagulation sanguine anormale (coagulation) dans les artères qui alimentent le cœur en sang. Les caillots sanguins qui se développent dans les artères peuvent provoquer une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral. Les caillots interrompent le flux sanguin vers le cœur (Klausner, 1983).

Bien que l'héparine ait le pilier du traitement anticoagulant des troubles thrombotiques aigus depuis des décennies. Cependant, l'héparine présente certaines limites, telles que l'inefficacité chez les patients présentant un déficit en antithrombine, le risque de développement de thromboses induites par l'héparine, l'immunosuppression et l'effet ostéoporotique en cas d'application à long terme. L'utilisation de certaines plantes médicinales par les herboristes dans le cadre d'une thérapie hémostatique populaire est appliquée dans plusieurs pays et constitue une source potentielle de nouveaux anticoagulants et antithrombotiques (Kee *et al.*, 2008 ;Kumar *et al.*, 2011 ; Félix-Silva *et al.*, 2014). Plusieurs plantes médicinales de différentes familles, utilisées dans les systèmes de médecine traditionnelle, sont étudiées pour le traitement des maladies thromboemboliques. Ces plantes ont montré une activité anticoagulante/antithrombotique. Elles ont en commun une composition en molécules bioactives, notamment des composés phénoliques (Kumar, 2011). Les flavonoïdes obtenus à partir de l'écorce de noyer ont un impact sur l'hémostase humaine, en particulier sur l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, et sur la coagulation plasmatique (Amirou., *et al* 2023). Les coumarines et leurs dérivés révèlent les meilleurs temps de prothrombine (TP) et rapport international normalisé (INR), Ils ont des propriétés anticoagulantes en inhibant la synthèse de la vitamine K, nécessaire à la coagulation sanguine (Duric *et al.*, 2015).

#### 2.4.5. Effet hépato-protecteur

Le foie est un organe essentiel à la digestion, métabolisme et l'élimination des toxines. Il s'agit de la plus grande glande du tube digestif et elle contient un grand nombre d'enzymes, ce qui lui permet de remplir de nombreuses fonctions biologiques, notamment la fonction de sécrétion, la fonction d'excrétion biliaire, la fonction métabolique et la fonction de détoxification (Diallo, 2019). L'activité hépatoprotectrice des molécules bioactives vis-a-vis l'hépatotoxicité induite par les médicaments, en particulier les médicaments anticancéreux tels que la doxorubicine, qui a été la plus étudiée pour ses effets secondaires sur la cardiomyopathie (khan *et al.*, 2014 ; Aktaş *et al.*, 2020) et le foie ( Mansouri *et al.*, 2017 ; Aktaş *et al.*, 2020), les reins (Djabir *et al.*, 2017), le cerveau (Siswanto *et al.*, 2016).

L'astragalus a déjà fait ses preuves et de nombreuses recherches ont été initiées dans ce domaine, certaines révélant des actions prometteuses. En 2017, l'équipe de Fouda a étudié le potentiel hépatoprotecteur d'extraits hydro-méthanoliques 80/20 de deux espèces d'Astragale, *A. echinops* et *A. logopodioides*, contre les lésions hépatiques induites par le paracétamol chez le rat. Les niveaux sanguins de deux enzymes, l'aspartate amino transférase (ASAT) et l'alanine amino transférase (ALAT), ont été mesurés. Les résultats ont montré que les deux extraits réduisaient de manière significative les taux sanguins d'ALAT et d'ASAT. D'autres recherches sur des modèles d'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène et le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), qui sont les plus fréquemment utilisés pour évaluer le pouvoir hépatoprotecteur de certaines espèces d'astragale, ont été satisfaisantes, montrant que les extraits d'astragale peuvent protéger les cellules hépatiques contre les dommages causés par ces agents (Yimam *et al.*, 2016; Simeonova *et al.*, 2016 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2018 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

En effet, plusieurs publications ont étudié l'activité anticancéreuse des flavonoïdes et des acides phénoliques, montrant leur effet hépatoprotecteur et anti-prolifératif sur les lignées cellulaires cancéreuses (Guon et Chung, 2016 ; Awad *et al.*, 2017 ; Alagawany *et al.*, 2017 ; Benarba et Pandiella, 2018 ; Diallo, 2019 ; Kalaycı *et al.*, 2023).

### **3. Cancer et doxorubicine**

#### **3.1. Généralité sur le cancer**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde. Le nombre de décès dus au cancer devrait augmenter au cours des prochaines années pour atteindre plus de 13 millions en 2030 (Chamandy, 2021).

L'incidence du cancer en Algérie est en constante augmentation en raison du développement socio-économique rapide du pays. Cette augmentation est due à un changement profond du mode de vie des citoyens, qui sont devenus plus exposés aux facteurs de risque de cancer tels que le tabagisme, l'alcool, l'obésité, une alimentation malsaine et la pollution (Raiah *et al.*, 2022).

Selon les statistiques du ministère de la santé, quelque 50 000 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en 2022, contre 30 000 nouveaux cas en 2005, soit une augmentation de plus de 67 % en 17 ans. Les principales causes sont le cancer du sein chez les femmes, suivi du cancer colorectal, et le cancer du poumon, suivi du cancer colorectal et du cancer de la prostate chez les hommes. La tendance à la hausse des taux d'incidence de certains cancers souligne la nécessité d'intensifier les efforts de prévention (Raiah *et al.*, 2022 ; Lounis *et al.*, 2023).

#### **3.2. Définition du cancer**

Le cancer est une maladie qui se développe à l'intérieur des cellules. Contrairement à de nombreuses autres maladies, qui sont causées par des agents extérieurs, tels que des virus, des bactéries ou des parasites. Le cancer est causé par des mutations dans le génome d'une cellule normale, qui se transforme et prolifère de manière nocive (Macdonald *et al.*, 2003). Ces mutations perturbent les mécanismes naturels de régulation de la croissance cellulaire, ce qui conduit à une multiplication anarchique et incontrôlée des cellules. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses (Tigrine, 2014 ; Chamandy, 2021). Le déclenchement des cancers est soit lié à des facteurs internes tels que l'activité hormonale, les mutations héréditaires et les maladies immunitaires, soit à des facteurs externes ou environnementaux tels que le tabac, les radiations, l'alimentation, l'alcool, etc (Chamandy, 2021).

### 3.3. Définition de l'apoptose

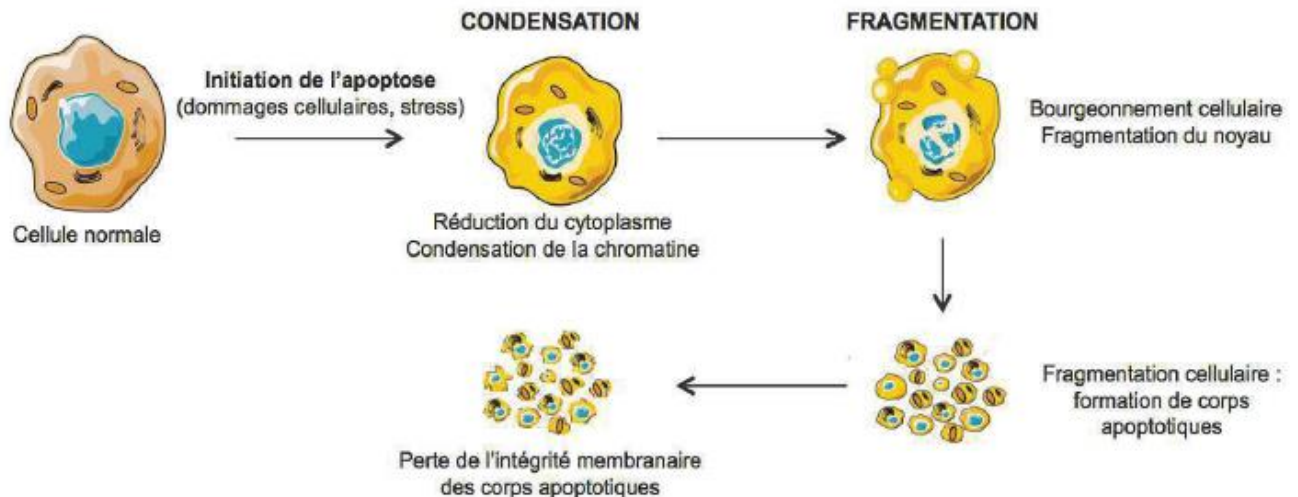
L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, appelé aussi mort cellulaire physiologique. Elle permet à l'organisme de se débarrasser des cellules inutiles ou endommagées, qui pourraient être dangereuses (Kerr *et al.*, 1972 ; Alibert et Chimini, 2002).

L'apoptose peut être d'origine physiologique ou pathologique. Dans le premier cas, elle correspond à l'organogenèse, comme la formation du cerveau et la genèse des doigts, mais aussi au développement du système immunitaire, à la différenciation intestinale, et la différenciation mammaire lorsque les cellules épithéliales des glandes mammaires sont éliminées après la période d'allaitement, etc.

La seconde est l'apoptose pathologique, dans laquelle le temps de survie des cellules est anormalement prolongé, entraînant des maladies malignes comme le cancer (mutation du gène P-53), des maladies auto-immunes, des maladies neurodégénératives, une apoptose excessive et la perte de cellules normales ou protectrices (syndrome syndrome d'immunodéficience SIDA) (Bensakhria, 2018).

#### 3.3.1. Changements morphologiques au cours de l'apoptose

La mort cellulaire se caractérise par de profonds changements morphologiques, génétiques et biochimiques : c'est le phénomène de l'apoptose. Le premier changement morphologique distinctif est une réduction du volume de la cellule. À ce stade, le cytoplasme se condense et les organites cellulaires sont morphologiquement intacts. En revanche, le noyau rétrécit, la chromatine se condense et se fragmente, formant des amas puis des croissants attachés à l'enveloppe nucléaire. Altération des autres organites, convolution des membranes nucléaires et cytoplasmiques (budding ou blebbing) conduisant à la formation de corps apoptotiques, qui initialement conservent leur intégrité membranaire et contiennent des fragments de noyau, de mitochondries et de divers constituants cytoplasmiques. (Hermetet, 2015). Ces changements morphologiques sont généralement associés à des changements biochimiques tels que la translocation des résidus de phosphatidylsérine à la surface externe de la bicouche lipidique. Toutes ces modifications conduisent à la reconnaissance et à la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages, et empêchent le contenu cytoplasmique d'être libéré dans le milieu extracellulaire, prévenant ainsi toute réaction inflammatoire locale (Bettaieb, 2009 ; Tigrine, 2014).



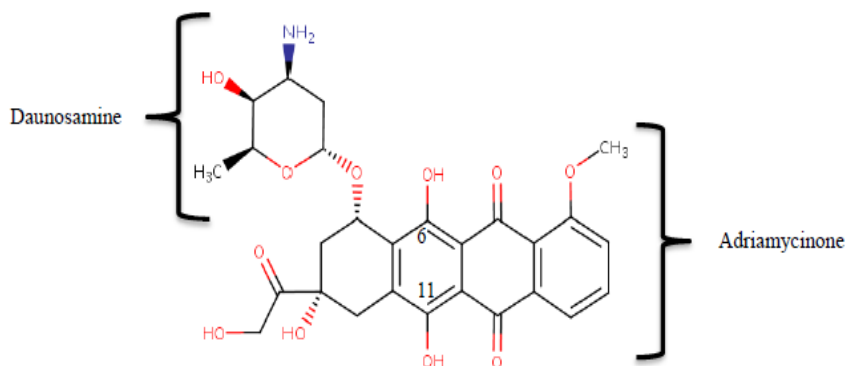
**Figure 5.** Schéma représentant les changements morphologiques induits lors de l'apoptose. (Hermetet, 2015)

### 3.3.2. Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

L'apoptose passe par trois étapes distinctes et successives ; la première est l'induction suivie par la phase d'exécution et la dernière la phase de dégradation. Tout d'abord, il existe deux voies majeures pour induire l'apoptose, phénomène réversible qui peut être intra- ou extracellulaire : la voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (voie mitochondriale) (Bettaieb, 2009 ; Hermetet, 2015). **La voie extrinsèque** est initiée par la liaison d'un ligand de mort extracellulaire, tel que Fas-L, TNF $\alpha$  ou TRAIL, à son récepteur à la surface de la cellule (Tigrine, 2014). La liaison récepteur-ligand =Fas-L induit l'activation du récepteur et le recrutement de protéines adaptatrices qui créent des liens permettant le clivage et l'activation des caspases initiateuses la caspase 8, qui à son tour clive et active les caspases effectrices la caspase 3, qui hydrolyse des substrats particuliers menant à l'apoptose. Tandis que **la voie intrinsèque** également connue sous le nom de voie mitochondriale ou voie régulée par le lymphome à cellules B -2(BCL), peut être activée suite à des dommages de l'ADN (activation de p53), à l'absence de facteurs de survie ou à un stress oxydant. La libération du cytochrome c dans le cytoplasme se combine avec le complexe APAf1 (Apoptotic Protease Activating factor 1) pour former le cyt c-APAf1 connu sous le nom d'apoptosome. Ce complexe active la caspase-9 qui, à son tour, active la caspase-3, induisant l'apoptose. Cette voie est associée à des changements dans la perméabilité des membranes internes et externes des mitochondries. Les deux voies conduisent à l'activation des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases (Delmas, 2014 ; Hermetet, 2015).

### 3.4. Doxorubicine

La doxorubicine est un antibiotique cytotoxique appartenant à la famille d'anthracycline, également appelé adriamycine, qui a été isolée dans les années 1960 à partir d'une espèce d'actinobactérie appelée *Streptomyces peucetius* (El-Moselhy *et al.*, 2014). Depuis lors, DOX a été utilisé avec succès comme agent chimio thérapeutique contre diverses tumeurs malignes solides et hématologiques en tant que première ligne de défense (Patil *et al.*, 2008). DOX exerce une action anticancéreuse qui cible et intercale les bases d'ADN, préférentiel, des cellules tumorales ; provoquant le blocage du cycle cellulaire en phase G2 en inhibant une enzyme appelée topo isomérase II, qui provoque ensuite la génération de radicaux libres et leurs dommages aux membranes cellulaires (Attia et Bakheet, 2013 ; El-Moselhy *et al.*, 2014). Les pratiques cliniques de DOX sont devenues limitées en raison de ses effets secondaires, notamment des lésions cardiaques mortelles (Bilgic *et al.*, 2020), de plus doxorubicine est considérée comme la classe la plus toxique des anthracyclines dans les hépatocytes (Kebieche, 2009 ; Damodar *et al.*, 2014). Il existe aujourd'hui huit anthracyclines couramment utilisées en clinique : la daunorubicine (Cerubidine®), doxorubicine (Driblastine®), épiburubicine (Farmorubicine®), idarubicine (Zavedos®), pirarubicine (Thépubicine®), daunorubicine liposomale (Daunoxome®) et deux doxorubicines liposomales (Zavedos®). Deux doxorubicines liposomales (Caelyx® et Myocet®) (Van Dalen *et al.*, 2006 ; Conway *et al.*, 2015). Le suffixe « rubicine » fait référence à leur couleur rouge intense. Aujourd'hui, la doxorubicine et l'épiburubicine sont les anthracyclines les plus utilisées (Mazevet, 2015).



**Figure 6.** La structure chimique de la doxorubicine. (Gallani, 2016)

Selon Diallo (2019), la doxorubicine est largement métabolisée par le foie et éliminée principalement par voie hépatobiliaire. Cela signifie que le foie est le principal organe responsable de l'élimination de la doxorubicine de l'organisme. L'insuffisance hépatique peut augmenter la toxicité de la doxorubicine,

et 40 % des patients soumis à ce traitement souffrent d'une forme ou d'une autre d'atteinte hépatique, allant d'une augmentation transitoire des transaminases à des foyers de nécrose cellulaire et à une cirrhose hépatique (Tacar *et al.*, 2013). Pour cette raison, il est important d'évaluer la fonction hépatique avant et pendant le traitement à la doxorubicine (Gallani, 2016). Les paramètres biologiques classiques comme l'ALAT, l'ASAT, les phosphatases alcalines et la bilirubine doivent être dosés (Yimam *et al.*, 2016 ; Simeonova *et al.*, 2016). Si la bilirubinémie est élevée, la clairance de la doxorubicine peut être plus lente et la toxicité globale peut être accrue. Dans ce cas, des doses plus faibles de doxorubicine doivent être administrées. La doxorubicine ne doit pas être administrée en cas d'atteinte hépatique sévère (Gallani, 2016).

### **3.4.1. Pharmacocénitique et pharmacodynamique de la doxorubicine**

L'activité pharmacologique des anthracyclines repose sur des réactions d'oxydoréduction dans lesquelles elles capturent un électron du NADPH, créant une radicale semi-quinone. Ce processus génère de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), des radicaux libres oxygénés et des radicaux hydroxyles (OH). L'interaction de la partie hydroquinone de l'anthracycline avec le fer ferrique présent dans les cellules peut ensuite déclencher la production non enzymatique de radicaux libres superoxydes (RL), entraînant une peroxydation des lipides qui altère la fonction des membranes. En outre, le stress oxydatif associé peut directement induire des dommages aux mitochondries et l'apoptose. La formation d'ONOO- à l'intérieur des cellules peut également jouer un rôle important dans la toxicité des anthracyclines (Michihiko *et al.*, 2006 ; Tacar *et al.*, 2013)

#### **3.4.1.1. Pharmacocinétique de la doxorubicine**

Conformément à la monographie éditée par Pfizer, la doxorubicine est rapidement éliminée du plasma des patients. Il se lie fortement aux tissus, y compris aux ascites, où il atteint des concentrations plus élevées que dans le plasma (Tacar *et al.*, 2013 ; Gallani, 2016). Environ 50 à 85 % de la doxorubicine se lie aux protéines plasmatiques. La doxorubicine est éliminée principalement par la bile et les selles, à raison de 40 à 50 % sous forme inchangée et de 23 % sous forme de doxorubicinol, un métabolite actif. L'excrétion urinaire est minime, à raison de 5 à 15 % de la dose, et sous forme inchangée. La clairance de la doxorubicine est de 400 à 583 mL/min/m<sup>2</sup>, et sa demi-vie terminale est de 17 heures (métabolites 30 à 50 heures) (Mazevet, 2015).

### 3.4.1.2. Pharmacodynamique de la doxorubicine

L'activité anticancéreuse des anthracyclines n'est pas encore totalement déterminée, mais plusieurs mécanismes semblent y contribuer, tels que les interactions avec l'ADN, l'inhibition de la topoisomérase II et la production de radicaux libres. A ce propos, la doxorubicine s'intercale dans la double hélice de l'ADN, ce qui a pour effet de détordre la molécule d'ADN et de bloquer la progression de l'ADN polymérase et de l'ARN polymérase. Cela inhibe la réplication de l'ADN et la transcription en ARN, ce qui entraîne la mort cellulaire. Ensuite, la doxorubicine est capable d'inhiber la topoisomérase II, empêchant l'étape de religation et conduisant à la rupture définitive des brins d'ADN et à la mort cellulaire. La doxorubicine est à l'origine d'une production de radicaux libres, qui provoquent divers dommages au niveau de l'ADN, telles que la molécule, la séparation des deux brins et l'augmentation des réactions d'alkylation. La doxorubicine peut également se lier aux membranes cellulaires et à certaines protéines plasmatiques (Tacar *et al.*, 2013 ; Mazevet, 2015 ; Gallani, 2016)

### 3.4.2. Toxicité de la doxorubicine

Les effets indésirables les plus souvent observés sont des hypoplasies médullaires (environ 2/3 des patients) parfois accompagnées d'une immunosuppression, des nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées, des stomatites, une alopécie (90% des patients) et une aménorrhée (Gallani, 2016). Ces toxicités ne sont pas liées spécifiquement à la doxorubicine mais sont fréquentes dans plusieurs familles de médicaments anticancéreux, car elles affectent les cellules qui se renouvellent rapidement. D'autres effets indésirables de la doxorubicine, bien que moins fréquents, sont plus spécifiques. Il s'agit notamment de la cardiotoxicité, caractéristique de la famille des anthracyclines, et des leucémies secondaires, fréquemment observées avec les inhibiteurs de la topoisomérase II (Lao *et al.*, 2013). La doxorubicine peut également provoquer des nécroses (en raison de son fort potentiel irritant). Elle peut également provoquer une néphrotoxicité et surtout une hépatotoxicité, en raison de son métabolisme principalement hépatobiliaire (Mazevet, 2015).

Les progrès récents dans la gestion thérapeutique des effets secondaires comprennent l'introduction de cytokines et de formulations liposomales. Cependant, contrairement à la cardiotoxicité, d'autres effets secondaires tels que l'hépatotoxicité ont été moins étudiés. Compte tenu des fonctions métaboliques cruciales du foie et du métabolisme hépatique important des anthracyclines, la gravité de l'hépatotoxicité induite par les anthracyclines augmente avec la tendance à l'augmentation des doses



d'administration (Prasanna *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2023). Les données cliniques suggèrent que la doxorubicine cause des lésions hépatiques supérieures à 30 % chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, mais le mécanisme de son hépatotoxicité n'est toujours pas élucidé, ce qui représente un défi clinique potentiel et une complication mortelle (Damodar *et al.*, 2014). En outre, et selon Alhashmi *et al.* (2020), l'hépatotoxicité représente 10 % des hépatites aiguës chez les patients adultes atteints de cancer, lorsque les premières doses d'anthracyclines sont administrées. De nombreux rapports basés sur l'examen histopathologique de tissus hépatiques extraits de modèles animaux traités à la doxorubicine ont révélé plusieurs anomalies telles que l'hyperplasie marquée des canaux biliaires, la dilatation de l'espace sinusoidal et la congestion des veines centrales , une vacuolisation des hépatocytes, dilatation des sinusoides, condensation des noyaux et dégénérescence des cordons hépatocytaires , œdème cellulaire, nécrose focale et désorganisation des travées hépatiques , prolifération du canal biliaire, nécrose parenchymateuse (Prasanna *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2023).

#### 4. Les fabacées

##### 4.1. Généralité

Les fabacées communément appelées légumineuses Ex Papilionacées, représentée par le genre *Faba* (fève, *Vicia faba*), ce sont des plantes dicotylédones de l'ordre Fabale, c'est l'une des plus grandes familles d'intérêt économique et d'importante plantes à fleurs, elles sont facilement identifiable par leurs fruit (gousses), qui sont de forme variée rarement uniloculaire (généralement à deux loges) et par ses feuilles imparipennées en général stipulées (Quezel et Santa, 1963 ; Garza, 2015).

Plusieurs études chimiotaxonomiques ont montré la richesse des fabacées en fibres, vitamines, composées organiques tels que protéines, les oligosaccharides, glucides, lipides, et acides phytiques, et des éléments minéraux (calcium, magnésium, potassium, fer, zinc et azote) (Garza, 2015 ; Chamandy, 2021). D'autre part des recherches en phytochimie ont révélé la présence d'isoflavones, flavonoïdes prénylés, flavanones, flavanols, saponines, glucosides, roténoïdes, chalcones, alcaloïdes et trypsine inhibiteurs. Les flavonoïdes sont les principaux constituants de la famille des fabacées (Bedir *et al.*, 2000 ; Ebrahimzadeh *et al.*, 2001 ; Garza, 2015).

#### 4.2. Le genre *Astragalus*

Les espèces du genre *Astragalus* sont largement réparties dans les régions tempérées du monde. La plupart des Astragales se trouvent dans les zones continentales arides de l'ouest de l'Amérique du Nord et de l'Asie centrale (Podlech, 1986 ; Pistelli *et al.*, 2003 ; Ríos et Waterman, 1997).

Les espèces d'Astragales poussant en Afrique du Nord sont des plantes méditerranéennes ou arabo-sahariennes. En Algérie, le genre *Astragalus* est représenté par 40-45 espèces annuelles et vivaces appartenant à 18 sections se réparties dans des aires géographiques très diversifiées comprenant les régions côtières, les hauts plateaux et les régions sahariennes (Quézel et Santa, 1962 ; Benferdia *et al.*, 2021). Dans le Sahara Algérien, il existe une quinzaine d'espèces dont une dizaine sont endémiques de l'Algérie, du Maroc et Tunisie (Quézel et Santa, 1962 ; Ozenda, 2004 ; Benferdia *et al.*, 2021). Le genre *Astragalus*, malgré sa large répartition géographique, a connu une diversification morphologique considérable (Zarre et Azani, 2013). Cependant, à ce jour, la classification du genre *Astragalus* est très complexe et difficile en raison de la similarité morphologique de ce taxon (Wojciechowski *et al.*, 1999 ; Zarre et Azani, 2013 ). L'astragale pousse de l'automne au printemps, avec des feuilles qui restent vertes tout au long de l'hiver et des fleurs hermaphrodites. Le calice est caduc ou persistant. La corolle est papilionacée et les pétales sont mités, avec un ovaire multi-ovulé à l'apex. Le fruit est généralement une gousse sèche de forme variable (Ozenda, 2004).

#### 4.3. *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge

L'*astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge est une espèce endémique saharienne, son nom vernaculaire est Feila en raison du nom arabe Foul (haricots) qui fait référence à la forme de sa gousse, cette espèce a plusieurs autres noms selon la région comme « Foul el hamir » ou « Djelban elhamir » et « Gelza » (Zeguerrou *et al.*, 2010). En Algérie, elle pousse dans les régions arides et semi-arides telles que Biskra, El Oued, Djelfa, Ghardaïa, Ouargla et Boussaâda (Ozenda, 2004 ; Ould El hadj *et al.*, 2003 ; Benferdia *et al.*, 2021).

*Astragalus gombo* est une plante vigoureuse de couleur claire (Ozenda, 2004). Elle pousse bien dans les lits sablonneux, sur les oueds et elle forme parfois d'importants pâturages après la pluie et résiste longtemps dans certains oueds. Elle est bien appréciée par les animaux, notamment, le dromadaire (Maamria, 2015). *A. gombo* est une espèce à des feuilles longues aux petites folioles, leurs tiges dressées élevées aboutissent 40 à 50 cm de hauteur, les fleurs en grappes denses de couleur jaunes et de

forme papilionacées. La gousse de celui-ci, protégée par une aigrette souple, a une forme renflée avec de légères nervures (Benchalah *et al.*, 2000).



**Figure 7.** a: Touffes d'*A. gombo* ;b : Tiges des feuilles et des fleurs ;c : Gosses couvertes de poils fins et laineux.

#### 4.3.1. Classification botanique

Selon la quatrième version établie par l'Angiosperm Phylogeny Group (APG : IV, 2016), décrit la position systématique d'*Astragalus gombo* Coss et Dur EX Bunge.

**Tableau 2.** Classification botanique de l'espèce *Astragalus gombo* Coss et Dur EX Bunge.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Astragalus</i> L
Espèce	d' <i>Astragalus gombo</i> Coss et Dur Ex Bunge

#### 4.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Astragalus*

##### 4.4.1. Usage et importance des astragales

L'étude ethnopharmacologique menée par Bellakhdar (1997) a valorisé l'utilisation de nombreuses espèces d'astragale comme plantes fourragères et ornementales ; cependant, les plantes fourragères indigènes et introduites sont utilisées pour restaurer la zone de surpâturage, contrôler l'érosion, remplacer les plantes indésirables, fournir un fourrage appétissant et nutritif pour la faune et le bétail domestique, et fournir des sources utiles pour la production de médicaments importants ou sources de gommes adragantes (Rios *et al.*, 1997 ; El Rhaffari et Zaid, 2002). Cependant, un certain nombre d'espèces sont toxiques pour le bétail et dans de nombreux cas, les toxines pourraient être transférées aux humains par la viande ou le lait (Rios *et al.*, 1997 ; Zarre et Azani, 2013).

Ainsi, il existe deux groupes d'espèces d'astragale qui sont étroitement liés à la santé : les espèces toxiques et les plantes médicinales. De manière générale, les études menées sur le genre *Astragalus* affirment que plus de trente-deux espèces sont appréciées en cuisine, voire comme substitut du thé ou du café, des supports cosmétiques et des médicaments (Rios *et al.*, 1997 ; El Rhaffari et Zaid, 2002; Teyeb *et al.*, 2011). L'astragale a été utilisé en médecine traditionnelle chinoise comme booster d'immunité depuis près de 2000 ans (Shahrajabian *et al.*, 2019).

La médecine traditionnelle du monde entier a utilisé l'astragale comme remède à base de plantes contre l'ulcère de l'estomac, la toux, la bronchite chronique, l'hypertension, les troubles gynécologiques, le diabète, l'hépatoprotection ; immunostimulant; les antiviraux et les piqûres de scorpions venimeux. (Hirovani *et al.*, 1994; Bisby *et al.*, 1994 ; Rios *et al.*, 1997 ; Niknam et Ebrahimzadeh, 2002; Shahrajabian *et al.*, 2019 )

##### 4.4.2. Composition chimiques d'astragales

Au cours des deux dernières décennies, l'intérêt pour les composants chimiques de diverses espèces du genre *Astragalus* a augmenté, en 2014 l'équipe de Li a répertorié plus de deux cents composants qui avaient été isolés, identifiés et obtenus à partir de 46 espèces d'*Astragalus*, notant plus de soixante flavonoïdes, les acides aminés non protéiques, les saponines, les alcaloïdes, les composés nitrés, les mucilages, les stérols (Ebrahimzadeh *et al.*, 2000 ; Ebrahimzadeh *et al.*, 2001; Shahrajabian *et al.*, 2019) et quatorze oligo-éléments, dont le sélénium, le zinc et le fer, qui sont micronutriments indispensables pour l'homme et même les animaux (Bedir *et al.*, 2000; Shahrajabian *et al.*, 2019).

Les triterpènes de la classe des cycloartanes ont été découverts pour la première fois dans le genre *Astragalus* et sont les plus distingués parmi les triterpènes répandus de ce genre. Une des saponines triterpéniques l'astragaloside IV, qui a été signalé comme étant un composé important responsable de l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T et B et de la production d'anticorps *in vivo* et *in vitro* (Wu *et al.*, 2005). Les flavonoïdes, en général, sont connus pour être des composés biologiquement actifs et posséder des propriétés antioxydantes, capables de réduire les maladies cardiovasculaires (El-Sebakhy., 2000 ; Wu *et al.*, 2005 ; Shahrajabian *et al.*, 2019).

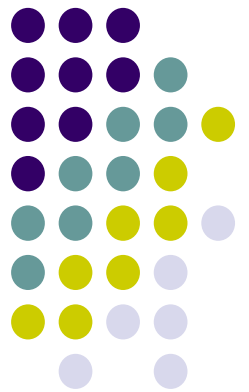
Nous présentons ici un récapitulatif des recherches récentes en phytochimie et en pharmacologie portant sur les différentes espèces d'*Astragale*.

**Tableau 3.** Travaux antérieures, activités pharmacologiques sur le genre *Astragalus*.

Espèce	Activité	Référence
<i>A. mongholicus</i>	Effets antiprolifératifs et apoptotiques	Yan <i>et al.</i> , 2009
<i>A. verus</i>	Effets immunomodulateurs	Nikbakht-Brujeni., 2011
<i>A. monspessulanus</i> L	effet hépatoprotecteur	Simeonova <i>et al.</i> , 2015
<i>A. membranaceus</i> ,	effet hépatoprotecteur	Yimam <i>et al.</i> , 2016
<i>A. echinops</i> , <i>A. logopodioides</i>	Activité antioxydante et hépatoprotective	Fouda <i>et al.</i> , 2017
<i>A. membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	Activitéhépatoprotective	Ali <i>et al.</i> , 2018
<i>A. spruneri</i> Boiss.	Activité antioxydante et hépatoprotective	Kondeva-Burdina <i>et al.</i> , 2018
<i>A. gomboformis</i>	Activité antioxydante	Lekmine <i>et al.</i> , 2021
<i>A. floccosus</i> Boiss.	Activité cicatrisante	Akbari <i>et al.</i> , 2021
<i>A. bruguieri</i>	Activité antioxydante	Aj Jabbar <i>et al.</i> , 2022
<i>A. monspessulanus</i>	Activité antioxydante et hépatoprotective	Kondeva-Burdina <i>et al.</i> , 2022
<i>A. gombo</i> Coss & Dur	Activité antioxydante, phagocytaires, , anticoagulantes et antiprolirative	Bellebcir <i>et al.</i> , 2022
<i>A. globosus</i> Vahl et <i>A. breviflorus</i> DC	Activité antiproliférative	Kalaycı <i>et al.</i> , 2023.

# Matériel et méthodes

---



### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel végétal

L'étude est menée sur la partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs, gousses) d'une espèce spontanée et non domestique *Astragalus gombo* Coss Dur Ex Bunge. Les organes ont été collectés de la station d'Ain Ben Naoui commune de l'Hadjeb en Mars 2017 (Coordonnées du système de positionnement global : 34° 47' 25" N / 5° 35' 49"E, et a une altitude de 146 mètres-dessus du niveau de la mer). La plante a été identifiée au niveau de l'Institut Technique de Développement de l'Agronomie Saharienne, ITDAS, (Biskra, Algérie). L'espèce est répertoriée au spécimen (FA-027) de l'herbarium de l'ITDAS.

Après nettoyage et séchage des parties aériennes à l'abri de la lumière, la poudre est stockée dans des tubes de verre sombres et conservée au réfrigérateur.

#### 1.2. Animaux

Afin d'éviter la variabilité intersexuelle, des Souris mâle BALB/c âgés de 2 à 2.5 mois provenant de l'institut Pasteur d'Alger, pesant entre 28 et 32 g. Les animaux sont maintenus dans l'animalerie du laboratoire dans des conditions standard [température (23±2°C) et un cycle nyctéméral de 12 h / 12 h]. Les souris sont acclimatées pendant dix jours dans des cages en plastique transparent, avec libre accès à l'eau et à l'aliment standard.

#### 1.3. Prélèvement et préparation du Plasma Pauvre en Plaquettaire (PPP)

Le PPP a été préparé d'un mélange de plasma de 10 sujets volontaires, adultes, sains non traités, dont les temps de Quick TQ et temps de céphaline kaolin TCK sont normaux. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction veineuse dans des tubes en plastique citrate (3.2% citrate de sodium), le PPP a été obtenu après une centrifugation de 10 min à 2500 rpm, Le mélange ainsi obtenu est conservé à -10°C jusqu'à son utilisation. Une licence éthique a été obtenue pour l'utilisation de plasma qui a été acquise par le laboratoire de Biochimie, Etablissement Public Hakim Saadane Biskra, Algérie.

#### 1.4. Lignées cellulaires cancéreuse et saines

Trois lignées cellulaires ont été évaluées pour le test de cytotoxicité ; des cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus humain (HeLa) et d'adénocarcinome du sein humain (MCF-7), et des cellules hépatiques de souris normales (Aml12). Les lignées cellulaires ont été obtenues auprès de la société ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.), ont été cultivées dans un milieu de Dulbecco essentiel minimum (DMEM) et du HAMS

F 12 (1:1) supplémenté avec 5 % de sérum bovin fœtal (FBS), 1 % de glutamine, et un mélange d'antibiotique 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO, New York, États-Unis). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Renouveaulement du milieu de culture réalisé tous les trois jours.

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction des composés phénoliques et dosage

#### 2.1.1. Préparation des fractions

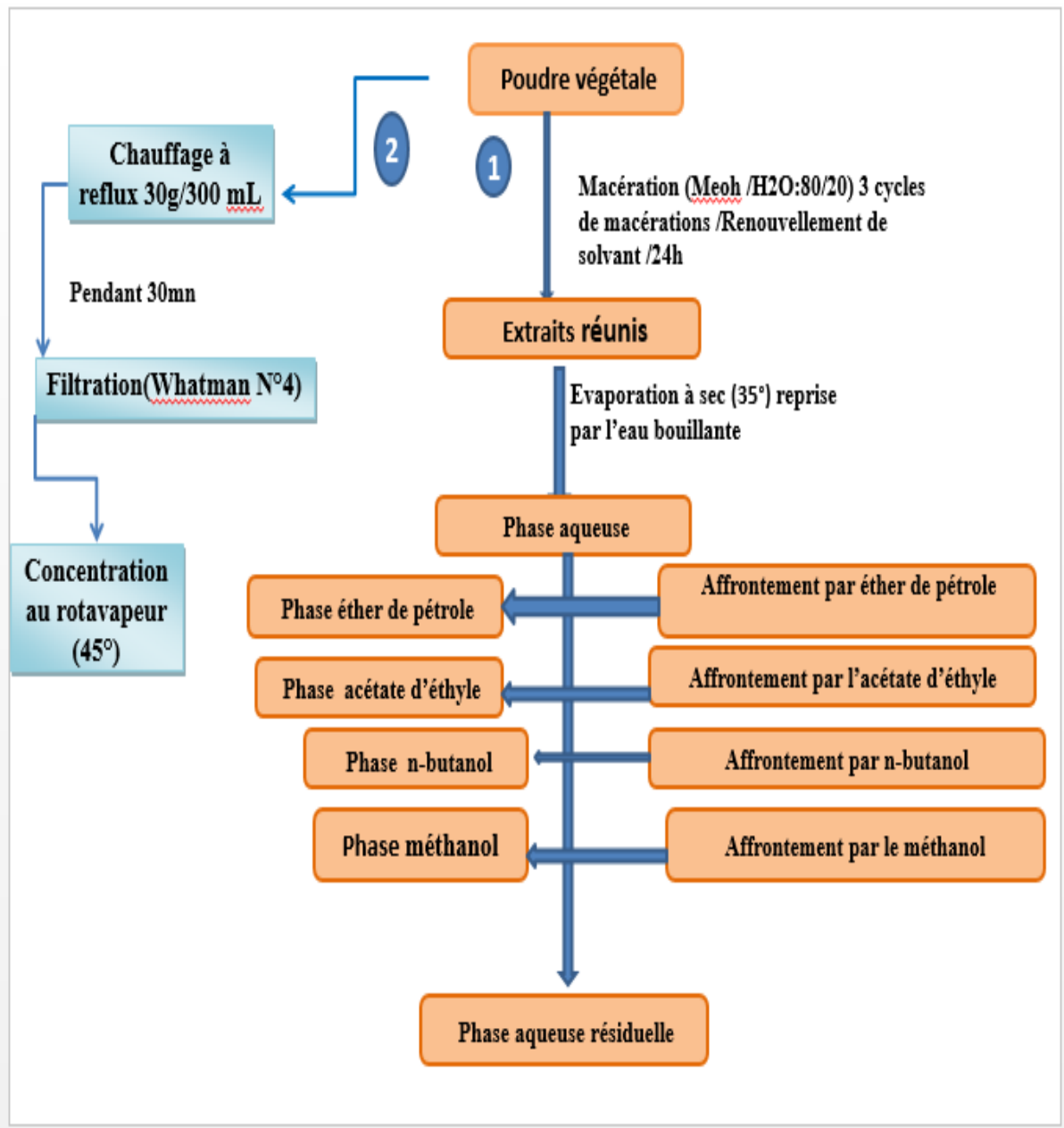
La macération a été réalisée par extraction solide-liquide, un mélange hydro-méthanoïque (20/80 v/v) a été préparé (60 g de poudre d'*A.gombo*) et soumis à trois cycles successifs de macération toutes les 24h (pendant 72 h). Les trois macérations ont été réunies et évaporées (45°) jusqu'à séchage sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph Rotavapor). L'extrait brut a été dissous dans de l'eau bouillante et soumis à une décantation pendant 12 heures afin d'éliminer les résidus. Ce dernier a subi une série d'affrontements successive (extraction liquide-liquide), par différents solvants de polarité croissante, en l'occurrence l'ether de pétrole, l'acétate d'éthyle, le *n*-butanol et le méthanol (Markham, 1982). Les trois phases organiques l'acétate d'éthyle, le *n*-butanol et le méthanol ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif (35°) à basse pression, puis repris par 10 mL du méthanol.

#### 2.1.2. Extrait brut aqueux

L'extrait aqueux a été préparé par la méthode du reflux : 30 g de poudre fine de la partie aérienne ont été portés à ébullition dans 300 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Par la suite le mélange est soumis à une filtration par le papier Whatman N°4, suivie d'une concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif (45°) (Ferreira *et al.*, 2013).

Les fractions obtenues nommées acétate d'éthyle (AEAg), *n*-butanol (NBAg), méthanol (MEAg) et l'extrait aqueux (AQAg) ont été pesées et stockées à 4 ° C pour les différentes analyses.





**Figure 8.** Protocole d'extraction de flavonoïdes via : 1 par fractionnement des phases ; 2 : Extrait brut aqueux.

## 2.2. Dosage des composés phénoliques

### 2.2.1. Détermination des polyphénols totaux (TPT)

Les polyphénols réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en milieu alcalin en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue (Singleton et Rossi, 1999). Une prise de 200  $\mu$ L de chaque échantillon (extrait /fraction) a été ajoutés à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à (10%) et 0,8 mL de solution de carbonate de sodium à 7,5 % dans un tube à essai. Le mélange a été agité pendant 30 min et à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm, par un spectrophotomètre UV-vis Jenway 6310. Les teneurs totaux des polyphénols ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE/g PS).

### 2.2.2. Détermination des flavonoïdes totaux (TFT)

Selon l'équipe de Dewanto (2002), un dosage colorimétrique a été effectué afin de quantifier les flavonoïdes totaux. Une prise de 0,5 mL de chaque échantillon (extrait/fraction) est additionnée de 75  $\mu$ L d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  à 5%, sous agitation pendant 6 min à température ambiante, 0,15 mL de chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  (100 g/L) fraîchement préparé sont ajoutés au mélange. Par la suite 0,5 mL de la soude  $\text{NaOH}$  (1M) sont rajouté au mélange après 5 min de repos, le volume a été ajusté à 2,5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 510 nm contre la même préparation sans échantillon. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg d'équivalent quercétine par gramme de poids sec (mg QE/ g PS).

### 2.2.3. Détermination des tanins condensés (TTT)

Selon le dosage colorimétrique décrit par (Sun *et al.*, 1998), avec des modifications légères, les proanthocyanidins ont été quantifiés par la méthode de vanilline. Un volume de (50 $\mu$ L) dilué de l'échantillon est ajoutée à 3 ml de vanilline /méthanol (4%) et 1500 $\mu$ L d'acide sulfurique concentré  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , le mélange a été bien homogénéisé à l'aide d'un vortex. Après une incubation de 15 min à température ambiante, l'absorbance a été mesuré à 500 nm contre un (blanc) le solvant d'échantillon. Les teneurs totaux des tanins sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de poids sec (mg CE/ g PS).

### 2.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est l'une des techniques d'analyse les plus utilisées pour détecter et quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique grâce à leur fragmentation. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

L'analyse LC-ESI-MS a été réalisée par un spectromètre de masse quadripolaire CL-MS-2020 (Shimadzu, Kyoto, Japon) alimenté par une source d'ionisation par électrospray (ESI) et fonctionnant en mode d'ionisation négative. Masse spectromètre a été couplé en ligne avec un liquide ultra-rapidesystème de chromatographie consistait en un LC-20AD XR système de pompe binaire, échantillonneur automatique SIL-20AC XR, CTO et un four à colonne 20AC et dégazeur DGU-20A 3R(Shimadzu, Kyoto, Japon). Pour l'analyse, une colonne Aquasil C18 (Thermo Electron, Dreieich, Allemagne) (150 mm  $\times$  3 mm, 3  $\mu$ m) connectée à une colonne de garde Aquasil C18 (10 mm  $\times$  3 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Electron) a été utilisée comme phase stationnaire à température ambiante.

La phase mobile contenait deux solvants : A (0,1 % d'acide formique dans H<sub>2</sub>O, v/v) et B (0,1 % d'acide formique dans du méthanol, v/v) avec un gradient d'élution linéaire de 10-100 % B en 45 min a été maintenu à 100% B après 10 min. Pour le ré-équilibre une durée de 5min entre les essais individuels. Le débit de la phase mobile était de 0,4 ml/min, la température est maintenue à 40°C.

Une concentration (4 mg/mL) de chaque des fractions n-butanol, d'acétate d'éthyle et de méthanol a été préparée dans le solvant correspondant, et filtrée à travers un filtre à film de 0,45  $\mu$ m, puis un volume de 5  $\mu$ L a été injectée dans la colonne du chromatographe. Les spectres acquis sont été contrôlés en mode SIM (Selected Ion Monitoring) et traités par le logiciel Shimadzu LabSolutions LC-MS.

Le spectromètre de masse fonctionnait en mode ions négatifs avec une tension capillaire de -3,5 V, un débit de l'azote comme gaz de nébulisation de 1,5 L/min, un débit de gaz sec de 12 L/min pour séchage, une température DL (ligne de dissolution) de 250°C, une température de source de bloc de 400°C, un détecteur de tension de 1,2 V et le spectre de balayage complet de 50 à 2000 Da.

## 2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

### 2.4.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antiradicalaire des fractions d'*A. gombo* ont été évaluées par le test DPPH• selon la méthode décrite par Kirby et Schmidt (1997). Le piégeage du radical libre stable du DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par une molécule antiradicalaire, entraîne la décoloration du DPPH• qui vire du violet au jaune. Brièvement, 500 µL de chaque échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 375 µL d'éthanol et 125 µL d'une solution de DPPH (0,2 mM dans l'éthanol) comme source de radicaux libres. Les mélanges ont été incubés pendant 60 min dans l'obscurité à température ambiante. La capacité de piégeage a été mesurée par le spectrophotomètre JENWAY 7315 à 517 nm. L'absorbance plus faible du mélange réactionnel indiquait une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} + A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Où

**A contrôle** est l'absorbance de la réaction témoin. **A blanc** contient tous les réactifs à l'exception de la solution DPPH, et **A échantillon** c'est l'absorbance des extraits d'*A. gombo*. La quercétine a été utilisés comme contrôle positif. L'IC<sub>50</sub> c'est la concentration de l'échantillon qui réduit 50% du DPPH.

### 2.4.2. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur des (fractions /extrait) d'*A. gombo* est déterminé par la méthode décrite par Yildirim *et al.* (2001). Une prise d'échantillon (0,5 ml) à différentes concentrations ont été mélangées avec 1,25 ml de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1,25 ml de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1% à 1 % (p/v). Les mélanges obtenus ont été incubés pendant 30 min à 50°C. Après 15 min d'incubation à température ambiante, 1,25 ml d'acide trichloroacétique (10 %, p/v) a été rajouté et les mélanges réactionnels ont été centrifugés pendant 10 min à 2500 g. Une aliquote de 1,25 ml du surnageant de chaque échantillon sont additonnés au 1,25 ml d'eau distillée et 0,25 ml d'une solution de chlorure ferrique à 0,1 % (p/v). Après un temps de réaction de 10 min, l'absorbance du mélange a été mesurée à 700 nm. L'absorbance la plus élevée du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur plus élevé. La valeur EC<sub>50</sub> (µg/mL) est la concentration efficace à la quelle l'absorbance égale 0,5.

La valeur de l'EC<sub>50</sub> est obtenue par interpolation de la courbe de régression linéaire. Le BHA a été utilisé comme standard.

### 2.4.3. Chélation de fer

La chélation des ions ferreux des échantillons d'*A. gombo* est évaluée par la méthode de Carter (1971). Brièvement, 100 µL de chaque (fraction/extrait) à différentes concentrations ont été mélangés avec 50 µL de 2 mM FeCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O et incubés à température ambiante pendant 5 min. La réaction a été initiée par l'ajout de 100 µL de solution de ferrozine 5 mM et 2750 µL d'eau déminéralisée. Le mélange est agité vigoureusement et laissé reposer à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance ensuite est lue à 562 nm. L'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe<sup>2+</sup> est calculée comme suit :

$$\text{Pouvoir chélateur\%} = (\text{A control} + \text{A blanc} - \text{A échantillon}) / (\text{A controle})$$

Où :

**Acontrôle** est l'absorbance du témoin (sans échantillon), **Ablanc** est l'absorbance du blanc (sans ferrozine) et **Aéchantillon** est l'absorbance du mélange contenant l'extrait. La valeur EC<sub>50</sub> (µg/mL) est la concentration efficace qui chélate 50 % de Fe<sup>2+</sup>. L'EDTA a été utilisé comme témoin positif.

### 2.5. L'activité phagocytaire

L'index phagocytaire a été déterminé *in vivo* par le test de clairance de carbone (carbone clearance rate test) comme décrit par Biozzi *et al.* (1970) et Ponkshe *et al.* (2002). Les animaux ont été divisés en quatre groupes, contenant chacun six souris. Le choix des deux fractions acétate éthyle et n-butanol a été basé sur leurs teneurs en composés phénoliques, pour évaluer l'activité immunomodulatrice sur du système réticulo-endothélial SRE. Trois doses ont été préparés de chaque fraction (AEAg et NBAg) : 50, 70 et 100 mg/kg dans du NaCl à 0,9 %, respectivement. Le groupe témoin (T<sub>émo</sub>) a reçu seulement 0,9 % de NaCl (0,5 ml/souris), Les trois autres groupes G<sub>50</sub>, G<sub>70</sub> et G<sub>100</sub> ont été, également, administrés par injection intra-péritonéale avec des doses de : 50, 70 et 100 mg/kg poids corporel, respectivement.

Après 48h, la solution d'encre de carbone a été injectée dans la veine caudale pour les quatre groupes à une dose de 0,1 mL/10 g. Le mélange contenait 4 ml de solution saline, 4 ml de solutions de gélatine à 3 % et 3 ml d'encre de chine.

Des échantillons de sang ont été prélevés à 5 et 15 min à l'aide de tube capillaires en verre de la veine rétro-orbitale et mélangés avec 4 ml de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,1% pour la lyse des érythrocytes, directement, la lecture de l'absorbance est effectuée par spectrophotomètre JENWAY 7315 à 675 nm. Par la suite, les souris ont été sacrifiées immédiatement.

L'activité phagocytaire est exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure toutes fonctions du système réticulo-endothélial en contact avec la circulation sanguine. Le taux de clairance est exprimé comme la période de demi-vie du carbone dans le sang (t<sub>1/2</sub>, min). Les calculs ont été effectués par les équations suivantes :

$$K = \frac{\ln OD_1 - \ln OD_2}{t_2 - t_1} \quad t_{1/2} = 0,693/K$$

D1 et D2 sont les densités optiques aux instants t<sub>1</sub> et t<sub>2</sub>, respectivement.

**Tableau 4.** Répartition des groupes des souris selon les doses injectées des fractions préparées.

Traitement	Les groupes	Les doses	Nombre de souris
Contrôle	Gtemoin	0,9% NaCL	6
Fraction NBAg	G50	50mg/kg poids corporel	6
	G70	70 mg/kg poids corporel	6
	G100	100 mg/kg poids corporel	6
Fraction AEAg	G50	50mg/kg poids corporel	6
	G70	70 mg/kg poids corporel	6
	G100	100 mg/kg poids corporel	6

## 2.6. Activité anticoagulante

Afin d'évaluer le pouvoir anticoagulant des composés phénoliques de l'A. *gombo*, les trois fractions AEAg, NBAg, MEAg et l'extrait AQAg ont été évalués *in vitro* face à des molécules

de références : la catéchine, la quercétine et l'acide ascorbique *in vitro* par deux tests de coagulation généraux de la voie exogène et la voie endogène : Temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) et Temps de céphaline kaolin (TCK), respectivement. TQ et TCK sont des tests de laboratoire les plus utilisés chez les patients suspectés d'avoir des pathologies thrombotiques (Rizzo *et al.*, 2008) ; le temps de céphaline kaolin (TCK) permet un dépistage global des déficits en facteurs II, V, VII et X de la voie endogène et la voie commune de la coagulation, le temps de Quick (TQ) permet une exploration semi globale des déficits en facteurs de la voie exogène VII, X, V, II et le fibrinogène (Lee *et al.*, 2003 ; Rizzo *et al.*, 2008).

### **2.6.1. Evaluation du pouvoir anticoagulant de la voie endogène TCK**

L'évaluation du pouvoir anticoagulant des échantillons vis-à-vis de la voie de la coagulation endogène est réalisée à l'aide du test temps de céphaline kaolin (TCK) selon la méthode décrite par Athukorala *et al.* (2007). Tout d'abord, un aliquote de 90 µL de pool de plasma normal a été additionné à 10 µL d'extrait à une concentration de 100 mg/mL, le mélange est incubé à 37° pendant 60 Sec. Ensuite, 100 µL de réactif céphaline-kaolin ont été ajoutés au mélange et incubés pendant 5 min à 37°C.

La coagulation est commencée par l'ajout de 100 µL de CaCl<sub>2</sub> (0,025 M) préchauffé. La coagulation a été exprimée en termes de temps en secondes jusqu'à la formation d'un caillot de fibrine. Le temps de coagulation est déterminé par un coagulomètre optique. Une solution saline normale 0.9% de NaCl a été utilisée comme contrôle négatif, l'héparine et certains composés phénoliques tels que la catéchine, la quercétine et l'acide ascorbique ont été utilisés comme contrôle positif à une concentration de 20 mg/mL. L'effet anticoagulant de cette voie est déterminé par un allongement du TCK en présence des polyphénols par rapport au contrôle négatif.

### **2.6.2. Evaluation du pouvoir anticoagulant de la voie exogène TP**

Pour évaluer le TP, les mélanges de plasma déplaqueté et décalcifié avec des échantillons de différents solvants ont été incubés pendant 10 minutes. Ensuite, 200 microlitres de tromboplastine calcique préchauffée ont été ajoutés au mélange et incubés à 37° pendant 10 mn. Parallèlement, les contrôles négatif et positif auparavant utilisées ont été réutilisées dans les mêmes conditions pour tous les extraits, les deux tests pour tous les échantillons ont été répétés au moins trois fois (n= 3).

## 2.7. Evaluation de l'activité cytotoxique *in vitro* : La fraction d'acétate d'éthyle

### 2.7.1. Teste de viabilité cellulaire : MTT

La succinate déshydrogénase est une enzyme réductase présente dans la membrane interne des mitochondries des cellules viables, ayant la capacité à réduire le substrat jaune MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium en un produit de formazan bleu foncé. Selon Mosmann (1983), l'intensité de la coloration violette du formazan est proportionnelle au nombre des cellules vivantes et à leurs activités métaboliques. Le choix de la fraction testé a été toujours sélectionné sur la base des résultats de l'analyse LC-ESI-MS qui montre sa teneur importante en acide phénolique et en flavonoïdes.

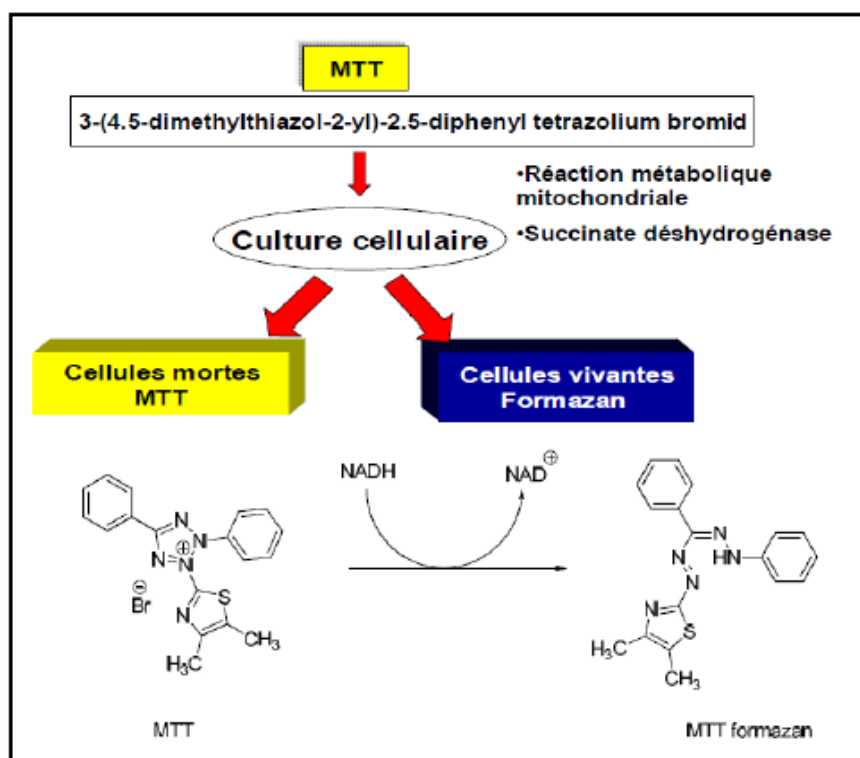


Figure 9. Principe chimique du teste MTT. (Mosmann 1983)

La fraction AEAg a été soumise à une évaluation de viabilité cellulaire par le test MTT selon Mosmann (1983). Les lignées cellulaires ont étéensemencées pendant 24 heures dans des microplaques à 96 puits dans 180 µl de milieu de croissance avec  $1 \times 10^5$  cellules dans chaque puits dans un incubateur aux conditions recommandées (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Les microplaques ont été traitées par la fraction acétate d'éthyle à des concentrations différentes



(3,9 à 2000 µg/mL) et incubées dans les mêmes conditions citées aux dessus. Ensuite, 10 µL de MTT ont été ajoutés à chaque puits (5 mg/mL) et l'incubation a été poursuivie pendant 4 h. Après cela, 100 µL de DMSO ont été ajoutés à chaque puits. L'absorbance (A) a été mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaques.

La cytotoxicité a été exprimée par la concentration d'AEAg qui inhibe 50% (IC<sub>50</sub>) de la croissance cellulaire. Toutes les concentrations ont été testées pour 8 répétitions ; le contrôle deux fois (cellules non traitées).

**L'indice de sélectivité (IS)** est défini, également, comme le rapport entre la concentration toxique d'une molécule et sa concentration bioactive (Indrayanto *et al.*, 2021) selon la formule suivante :

$$IS = \frac{\text{cytotoxicité de la fraction EAAg dans les cellules normales (CC50)}}{\text{cytotoxicité de la fraction EAAg dans les cellules cancéreuses (IC50)}}$$

### **2.7.2. Marquage d'apoptose par la méthode : Coloration des cellules vivantes/mortes par DAPI/ Acridine orange**

Pour évaluer l'apoptose, les cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) et d'adénocarcinome du sein (Mcf-7), ainsi que des cellules hépatiques de souris normales (Aml12) ont étéensemencées dans des microplaques à 24 puits, 1 × 10<sup>5</sup> cellules / puits ont été incubées pendant 24 heures. Ensuite, chaque lignée cellulaire a été traitée avec une concentration IC<sub>50</sub> de la fraction AEA g pendant 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées 3 fois avec une solution saline phosphaté (PBS) puis un 1 ml de milieu a été ajouté aux cellules.

Le colorant DAPI associé à l'Acridine orange a été appliqués selon les recommandations du fabricant. Tout d'abord, 2 gouttes de colorant orange acridine ont été ajoutées, après 10 minutes, deux gouttes de réactif NucBlue® Live Reagent ont été ajoutées. Au final, le total de réactif Live/Dead a été fixé à 30 minutes, le bleu nucléaire à 20 minutes. Les cellules ont été protégées de la lumière puis visualisées par microscopie à fluorescence Zeis (grossissement ×40).

## 1. Evaluation de l'activité toxique *in vivo* de la fraction acétate d'éthyle

### 1.1. Evaluation de la toxicité aiguë

Afin de déterminer la dose létale de la fraction acétate d'éthyle d'*A.gombo*, l'essai limite a été effectué, conformément à la ligne directrice 423 de l'OCDE (OCDE, 2011). L'essai limite est une méthode d'ajustement de dose utilisant le nombre minimum d'animaux indispensables pour évaluer la toxicité aiguë d'une substance /extrait. Cette méthode recommande l'utilisation de trois animaux du même sexe pour chaque étape. Trois doses limites de 300, 2000 et 5000 mg / kg ont été testé, après la mise des souris à jeun pendant 12h (privées de la nourriture) et de l'eau pendant 3 à 4h, les souris ont été pesées et gavées par une seule dose de la fraction d'acétate d'éthyle, et maintenues dans les mêmes conditions pendant 14 jours.

La quantité de nourriture et d'eau consommée a été enregistrée quotidiennement et les souris ont été pesées une fois par semaine. Les souris ont été surveillées pour des signes de toxicité ou mortalités aux cours des 30 premières minutes et périodiquement pendant 24 h, en accordant une attention particulière aux quatre premières heures, puis quotidiennement pendant 14 jours.

### 1.2. Effet protecteur de la fraction acétate d'éthyle sur l'hépatotoxicité induite par la doxorubicine chez les souris

#### 1.2.1. Choix de la dose

L'administration orale de l'AEAg pour le test de toxicité aiguë, n'a montré aucun signe de toxicité ou mortalité jusqu'à 5 000 mg/kg du poids corporel. Pour la présente étude, soit 1/20 de la dose la plus élevée administrée (250 mg/kg p.c) a été sélectionnés (Dahamna, 2004 ; Foudah et *al.*, 2017 ; Kondeva-Burdina et *al.*, 2018).

#### 1.2.2. Procédure expérimentale

Les animaux ont été répartis en 4 groupes (lots) selon le protocole suivant :

- **Groupe 1 (témoin)** : Les souris de ce groupe ont reçu quotidiennement par gavage 10ml/kg d'eau distillée pendant 15 jours. Le 12<sup>ème</sup> jour, ces souris reçoivent une injection de NaCl 9g/l par la voie intra péritonéale.
- **Groupe 2 (AEAg)** : Les souris de ce groupe ont reçu chaque jour par la voie orale une dose de 250 mg/kg p.c de la fraction AEA g pendant 15 jours. Le 12<sup>ème</sup> jour, ces souris reçoivent une injection du de NaCl 9g/l par la voie intra péritonéale

- **Groupe 3 (DOX) :** Les souris de ce groupe ont reçu chaque jour par la voie orale 10 ml/kg d'eau distillée pendant 15 jours. Le 12<sup>ème</sup> jour, ces souris reçoivent une injection du doxorubicine 15 mg/kg par la voie intra péritonéale
- **Groupe 4 (AEAg/ DOX) :** Les souris de ce groupe ont reçu par voie orale une dose quotidienne de (250 mg/kg p.c) de la fraction pendant 15 jours. Le 12<sup>ème</sup> jour, ces souris reçoivent une injection de la doxorubicine 15 mg/kg par la voie intra péritonéale.

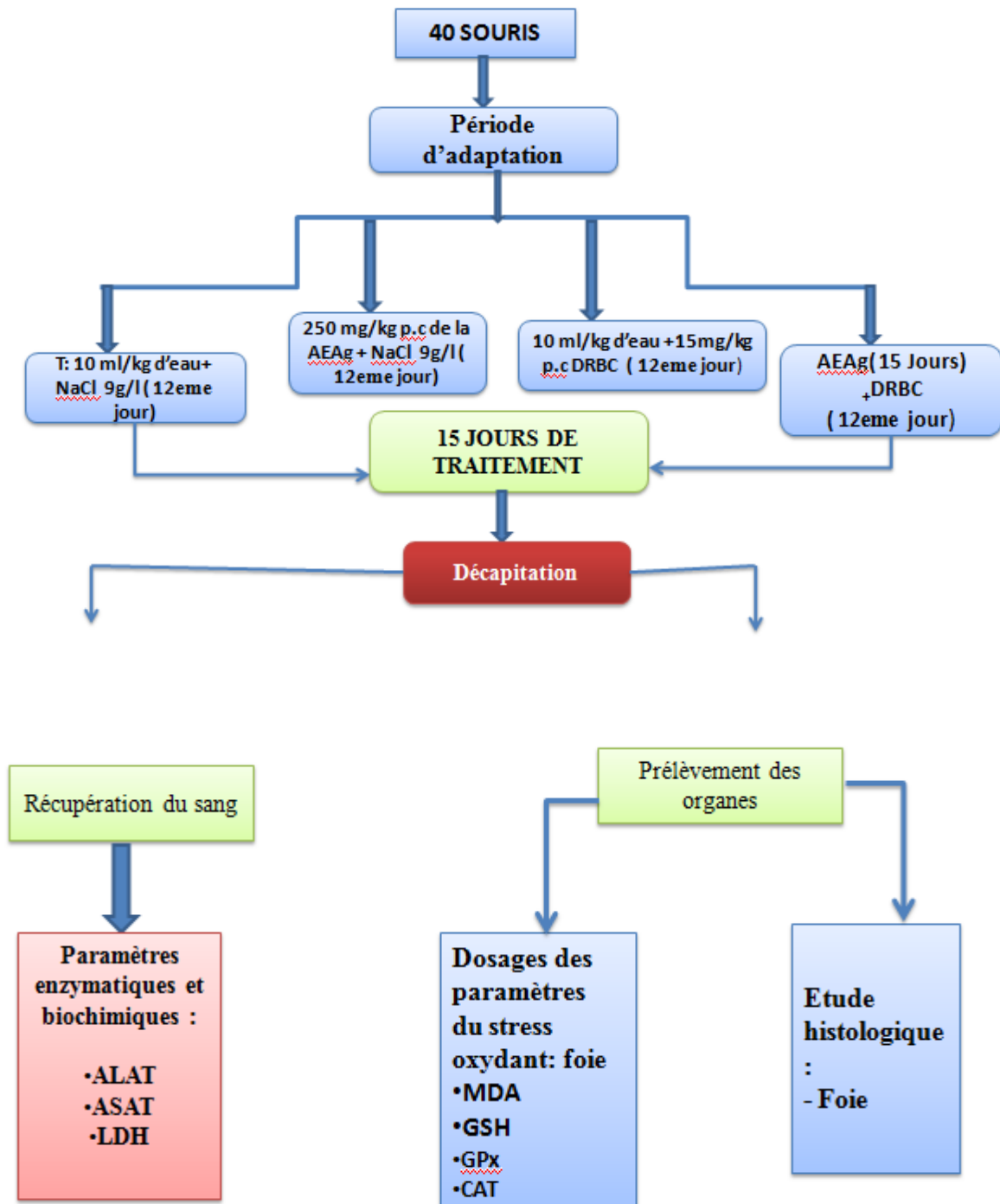


Figure 10. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

### 1.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons (sang et organes ; sérums et homogénats)

Après 15 jours de traitement les souris sont mises à jeun pendant 12h, l'animal a été sacrifié par décapitation, la veine jugulaire étant sectionnée avec une lame chirurgicale. Les prélèvements de sang ont été effectués directement suite à la décapitation et collectées dans des tubes héparinés puis les échantillons de sang ont été centrifugés pendant 15 min à 3000 rpm et à 4 °C, le sérum est soigneusement récupéré et conservé (à -20 °C) pour les analyses biochimiques et enzymatiques (ALAT, ASAT et LDH).

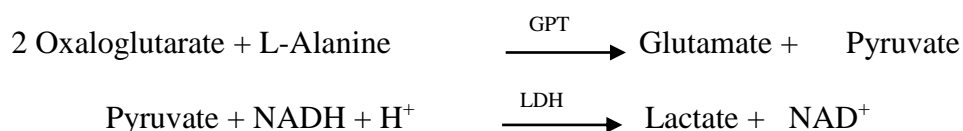
Les organes (foie) de chaque souris ont été rapidement prélevés, pesés, rincés et avant de les mettre dans le Formol 10% pour réaliser les coupes histologiques, une partie de chaque organe a été découpée en petits morceaux pour préparer les fractions tissulaires. Le broyage des tissus a été réalisé, à l'aide d'un homogénéisateur de Daounce, dans du tampon phosphate 0.1M pH 7.4 à froid 4°C après un rinçage abondant dans le même tampon [la fraction cytosolique de tissus du foie 10% (P/V)]. La fraction tissulaire obtenue est mise à une centrifugation de 2000 rpm pendant 10 mn à 4 °C, les échantillons sont stockés à -80 °C, pour l'exploration du stress oxydant.

### 1.3. Dosage des paramètres enzymatiques et biochimiques

Les transaminases l'oxaloacétate de glutamate (TGO) et pyruvate de glutamate transaminase (TGP) des enzymes présentes à l'intérieur des cellules. Ce sont des bons marqueurs des maladies du foie et du cœur. Les lactates déshydrogénases (LDH) également est une enzyme utile pour repérer un ensemble de maux, qui peut aller de l'anémie au cancer.

#### 1.3.1. Dosage de l'activité alanine aminotransférase (ALAT)

Le Glutamo pyruvate transférase (GPT) nommé aussi alanine aminotransférase (ALAT), catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate (Kit SPINREACT). Le schéma de la réaction est le suivant :



GPT : Transaminase glutamique pyruvique ; LDH : Lactate déshydrogénase.

- Préincuber 1 ml de réactif de dosage à 37 °C (constituée d'un mélange de réactif R1 et réactif R2 (v/v)) (voir annexe) ;
- Ajouter 100 µl de sérum au mélange réactionnel ;
- Mélanger et incuber pendant 1, 2 et 3 min à 37 °C ;
- Mesurer la densité optique après 1, 2 et 3 min d'incubation à 340 nm ;

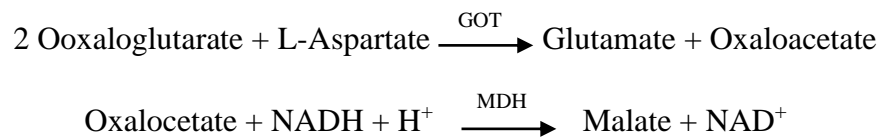
L'activité ALAT est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{ALAT (mg/dl)} = \Delta(\text{DO}_{\text{Échantillon}}/\text{min})$$

Le dosage a été effectuée à l'aide de kit de commerce (SPINREACT), sur un automate multiparamétrique (Diatron PICTUS200) au niveau de laboratoire de Biochimie, Etablissement Public Hakim Saadane Biskra, Algérie.

### 1.3.2. Dosage de l'activité aspartate aminotransférase (ASAT)

Le glutamate oxaloacétate (GOT) appelé aussi aspartate aminotransférase (ASAT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'Aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produite est réduite au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Kit Biomaghreb Réf 20042). Le schéma réactionnel de l'activité est le suivant :



GOT : Transaminase flutanique oxaloacétique ; MDH : Malate déshydrogénase.

- Mélanger et préincuber à 37 °C, 1 ml de la solution de dosage (formée par un mélange de deux réactifs R1 et R2 (v/v)) (voir annexe) ;
- Ajouter à la solution de dosage un volume de 100 µl de sérum ;
- Mélanger et incuber pendant 1, 2 et 3 min à 37 °C ;
- Lire la densité optique après 1, 2 et 3 min d'incubation à 340 nm ;

L'activité ASAT est calculée selon la formule suivante :

$$\text{ASAT (mg/dl)} = \Delta(\text{DO}_{\text{Échantillon}})/\text{min}$$

Avec :

Échantillon : sérum

Le coefficient de conversion : mg/dl x 1750= U/l.

### 1.3.3. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H<sup>+</sup>, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique du lactate déshydrogénase :

- Préparation du réactif du travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 2 jours à 2-8°C ou 12 heures à 15-25°C.
- Réactif 1 : Imidazole (65 mM/L) ; Tampon : Pyruvate (0,6 mM/L) ;
- Réactif 2 : Substrat NADH (0,18 mM/L).
- Dans une température de 37° mélanger et incubé pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.
- L'activité catalytique du lactate déshydrogénase est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité de LDH (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

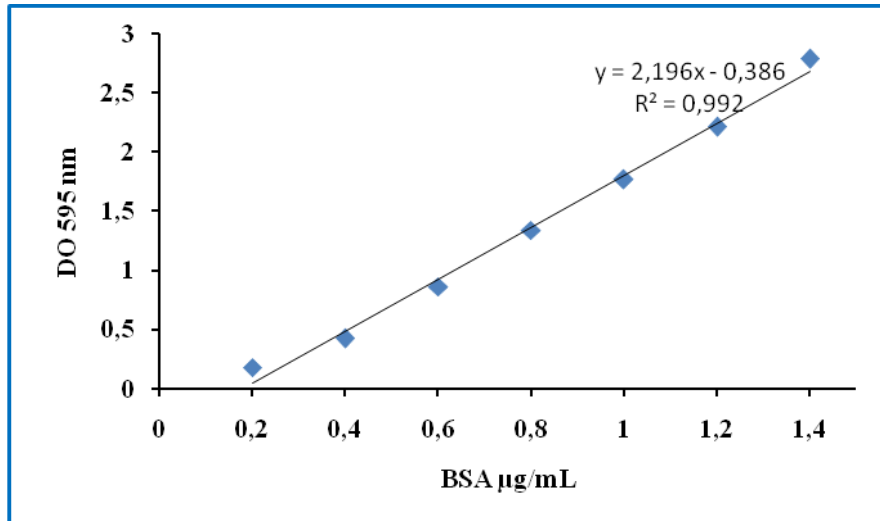
## 2. Effet antioxydant *in vivo* de la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. gombo*

### 2.1. Dosage des protéines tissulaire

Le dosage des protéines a été déterminé par la méthode de Bradford (1976) comme suit : 0,8 ml de l'échantillon préalablement dilué est mélangé avec 0,2 ml du réactif de Bradford ; le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité puis la densité optique est mesurée à 595 nm. La méthode permet de déterminer des concentrations de protéines allant de 1 à 20 µg/ml, en utilisant la BSA (sérum albumine bovine) comme étalon.

$$P (\mu\text{g/ml}) = \frac{DO \times d}{0,0612}$$

Avec : d : Facteur de dilution.



**Figure 11.** Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 µg/ml) pour le dosage des protéines.

## 2.2. Dosages des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finaux formés après la peroxydation des acides gras polyinsaturés par les EROs, et qui altèrent la structure cellulaire. La quantification de cet aldéhyde révèle le niveau de stress causé par la peroxydation lipidique, et le malondialdéhyde est considéré comme le marqueur le plus couramment utilisé pour évaluer le stress oxydant.

Le test de peroxydation lipidique a été réalisé comme décrit par d'Ohkawa et al. (1979), brièvement modifié, 125 µl d'homogénat hépatique et 125 µl de tampon TBS (solution saline) tube blanc puis additionner 50 µl de tampon TBS pH 7,4 et 125 µl de TCA-BHT (voir annexe), pour dé-protéiniser le cytosol. Les mélanges obtenus ont été vortexés puis centrifugés à 1000 tours /min pendant 10 min. Prélever de chaque tube 200 µl du surnageant puis ajouter 40 µl de HCl (0,6 M) et 160 µl du Tris-TBA (voir annexe), les mélanges ont été incubés à 100 °C pendant 10 min, la densité optique du complexe formé (TBA-MDA) a été mesurée à 530 nm. Cette densité optique est proportionnelle à la concentration de MDA et donc de lipides peroxydés. Le calcul des TBARS se fait selon la formule suivante :

$$\text{MDA (nmoles MDA/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{E \times L \times X \times F_d}$$

DO: densité optique lue à 530 nm; E: coefficient d'extinction molaire du MDA ( $E = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); L: longueur du trajet optique ( $L = 0,779 \text{ cm}$ ); X: concentration du cytosol en protéines (mg/ml);



$F_d$  : facteur de dilution,  $F_d = (V_{S1} \times V_S) / (V_f \times V_F)$  avec :  $V_{S1}$  : volume de prise de l'échantillon (125  $\mu$ l);  $V_S$ : volume prélevé du surnageant (200  $\mu$ l);  $V_f$  : volume final à l'incubation à 80 °C (400  $\mu$ l);  $V_F$  : volume final intermédiaire à la centrifugation (300  $\mu$ l) ;  $F_d = 0,2083$ .

### 2.3. Dosage du glutathion réduit (GSH)

La régénération de plusieurs antioxydants tels que la vitamine E et la vitamine C provient de la formation du glutathion (Kern *et al.*, 2011). De coté chimique, le glutathion se compose de trois acides aminés (tripeptide) : la glycine, la cystéine et l'acide glutamique.

Le dosage du glutathion réduit, a été évalué par la méthode décrite par Ellman, (1959). Le principe de cette réaction est de fractionner la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, donnant un acide thio-nitrobenzoïque (TNB) qui absorbe à 412 nm.

Après la préparation de 0.2 ml d'acide sulfosalicylique (0.25%) 0.8 ml de l'homogénat hépatique est ajouté et laisser dans un bain de glace pendant 15 min ; le mélange a été soumis à une centrifugation pendant 15 min (1000 tours/min). Ensuite, 0.5 ml du surnageant est prélevé et ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, pH 9.6), puis 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M a été additionné. Le mélange réactionnel est laissé à une température ambiante pendant 5 min. La lecture des densités optiques à 412 nm contre un blanc réactif.

La concentration du glutathion est calculée selon la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg PROT}}$$

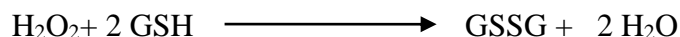
1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8mL homogénat + 0.2 mL de l'acide salicylique) ; D0 : Densité optique ; 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 mL surnageant +1 mL Tris + 0.025 mL DTNB) ; 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

0.5 : Volume du surnageant ; 0.8 : Volume de l'homogénat.

## 2.4. Dosage de l'activité des antioxydants enzymatiques

### 2.4.1. Dosage de l'activité glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. La capacité de cette enzyme est de se combiner avec les composés électrophiles et de se transformer en hydroperoxydes lipidique ou organique selon la formule suivante :



Selon la méthode de Flohé et Günzler (1984), l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée. Brièvement, 200 µl de chaque homogénat hépatique a été additionnée avec 400 µl de glutathion (0,1 mM) et 200 µl de KNaHPO<sub>4</sub> (67 mM) (Dans le tube blanc, on remplace l'extrait par KNaHPO<sub>4</sub> (67 mM)), le mélange a été incubé pendant 5 min à 25 °C puis rajouter 200 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM) pour initier la réaction puis le laisser 10 mn sous agitation, et pour stopper la réaction 1000 µl de TCA 1% a été ajouter.

Les tubes réactionnels ont été centrifugé 10 min à 3000 rpm, 480 µl du surnageant de chaque tube a été récupéré et ajouté à 2200 µl de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,32 M) et 320 µl de DTNB (1 mM). La lecture de la DO à 412 nm dans les 5 min qui suivent l'ajout du DTNB.

L'activité GPx est calculée selon la suivante :

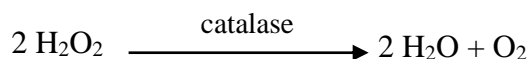
$$\text{GPx (}\mu\text{moles GSH oxydé/min/mg de protéines)} = \frac{(\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 0.04 \times 5}{\text{DO}_{\text{blanc}} \times X \times 10}$$

0,04 : quantité initiale de glutathion par tube ; 5 : Facteur de conversion de l'activité par 1 ml ;

X : concentration de protéines en mg/ml ; 10 : temps de la réaction en min.

### 2.4.2. Dosage de l'activité catalase (CAT)

Les catalases sont des enzymes tétramériques, qui peuvent transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Aebi, 1984). La réaction catalysée par la catalase est une dismutation du peroxyde d'hydrogène.



L'activité catalasique est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6105) par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en faisant réagir 780 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,5) avec 200 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(500 mM) et 20 µl d'homogénat hépatique. L'activité catalase est calculée selon la réaction suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéine}) = \frac{\Delta\text{DO} \times d}{(\epsilon \times L \times X \times 0,02)}$$

$\Delta\text{DO}$  : variation de la densité optique par minute ;  $d$  : dilution de l'échantillon au début ;  $\epsilon$  : coefficient d'extinction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon = 0,043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ;  $L$  : largeur de la cuve ( $L = 1 \text{ cm}$ ) ;  $X$  : concentration de protéines en mg/ml ; 0,02 : facteur de conversion de l'activité de 20 µl à 1000.

### 3. Technique histologique

Les coupes histologiques réalisées au service d'anatomie pathologique de l'EHS maternité gynécologie et pédiatrie de Biskra ont été effectuées selon la technique de Houlot (1984).

#### 3.1. Fixation des échantillons

Les organes (fragment de foie) des quatre lots sont fixés immédiatement après le prélèvement, dans une solution de formol dilué à 10%, afin d'immobiliser les structures cellulaires tout en préservant leurs morphologies et en entraînant leur insolubilité.

##### 3.1.1. Déshydratation

Une fois le macrotome réalisé, les fragments d'organes sont placés dans des cassettes spéciales à paroi perforée et laissés pendant 24 heures dans du formol tamponné. Les échantillons sont ensuite retirés du formol et rincés à l'eau distillée. La déshydratation est réalisée à l'aide d'un automate (Leica TP 1020) qui immerge les cassettes d'échantillons dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène pour l'éclaircissement des tissus, et enfin dans des bains de paraffine liquide qui pénètrent progressivement dans les tissus en remplaçant le solvant. Cette étape a pour but de préparer et de déshydrater les fragments, et de les imprégner du milieu d'inclusion : La paraffine.

##### 3.1.2. Inclusion

Une fois les échantillons saturés de paraffine liquide, ils sont incorporés dans de petits moules à fond plat pour former des blocs faciles à découper, à l'aide du dispositif d'incorporation de paraffine "Leica EG 1150 C", qui contient un réservoir de paraffine maintenu à l'état liquide par un système de chauffage, et une plaque métallique réfrigérée pour solidifier rapidement le

bloc de paraffine qui renferme le tissu. Ce dernier peut se conserver pendant des années sans dommage.

### 3.2. Préparation des coupes

De fines tranches, d'environ 4 à 5 $\mu$ m d'épaisseur, ont été coupées au microtome puis étalées dans un bain de gélatine et d'eau, afin de faciliter la fixation du produit sur des lames porte objet. Les lames ont ensuite été séchées dans une étuve à 100°C, puis placées directement dans du xylène pour le déparaffinage et l'éclaircissement.

### 3.3. Coloration

Avant la coloration, un déparaffinage est indiqué pour l'élimination des débris de paraffine ; pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine, qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 mL d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 mL d'eau distillée + 2 mL ammoniaque) et solution d'Eosine (100 mL eosine solution aqueuse à 3 %, 125 mL alcool éthylique à 95 %, 375 mL d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration se fait selon les étapes suivantes :

- ✓ Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- ✓ Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu

Violacée les structures basophiles (noyaux).

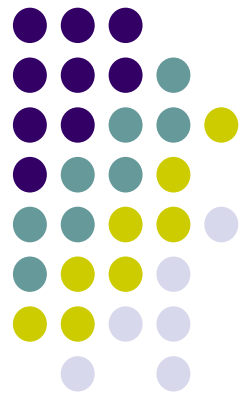
- ✓ Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- ✓ Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- ✓ Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
- ✓ Les échantillons ont finalement été séchés puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

### 2.8. L'analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$ SD (Erreur standard) et moyenne  $\pm$  SEM (Erreur standard sur la moyenne), respectivement. La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA à un facteur suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples des moyennes et la détermination des taux de signification. Le seuil  $P^* < 0,05$  est considéré statistiquement significatives. Nous avons utilisé le logiciel Xl stat.

# Résultats et discussion

---



**Chapitre 1 :**  
**Rendements et Teneurs en Composés**  
**Phénoliques :**  
**Dosage et Analyse par**  
**CLHP /LC-ESI-MS**

**1.1. Rendements et dosage colorimétriques des extraits d’*A. gombo***

**1.1.1. Rendements d’extraction et fractionnement de la partie aérienne de l’*A. gombo***

La poudre fine de la partie aérienne a été soumise à deux méthodes d’extraction différentes. Selon Ferreira *et al.* (2013), la première technique est une extraction à reflux (solide-liquide), qui fournit un extrait brut aqueux après agitation à reflux, filtration et concentration par rotavapeur. La deuxième méthode d'extraction est une combinaison de trois macérations (extraction solide-liquide) d'un solvant hydrométhanolique (80/20) (pendant une période de 72 heures), suivie d'une série de fractionnement avec des solvants de polarité croissante (extraction liquide-liquide). Cette méthode a permis d'obtenir trois fractions (Markham, 1982). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Rendement de l’Extrait aqueux AQAg et de différentes fractions de l’*Astragalus gombo*.

MEAg :fraction méthanolique ; NBAg : fraction n-butanol ; AEAg : fraction acétate d’éthyle.

Extrait	AQAg	MEAg	AEAg	NBAg
Rendement %	18,24	15,52	4,54	8,13

Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent une grande variation entre les différentes fractions organiques et l’extrait aqueux, ce dernier a enregistré le taux le plus élevé suivi par la fraction méthanolique. Cependant, Benferdia *et al.*(2021) rapportent des taux très faible pour les fractionsde méthanol, l’acétate d’éthyle et le n-butanol (4,88 ; 0,150% et 1,294% respectivement) de la partie aérienne de la même espèce *A. gombo* de la région de (Ouargla, Algerie), comparés à ceux de notre étude.

Cette variation est due essentiellement aux techniques utilisées pour l’extraction, qui sont complètement différente, la nature et la composition chimique des composés obtenus et les conditions dans lesquelles l’extraction a été réalisée ; pareillement aux facteurs génétiques et environnementaux (Garza, 2015 ; Gulcin, 2020).



### 1.1.2. Dosage de polyphénol totaux, flavonoïdes et tanins condensés

Le présent chapitre porte sur la caractérisation et valorisation des métabolites secondaires présents dans la partie aérienne (tige, feuille, gousse et graine) de *l'Astragalus gombo*, un dosage colorimétrique des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés a été effectué. Hudz et ces collaborateurs (2019) ont rapporté que le dosage de Folin ciocalteu décrit dans la pharmacopée européenne est l'un des normes de qualité pour les remèdes phytothérapeutiques traditionnels (Erdogan *et al.*, 2014).

Les résultats illustrés dans le tableau 6 présentent les teneurs en polyphénols totaux qui ont été déterminés par le dosage de Folin Ciocalteu. Les teneurs varient de 22,52 à 98,74 mg GAE/g PS, la fraction méthanolique a marqué la teneur la plus élevée suivi par l'extrait aqueux. Ces résultats concordent avec ceux de Niknam et Ebrahimzadeh (2002), dans lesquels la teneur en polyphénols totaux des racines de 20 espèces d'Astragale est plus élevée dans l'extrait (méthanol/eau, 80/20) que l'extrait aqueux. Toutefois, Lekmine et ces collègues (2021) ont rapporté une teneur importante pour l'extrait butanolique de la plante entière d'une espèce de la même famille, *A. gombiformis* Pomel, originaire de la région d'Oued Souf en Algérie. En outre, Fidrianny et son équipe, en 2015, ont démontré que la teneur en composés phénoliques dans un extrait éthanolique d'une plante de la famille des Fabacées, *Phaseolu sradiatus*, était nettement supérieure à celle de l'acétate d'éthyle.

En général, nous avons constaté que les concentrations les plus élevées en composés phénoliques sont détectées lors de l'utilisation d'un mélange de solvant organique et d'eau (solvant hydro-alcoolique) plutôt qu'un solvant organique pur, comme l'ont noté Grujic et ses collègues en 2012. Par ailleurs, Djeridane et son équipe (2010) ont constaté que le choix du solvant d'extraction peut importer des composés non phénoliques tels que les sucres et l'ensemble brut interférer pendant la valorisation des polyphénols où plusieurs molécules réagissent avec le Folin-Ciocalteu. Par conséquent, ces variations peuvent être attribuées aux polarités des métabolites présents dans les matières brutes, principalement à l'effet du solvant (polarité) sur l'extraction, le coefficient de partage...etc. (Cuellar *et al.*, 2018).

De même, les conditions biotiques et/ou abiotiques induisant à un stress oxydant mènent les plantes à accélérer la biosynthèse des métabolites secondaire (Garza, 2015, Gulcin, 2020).

**Tableau 6.** Rendements, teneurs des polyphénols (équivalent mg GAE/ g PS), teneurs flavonoïde et tanins condensés (équivalent mg QE/ g PS and mg CE/ g PS) respectivement de la partie aérienne de l’A. *gombo*

Extrait/ Fraction	TPT (mg GAE/g) Poid sec	TFT (mg QE/g) Poid sec	TTT (mg CE/ g) Poid sec
AQAg	84,48±1,58 <sup>c</sup>	10,20±0,33 <sup>a</sup>	20,71±2,61 <sup>a</sup>
MEAg	98,74±1,75 <sup>d</sup>	47,84±1,22 <sup>c</sup>	25,82±1,39 <sup>a</sup>
AEAg	43,50±1,42 <sup>b</sup>	68,79±1,09 <sup>d</sup>	N D
NBAg	22,52±0,73 <sup>a</sup>	34,46±1,02 <sup>b</sup>	N D

ND : non déterminé. MEAg : fraction méthanolique. AEAg : fraction d’acétate d’éthyle. NBAg : fraction n-butanol. AQAg : extrait aqueux.

Les valeurs sont de moyennes n=3 ; chaque paramètre suivi de la même lettre, dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes à P < 0,05.

Les résultats présentés sur le tableau 6 montrent que la teneur en flavonoïdes la plus élevée a été enregistrée pour la fraction d’acétate d’éthyle suivie par le méthanol, le n-butanol et en fin l’extrait aqueux ; l’analyse de la variance a révélé des différences significatives dans la teneur en flavonoïdes entre les quatre échantillons. De même, Fidrianny et ses collaborateurs (2015) ont constaté que la teneur en flavonoïdes de l’extrait d’acétate d’éthyle est plus élevée que celle de l’extrait aqueux pour les feuilles de *P. radiatus* (Fabacée).

Les résultats de la présente étude sont beaucoup plus significatifs si on les compare à ceux obtenus à partir de la partie aérienne de la même espèce *A. gombo* (Ouargla, Algérie) rapportés par Benferdia *et al.* (2021), notamment des teneurs très proches de nos résultats ont été enregistrées de la fraction n-butanol chez une espèce de la même famille *A. gombiformis* Pomel de la région d’Oued Souf-Algérie (Lekmine *et al.*, 2021). De plus, l’extrait méthanolique a montré la même tendance avec la teneur en flavonoïdes du même extrait pour quatre espèces d’Astragale palestinienne (Jaradat *et al.*, 2017).

En effet, plusieurs travaux antérieurs ont prouvé la présence des flavonoïdes dans la partie aérienne des Astragales algériennes (Benchadi *et al.*, 2013 ; Khalfallah *et al.*, 2014 ; Maamria *et al.*, 2015 ; Labeled *et al.*, 2016 ; Benferdia *et al.*, 2021 ; Lekmine *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus ont montré que les deux extraits méthanolique et aqueux contenaient des tanins, la teneur du MEAg est plus élevée que celle de AQAg, bien qu'aucune différence statistiquement significative n'ait été constatée. Les teneurs en tanins dans les deux fractions AEAg et NBAg n'ont pas été déterminées. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Jaradat *et al.* (2017) et Benferdia *et al.* (2021), qui ont montré que l'extrait méthanolique d'*A. boeticus* et l'extrait aqueux d'*A.gombo* avaient la même tendance que nos résultats, respectivement.

La présence, l'abondance et la variabilité des métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes dans le matériel végétal sont attribuées à un certain nombre de facteurs génétiques et environnementaux, tels que les températures élevées et l'ensoleillement, la sécheresse et la salinité (Djeridane *et al.*, 2010; Garza, 2015 ; Gulcin, 2020) ainsi qu'aux processus d'extraction, aux temps de macération prolongés, aux conditions de stockage et à la présence de composés interférents (Gulcin, 2020).

### **1.2. Identification des composés phénoliques d'*A. gombo* par analyse LC-ESI-MS.**

Les résultats d'analyses quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans les différents extraits de la partie aérienne d'*Astragalus gombo* sont résumés dans les tableaux 7 et 8. Les molécules que nous avons identifiées sont dotées d'activités et de propriétés biologiques significatives.

Afin de confirmer le criblage phytochimique et la teneur en molécules bioactives de la plante d'intérêt, des analyses par chromatographie liquide-électrospray-ionisation-spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS) ont été réalisées et validées par rapport à 35 standards de référence (composés phénoliques et flavonoïdes). Par conséquent, 25 composés ont été identifiés à travers les trois extraits MEAg, AEAg et NBAg (13 acides phénoliques, 12 flavonoïdes).

Les principaux composés ont été détectés dans la fraction d'acétate d'éthyle à des concentrations élevées par rapport aux deux autres fractions ; l'acide *p*-coumarique a été enregistré comme prédominant, suivi par l'acide tans-férulique et l'acide quinique avec des concentrations de 1315, 641 et 370 µg/g d'extrait, respectivement.

De même, une étude récente a montré la présence de ces acides phénoliques (8,99, ND, 6,16 µg/g d'extrait, respectivement) identifiés dans l'extrait butanolique d'*A. gombiformis* par LC-ESI-MS (Lekmine *et al.*, 2021). Plusieurs études ont décrit les importantes propriétés thérapeutiques attribuées à l'acide *p*-coumarique, telles que les propriétés antioxydantes et anti-génotoxiques et le potentiel cosmétique (Ekiert *et al.*, 2014).

En outre, deux acides phénoliques ont été identifiés et quantifiés dans la fraction acétate d'éthyle l'acide 3, 4-di-*o*-caffeoquinique et 4, 5-di-*o*-caffeoquinique avec des valeurs élevées, les travaux antérieurs de Li *et al.* (2018) ont confirmé que cinq dérivés de l'acide di-*O*-cafféoyquinique possèdent un potentiel puissant d'antioxydant et cytoprotecteur sur les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse endommagées par OH (bmMSC).

En particulier, plusieurs acides phénoliques ont été détectés dans la fraction acétate d'éthyle alors qu'ils étaient totalement absents dans les deux autres fractions, tels que l'acide protocatéchique, l'acide trans cinnamique, l'acide gallique et l'acide salviniolique (79,96 ; 65,04 ; 18,76 ; 15,40µg/g d'extrait, respectivement).

De manière générale, les acides hydroxy benzoïques et les acides hydroxy cinnamiques étaient les polyphénols les plus abondants dans la fraction d'acétate d'éthyle et présentaient des concentrations plus élevées que les autres extraits. A l'exception de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique, tous les acides phénoliques énumérés ci-dessus n'ont pas été détectés auparavant dans la partie aérienne du genre *Astragalus* (Benchadi *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014 ; Maamria *et al.*, 2015 ; Lekmine *et al.*, 2021).

Un certain nombre d'études antérieures ont démontré que les acides phénoliques ont des propriétés biologiques appréciables telles que des propriétés immunostimulantes, hépatoprotectrice, anticancérogène, anti-inflammatoire, antimicrobiennes et antioxydantes (Silva *et Batista*, 2017 ; Awad *et al.*, 2017 ; Alagawany *et al.*, 2017 ; Diallo, 2019 ; Lekmine *et al.*, 2021).

**Tableau 7.** Identification des acides phénoliques dans les fractions méthanolique, l'acétate d'éthyle et de n-butanol d'A. *gombo* par analyse LC-ESI-MS.

Acide phénolique		Quantification (µg /g extrait)					
	m/z	MEAg		AEAg		NBAg	
		Ret time	CC (ug/g extrait)	Ret time	CC (ug/g extrait)	Ret time	CC (ug/g extrait)
Acide quinique	191.00	2.05	314,566	2.05	370,455	2.05	226,820
Acide gallique	169.00	-----	N.D	3.97	18,766	-----	N.D
Acide protocatechuique	153.00	-----	N.D	6.84	79,960	-----	N.D
Acide 4-O-caféoylquinique	353.00	11.45	5,489	11.51	2,539	11.55	6,245
Acide caféique	179.00	-----	N.D	14.30	19,365	14.35	1,206
Acide syringique	197.00	15.82	0,472	15.90	30,904	15.96	7,872
Acide p-coumarique	163.00	20.75	61,248	20.79	1315,182	20.90	57,564
Acide trans-frulique	193.00	22.89	29,718	22.91	641,787	22.91	7, 633
Acide O-coumarique	163.00	26.13	2,144	26.07	5,453	26.07	2,567
Acide 3,4-di-O-caféoyquinique	717.00	-----	N.D	28.18	17,700	-----	3,708
Acide 4,5-di-O-caféoyquinique	515.00	24.96	7.24	24.96	262,332	24.84	27,710
Acide salvioquinique	515.00	26.83	30.42	27.14	15,406	27.03	N.D
Acide trans cinnamique	147.00	-----	N.D	31.88	65,049	-----	N.D

N.D : Non déterminé

Les données de LC-ESI-MS ont également révélé que les flavonoïdes détectés et leurs dérivés ont été attribués à la polarité du solvant d'extraction. Le profil chromatographique d'*A.gombo* a montré la richesse des trois fractions en flavonoïdes dont la fraction d'acétate d'éthyle est dominante par dix flavonoïdes.

Les composés majoritaires de la fraction AEAg sont (Cirsiliol, quercetine-3-*O*-galactoside, lutéoline avec 1115,5, 491,56 et 151,68 µg/g extrait, respectivement) suivi par (la quercetine, l'apégénine-7-*O*-glucoside et silymarine avec 75,40, 19,96 et 9,13 µg/g extrait, respectivement) et avec faible quantité des composés suivants : la catechine, l'apigénine, le kaempférol et la naringénine.

La fraction MEAg a révélé cinq flavonoïdes dont le cirsiliol représente le composé principal avec 140 µg/gextrait. Sept composés flavonoidiques ont été détectés dans la fraction NBAG, dont exclusivement la quercetine-3-rhamonosid (17,90µg/g extrait). D'après ces données, les molécules que nous avons identifiées sont connues pour leurs activités antioxydantes et leur potentiel à piéger les radicaux voire à bloquer la génération de nouveaux radicaux, à savoir leurs actions comme des donneurs d'électrons ou d'hydrogène (Pereira *et al.*, 2009 ; Skotti *et al.*, 2014).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs qui ont avéré la richesse de la partie aérienne en composées phénoliques chez les Astragales algériennes (Benchadi *et al.*, 2013, Khalfallah *et al.*, 2014, Maamria *et al.*, 2015 ; Lekmine *et al.* ; 2021; Benferdia *et al.*,2021). Les travaux menés par Forgo *et al.* (2012) ; Awad *et al.* (2017) Prasad *et al.* (2019) ont rapporté que le cirsiliol présentait une activité cytotoxique contre les cellules Hela, MCF-7, A431 et les cellules de mélanome métastatique B16F10, respectivement.

Au cours des dernières décennies, les substances naturelles biologiquement actives telles que les composés phénoliques ont suscité un grand intérêt en raison de leur biodisponibilité, de leurs composés plus sûrs et de leur sélectivité éminente pour éliminer plus efficacement les cellules cancéreuses (Oueslati, 2013).

**Tableau 8.** Identification des flavonoïdes dans les fractions méthanolique, l'acétate d'éthyle et de n-butanol d'A. *gombo* par analyse LC-ESI-MS.

Flavonols		Quantification (µg /g extrait)					
		MEAg		AEAg		NBAg	
	m/z	Ret time	CC (ug/g extrait	Ret time	CC (ug/g extrait	Ret time	CC (ug/g extrait
Catéchine (+)	289	-----	N.D	10.30	1,675	-----	N.D
Hyperoside (quercétine-3-O-galactoside)	463.00	24.22	61,554	24.30	491,566	24.30	15,530
Quercetrine (quercétine-3-O-rhamonoside)	ND	-----	N.D	N.D	N.D	26.33	17,903
Apegenin-7-O-glucoside	431.00	26.33	29,599	26.33	19,974	26.33	22,332
Quercétine	301.00	-----	N.D	31.75	75,406	-----	N.D
Kamphérol	285	-----	N.D	31.76	3,550	-----	N.D
Naringénine	271.00	33.74	0,252	33.75	4,999	33.74	0,245
Silymarine	481	-----	N.D	33.34	9,131	33.67	11,156
Apegénine	269.00	-----	N.D	34.20	2,604	-----	N.D
Lutéoline	285.00	34.78	23,072	34.77	151,684	34.82	35,182
Cirsiliol	329.00	35.49	140,280	35.50	1155,504	35.48	28,964
Acétine	ND	-----	N.D	N.D	N.D	40.06	0,205

N.D : Non déterminé

**Chapitre 2 :**  
**Exploration des potentialités**  
**biologiques des différents extraits**  
***d'Astragalus gombo***



## 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Par définition et de point de vue chimique, les antioxydants sont des espèces chimiques ou un composé plus au moins complexe qui réagissent avec un oxydant pour le neutraliser. L'importance des antioxydants peut se résumer à la prévention de la synthèse des radicaux libres et la désactivation des EROs, leur classement est dépendant de leurs mécanismes d'actions, tels que piégeage des radicaux libres, chélation des métaux, l'inhibition des enzymes en particulier des oxydases et activation des enzymes antioxydantes (Pernin, 2018).

**Tableau 9.** Propriétés antioxydantes des extraits /fractions de la partie aérienne d'*A. gombo*.

Test du radical DPPH. Exprimée en  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), pouvoir réducteur de fer exprimée en  $CE_{0.50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) et capacité chélatrice des ions ferreux exprimée en  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ )

Extrait/fractions	Test DPPH $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Test FRAP $CE_{0.50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Test CCIF $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
AQAg	$91,29 \pm 0,88^e$	$174,30 \pm 6,97^d$	$321,16 \pm 1,59^d$
MEAg	$104,53 \pm 2,09^d$	$109,36 \pm 2,73^b$	$510,01 \pm 0,37^e$
NBAg	$30,55 \pm 1,35^c$	$127,51 \pm 2,56^c$	$114,56 \pm 2,77^c$
AEAg	$18,18 \pm 0,29^b$	$90,44 \pm 3,80^a$	$83,005 \pm 0,009^b$
BHA	-----	$100,56 \pm 5,71^{a,b}$	-----
EDTA	-----	-----	$51,57 \pm 0,00^a$
Quercétine	$6,81 \pm 0,07^a$	-----	-----
Acide ascorbique	$11,29 \pm 0,11^{ab}$	-----	-----

MEAg : fraction méthanolique. AEAg : fraction d'acétate d'éthyle. NBAg : fraction n-butanol. AQAg : extrait aqueux. Les valeurs sont de moyennes  $n=3$  ; chaque paramètre suivi de la même lettre, dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

### 2.1.1 Capacité de piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation des propriétés antioxydantes d'*Astragalus gombo* des extraits (acétate d'éthyle, n-butanol, méthanol et aqueux) n'avait pas été étudié auparavant. Les effets de piégeage des différentes fractions sur le radical DPPH ont été influencés de manière significative par la nature du solvant (tableau 9).

Les  $IC_{50}$  s'étendent plus de 5 fois sur la plage de valeurs. Les deux fractions AEAg et NBAg ont été montrés l'activité la plus élevée par rapport à la fraction méthanolique et l'extrait aqueux

AQAg et MEAg avec 18, 30, 91 et 104 µg/mL, respectivement. De même, les deux fractions AEAg et NBAg se sont avérées plus puissantes que les mêmes fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol des gousses d'*A.armatus* Algérien (Labeled *et al.*, 2016).

En effet, la fraction AEAg a révélé un puissant pouvoir antioxydant proche d'IC<sub>50</sub> du standard de référence l'acide ascorbique avec 18 et 11 µg/mL, respectivement (Li *et al.*, 2009). Cette fraction a révélé un puissant effet scavenger qu'est probablement due à sa richesse en acides phénoliques et surtout en flavonoïdes et à leur effet synergique.

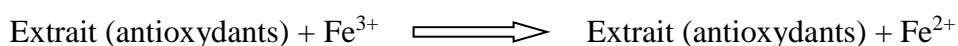
À cet égard, Fitriansyah et ses collaborateurs (2017) ont confirmé qu'une forte capacité antioxydante prouvée par la méthode DPPH et FRAP était liée à la quantité élevée de composés phénoliques et de flavonoïdes totaux. Ainsi, nos résultats (tableau 8) confirment une forte corrélation positive et significative entre les teneurs en TPT, TFT, TTT et l'IC<sub>50</sub> de la méthode de piégeage du radical DPPH  $r^2 = 0,91, 0,97$  et  $0,83$ , respectivement.

Une étude récente menée par Benferdia et ses collaborateurs (2021), ont marqué une corrélation modérée entre le TPC et l'effet scavenger du DPPH ( $r^2 = 0,78$ ) chez *A. gombo* de la région de Ouargla.

La présente étude a montré la richesse de la plante en acides phénoliques tels que le *P*-coumarique et l'acide quinique, et surtout les flavonoïdes ont enregistré une meilleure corrélation hautement significative ( $r^2 = 0,97^{**}$ ). Ces résultats sont en bon accord avec ceux trouvés par Li *et al.* (2018) et Diallo *et al.* (2019) qui ont montré que les acides phénoliques sont considérés comme les meilleurs donneurs d'hydrogène compétents en raison de leurs groupes carboxyliques qui s'ionise facilement.

### 2.1.2 Pouvoir réducteur du fer

Selon Huang et ses collaborateurs (2005), ce pouvoir réducteur est basé sur la réaction (oxydo-réduction) qui a lieu entre les antioxydants des extraits de plante (donneurs d'électrons) et les ions Fe<sup>3+</sup> (accepteur d'électron) en acceptant un électron cédé par les antioxydants.



Le pouvoir réducteur des quatre extraits a été testé selon la méthode de Yildirim *et al.* (2001), ont considéré dans l'ordre suivant AEAg > BHA > MEAg > NBAg > AQAg (tableau 9).

Ces résultats ont indiqué que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration des composés dans l'extrait, tandis que l'efficacité de réduction est inversement proportionnelle à

la valeur d'CE<sub>50</sub>. La fraction acétate d'éthyle a montré un pouvoir réducteur plus puissant que celui du témoin positif BHA en présentant un CE<sub>50</sub> de 90,44 et 100,56 µg/mL, respectivement. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre le BHA (100,56 µg/mL) et le MEAg (109,36 µg/mL) à (p < 0,05).

Nos résultats mettent en évidence l'importante capacité des deux extraits AEA<sub>g</sub> et MEA<sub>g</sub> à réagir avec les radicaux libres et les transformer à un complexe plus stable qui forme un potentiel mécanisme antioxydant. D'une manière générale, l'analyse de corrélation de Pearson a révélé une corrélation hautement significative et négative entre les teneurs de TPC, TFC, TCT et l'EC<sub>50</sub> de FRAP ( $r^2 = -0,91, -0,98$  et  $-0,83$ , respectivement).

Les résultats de la présente étude sont conformes à ceux rapportés par Fidrianny *et al.* (2015), qui ont prouvé que le TPC dans les feuilles de *Glycine max* (Fabaceae) des deux extraits l'acétate d'éthyle et l'éthanol présentaient une corrélation négative et la plus élevée avec l'CE<sub>50</sub> de FRAP.

Le niveau de corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante soutient l'hypothèse selon la quelle les polyphénols contribuent directement à la capacité antioxydante. De plus, Deghima *et al.* (2020) ont défini les composés phénoliques comme d'excellents donneurs d'électrons. Néanmoins, Djeridane *et al.* (2006) supposent que l'effet synergique des composés phénoliques contribue aux pouvoir antioxydant des plantes.

Par ailleurs, Pernin (2018) estime que le potentiel redox dépend aussi de l'association des facteurs primordiaux tels que : La structure chimique des composés, les substituant des groupements phénoliques (OCH<sub>3</sub> et OH) et la conformation stérique du composé. A titre d'exemple, la (+) catéchine a la chance quatre fois plus de céder un atome d'hydrogène face à la (-) épicatechine.

### 2.1.3 Capacités de chélation des ions ferreux

Les composés phénoliques jouent un rôle majeur à la transition des ions métalliques, en particulier Fe<sup>2+</sup>, ce qui conduit à la formation d'un produit de chélation doué d'un important mécanisme d'activité antioxydante. Ainsi, cette activité possède une capacité de catalyser la décomposition de l'hydro-peroxyde en radicaux pyroxyles et alcoxyles et les réactions de type Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Demirtas *et al.*, 2013 ; Pernin, 2018).

Les résultats du test d'activité chélatrice (voir tableau 9) des différents solvants de la partie aérienne de l'*A.gombo* et de l'EDTA par rapport au fer ferreux ont gardé le même classement que l'activité antiradicalaire DPPH, à savoir EDTA >AEA<sub>g</sub>>NBA<sub>g</sub>>AQA<sub>g</sub>>MEA<sub>g</sub> (51, 83, 114, 321 et 510 µg/mL).

Les résultats de la présente étude sont nettement plus importants que ceux obtenues à partir d'un extrait méthanolique de trois espèces d'Astragales Turque : *A. gymnologus*, *A. leporinus var. hirsutus*, et *A. onobrychis* avec 1,53, 1,15 et 1,69 mg/ml, respectivement (Sarikurkcu *et al.*, 2020). Cependant, la même tendance a été noté avec les résultats de Ceylan et ses collaborateurs (2016) pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne des deux Fabaceae Turques : *Cytisopsis dorycniifolia* et *Ebenus hirsute*.

En outre, l'extrait aqueux présente une grande capacité à chélater les ions ferriques que l'extrait méthanolique, malgré son faible contenu en composés phénoliques, ces résultats corroborent ceux de Deghima et ses collaborateurs (2020).

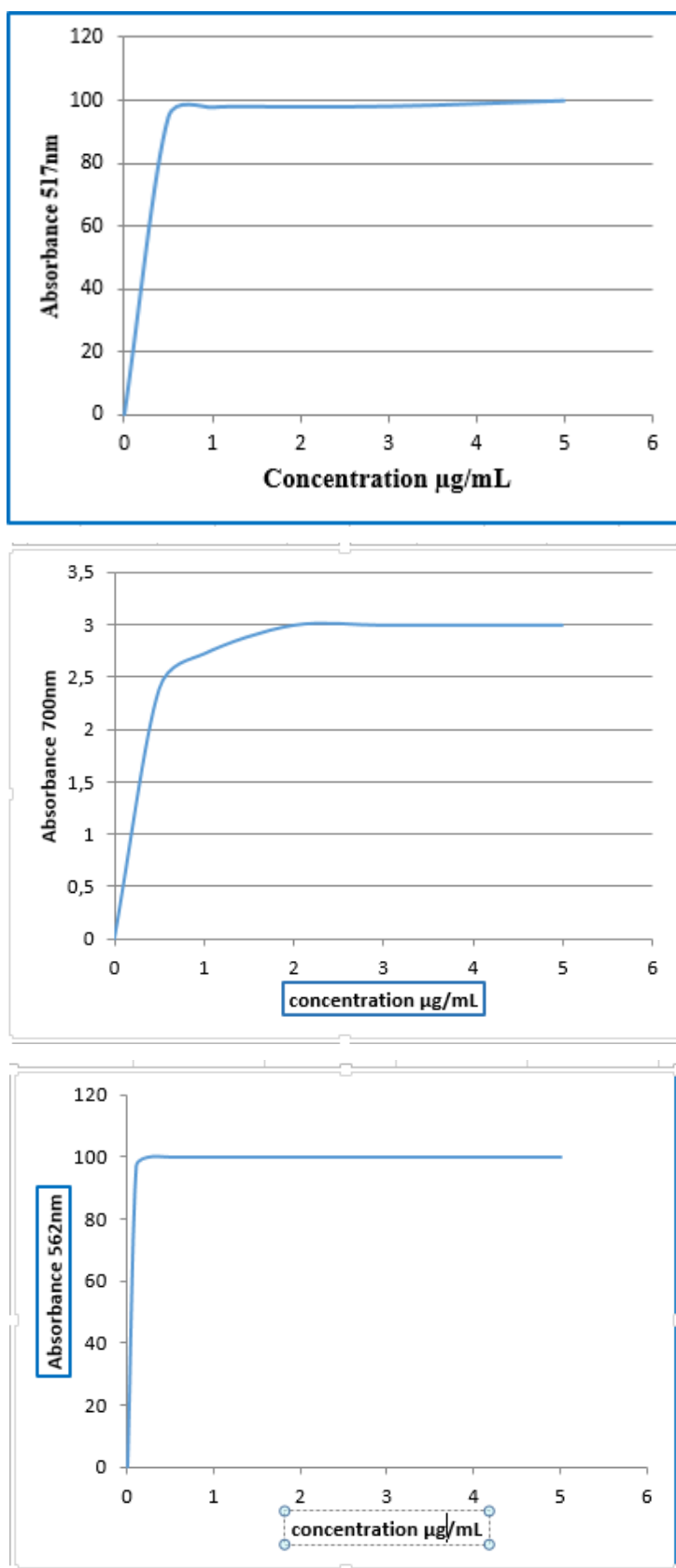
En effet, plusieurs études ont montré que l'extrait aqueux possède une activité chélatrice envers les ions de métaux bien distincte que le méthanol et l'acétone à 70% (Sahreen *et al.* 2010 ; Deghima *et al.*, 2020). Les données de ce travail montrent une corrélation de Pearson hautement significative entre les flavonoïdes, les polyphénols totaux et le CE<sub>50</sub> de la capacité chélatrice ( $r^2= 0,99$  et  $0,97$  respectivement) ; ce qui permis de suggérer que cette importante capacité est dû à un effet synergique entre les différent classe phénoliques (Djeridane *et al.*, 2006).

Par conséquent, des travaux antérieurs ont démontré que les acides phénoliques et les flavonoïdes ont une capacité de chélation notable vis-à-vis des ions métalliques tels que Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> et Cu<sup>+2</sup>(Tigrine, 2014 ; Alavi et Karimi, 2018) ; en particulier, le pouvoir chélateur de certains flavonoïdes s'explique par leurs capacités à chélater les métaux par l'intermédiaire de leurs groupements hydroxyles, notamment ceux des deux cycles A et C (Andjelković *et al.*, 2006 ; Verdan *et al.*, 2011).

**Tableau 10.** Coefficient de corrélation de Pearson entre les teneurs en composés phénoliques dans divers extraits et leurs IC<sub>50</sub> correspondants pour les activités antioxydantes.

Extraits/frations	DPPH	FRAP	CCIF
TPT	0,91*	-0,90*	0,96**
TFT	0,97**	-0,98**	0,99***
TTT	0,82*	-0,82*	0,74 <sup>ns</sup>

(P < 0,05) ns, non significatif ; \*, significatif (P < 0,05) ; \*\*, très significatif (P < 0,01) ; \*\*\*, très hautement significatif (P < 0,001). TPT : Teneur polyphénols totaux ; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux, TTT : tanin condensé total



**Figure 12.** (A) : Courbe d'étalonnage du radical DPPH par le control positif la quercétine, (B) : Pouvoir antioxydant réducteur du fer du BHA ; (C) :l'activité chélatrice envers le fer ferreux par rapport au contrôle positif l'EDTA.

Chaque point représente la moyenne SD (n=3).

### 2.2. Evaluation de l'activité immunomodulatrice

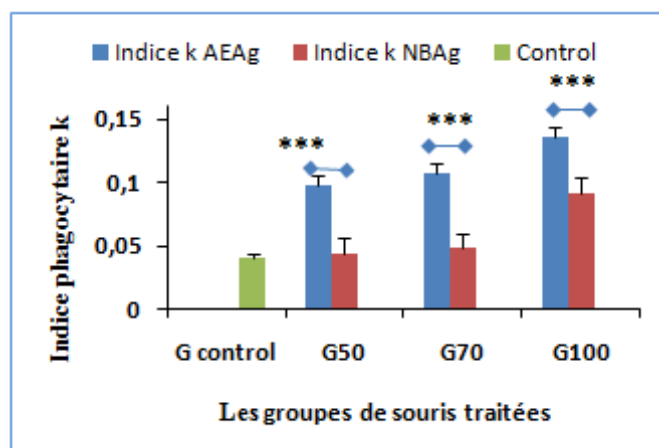
Le système réticulo-endothélial (RES) ou système phagocytaire mononucléé (SPM) est un ensemble de cellules qui jouent un rôle important dans le système immunitaire. Le RES est composé de macrophages, de monocytes, de cellules dendritiques et d'autres cellules qui peuvent englober et digérer des particules étrangères, telles que des agrégats de fibrine, des bactéries, des virus et des cellules mortes.

Ce processus est défini par la phagocytose typique du système immunitaire inné, qui conduit la cellule à détecter, internaliser et détruire les bactéries, champignons ou cellules mortes d'un diamètre supérieur à 0,5  $\mu\text{m}$  (Zak, 2019). Le RES est présent dans tout le corps, mais il est particulièrement concentré dans le foie, la rate, la moelle osseuse et les poumons.

#### 2.2.1. Indice phagocytaire K

L'indice phagocytaire des fractions AEAg et NBAG a été déterminé *in vivo* par le test de clairance de carbone comme décrit par Biozzi *et al.* (1970) et Ponkshe *et al.*, (2002). La détermination de cette activité, exprimée par l'indice phagocytaire (K), s'effectue en mesurant les particules de carbone circulant dans le sang pendant un intervalle de temps défini. Le potentiel du système réticulo-endothélial dépend de l'estimation du taux d'élimination des corps étrangers par le sang, tels que le carbone colloïdal « encre de chine » (Benmebarek *et al.*, 2013).

Les données actuelles indiquent qu'il existe des différences significatives dans les moyennes de l'indice phagocytaire (K) entre les groupes G<sub>50</sub>, G<sub>70</sub> et G<sub>100</sub> des deux fractions avec valeur de  $p < 0,0001$  et  $p < 0,001$  pour AEAg et NBAG, respectivement, par rapport au groupe témoin qui n'a reçu que de l'eau physiologique.



**Figure 13.** Effet des fractions AEAg et NBaAg sur l'activité phagocytaire de groupes de souris.

Les souris ont été injectées avec des différentes concentrations 0, 50, 70 et 100 mg/kg d'AEAg et de NBaAg préparés dans du NaCl à 0,9 %, le control est injecté par NaCl à 0,9 %.

Les valeurs sont la moyenne de  $n = 6 \pm SD$ , \*\*\*  $P < 0,001$  différence hautement significative (test Tukey) par rapport au contrôle non traité

L'indice phagocytaire de la fraction AEAg a augmenté de manière hautement significative dans les groupes **G50**, **G70** et **G100** avec des valeurs de K : 0,097, 0,107 et 0,136, respectivement, par rapport à **Gcontrol** (0,040) (figure 13). Alors que les groupes injectés par NBaAg avaient un indice phagocytaire non significatif pour les deux doses 50 et 70 mg/kg pc. Pratiquement, **G100** (0,091) a montré un effet hautement significatif ( $p < 0,001$ ) par rapport **Gcontrol**, **G50** et **G70** (0,040, 0,044 et 0,047 respectivement). En effet, plus la dose de la fraction injectée est élevée, plus la réponse phagocytaire est importante.

La présente étude est en accord avec les résultats de Labeled et ses collaborateurs (2016) menée sur la fraction n-butanol de l'*A. armatus* algérien attestant d'un indice phagocytaire K plus élevé à la même dose de 100 mg/kg. Ainsi, les résultats de la présente étude indiquent que les deux fractions améliorent l'activité phagocytaire en stimulant le système réticulo-endothélial de manière dose-dépendante, où la fraction d'acétate d'éthyle a stimulé l'activité phagocytaire mieux que le n-butanol. Ceci explique l'élimination rapide des particules de carbone (l'encre de Chine) injectées dans la circulation sanguine par la fraction AEAg par rapport NBaAg, ce qui permet de conclure que l'AEAg peut être utilisé comme immunostimulant pour améliorer l'efficacité du système immunitaire non spécifique (innée) (Benmebark *et al.*, 2013 ; Zerizer *et al.*, 2015).

Dans le même contexte, Nikbakht-Brujeni *et al.* (2013) ont rapporté que l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*A. verus* Olivier augmente l'activité phagocytaire à une dose de 100mg/kg par rapport aux extraits de méthanol et d'acétone à la même dose.

Les résultats obtenus par l'analyse LC-ESI-MS révèlent la richesse des extraits d'*A.gombo*, en particulier la fraction d'acétate d'éthyle, en termes de flavonoïdes et d'hydroxycinnamiques. La teneur en acide *p*-coumarique de la fraction AEA<sub>g</sub> est 70 fois plus élevée que celle de l'acide caféique, les cinq dérivés de l'acide di-*O*-caféoyquinique sont 5 fois plus élevés que l'acide caféique, et il faut noter une teneur importante en acide quinique dans les deux fractions ; ceci suggère que l'activité phagocytaire est stimulée par l'effet des acides hydroxycinnamiques en général et par leur synergie, et n'est pas spécifique à l'acide caféique. En revanche, les résultats de Kilani-Jaziri *et al.* (2017), qui affirment un effet immunomodulateur significatif, particulièrement obtenu par l'acide caféique, par rapport à ceux des acides férulique et *p*-coumarique.

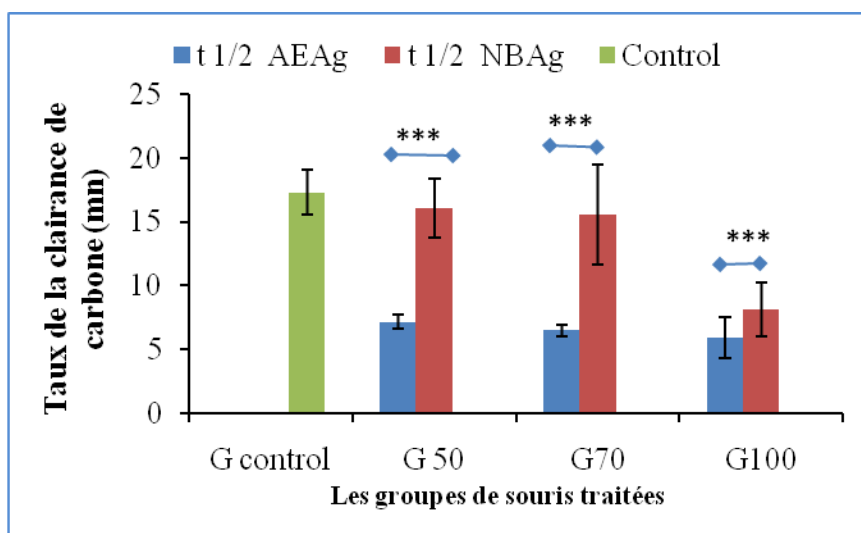
### Taux de la clairance de carbone

La figure (14) présente les résultats obtenus lors du test de la clairance de carbone. Après 48 h d'administration intra-péritonéal des deux fractions, l'AEA<sub>g</sub> a révélé un taux de clairance de carbone plus rapide que la NBA<sub>g</sub> ( $p < 0,001$ ). En outre, les deux fractions ont montré une différence significative entre les moyennes des groupes (**G<sub>control</sub>**, **G<sub>50</sub>**, **G<sub>70</sub>** et **G<sub>100</sub>**) avec une valeur de  $p < 0,001$ . La fraction AEA<sub>g</sub> a fortement contribué à la demi-vie du carbone colloïdal, et ce de manière hautement significative dans les groupes (**G<sub>50</sub>**, **G<sub>70</sub>** et **G<sub>100</sub>**) par rapport au **G<sub>control</sub>**. Parallèlement à la fraction NBA<sub>g</sub>, dont (**G<sub>100</sub>**) est plus rapide et hautement significative par rapport aux autres groupes.

Par conséquent, la réduction de la demi-vie de clairance du carbone colloïdal est proportionnelle à l'augmentation de l'indice phagocytaire. Cette augmentation correspond à une amélioration de la fonction phagocytaire des macrophages et de l'immunité non spécifique (innée). Les macrophages sont des cellules du système immunitaire responsables de la phagocytose, c'est-à-dire de l'opsonisation, l'internalisation et de la digestion des particules étrangères. Le taux d'élimination du carbone du sang par les macrophages est déterminé par une équation exponentielle (Biozzi *et al.*, 1953). Plusieurs travaux suggèrent que les macrophages sont la cible principale de la majorité des immunomodulateurs, dont le rôle est de déclencher une réponse immunitaire innée (Sung *et al.*, 2013 ; Besançon, 2017).

Nos résultats indiquent clairement que les fractions d'*A. gombo* améliorent l'activité phagocytaire en stimulant le système réticulo-endothélial, dont la majorité est composé de cellules phagocytaires.





**Figure 14.** Effet des fractions AEAg et NBAg sur la demi-vie des particules de carbone colloïdale dans le sang des souris.

(Les valeurs sont la moyenne de  $n = 6 \pm SD$ , \*\*\*  $P < 0,001$  différence hautement significative (test Tukey) par rapport au contrôle non traité).

Des études antérieures ont rapporté des liens étroits entre l'activité immunomodulatrice des composés phénoliques et leurs pouvoirs antioxydants (Grigore, 2017 ; Kilani-Jaziri *et al.*, 2017). En fait, la fraction d'acétate d'éthyle a montré les meilleurs résultats pour toutes les activités antioxydantes testées, et a également eu une activité phagocytaire très significative comparable à la fraction de n-butanol.

Plusieurs études ont confirmé l'effet immunomodulateur des flavonoïdes, en particulier ceux d'origine Astragales, tels que la modulation de la balance Th1/Th2 (Boroujerdnia *et al.*, 2011) ; en outre, leur effet sur la fonction des cellules T, des cellules B, des cellules NK, des macrophages, des mastocytes, des basophiles, neutrophiles, éosinophiles et sur les plaquettes (Middleton *et al.*, 2000 ; Boroujerdnia *et al.*, 2011 ; Ren *et al.*, 2018).

Plusieurs sources de données ont mis en évidence le rôle immunomodulateur des principaux composés phénoliques ; il a été rapporté que le traitement à la quercétine des cellules mononucléées humaines (les lymphocytes et les monocytes) induit préférentiellement l'expression et la synthèse de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) tout en inhibant la production d'IL-4 (Nair *et al.*, 2002 ; Masad *et al.*, 2021). Ces données visent à montrer que la quercétine peut activer les cellules Th1 de manière préférentielle, ce qui pourrait avoir des applications thérapeutiques dans le traitement des infections et des cancers (Masad *et al.*, 2021).

Selon Sung et ses collègues (2013), la catéchine (flavanol) possède des activités immunostimulantes, induisant la libération d'IFN- $\gamma$ , d'IL-12 et d'IL-2 par les splénocytes

murins et activant la capacité de présentation d'antigènes des macrophages en augmentant l'expression des protéines costimulatrices CD80 et CD86.

Les ligands costimulateurs CD80 et CD86 jouent un rôle crucial dans l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire impliquant trois signaux : la reconnaissance de l'antigène, l'interaction du CD28 (présent à la surface d'un lymphocyte) avec ses ligands (CD80/CD86 portés sur les cellules présentatrices d'antigènes) et le signal cytokinique ; l'expression des CD80 et CD86 est induite à la surface des CPAg (cellules spécialisées du système immunitaire qui présentent des molécules étrangères et informent ainsi les lymphocytes T de la présence de cet antigène étranger) en cas d'inflammation et/ou en présence de molécules microbiennes, c'est pourquoi leur expression est synonyme de danger pour l'organisme (Subauste *et al.*, 1998 ; Masad *et al.*, 2021).

Dans une *étude in vitro* sur des cellules souches embryonnaires murines et humaines réalisée par l'équipe de Verbeek (2004), la combinaison des flavones apigénine et lutéoline a inhibé les réponses des cellules T donc réduit leur capacité à produire l'interféron-gamma l'IFN $\gamma$  (molécule clé de la réponse immunitaire) qui sont considérées comme pertinentes pour les maladies auto-immunes et en particulier pour la sclérose en plaques. Ces résultats suggèrent que ces flavonoïdes pourraient avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies auto-immunes et permet de mieux contrôler les réponses immunitaires indésirables (Verbeek *et al.*, 2004 ; Masad *et al.*, 2021). Ceci résume les effets immunomodulateurs des polyphénols et quelques mécanismes qui interviennent dans la stimulation des réponses immunitaires (Masad *et al.*, 2021 ; Shakoor *et al.*, 2021).

Par conséquent, le système immunitaire peut être modifié par des agents pharmacologiques, des polluants de l'environnement, et/ou un régime alimentaire qui inclue des aliments naturels riches en antioxydants comme les flavonoïdes. Dans le même contexte, Garza (2015) a confirmé que les polyphénols et les flavonoïdes originaires des Fabacées jouent un rôle bénéfique dans le maintien du bien-être de l'homme, améliorer la santé et la fonction immunitaire en vue de prévenir des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives.

### 2.3. Evaluation de l'activité anticoagulante

Les anticoagulants jouent un rôle essentiel dans la prévention et le traitement des troubles thromboembolique qui se manifestent par deux types : la thrombose veineuse profonde (TVP), et l'embolie pulmonaire (EP). En fait, La thromboembolie veineuse demeure la 3<sup>ème</sup> cause de décès dans les pays développés, après les accidents vasculaires cérébraux/cardiaques et le cancer (<https://www.gemmat-thrombose.fr>).

L'activité anticoagulante de différentes fractions d'*A.gombo* a été évaluée par deux tests : Le temps de céphaline-Kaoline (TCK) par voie endogène qui n'implique que des substances d'origine sanguine, et le temps de prothrombine (TP) par voie exogène, qui implique des facteurs tissulaires qui ne sont pas dans le plasma mais qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire, conduisant à une voie finale commune qui aboutit à la formation d'un caillot de fibrine (Colman, 2006).

#### 2.3.1. Evaluation du pouvoir anticoagulant de la voie exogène TP

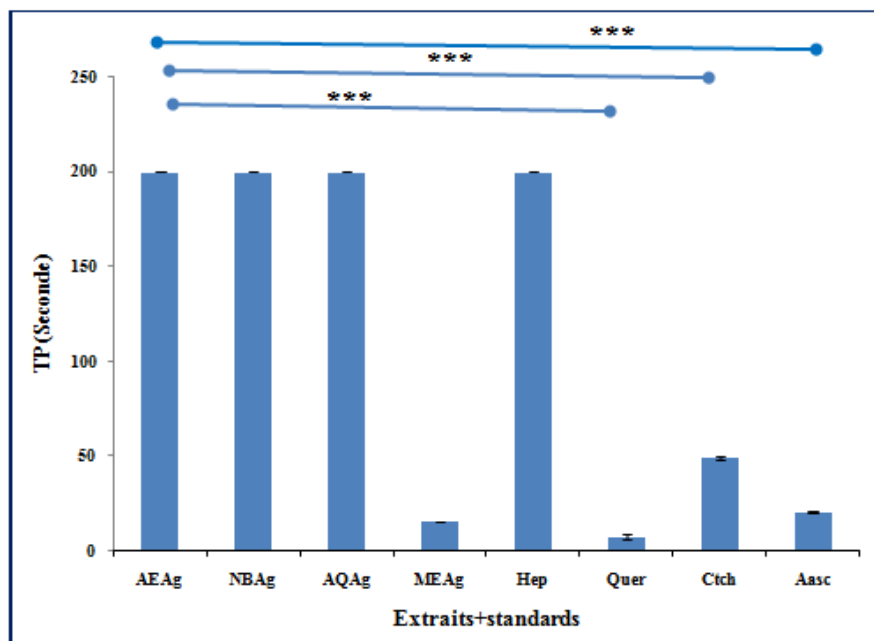
La figure 15 présente les résultats obtenus du test TP, les deux fractions AEAg, NBAG et l'extrait AQAg ont révélé un potentiel anticoagulant important très significatif ( $P < 0,001$ ) et une coagulation prolongée plus de 200 S parallèlement à l'héparine ( $> 200$  S). Alors que, l'extrait méthanolique et tous les standards ont enregistré un temps de coagulation modéré allant de 7 à 49 S. Ainsi, les résultats de la présente étude ont indiqué que les AQAg, NBAG et AEAg exercent une prolongation du temps de la voie extrinsèque quatre fois plus par rapport la catéchine et huit fois plus importante que ceux enregistré par l'extrait de méthanol et l'acide ascorbique.

Ces résultats sont attribués à la forte teneur des fractions/extrait (AEAg, NBAG et AQAg) en composés phénoliques et à l'effets synergiques qui s'établie entre les différents composés constituant l'extrait, et cela peut s'expliquer par leurs structures, leurs tailles, leurs nombres et arrangement des atomes de carbones et la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzène (Auger et al., 2014). Omar et ses collaborateurs (2017) ont enregistré un modeste temps (20.12 S) prolongé pour l'extrait d'éthanol de *Lupinus pilosus* (Fabaceae), la même tendance est révélée par la fraction MEAg (15.45 S).

En effet, il est suggéré que l'effet faible d'extrait de méthanol est dû au comportement sélectif des molécules présente vis-à-vis l'inhibition des facteurs de coagulation ; tandis qu'il est

recommandé d'utiliser les solvants polaire tels que l'eau, méthanol voire hydro-alcoolique afin de multiplier le rendement d'extraction en composés phénoliques (Diallo., 2019).

Des études antérieures ont confirmé que les flavonoïdes contenus dans les extraits de pépins de raisin ont un double rôle antiplaquettaire et anticoagulant, contribuant ainsi à la prévention des troubles thromboemboliques (Bijak *et al.*,2019).



**Figure 15.** Temps de prothrombine des extraits d'*A.gombo*.

MEAg, AQAg, NBAg et AEAg (100 mg/mL) ; contrôle positif : (Hep) Heparine, (Ctch) catechine, (Quer) quercétine et (Aasc) acide ascorbique (20 mg/mL).

Les valeurs sont la moyenne de  $n = 3 \pm SD$ , \*\*\*  $P < 0,001$  différence hautement significative par rapport au contrôle positive l'héparine).

### 2.3.2. Evaluation du pouvoir anticoagulant de la voie endogene TCK

Les résultats présentés sur la figure 16 montrent les temps de coagulation (TCK) céphaline-Kaolin en présence des composés phénoliques d'extraits d'*Astragalus gombo* face à des molécules de références : catéchine, quercétine et acide ascorbique et de l'héparine (anticoagulant de référence). Les résultats obtenus montrent que les fractions NBAg et AEAg ont révélé un allongement de temps de coagulation sur la voie intrinsèque de formation des caillots de sang ( $P < 0,001$ ) plus important que ceux enregistré par MEAg, AQAg et même les molécules de références. En revanche, des études antérieures ont démontré que l'extrait du méthanol (4mg/mL) présente un temps d'allongement significatif (31 S) pour la plante

médicinale indienne *Bauhinia tomentosa* (Fabaceae) et l'extrait d'éthanol (50mg/mL) d'une Fabaceae palestinienne *Lupinus pilosus* (71 S), respectivement (Uma *et al.*, 2014, Omar., *et al* 2017).

D'autre part, nos résultats sont aussi meilleurs que ceux enregistré pour la fraction polyphénolique extraite d'un fruit chinois *Lachnum singerianum* (Fabaceae) dans lequel le TP et le TCK ont révélé un temps de coagulation allongé à concentration 100mg/ml : 23 et 54 S, et à 200 mg /ml : 32 et 87 S, respectivement (Zong *et al.*, 2017). Cependant, il a été constaté que le l'extrait d'AQAg a réagi différemment vis-à-vis du TCK, ce résultat comparable aux résultats de Félix-Silva *et al.* (2014), où l'extrait aqueux a amélioré mieux que les autres fractions MEAg et même les molécules de références envers le temps de prothrombine (TP) comparant au TCK.

Dans le même contexte, de nombreux rapports ont également étudié l'activité anticoagulante de certains extraits naturels ont affirmé que l'extrait aqueux prolongeait le temps de coagulation et la formation de fibrine mieux que l'extrait organique (Kee *et al.*, 2008 ; Félix-Silva *et al.*, 2014).

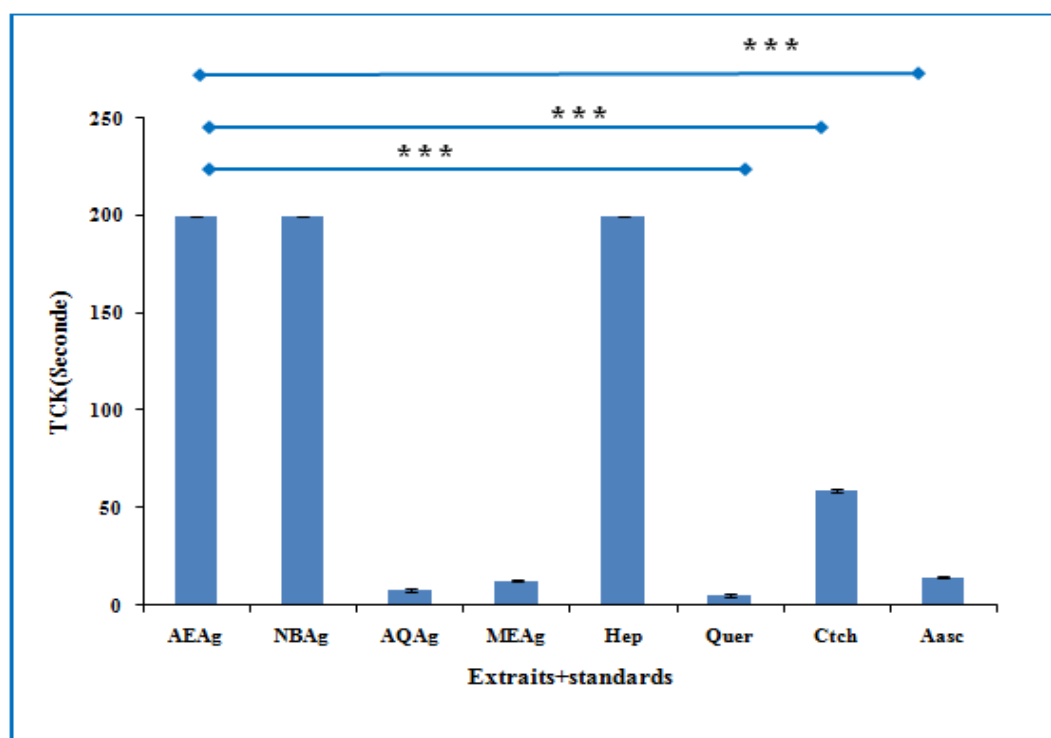


Figure 16. Temps de céphaline Kaolin des extraits d'*A.gombo*.

MEAg, AQAg, NBAg et AEAg (100 mg/mL) ; contrôle positif : (Hep) Heparine, (Ctch) catechine, (Quer) quercétine et (Aasc) acide ascorbique (20 mg/mL).

(Les valeurs sont la moyenne de  $n = 3 \pm SD$ , \*\*\*  $P < 0,001$  différence hautement significative par rapport au contrôle positive l'héparine).

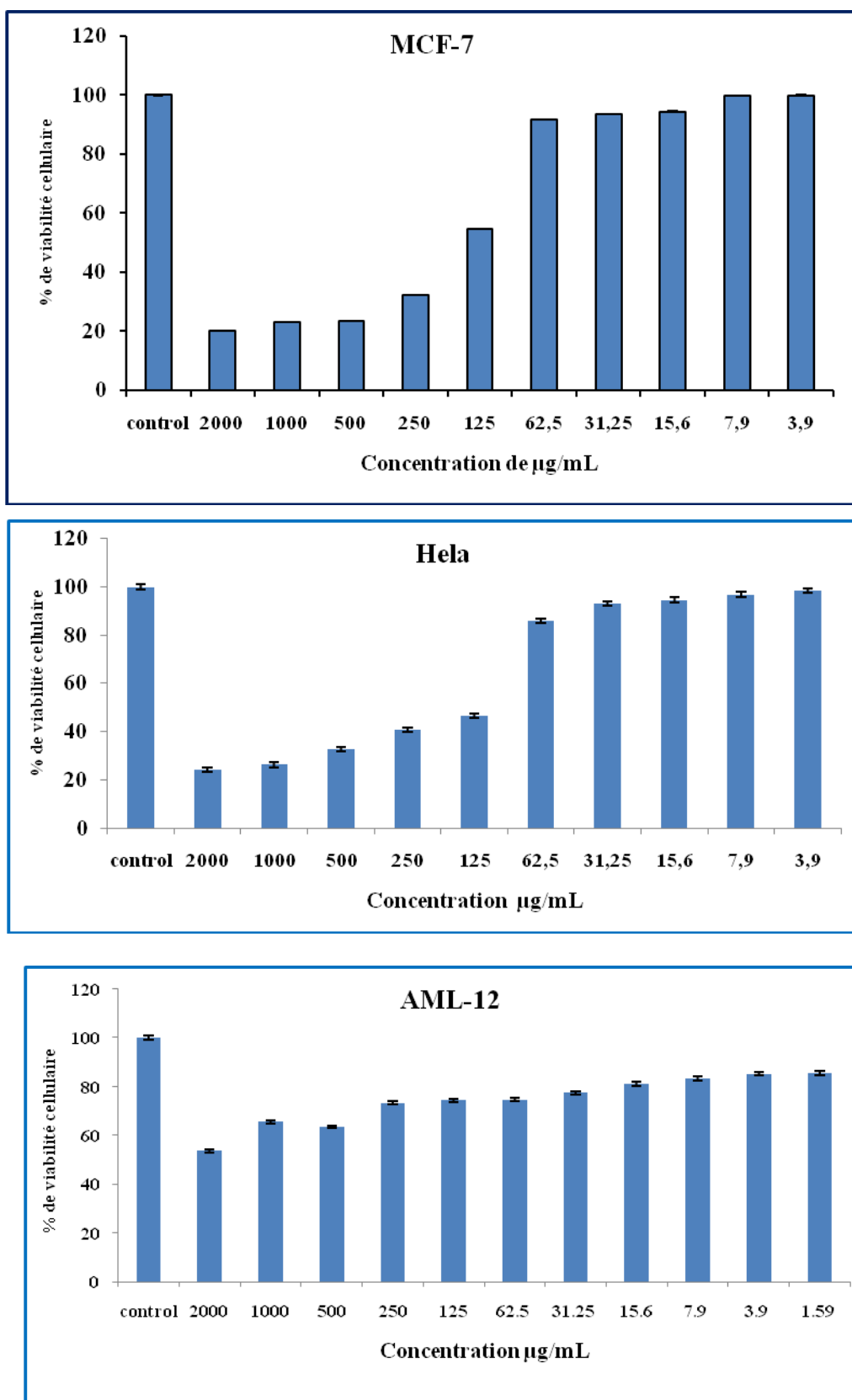
Les résultats de ce travail nous ont amenés à supposer qu'une action préférentielle sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation était appropriée pour l'extrait aqueux d'*A. gombo*. Kee *et al.* (2008) ont démontré l'effet anticoagulant des tanins de neuf plantes du sud africain, ce qui a permis d'améliorer l'activité anticoagulante. Donc, il est probable que l'efficacité de l'extrait aqueux soit due à la dominance des composés polaires et à la présence de plusieurs composés biologiquement actifs qui ont été notés dans l'extrait aqueux. D'autre part, Athukorala *et al.* (2007) supposent que le temps de coagulation prolongé pour les deux voies pourrait être dû aux poids moléculaires très élevés des molécules bioactives.

Les résultats de la présente étude montrent que les extraits d'*A. gombo* sont capables d'activer la cascade de la coagulation. Comme indiqué dans la littérature, la famille des Fabaceae est une source d'inhibiteurs enzymatiques naturels comprenant des composés polypeptidiques ou phénoliques ; ces composés agissent sur les protéases à sérine telles que la trypsine, la chymotrypsine et les facteurs de coagulation (Pereira et Brazón 2015 ; Kumar *et al.*, 2011).

Nous avons suggéré que la présence de différents types de molécules explique les effets anticoagulants de l'extrait aqueux, qui inhibent la formation de caillots et augmentent le TP de manière dépendante du solvant. Selon une étude menée par KEE *et al.* (2008), cette réduction de la formation de fibrine pourrait potentiellement jouer un rôle dans la prévention des métastases cancéreuses.

### **2.4. Evaluation de l'activité antiproliférative et cytotoxique *in vitro***

Le test MTT est largement utilisé et a fait ces preuves pour déterminer la viabilité cellulaire, la prolifération et même la cytotoxicité. Dans la présente étude, le test MTT est effectué afin d'évaluer l'activité antiproliférative de la fraction AEAg, deux lignées cellulaires cancéreuses (adénocarcinome du col de l'utérus humain (HeLa) et adénocarcinome du sein humain (MCF7), la troisième culture étant des cellules hépatiques de souris normales (Aml12), toutes traitées par une large gamme de concentration (3,9 à 2000µg/mL) de la fraction d'acétate d'éthyle.



**Figure 17.** Effet cytotoxique de la fraction AEAg à différentes concentrations sur les lignées cellulaires cancéreuses (MCF-7 et HeLa), et des cellules hépatiques de souris normales (Aml12) après 48 h incubation, (Les valeurs sont la moyenne de  $n = 8 \pm SD$ ).



Les résultats obtenus après 48 heures d'incubation, ont montré l'effet inhibiteur de la fraction AEAg sur la prolifération des deux lignées cellulaires cancéreuses Hela et MCF-7 avec des valeurs de  $CI_{50}$  :  $108,8 \pm 1,8$  et  $168,4 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ , respectivement, ainsi que sur la viabilité des cellules saines (Aml12) (figure 17).

La fraction AEAg a montré un potentiel antiprolifératif puissant contre les cellules Hela, cependant, nous avons suggéré que la fraction AEAg est moins sensible contre les cellules MCF-7. Cependant, Salem *et al.* (2020) ont confirmé que la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. Sieberi* D C. Égyptien exerçait une activité cytotoxique plus remarquable contre MCF-7 avec une valeur  $CI_{50}$  de  $69,6 \mu\text{g/mL}$ . À cet égard, l'étude d'Ibrahim *et al.* (2013) a affirmé que l'extrait butanolique de l'*A. bombycinus* égyptien a montré un effet cytotoxique potentiel contre MCF-7. De même et selon la littérature, les flavonoïdes totaux et la calycosine d'*A. mongholicus* Bunge ont révélé un puissant effet inhibiteur sur la prolifération de la lignée cellulaire érythro-leucémie humaine avec des valeurs  $CI_{50}$   $98,63$  et  $130,32 \mu\text{g/mL}$ , respectivement (Zhang *et al.*, 2012).

Une étude récente menée sur deux plantes d'astragale endémiques turques, *Astragalus globosus* Vahl et *Astragalus breviflorus* DC, a montré une activité cytotoxique très réduite, par rapport à nos résultats, sur deux lignées cellulaires cancéreuses, MCF-7 et MDA-MB-23. Les extraits n-butanol et aqueux des parties aériennes d'*A. globosus* présentent des  $CI_{50}$  de  $868,60$  et  $1753,00 \mu\text{g/mL}$  contre la lignée cellulaire MCF-7, et de  $620,30$  et  $1300,50 \mu\text{g/mL}$  contre la lignée cellulaire MDA-MB-231. La fraction dichlorométhane de l'*A. globosus* présente une activité antitumorale significative, en comparaison à notre fraction AEAg, contre la lignée cellulaire MCF-7, avec une  $CI_{50}$  de  $28,39 \mu\text{g/mL}$ . Ce résultat suggère que la fraction de dichlorométhane possède un pouvoir antioxydant significatif, en fonction de sa richesse en flavonoïdes et en acides phénoliques. Bien que l'AEAg ( $491,566 \mu\text{g/mL}$ ) présente une concentration plus élevée de quercétine-3-*O*-galactoside (d'hyperoside), que la fraction de dichlorométhane ( $465,101 \mu\text{g/mL}$ ), il est plausible que d'autres composés agissent également en synergie pour contribuer à l'activité antiproliférative (Kalaycı *et al.*, 2023).

Dans la littérature, de nombreuses études ont montré que les espèces d'astragale et leurs composés actifs attirent l'attention par leur potentiel d'effet anticancéreux utilisés dans le traitement du cancer du sein (Ibrahim *et al.*, 2013 ; Salem *et al.*, 2020 ; Kalaycı *et al.*, 2023)

À ce jour, l'activité anticancéreuse des composés phénoliques des extraits d'astragale n'a pas été révélée contre le cancer du col de l'utérus humain, et nous avons constaté un manque d'informations, bien que la fraction AEAg ait montré des résultats encourageants.

**Tableau 11.** Cytotoxicité et indice de sélectivité de la fraction acétate d'éthyle envers des cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus humain (HeLa) et du sein humain (MCF-7), et des cellules hépatiques de souris normales (Aml12)

Acétate d'éthyle	MCF-7	Hela	Aml12
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	168,4±1,6 <sup>a</sup>	108,8±1,8 <sup>b</sup>	> 2000 <sup>c</sup>
IS	18,38	11,87	

Indice de sélectivité (IS) : CC<sub>50</sub> contre cellules saines/ CI<sub>50</sub> contre cellules cancéreuses.

Les données ont été examinées à l'aide d'une ANOVA à un facteur suivi par le test post-hoc de Tukey. Chaque paramètre suivi de la même lettre, pour la même ligne, n'est pas significativement différent à P < 0,05.

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes de la fraction d'acétate d'éthyle d'*A.gombo* possèdent une activité antiproliférative particulière pour le cancer du col de l'utérus humain (HeLa), sans endommager les cellules saines et /ou normale. Selon la littérature, le genre *Astragalus* a présenté une activité anticancéreuse avec un effet cytotoxique distinct contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (Bedir *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2014 ; Aslanipour *et al.*, 2017 ; Kalaycı *et al.*, 2023). En outre, nos résultats sont en accord avec ceux de Forgo et de ses collaborateurs (2012), qui ont suggéré que les flavonoïdes, tels que la cirsiliole, l'apigénine, la quercétine-3-*O*-galactoside, la quercétine-3-*O*-rhamnoside, l'apigénine-7-*O*-glucoside et la quercétine, sont responsables des effets antitumoraux des extraits de *Centaureajacea* L. Ces flavonoïdes sont les composés majoritaires de la fraction AEAg.

L'évaluation de l'indice de sélectivité pour toute recherche sur un médicament à base de plantes et/ou un composé isolé est très importante pour déterminer s'il est nécessaire de poursuivre les recherches. Dans cette optique, nous avons cherché à déterminer l'indice de sélectivité (IS), qui peut être défini comme le rapport entre la concentration toxique d'un échantillon et sa concentration bioactive effective (Pritchett *et al.*, 2014).

En effet, nous avons déterminé l'activité cytotoxique, la fraction AEAg a été testée contre des cellules normales hépatiques de souris (Aml12), dont les résultats sont présentés dans la figure 17. La présente étude a révélé des résultats intéressants, indiquant que la fraction AEAg est plus toxique pour les cellules cancéreuses que les cellules normales. La nouveauté de la présente étude est que la fraction AEAg améliore la viabilité des cellules AML12 normales, tout en étant non toxique jusqu'à une concentration CC<sub>50</sub> ≥ 2000µg/mL pendant 48h d'incubation.

Ces dernières années, d'innombrables études ont souligné l'importance de la valeur de l'IS. Afin d'évaluer l'activité anticancéreuse d'un échantillon, sa cytotoxicité contre des lignées cellulaires non cancéreuses doit être déterminée (López-Lázaro, 2015 ; Peña-Morán *et al.*, 2016 ; Indrayanto *et al.*, 2021). Utiliser uniquement des lignées cellulaires malignes ou des animaux sans déterminer l'IS est un mauvais pronostic pour une étude (clinique).

Selon Indrayanto et ces collaborateurs (2021), la sélection des lignées cellulaires les plus appropriées pour les tests de toxicité est l'étape la plus importante dans la détermination de la valeur (IS) de l'échantillon. L'activité anticancéreuse d'un échantillon de médicament à base de plantes est évaluée à l'aide de certaines lignées cellulaires cancéreuses, le test de toxicité doit être réalisé sur des lignées cellulaires non cancéreuses appropriées ; car les mécanismes exacts de la toxicité de l'échantillon ne sont peut-être pas encore totalement connus ou élucidés. Cependant, le médicament à base de plantes et/ou un composé isolé idéal, devrait avoir une concentration toxique relativement élevée mais une concentration active très faible (Indrayanto *et al.*, 2021).

Comme présente le tableau (11), les données ont montré des niveaux élevés d'indice de sélectivité (IS). La fraction AEAg a montré une sélectivité très hautement significative ( $p \geq 0,0001$ ) envers les deux lignées cellulaires HeLa et Mcf-7 avec des valeurs d'IS : 18 et 11, respectivement.

Des travaux antérieurs ont montré que l'indice de sélectivité (IS) des cellules de l'hépatocarcinome humain HepG2 et des cellules Chang du foie normal, obtenu à partir des valeurs IC<sub>50</sub> de la goniotalamine (une lactone styrylique isolée de la racine et de la tige de *Goniothalamus macrophyllus*), révélait un IS pour les cellules du foie normal 7,6 fois plus élevé que celui des cellules HepG2 (Al-Qubaisi *et al.*, 2011). On outre, l'indice de sélectivité était supérieur à 10 pour l'extrait méthanolique brut obtenu à partir des parties aériennes de *Verbascum nigrum* a été examiné pour son effet sur la viabilité des kératinocytes HaCaT immunisés et des cellules de carcinome épidermoïde A431 (test MTT, 24 heures) (Iliescu *et al.*, 2020).

Dans le même contexte, la communauté scientifique a envisagé de réaliser des tests de toxicité sur des lignées cellulaires saines (normales) afin de déterminer leur sélectivité. La première étude a porté sur des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (HT-29) et des cellules de cancer du sein (MCF-7). La deuxième étude a porté sur l'hépatocarcinome humain (HEP-G2) et la lignée cellulaire de lymphome murin (L5178Y-R) ; Dans les deux études, les composés bioactifs ont été testés sur des lignées cellulaires saines, telles que les cellules rénales

normales de singe vert africain (VERO), des cellules épithéliales de rein de singe normal (MA-104) et les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2021 ; Elizondo-Luévano *et al.*, 2023).

Selon Ahmed et ses collaborateurs (2018), l'indice de sélectivité (**IS**≥**3**) supérieure ou égale à trois considérait comme efficace contre les cellules cancéreuses. Dans le même cadre, Awouafack *et al.* (2013) ont également recommandé un critère d'acceptation d'IS ≥**10** pour un échantillon bioactif sélectif, l'équipe de Peña-Morán (2016) et Pécheur & Polyak (2016) ont déclaré qu'un échantillon ayant un **IS** ≥**10** doit une investigation plus approfondie. Toutefois, une valeur IS relativement faible <1 signifie que l'échantillon pourrait être toxique et ne peut être utilisé comme médicament et/ou substance bioactive. Si la valeur IS calculée est comprise entre 1 et 10, il est recommandé de procéder à une nouvelle évaluation en utilisant d'autres techniques pour confirmation (Indrayanto *et al.*, 2021).

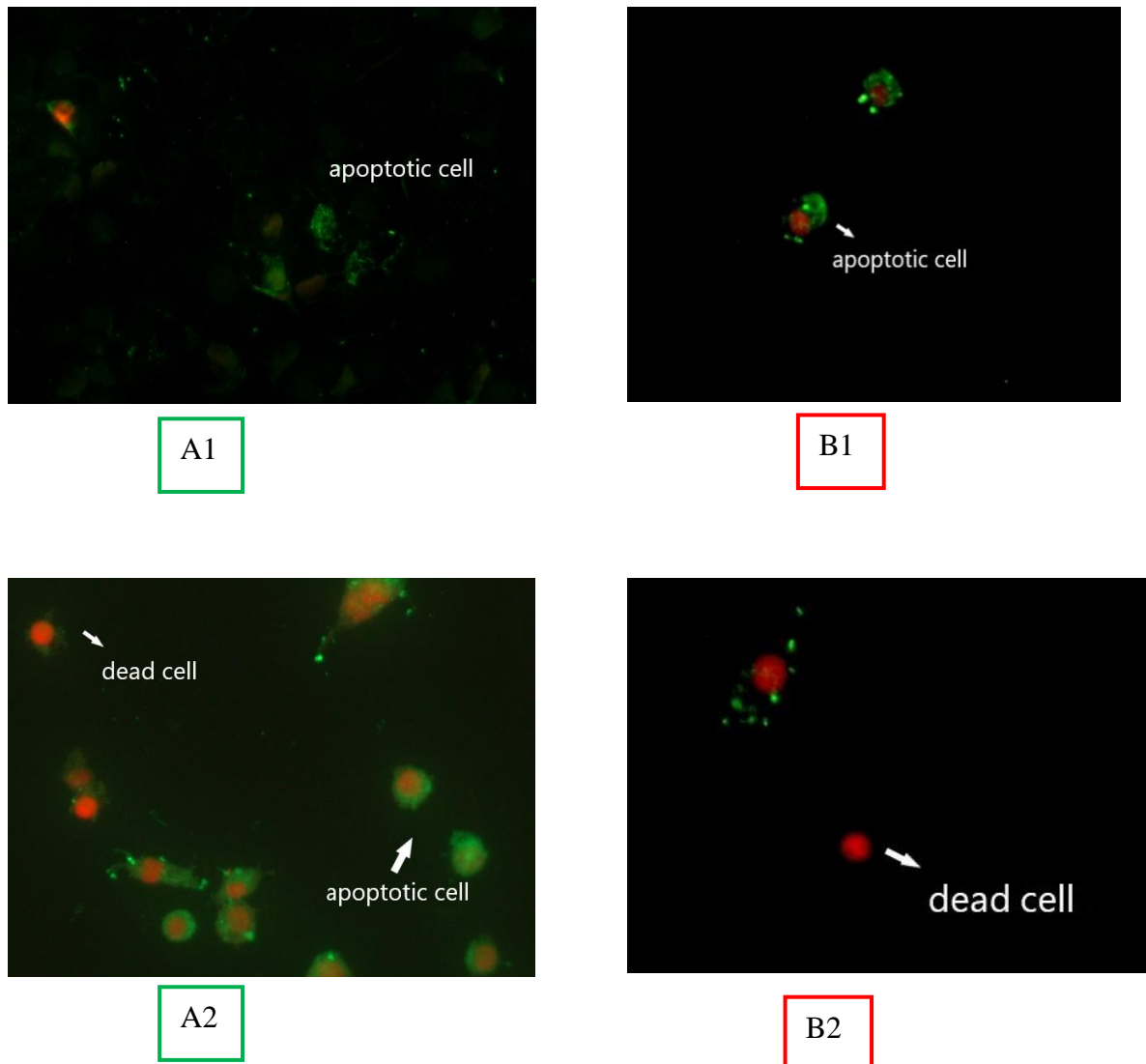
La particularité de ce travail est que les composés phénoliques d'*A. gombo* ont révélé un potentiel anticancéreux significatif, et possèdent un indice de sélectivité élevé contre les cellules cancéreuses par rapport aux cellules hépatiques saines AML12. Ces effets suggèrent que la plante médicinale *Astragalus gombo* pourrait être considérée comme un agent chimiothérapeutique prometteur. Plusieurs travaux scientifiques ont rapporté la bioactivité d'innombrables plantes médicinales, biomolécule et composés isolés, la majorité entre eux n'ont pas défini l'indice de sélectivité, ce qui limite leur utilité (Indrayanto *et al.*, 2021).

### 2.4.1. Marquage d'apoptose par la méthode : Coloration des cellules vivantes/mortes par DAPI/ Acridine orange

Selon Kerr *et al* (1972) l'apoptose indique une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose, elle est aussi bien morphologique que biochimique, c'est du point de vue, une mort cellulaire "programmé" qui résulte de différentes phases qui prennent quelques heures. L'apoptose, probablement, se définit par simple mesure du contenu d'ADN en utilisant un colorant qui intercale l'ADN comme le iodure de propidium (PI) et l'acridine orange(AO), ou des colorants qui se lient à l'extérieur de l'ADN comme le DAPI (4'-6-diaminido-2-phenylindole) et Hoechst 33342. La combinaison des deux fluorochromes le DAPI et l'acridine orange, ne diffuse pas à travers les membranes intactes, et permet de différencier et de quantifier les cellules apoptotiques, nécrotiques et viables (Carmaux, 2008).

Afin d'évaluer l'effet apoptose induit par la fraction acétate d'éthyle, les lignées étudiées mises à un traitement avec les concentrations d'IC<sub>50</sub> de l'extrait d'intérêt et incubée pendant 24 h, puis l'application d'un double marquage DAPI associée à l'acridine orange. La coloration DAPI/Acridine orange des cellules traitées des deux lignées cancéreuses MCF-7 et Hela a révélé un effet apoptotique important.

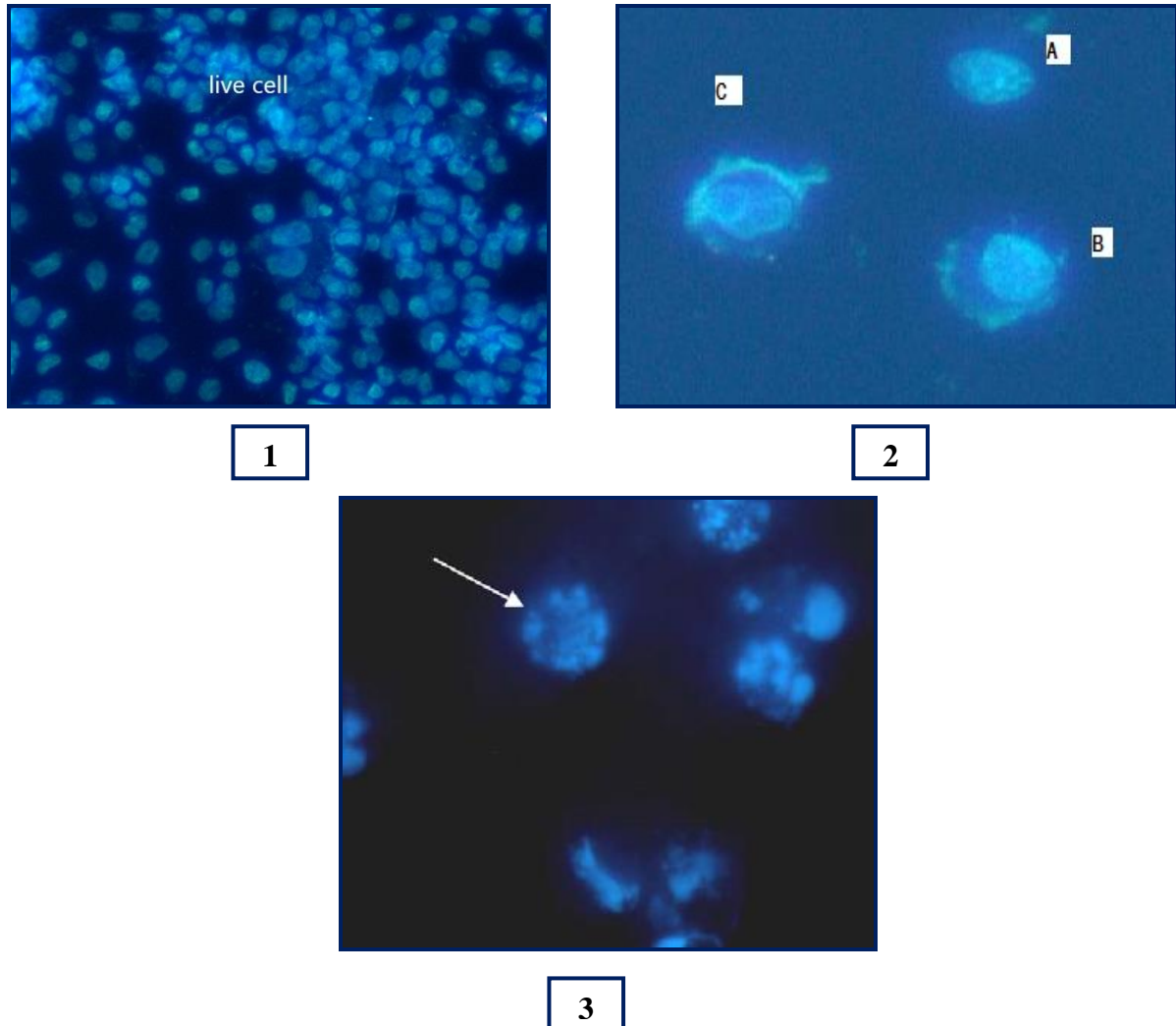
La combinaison des deux marqueurs acridine orange/DAPI, a permet de différencier les cellules. Les cellules apoptotiques précoces émettent une fluorescence verte résulte de la coloration des acides nucléiques (figure 18 A1 et 18 B1), tandis que l'acridine orange (AO) chasse le DAPI. Les cellules nécrotiques (nécrose secondaire) produisent une luminescence rouge par implication de l'AO (figure 18 A2 et 18 B2).



**Figure 18.** Apoptose induite par la fraction d'acétate d'éthyle d'*Astragalus gombo* dans les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et du col de l'utérus (Hela). DAPI/AO a été appliquée après 24h de traitement avec la concentration d'IC<sub>50</sub> d'AEAg pour chaque lignée.

(MCF-7) « A1 » l'image est prise après 8h de coloration, « A2 » après 24h de coloration. (Hela) : « B1 » l'image est prise après 8h de coloration, « B2 » après 24h de coloration. Les cellules ont été protégées de la lumière et visualisées par microscopie à fluorescence Zeis (×40).

La fluorescence verte et rouge montre les cellules apoptotiques et les cellules mortes (nécrose), respectivement.



**Figure 19.** Apoptose induite par la fraction d'acétate d'éthyle d'*Astragalus gombo* dans les cellules hépatiques de souris normales.

« 1 » (Aml12) cellules contrôle viable, « 2 » (Aml12) cellules apoptotiques traitées par  $IC_{50}$  de la fraction AEAg, image prise après 24h de coloration dans les mêmes conditions cités au-dessus. La coloration par DAPI montre la condensation de la chromatine « 2B » « 2 c » et la fragmentation nucléaire « 2A » « 3 ».

Cependant, les cellules normales (AML12) ont été traitées dans les mêmes conditions de traitements avec  $CI_{50} > 2000 \mu\text{g/ml}$  d'AEAg, suivi d'une double coloration. Les résultats de la coloration au bleu DAPI montrent des noyaux ronds sur les cellules contrôles (**Figure 19, 1**), ce qui s'explique par la fixation du fluorochrome sur les paires de bases (A-T) d'ADN et l'intégrité membranaire. Alors qu'après 24h, les gros plans 2A, 2B et 2C (**Figure 19**) montrent une chromatine condensée et fragmentée ; les cellules apoptotiques précoces se distinguent par leur chromatine très condensée (Sreelatha *et al.*, 2011 ; Hassan *et al.*, 2017). Les observations morphologiques de la présente étude indiquent clairement les caractéristiques d'apoptose des cellules (AML12).

Le présent travail a montré une bonne corrélation entre les changements morphologiques cellulaires par la coloration DAPI et la coloration à l'acridine orange, confirmant l'efficacité de la fraction AEA g dans l'induction de l'apoptose, ces résultats sont similaires à ceux de (HU *et al.*, 2009), après évaluation morphologique des cellules apoptotiques par coloration de l'ADN avec Hoechst 33258, lors du traitement des lignées de carcinome hépatocellulaire humain SMMC-7721 avec un extrait flavonoïde d'*Astragalus complanatus*. En effet, Hassan *et al.* (2017), a montré que les polyphénols naturels ont un effet apoptotique potentiel significatif sur une nouvelle ligne cancéreuse hépatique dérivée de HepGe nommée HepaPSU.

Certains polyphénols ont montré leur capacité d'induire l'apoptose, dans différentes cellules cancéreuses. Cette apoptose est due à l'activation de p53, une protéine qui joue un rôle important dans la régulation de la croissance et de la mort cellulaire. L'activation de p53 entraîne la répression des gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, et l'activation des gènes pro-apoptotiques, tels que Bax. Ces gènes contrôlent la mort cellulaire en régulant la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération de cytochrome c, un facteur qui déclenche l'apoptose (Hassan, 2018).

En 2013, Tigrine et ses collègues ont rapporté que l'extrait flavonoïdique de feuille de *Cléome arabica* pouvait prévenir le cancer en stimulant directement l'apoptose dans les cellules tumorales (cinq lignées cancéreuses étudiées) et en empêchant la création d'un micro-environnement inflammatoire qui soutiendrait la progression des tumeurs. En outre, dans les cellules cancéreuses humaines du côlon de type LNCaP, les composés phénoliques tels que le resvératrol ont la capacité de réduire la résistance aux médicaments anticancéreux en supprimant le NF- $\kappa$ B et en augmentant l'apoptose associée à la voie Bax/caspase 3



(Karunaweera *et al.*, 2015). Ces découvertes suggèrent que les polyphénols pourraient être utilisés comme traitements potentiels du cancer.

Dans le même contexte, une étude de l'équipe de Yan (2009) a montré que la glucoprotéine (40 µg/mL de lectine) extraite de l'*Astragalus mongholicus* chinois induisait l'apoptose des cellules HeLa ; suite à un double marquage DAPI / PI. Cette observation a été confirmée par microscopie à fluorescence, qui a révélé une condensation du noyau (bleu) des cellules apoptiques. Selon Wang et Jiao (2001) ont rapporté que l'efficacité des composés biologiquement actifs à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses indique une action anticancéreuse.

La technique de coloration DAPI a été réalisée pour mettre en évidence les changements morphologiques au cours de l'apoptose induite par la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. gombo*. Les résultats de la présente étude confirment le comportement particulier de la fraction AEAg pour son action cytotoxique sélective sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, qui peut inhiber la prolifération et induire des dommages oxydatifs et l'apoptose.

## **Chapitre 3**

**Exploration de l'effet protecteur de la  
fraction d'acétate d'ethyle  
d'*A. gombo* contre l'hépatotoxicité  
induite par la doxorubicine chez les  
souris Balb/c**

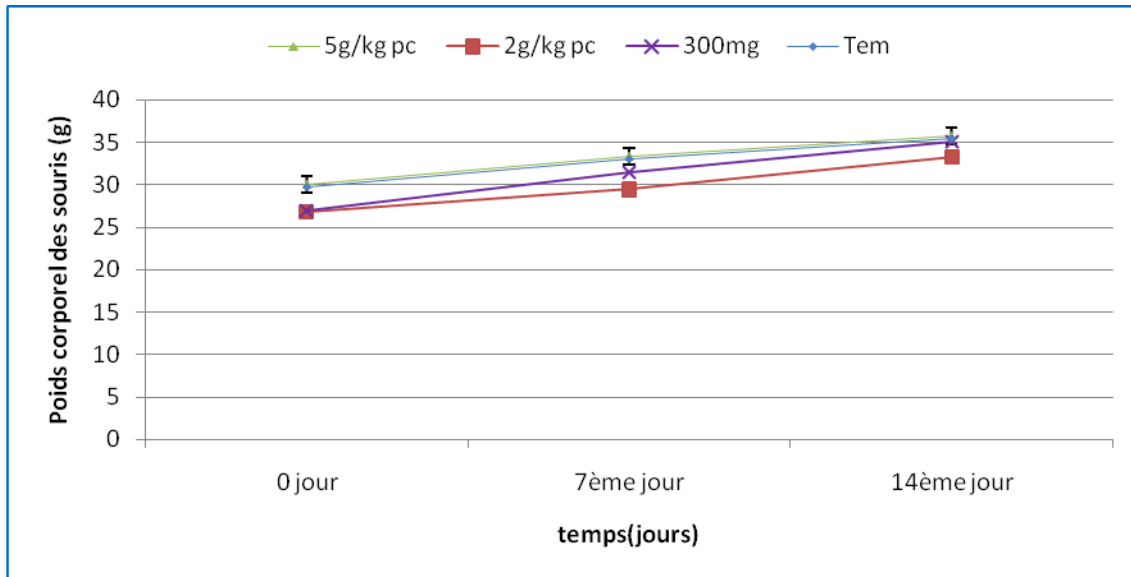
Les résultats fournis par notre étude des deux premiers chapitres nous ont amenés à énoncer un nouvel objectif. En effet, les polyphénols ont un pouvoir antioxydant, immunomodulateur et anticoagulant, et ils ont un effet cytotoxique *in vitro* contre les cellules cancéreuses sans endommager les cellules hépatiques normales des souris Aml12. Ils sont également sélectifs dans leur action. Par conséquent, les composés phénoliques de cette espèce *A. gombo* présentent des effets cytotoxiques par induction de l'apoptose. Ces données nous ont incités à évaluer *in vivo* l'effet protecteur de la fraction AEAg contre l'hépatotoxicité induite par l'agent chimiothérapeutique DOX. A notre connaissance, l'utilisation clinique de la DOX est désagréable et reste limitée en raison de sa toxicité cumulative aiguë, qui s'accompagne à long terme d'une altération significative des fonctions cardiaques et hépatiques. La cardiotoxicité et l'hépatotoxicité générées par la doxorubicine sont ainsi un problème majeur dans les protocoles de chimiothérapie utilisant cette anthracycline à toxicité marquée (Prasanna *et al* 2020 ; Liu *et al.*, 2023).

### 3.1. Evaluation de la toxicité aiguë (Test d'innocuité de la fraction AEAg)

Dans ce travail, l'administration orale a été effectuée sur des souris mâles Balb/c, trois doses de 300, 2000 et 5000 mg / kg(pc) de la fraction d'acétate d'éthyle ont été testé et comparées à un lot témoin contenant des souris gavées par l'eau distillée selon la ligne directrice 423 de l'OCDE (OCDE, 2011).

Les animaux ont été surveillés pendant les quatre premières heures après l'administration de la fraction d'acétate d'éthyle. Ils n'ont présenté aucun signe de toxicité pendant 14 jours, les animaux ont survécu, il n'y a pas de mortalité, aucun signe comportemental visible de toxicité n'a été observé tout au long de la période expérimentale.

Par conséquent, la fraction semble être sûre à un seuil de dose de 5 000 mg/kg, et la DL<sub>50</sub> a été considérée comme supérieure à 5 000 mg/kg. Ce qui suggère que la fraction d'acétate d'éthyle est inoffensive selon le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH, 2011). Ce résultat corrobore plusieurs travaux qui ont montré que la toxicité aiguë par voie orale (dose unique) des fabacées et particulièrement les astragales est presque pas toxique selon l'Échelle de Hodge et Sterner avec DL<sub>50</sub> supérieure à 5g/kg (Boroujerdnia *et al.*, 2011 ; Lebri *et al.*, 2015 ; Fouda *et al.*, 2017).



**Figure 20.** Évolution du poids corporel des souris mâles Balb/c traitées par la fraction AEAg de la partie aérienne *A. gombo*.

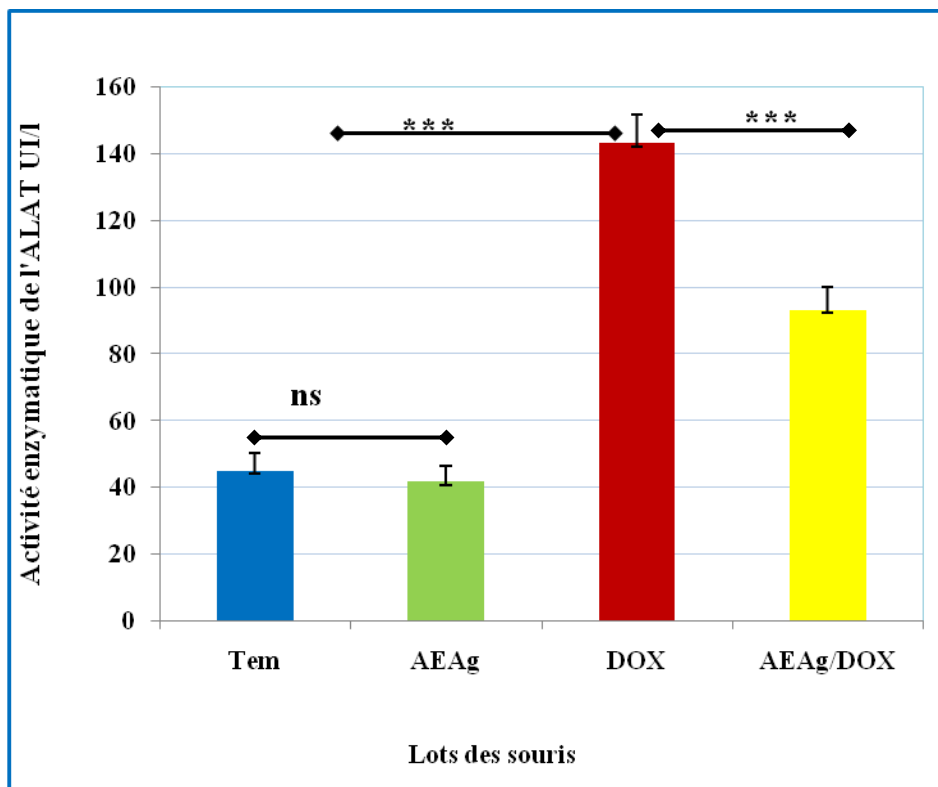
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type (n= 3). ns : aucune différence significative n'a été observée entre le groupe témoin et les groupes traités.

### 3.2. L'effet du traitement sur les paramètres biochimiques sériques ALAT, ASAT et LDH

La cytolyse est le syndrome majeur d'atteinte hépatique, ce syndrome est fortement lié à la lyse cellulaire qui se manifeste par le déversement de leurs contenus dans le sang.

Les transaminases alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT) sont des enzymes présentes à l'intérieur des cellules, qui sont également des bons marqueurs de la cytolyse hépatique. Toute lésion cellulaire ou une augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes entraîne un déversement de ces enzymes dans la circulation sanguine et également une élévation de leurs taux sériques, ce qui pourrait être des signes de maladies cardiaques et hépatiques (Wallace et Meyer, 2010).

Dans le même ordre d'idées, l'augmentation de la concentration de LDH dans le sang est associée à une cytolyse hépatique (des lésions membranaires) qui peut provoquer des hépatites, des cirrhoses, une perte de la viabilité cellulaire suivies de nécrose et des carcinomes hépatocellulaires, etc...



**Figure 21.** Variation de l'activité enzymatique des transaminases ALAT (UI/L).

Chez les souris témoins (Tem) et les souris traitées par la fraction AEAg (250 mg/kg p.c.), DOX (15mg/kg p.c.) et par la combinaison (AEAg/DOX).

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type (n=10). Les résultats des groupes DOX comparés aux groupes co-traités (DOX/Fraction), et les groupes DOX sont comparés à ceux des groupes témoins et groupes AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0.05$ ); (\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ )

Les résultats obtenus, présentent une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) des taux sériques d'ALAT ( $143,28 \pm 8,42$  IU/ml) chez les souris traitées par la DOX contre le groupe témoin par ( $45,1 \pm 5,19$  IU/ml). En outre, la fraction d'acétate d'éthyle a contrôlé l'effet du médicament chez les souris co-traitées (AEAg/ DOX) en régulant le taux d'enzyme et en restaurant l'activité métabolique à ( $93,35 \pm 6,80$  IU/ml). En effet, une diminution hautement significative ( $p < 0,001$ ) a été enregistrée par rapport au groupe DOX.

De même, des variations sont enregistrés pour l'ASAT et LDH avec DOX ( $224,58 \pm 20,95$  et  $383,99 \pm 13,78$  IU/ml) par rapport à la fraction flavonoïdique associé à la molécule de doxorubicine avec ( $131,84 \pm 13,61$  et  $170,51 \pm 9,47$  IU/ml), respectivement, l'AEAg a réduit d'une manière très hautement significatives ( $p < 0,001$ ) les taux sanguins des deux enzymes l'ASAT et LDH dans le groupe co-traité (AEAg/ DOX) comparé au groupe DOX,

Cependant, le groupe témoin et le groupe traité seulement avec la fraction AEAg (250 mg/kg p.c.), statistiquement, n'ont pas enregistré de différences significatives ( $p \geq 0,05$ ) pour les trois paramètres sériques.

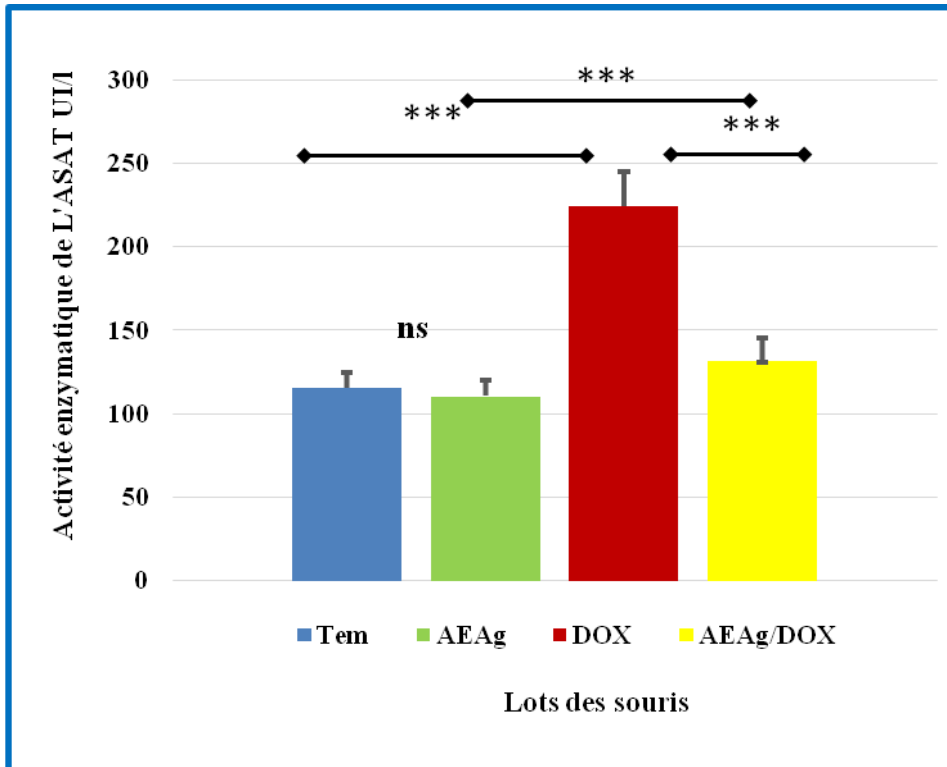
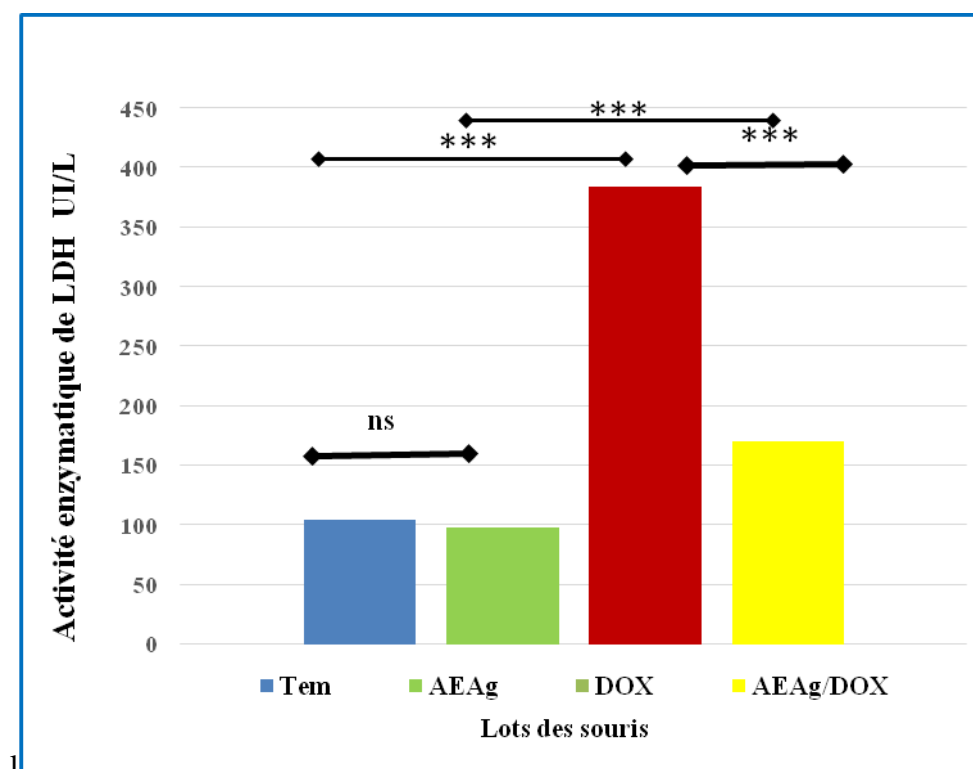


Figure 22. Variation de l'activité enzymatique des transaminases ASAT (UI/L).

Chez les souris témoins (Tem) et les souris traitées par la fraction AEAg (250 mg/kg p.c.), DOX (15mg/kg p.c.) et par la combinaison (AEAg/DOX).

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type (n=10). Les résultats des groupes DOX comparés aux groupes co-traités (AEAg/DOX), et les groupes DOX sont comparés à ceux des groupes témoins et groupes AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0,05$ );(\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0,001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0,001$ )



**Figure 23.** Variation de l'activité enzymatique des transaminases LDH (UI/L).

Chez les souris témoins (Tem) et les souris traitées par la fraction AEAg (250 mg/kg p.c.), DOX (15mg/kg p.c.) et par la combinaison (AEAg/DOX).

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type (n=10). Les résultats des groupes DOX comparés aux groupes co-traités (AEAg/DOX), et les groupes DOX sont comparés à ceux des groupes témoins et groupes AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0.05$ ); (\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ )

Les résultats de cette étude montrent l'effet protecteur de la fraction AEAg dans le groupe co-traité (AEAg/DOX) par rapport au groupe témoin et au groupe DOX seul. L'analyse des résultats obtenus a montré que l'administration de la molécule DOX à une dose unique 15 mg/kg par voie intra péritonéale a révélé des taux sériques (ALAT, ASAT et LDH) très élevés par rapport aux groupes témoins et aux groupes traités par la fraction seule (250 mg/kg p.c.), confirmant clairement une atteinte hépatique significative due à l'accumulation de doxorubicine dans le foie, qui pourrait provoquer une destruction cellulaire ou augmenter la perméabilité des cellules hépatiques (Hozayen *et al.*, 2014).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux (El-Moselhy *et al.*, 2014 ; Nagai *et al.*, 2016 ; Mansouri *et al.*, 2017 ; Kara Ali et Abidli, 2017 ; Hassan, 2018 ; Omobowale *et al.*, 2018) qui ont montré que la doxorubicine peut provoquer une hépatotoxicité qui se manifeste par l'augmentation d'enzymes suite à la destruction d'hépatocytes, la cytolyse étant donc le principal syndrome affectant le foie (Allard, 2020 ; Prasanna *et al.*, 2020 ; Alhashmi *et al.*, 2020).

L'hépatotoxicité s'est avérée être l'un des principaux effets secondaires associés à l'administration de doxorubicine dans le traitement du cancer (Omobowale *et al.*, 2018 ; Allard, 2020 ; Alhashmi *et al.*, 2020 ; Prasanna *et al.*, 2020).

Toutefois, l'administration journalière de la fraction AEA<sub>g</sub> a provoqué une diminution très hautement significative des paramètres étudiés (ALAT, ASAT et LDH) chez le groupe ayant subi un co-traitement (AEA<sub>g</sub>/DOX). Cette diminution dépend de l'atténuation des lésions hépatiques et explique le rôle protecteur des polyphénols contre l'hépatotoxicité induite par la DOX. Plusieurs études ont rapporté l'effet hépatoprotecteur des biomolécules de l'astragale contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine (Rašković *et al.*, 2011 ; Yimam *et al.*, 2016 ; Nagai *et al.*, 2016 ; Foudah *et al.*, 2017 ; Omobowale *et al.*, 2018 ; Bellebcir *et al.*, 2022 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

Les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces propriétés pourraient contribuer à protéger contre le cancer et d'autres maladies dégénératives (Middleton *et al.*, 2000 ; Tigrine, 2014 ; Kilani-Jaziri *et al.*, 2017 ; Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Les résultats de cette étude montrent que la fraction AEA<sub>g</sub> a une activité antiproliférative *in vitro*, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement du cancer.

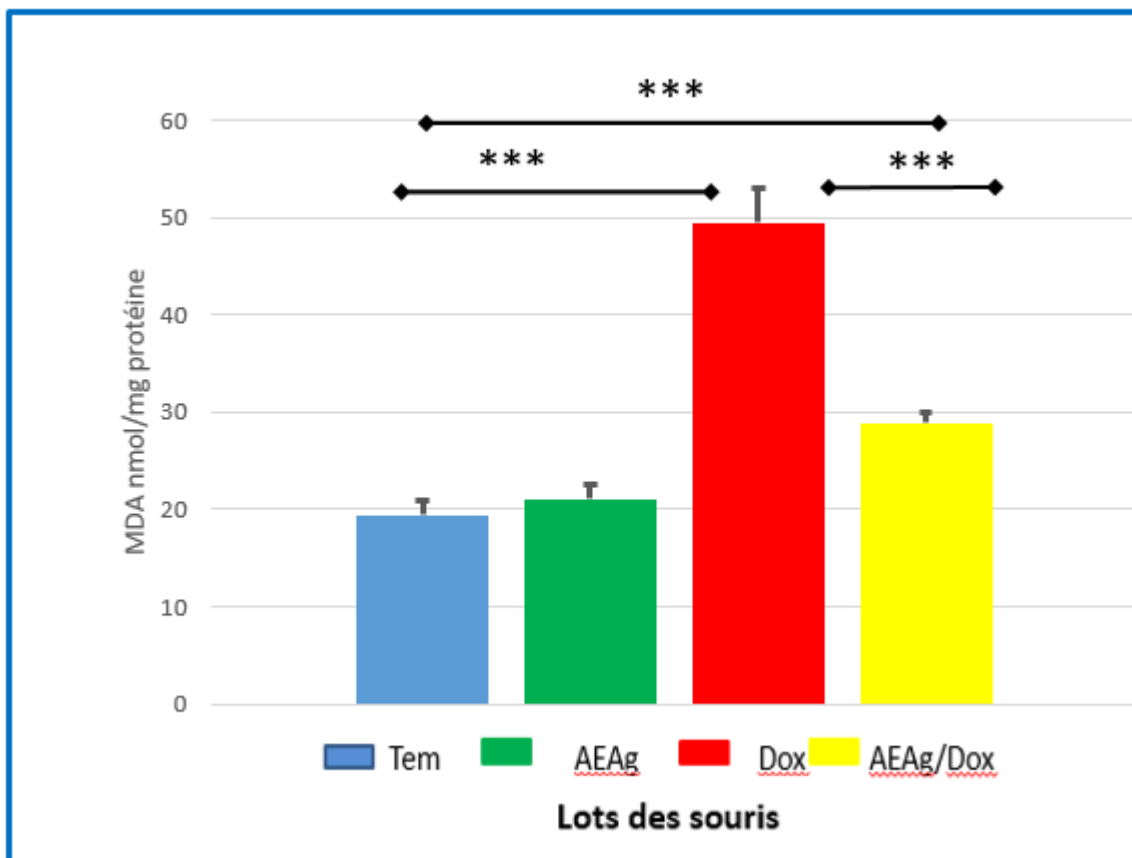
Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études scientifiques ont rapporté qu'un grand nombre d'antioxydants naturels (biomolécules) ont été explorés pour réduire les effets nocifs du DOX sur le foie (Foudah *et al.*, 2017 ; Omobowale *et al.*, 2018 ; Prasanna *et al.*, 2020 ; Bellebcir *et al.*, 2022 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022). De ce fait, la pharmacothérapie antioxydante serait donc un moyen efficace de réduire le stress oxydant causé par le DOX. Notre étude confirme cette idée et montre que le co-traitement du DOX avec des molécules antioxydantes, les flavonoïdes de la fraction AEA<sub>g</sub>, peut potentiellement atténuer l'hépatotoxicité du DOX *in vivo*, probablement en réduisant les EROs.



### 3.3. L'effet du traitement sur les paramètres du stress oxydant MDA et GSH

Les dommages oxydatifs ont été évalués dans les homogénats de foie en estimant le taux de production de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) exprimés en équivalents MDA et les niveaux du glutathion réduit (GSH).

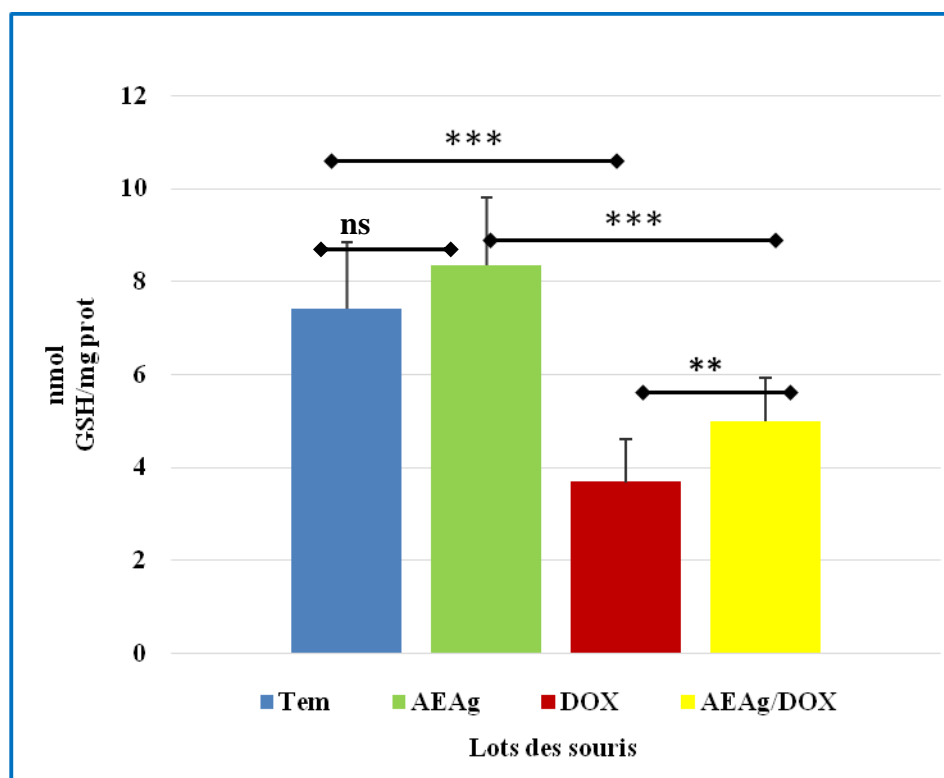
Le malondialdéhyde (MDA), l'un des marqueurs les plus étudiés du stress oxydant et un indice de la peroxydation lipidique. Le GSH est l'un des enzymes antioxydantes qui protègent les cellules contre les agressions chimiques endogènes ou exogènes et leurs sous-produits EROs. Une déplétion excessive de GSH peut conduire à un stress oxydant et à des lésions hépatiques (Prasanna *et al.*, 2020).



**Figure 24.** Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. gombo*.250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique, le taux de malondialdéhyde (MDA).

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type (n=10). Les résultats des groupes DOX comparés aux groupes co-traités (AEAg /DOX), et les groupes DOX sont comparés à ceux des groupes témoins et groupes AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0.05$ );(\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ )

La figure 24 montre les variations de la formation du MDA hépatiques ; une augmentation très hautement significative ( $p < 0,001$ ) chez le groupe traité par la DOX (49,40±3,33nmol / mg protéine) par rapport aux souris traitées par la fraction flavonoïdique seule (250 mg/kg p.c.) et le traitement combiné (AEAg/DOX) 21,01±1,38 et 28,88±2,06 nmol/mg protéine, respectivement. Tandis que le groupe témoin et le groupe traité par la fraction seule (250 mg/kg p.c.) n'ont pas montré une variation significative ( $p \geq 0,05$ ). L'atténuation des niveaux de MDA dans le groupe prétraité avec la fraction flavonoïde peut probablement être expliquée par la réduction de l'attaque oxydante et l'augmentation de la défense antioxydante par le piégeage des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et l'arrêt de la peroxydation lipidique. En revanche, les taux élevés de MDA dans le groupe DOX sont dus à la peroxydation des lipides membranaires générée par les EROs induits par la doxorubicine.



**Figure 25.** Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d'A. gombo (AEAg) 250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique, le taux de glutathion réduit (GSH) (nmol GSH/mg prot).

AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0,05$ );(\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0,001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0,001$ )

Dans le même ordre d'idée, la figure 25 montre que les niveaux de GSH chez les souris co-traitées avec (AEAg/DOX) ont montré une augmentation hautement significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe DOX. De même, le groupe DOX a montré une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) des niveaux de glutathion hépatique par rapport au groupe témoin et au groupe traité par la fraction (AEAg).

Des études antérieures ont confirmé le pouvoir antioxydant et l'effet hépato protecteur des flavonoïdes extraits d'*Astragalus monspessulanus* L et d'*Astragalus spruneri* Boiss contre les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) (Kondeva-Burdina., 2022). Toutefois, D'autres études ont montré que l'alcesefoliside, un flavonol tétraglycoside extrait d'*Astragalus monspessulanus*, et la cilymarine, un flavonolignane ont été co-administrés avec la doxorubicine (DOX). Les résultats ont montré que ces composés réduisaient les niveaux de malondialdéhyde (MDA), un marqueur de stress oxydatif. Cet effet pourrait être lié au cycle d'oxydo-réduction de la DOX (Kondeva-Burdina., 2018). Dans notre étude, nous avons obtenu des résultats similaires. Les flavonoïdes de la fraction AEA<sub>g</sub> ont contribué de manière significative à réduire les niveaux de MDA chez le groupe des souris traitées (AEAg/DOX).

D'innombrables études ont montré que les flavonoïdes rétablissent la déplétion du GSH et diminuent la production du MDA (Simeonova et al., 2015 ; Kondeva-Burdina., 2018 ; Kondeva-Burdina., 2022) ; ces effets corroborent les résultats de la présente étude, dans laquelle le GSH hépatique a révélé une déplétion très hautement significative dans le groupe traité par, DOX. Dans une étude publiée en 2018, Omobowale et ses collaborateurs ont montré que l'acide gallique protège le foie des dommages causés par la doxorubicine. Ils ont proposé que l'acide gallique agisse en piégeant les radicaux libres, ce qui réduit le stress oxydatif.

Les résultats de la présente étude ont montré que les composés phénoliques dérivés de l'astragale empêchaient également la déplétion du glutathion hépatique et la peroxydation des lipides induits par la doxorubicine chez les souris, cette peroxydation peut entraîner des lésions cellulaires et la perte de l'intégrité membranaire. Ce résultat confirme l'action suggérée des polyphénols en tant qu'agents hépatoprotecteurs (Middleton et al., 2000 ; Foudah et al., 2017 ; Ali et al., 2018 ; Aktaş et al., 2020 ; Kondeva-Burdina et al., 2022).

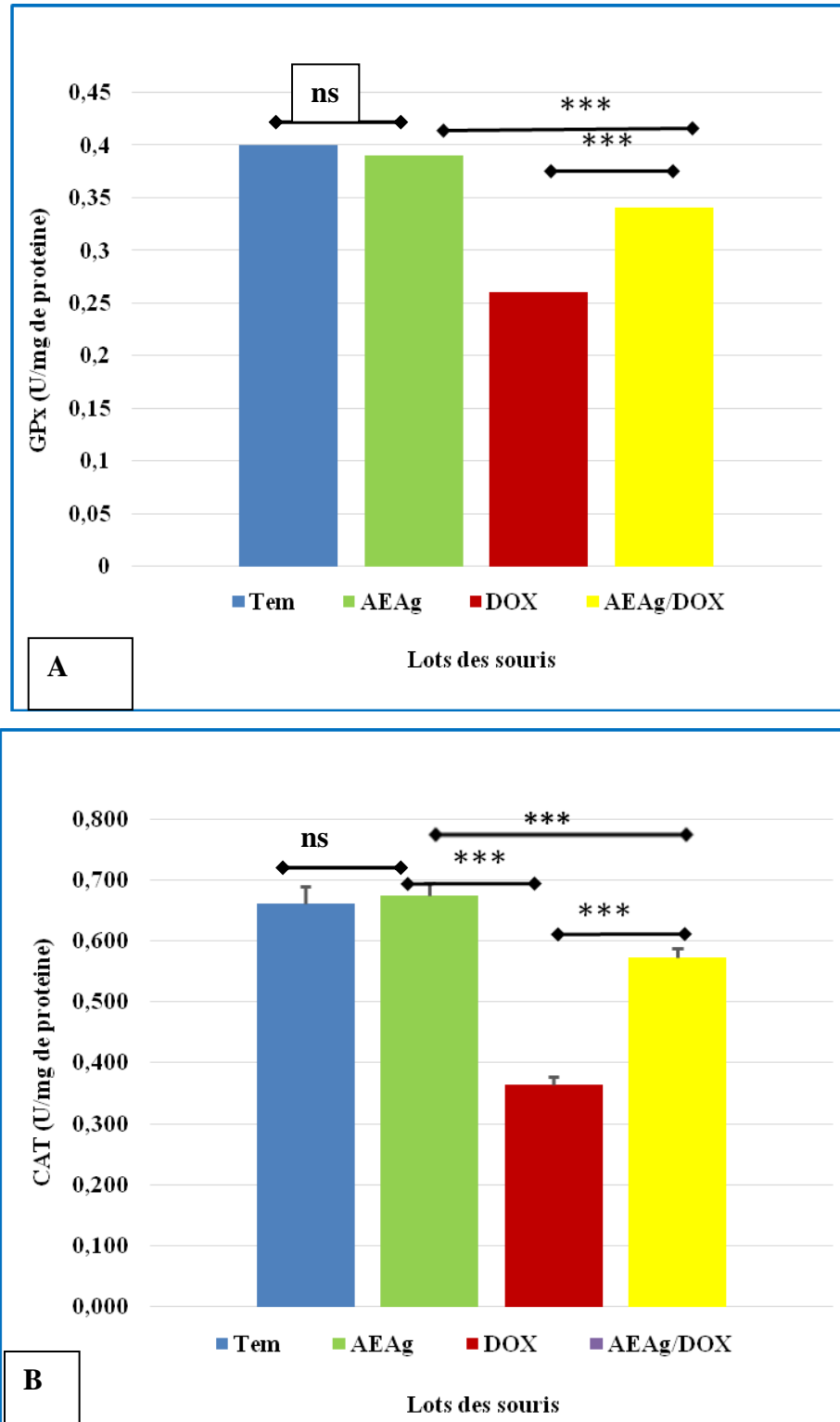
De nombreuses études ont été menées sur les effets des polyphénols, notamment des flavonoïdes issus de plantes médicinales, sur l'hépatotoxicité induite par la doxorubicine (Foudah *et al.*, 2017 ; Kara Ali et Abidli, 2017 ; Omobowale *et al.*, 2018 ; Bellebcir *et al.*, 2022 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022). Les effets protecteurs des flavonoïdes contre l'hépatotoxicité de la doxorubicine sont également dus à leurs propriétés antioxydantes, en particulier leur capacité à piéger les radicaux libres (Nagai *et al.*, 2016 ; Foudah *et al.*, 2017 ; Ali *et al.*, 2018).

### **3.4. L'effet du traitement sur l'activité des enzymes hépatiques (GPx et CAT)**

Le stress oxydatif donne lieu à une toxicité lorsque le taux de génération de radicaux libres dépasse la capacité de la cellule à les éliminer. L'organisme est doté d'un système de défense antioxydant complexe localisé dans les compartiments intra et extracellulaire. Afin de neutraliser les EROs en agissant sur leur réactivité et en la rendant stable et non réactive, il est essentiel de lutter contre les effets toxiques. L'évaluation du stress oxydant est l'un des objectifs capitaux de la présente étude vue que son exploration servira à diagnostiquer les conséquences de l'administration de doxorubicin et l'effet hépato-protecteur des flavonoïdes vis à vis l'hépatotoxicité induite par DOX. De ce fait, il semble être intéressant d'évaluer les effets sur le système antioxydant enzymatique (CAT, GPx).

La catalase est un groupe d'enzymes tétramériques où chaque unité comporte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Cette enzyme prévient la peroxydation des molécules biologiques induite par l'eau oxygénée. Le rôle de la catalase est d'accélérer la transformation du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau et en dioxygène, pour protéger les cellules des dommages oxydatifs.

Le glutathion peroxydase joue un rôle principal dans la protection de l'organisme contre les dommages oxydants, il est capable de réduire les hydroperoxydes de lipides en composés hydroxyles correspondants du glutathion (GSH) ou à des agents réducteurs équivalents comme co-substrats (Arthur, 2000). La glutathion peroxydase catalyse la détoxification du  $H_2O_2$  et des peroxydes lipidiques par le glutathion réduit.



**Figure 26.** Effet de la fraction d'acétate d'éthyle d'*A. gombo* (AEAg) 250 mg /kg p.c, de la DOX (15 mg / kg p.c) et de la combinaison (AEAg /DOX) sur l'état redox hépatique. (A) : Glutathion peroxydase (GPx). (B)Activité de catalase (CAT).

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type (n=10). Les résultats des groupes DOX comparés aux groupes co-traités (DOX/AEAg), et les groupes DOX sont comparés à ceux des groupes témoins et groupes AEAg. (ns) effet non significatif ( $p \geq 0.05$ );(\*\*) effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ) (\*\*\*) effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Les figures 26A et 26 B représentent l'activité de la GPx et de la CAT cytosolique hépatique chez les quatre lots de souris. Le traitement des souris avec le DOX seul (15mg/kg i.p) provoque une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) des activités CAT et GPx par rapport au groupe ayant subi une co-administration (AEAg/DOX) et au groupe témoin.

En revanche, le groupe témoin et le groupe traité avec la fraction (AEAg) seule (250 mg/kg p.c.), n'ont enregistré aucune variation significative ( $p \geq 0,05$ ) de l'activité enzymatique de la CAT et de la GPx. L'effet de la fraction par sa composition en flavonoïde dans le groupe prétraité (AEAg/DOX) se traduit par la normalisation significative des deux enzymes CAT et de GPx :  $0,57 \pm 0,015 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protéine et  $0,341 \pm 0,014 \mu\text{moles GSH oxydé}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines respectivement comparés au groupes traités avec DOX :  $0,364 \pm 0,013 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protéine et  $0,261 \pm 0,014 \mu\text{moles GSH oxydé}/\text{min}/\text{mg}$ . Une normalisation distincte du profil antioxydant a été détectée dans les groupes des souris co-traitées (AEAg /DOX). Nos résultats suggèrent que les flavonoïdes ont un effet protecteur contre la toxicité et les lésions hépatiques causées par l'accumulation aiguë de doxorubicine (DOX) dans le foie.

De même, Kondeva-Burdina *et al.* (2018 et 2022) ont confirmé l'effet hépato-protecteur des alcesefoliside et silymarine extraits d'*Astragalus monspessulanus* et trois autres flavonoïdes extraits d'*Astragalus spruneri* Boiss par la normalisation des taux des CAT et de GPx chez les rats prétraités avec les flavonoïdes par rapport à des rats traités avec le tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ). Ces résultats corroborent plusieurs travaux qui ont montré que les flavonoïdes de l'astragale sont capable de stabiliser les radicaux libres et les EROs, de maintenir l'intégrité des membranes des hépatocyte et d'empêcher la diffusion de substances toxiques (Simeonova *et al.*, 2015 ; Yimam *et al.*, 2016 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2018 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

Des travaux antérieurs sur des rats traités à la DOX ont montré une réduction significative des taux de cytochrome P450 (CYP 450) et de GSH dans le tissu hépatique des rats, tandis que les taux de glutathion et de MDA augmentent dans le tissu hépatique et les hépatocytes. En outre, la DOX augmente le niveau des marqueurs apoptotiques tels que la caspase 3 activée (Cas 3) et le  $\gamma$ -H2AX phosphorylé (membre X de la famille des histones H2A) dans le foie de rat. Le niveau élevé de  $\gamma$ -H2AX peut être considéré comme un biomarqueur de la réponse aux lésions de l'ADN (Kwiecień *et al.*, 2006 ; Prasanna *et al.*, 2020).

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par l'équipe de Hozayen (2014), qui ont montré que la pré-administration de rutine et d'hésperidine à des rats traités à la doxorubicine

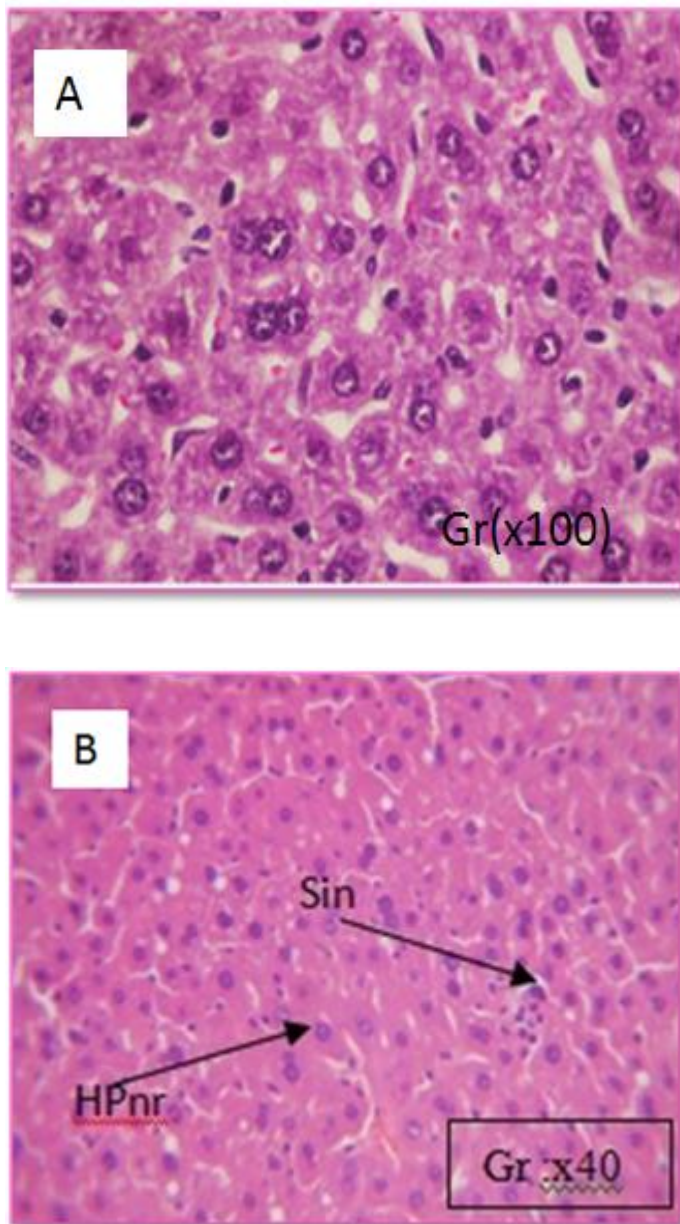
(DOX) augmente les activités de la glutathion peroxydase et de la glutathion-S-transférase, et réduit le niveau de peroxydation lipidique. On suppose que les flavonoïdes dérivés de plantes médicinales, principalement des Fabacées, agissent sur le glutathion intracellulaire, qui prévient la peroxydation lipidique des membranes (Garza, 2015 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2018 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

Dans le même ordre d'idées, Gao *et al.* (2015) ont rapporté que la CAT fonctionne en synergie avec le GPx pour neutraliser l'effet des EROs produites par un agent indicateur de stress (substance chimique) et/ou une toxicité induite par un médicament.

### 3.5. Examen histopathologique

Pour étudier l'effet protecteur de la fraction d'acétate d'éthyle dose de (250 mg/kg p.c.) contre la toxicité et les dommages causés par le DOX (dose unique 15 mg/kg p.c./I.P) chez les souris, il est essentiel de procéder à un examen histopathologique. Cela permet de comprendre l'évolution des processus pathologiques au sein du foie. L'observation microscopique des coupes histo-pathologiques du foie des souris a montré que le tissu hépatique était normal dans le lot témoin (figure 27A), présentant une architecture normale des cellules hépatiques avec un cytoplasme clair et des noyaux normaux ; le lot prétraité avec la fraction flavonoïde AEAg (250 mg/kg p. c ), présentait une architecture cellulaire normale et des altérations structurelles insignifiantes, ce qui suggère qu'il n'est pas pathologique, cette hypothèse étant soutenue par l'architecture normale des hypatocytes intacts et des niveaux normaux d'enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) (figure 27B).

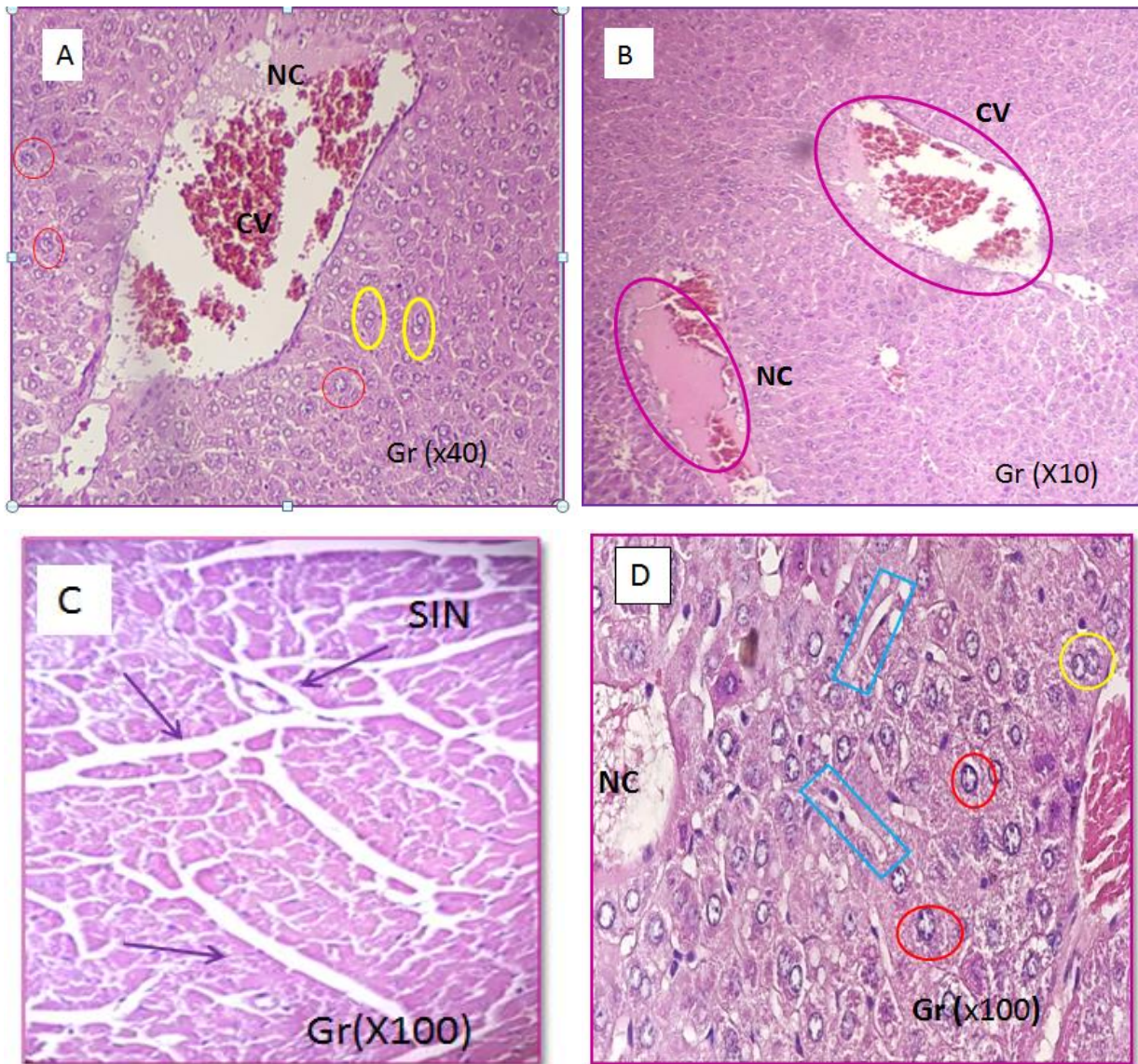
Selon Reungoat (2019), les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) du foie assurent la tonicité vasculaire hépatique, elles tiennent les hématies mais elles permettent le passage d'une multitude de molécules telles que les protéines plasmatiques, les lipoprotéines, les molécules pharmacologiques, les virus et les exosomes, qui peuvent ensuite être dirigées vers les hépatocytes ou les cellules étoilées pour créer de la signalisation.



**Figure 27.** (A) : Coupe histologique du foie groupe témoin ; (B) groupe traité par AEAg (250 mg/kg p.c) pendant 15 jours : HPnr : Hépatocytes normaux ; Sin : Sinusoïdes. Coloration, hématoxyline-Eosine.



En revanche, les coupes histologiques des souris ayant reçu du DOX ont montré des changements importants dans la structure du foie. Ces altérations incluent une congestion vasculaire de la veine centrolobulaire, des signes de souffrance hépatocytaire, une dilatation importante des sinusoides, une vacuolisation des hépatocytes, une condensation des noyaux et une binucléation (Figure : 28A ,28B, 28C, 28D). Selon Prasanna et *al.* (2020), la doxorubicine augmente de manière significative l'expression des molécules apoptotiques intrinsèques et extrinsèques telles que la protéine X associée à BCL2 (Bax) et Fas, respectivement, suite à la formation de grandes quantités de caspase-3 et de cytochrome C (Cyt C) dans les cellules cancéreuses et non cancéreuses, ce qui déclenche finalement une signalisation apoptotique des deux voies.



**Figure 28.** Coupe histologique du foie groupe traité par DOX. Coloration, hématoxyline-Eosine.

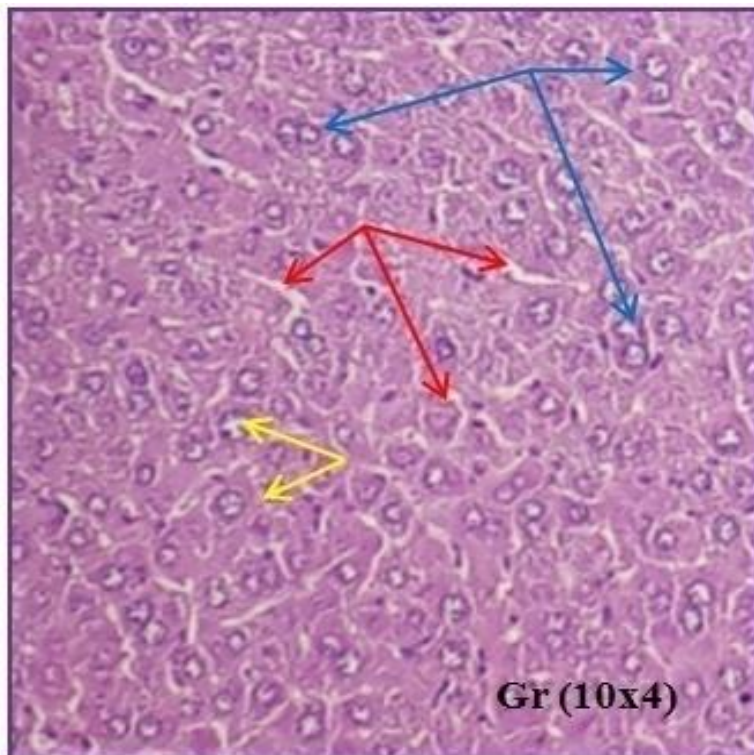
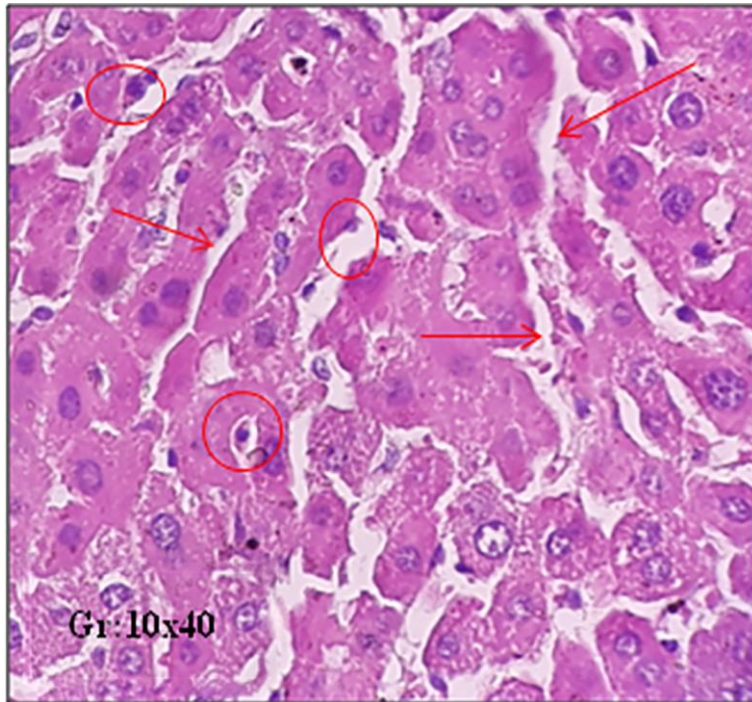
CV: congestion vasculaire (dilatation) ; Nc : nécrose ; ○ Binucleation, ○ Ballonisation cellulaire, ▭ Sinusoides dilatés

Les coupes du lot co-traité (AEAg/DOX) ont montré des altérations structurelles notables par rapport aux groupes témoin et AEAg seul. Ces altérations se manifestaient par une dilatation des capillaires sinusoides, qui étaient plus larges que la normale (subnormales). L'équipe de DeLeve (2008) et Reungoat (2019) ont montré que les LSECs sont les premières cellules à se différencier en capillaires, et ce de façon très précoce, avant même l'inflammation et la fibrose. En outre, on observe une hypertrophie des hépatocytes, mais une absence remarquable de nécrose par rapport au groupe DOX. Cela nous laisse suggérer que la fraction flavonoïdique (AEAg) a pu réduire les lésions et certains troubles causés par le stress cytotoxique de la DOX, comme le montre la figure 29.

Nos résultats confirment ceux de Kalender *et al.* (2005), Nagai *et al.* (2015), Hassan *et al.* (2017); Mansouri *et al.* (2017) et Prasanna *et al.*, (2020). Ces études ont montré que la doxorubicine, un type d'antracycline, induit des lésions graves du foie, caractérisées par des altérations dégénératives des hépatocytes et une nécrose importante. Cependant, l'association de la doxorubicine et des polyphénols a permis de réduire ces lésions de manière significative.

En effet, il a été reporté que la combinaison de la bergamottine, de la catéchine, de la quercétine et de l'acide gallique avec des médicaments anticancéreux (Doxorubicine et Gemcitabine) peut augmenter de manière significative l'effet apoptotique de ces médicaments (Hassan *et al.*, 2017). Ces résultats s'accordent avec les résultats de Kalender et ses collaborateurs (2005), qui ont démontré que la vitamine E et la catechine exercent un effet hépatoprotecteur contre la toxicité induite par la chimiothérapie à base de doxorubicin.

Par ailleurs, l'équipe de Jayameena (2018) apporte des preuves solides que la rutine inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du côlon humain (HCT116) en induisant l'apoptose en réduisant la migration des cellules HCT116 qui interrompent le cycle cellulaire en phase G0-G1.



**Figure 29.** Coupe histologique du foie groupe co-traité (DOX/AEAg/ 250 mg/kg p.c). Coloration, hématoxyline-Eosine.

Flèche jaune : Ballonisation cellulaire ; Flèche bleu : Binucléation ; Flèche rouge : sinusoides dilatés (subnormales) ; Cellules sinusoidale ○

Dans une étude publiée en 2017, Fouda et ses collaborateurs ont montré que les rats co-traités avec des extraits d'*Astragalus echinops* et d'*Astragalus logopodioides*, suivis d'une overdose de paracétamol, ont présenté une amélioration significative de leur aspect histopathologique. Cela suggère que ces extraits ont protégé les hépatocytes contre les lésions hépatiques induites par le paracétamol.

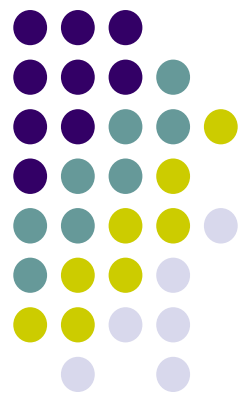
Dans le même contexte, plusieurs études ont montré que les flavonoïdes peuvent avoir un double effet sur la chimiothérapie : ils peuvent protéger les cellules normales contre les effets secondaires de la chimiothérapie ; ils peuvent augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux médicaments de chimiothérapie (Hozayen *et al.*, 2014 ; Nagai *et al.*, 2015 ; Hassan *et al.*, 2017 ; Mansouri *et al.*, 2017 ; Jayameena *et al.*, 2018 ; Hassan, 2020 ; Kondeva-Burdina *et al.*, 2022).

Le stress oxydant est le mécanisme le plus probable de cette toxicité (Zhang *et al.*, 2012 ; Uygur *et al.*, 2014 ; Guon et Chung, 2016). Les résultats de ce travail confirment que le DOX diminue de manière très hautement significative ( $p < 0,001$ ) le niveau de glutathion (GSH) dans les tissus du lot DOX en augmentant la teneur malondialdéhyde (MDA). Sur la base de toutes les informations citées précédemment, nous concluons que la toxicité de doxorubicine est due à un état de stress oxydant.

Les résultats de cette étude montrent que la fraction AEAg possède une forte activité antioxydante. Cette étude démontre également que les polyphénols ont un effet protecteur et apoptotique. Les résultats de l'étude histopathologique et biochimique montrent que l'accumulation de la doxorubicine (DOX) dans les hépatocytes provoque un stress oxydant hépatique, ce qui entraîne des dommages importants au foie. La coloration DAPI/Acridine orange a permis de confirmer que la fraction AEAg induit l'apoptose *in vitro* dans les lignées cancéreuses étudiées.

# Conclusion générale et perspective

---



*Astragalus gombo* coss & dur est une espèce endémique des zones arides d'Algérie, connue des populations locales, mais peu de données scientifiques sont disponibles sur ses propriétés biologiques et médicinales et sur les métabolites responsables de ces propriétés.

Par conséquent, dans la présente étude, nous avons évalué les effets antioxydants, anticoagulants, immunomodulateurs, anticancéreux et hépatoprotecteurs de l'extrait aqueux (AQAg) et de trois autres fractions : AEAg, NBAg et MEAg, obtenues par fractionnement bioguidé. La première partie de cette étude vise à identifier les molécules bioactives responsables des propriétés thérapeutiques traditionnelles de l'*A. gombo*

Sur la base des recherches effectuées dans cette étude, l'analyse LC-ESI-MS a révélé que les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques constituaient les principaux groupes de composés phénoliques dans les différents solvants. L'activité antioxydante est exploitée par différentes approches : le test DPPH, la chélation du fer ferreux et le pouvoir réducteur qui s'est avéré significativement plus puissant que le contrôle positif BHA, un antioxydant commercial.

L'activité phagocytaire est menée sur les fractions AEAg et NBAg, dont l'index phagocytaire marqué indique une stimulation du SRE de manière dose-dépendante. En effet, les flavonoïdes dérivés d'*A. gombo* ont révélé un effet immunomodulateur significatif.

L'effet anticoagulant des fractions est évalué *ex vivo*, AQAg, NBAg et AEAg ont enregistré un allongement du temps de prothrombine (TP) sur la voie intrinsèque, en particulier, NBAg et AEAg ont significativement ( $P < 0,001$ ) allongé le temps de coagulation sur la voie intrinsèque TCK. Cependant, les composés phénoliques de l'AQAg ont inhibé la formation de caillots et augmenté le TP de manière dépendante du solvant.

L'activité anticancéreuse de la fraction AEAg a montré un potentiel antiprolératif significatif contre les cellules Hela, avec une  $IC_{50}$  de 108,8  $\mu\text{g/mL}$ . En revanche, son effet sur les cellules MCF-7 a été moins significatif, avec une  $IC_{50}$  de 168,4  $\mu\text{g/mL}$ . Il convient de noter que l'évaluation des lignées cellulaires par rapport à un extrait d'origine d'*A. gombo* a été réalisée pour la première fois.

Les cellules hépatiques normales de Souris (Aml12) se sont avérées viables après traitement à l'AEAg à des concentrations supérieures à 2000  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui indique un indice de sélectivité très élevé.

En effet cet indice a montré que les flavonoïdes contenant à la fraction d'acétate d'éthyle ont une action cytotoxique préférentielle sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Ainsi, Le traitement des lignées cellulaires Hela, MCF-7 et Aml12 avec la concentration IC50 d'AEAg pour chaque lignée, pendant 24 heures, a induit un effet apoptotique, comme l'a montré la technique de double coloration DAPI/AO.

Au vu de ce qui précède, les résultats obtenus *in vitro* avec la fraction d'acétate d'éthyle d'*A.gombo* dans la première partie de cette étude nous ont incités à évaluer la toxicité *in-vivo* et plus particulièrement l'effet hépato-protecteur de la fraction AEA<sub>g</sub> contre la toxicité aigüe provoquée par la doxorubicine. Le test d'innocuité a confirmé que la plante *A. gombo* est inoffensive à un seuil de dose de 5000 mg/kg.

L'extrait d'acétate d'éthyle a pu prévenir l'hépatotoxicité et réduire le stress oxydant médié par la doxorubicine. Cela a été démontré par la normalisation des biomarqueurs du stress oxydant (MDA et GSH), et de l'activité enzymatique cytosolique hépatique (CAT et GPx), la régulation des enzymes sériques (ASAT, ALAT et LDH). En outre, l'étude histopathologique a montré que l'extrait a pu rétablir les lésions histologiques du foie causés par le stress cytotoxique généré par la doxorubicine.

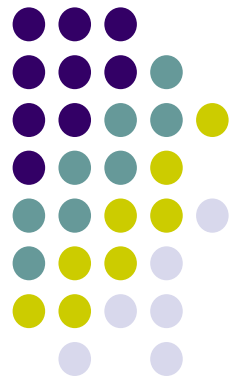
Les résultats obtenus dans cette étude sont prometteurs, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour :

- Identifier avec précision des molécules et de leur synergie impliquées dans l'effet anticoagulant ;
- L'agent immunostimulant doit être étudié plus amplement en déterminant la structure moléculaire des flavonoïdes et en évaluant son activité immunomodulatrice *in vivo*.
- Evaluation de l'effet anticancéreux de différents extraits sur plusieurs lignées cancéreuses en élucidant les protéines responsables de l'activation de la cascade apoptotique, en particulier l'effet des molécules d'intérêt sur le fonctionnement de l'action pro-apoptotique.
- L'investigation du cycle cellulaire en générale
- Une culture de cette espèce et un investissement dans ces molécules seraient judicieux, en collaboration avec des chercheurs en botanique, en chimie et en agronomie pour développer des méthodes de culture et de transformation efficaces.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



## A

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., ... & Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.
- Aguilar, T. A. F., Hernández, B. C. N., & Pérez, J. A. M. (2016). Endogenous antioxidants: A review of their role in oxidative stress. In J. A. Morales-Gonzalez (Ed.), *A master regulator of oxidative stress - the transcription factor Nrf2* (p. 13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Ahmad K, Hafeez ZB, Bhat AR, Rizvi MA, ThakurSC, Azam A (2018) Antioxidant and apoptotic effects of *Callistemon lanceolatus* leaves and their compounds against human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: 1195-1209.
- Aktaş, I., Özmen, Ö., Tutun, H., Yalçın, A., & Türk, A. (2020). Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(2), 121-128.
- Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M (2017) Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews* 18:167-176.
- Alavi, M., & Karimi, N. (2018). Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using *Artemisia haussknechtii* leaf extract. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(8), 2066-2081.
- Alhashmi, M., & Alshaikhi, R. (2020). Hepatotoxicity in Cancer Patients Receiving Anthracyclin at KAUH: A Retrospective Study. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*, 10(2), 82-7.
- Alhashmi, M., & Alshaikhi, R. (2020). Hepatotoxicity in Cancer Patients Receiving Anthracyclin at KAUH: A Retrospective Study. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*, 10(2), 82-7.
- Ali, M., Khan, T., Fatima, K., Ali, Q. U. A., Ovais, M., Khalil, A. T., ...& Idrees, M. (2018). Selected hepatoprotective herbal medicines: Evidence from ethnomedicinal applications, animal models, and possible mechanism of actions. *Phytotherapy research*, 32(2), 199-215.
- Alibert, M., & Chimini, G. (2002). L'élimination des cellules apoptotiques : une phagocytose particulière. *Medecine/sciences*, 18(8-9), 853-860.
- Allard, J. (2020). Mise en évidence de l'implication de différents mécanismes dans la survenue de la stéatose hépatique d'origine médicamenteuse en absence de dysfonction mitochondriale sévère (Doctoral dissertation, Rennes 1).

- Al-Qubaisi, M., Rozita, R., Yeap, S. K., Omar, A. R., Ali, A. M., & Alitheen, N. B. (2011). Selective cytotoxicity of goniotalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules*, 16(4), 2944-2959.
- Amiot, M. J., Tacchini, M., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1990). Le processus technologique de désamérisation des olives : caractérisation des fruits avant et pendant le traitement alcalin.
- Amiri, M. S., Joharchi, M. R., Nadaf, M., & Nasseh, Y. (2020). Ethnobotanical knowledge of *Astragalus* spp.: The world's largest genus of vascular plants. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 10(2), 128.
- Amirou, A., Razzok, E. M., Legssyer, A., Ziyat, A., Aziz, M., Bnouham, M., ...& Mekhfi, H. (2023). Effects of Walnut Bark Extract on the Human Platelet Aggregation, Adhesion, and Plasmatic Coagulation In Vitro. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2023.
- Amoussa AMO, Sanni A, Lagnika L (2015) Antioxidant activity and total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the bark extracts of *Acacia ataxacantha*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4: 172-178.
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98(1), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.044>
- Aslanipour B, Gülcemal D, Nalbantsoy A, Yusufoglu H, BedirE (2017) Cycloartane-type glycosides from *Astragalus brachycalyx* FISCHER and their effects on cytokine release and hemolysis. *Phytochemistry Letters* 21: 66-73.
- Athukorala Y, Lee K, Kim S, Jeon Y (2007) Anticoagulant Activity of Marine Green and Brown Algae Collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource technology* 98: 1711-1716.
- Attia, S. M., & Bakheet, S. A. (2013). Effect of dihydrokainate on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by doxorubicin. *Mutagenesis*, 28(3), 257-261.
- Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2014). Potential of polyphenols to improve vascular health by stimulating the endothelial function. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 160-172.
- Awad BM, Eman SH, Amany KI, Amira SW, Mohamed MR, Mo-hamed AH, Mahmoud AE, Safwat AA (2017) Cytotoxic Activity Evaluation and Molecular Docking Study of Phenolic Derivatives from *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Growing in Egypt. *Medicinal Chemistry Research* 26: 2065-2073.
- Awouafack, M. D., McGaw, L. J., Gottfried, S., Mbouangouere, R., Tane, P., Spitteller, M., & Eloff, J. N. (2013). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions

and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 1-9.

## B

Beau, P. (2001) Les immunomodulateurs naturels utilisés en prophylaxie et lors des traitements des infections ORL a récides (Thèse d'état de Docteur en pharmacie) Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Bedir E, Pugh N, Calis I, Pasco DS, Khan IA, (2000) Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glyco-sides from *Astragalus* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(7): 834-837.

Bellakhdar J .1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press. Paris. France.

Benarba, B., & Pandiella, A. (2018). Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 408-423.

Benchadi W, Haba H, Lavaud C, Harakat D, Benkhaled M (2013) Secondary metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. And their chemotaxonomic significance. *Records of Natural Products* 7:105-113.

Benferdia S, Rahmani Z, Belfar A, Cherbi R, Messaoudi A, Saïdi M. (2021). Phytochemical composition and antioxidant activity of Algerian *Astragalus gombo* stems. *Bulgarian Chemical Communications*, 307.

Benmebarek A, Zerizer S, Laggoune, S, Kabouche, Z (2013) Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 9(1):1-4.

Bensakhria, A., 2018 Cytotoxicité, Nécrose, Apoptose Chapter In book: Toxicologie Générale. Liverpool John Moores University. Liverpool, Merseyside, United Kingdom

Bettaieb, A. (2009). Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C/thèse présentée comme exigence partielle du doctorat en biologie par Ahmed Bettaieb.

Bijak, M., Sut, A., Kosiorek, A., Saluk-Bijak, J., & Golanski, J. (2019). Dual anticoagulant/antiplatelet activity of polyphenolic grape seeds extract. *Nutrients*, 11(1), 93.

Bilgic, S., Ozgocmen, M., Ozer, M. K., & Asci, H. (2020). Misoprostol ameliorates doxorubicin induced cardiac damage by decreasing oxidative stress and apoptosis in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(7), 514-521.

Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Decreusefond, C., Corradetti, A., Verolini, F., ... & Ventura, A. (1970). Effect of vaccination with irradiated *Plasmodium berghei* on the phagocytic activity of the reticulo endothelial system during plasmodium infection of the rat. *Bulletin of the World Health Organization*, 42(1), 163-168.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

Bisby F A., Buckingham J., Harborne J B. 1994. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. Chapman & Hall, London.

Bkhairia, I., Ktari, N., Younes, I., Nasri, M. & Ghrobel, S. (2015). Golden grey mullet (*Liza aurata*) alkaline proteases: biochemical characterization, application in the shrimp wastes deproteinization, laundry commercial detergents, and preparation of antioxidant protein hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(6), 597–613.

Borel, P. (2014). Biodisponibilité des phytomicronutriments : Mécanismes impliqués et stratégies d'amélioration. *Innovations Agronomiques*, 42, 27-37.

Boroujerdnia, M. G., Azemi, M. E., Hemmati, A. A., Taghian, A., & Azadmehr, A. (2011). Immunomodulatory effects of *Astragalus gypsicolus* hydroalcoholic extract in ovalbumin-induced allergic mice model. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 281-288.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3ème éd. Lavoisier, Paris, 1120.

## C

Calatayud, P. A., Garrec, J. P., & Nicole, M. (2013). Adaptation des plantes aux stress environnementaux. *Interactions Insectes-Plantes; Sauvion, N., Calatayud, P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, M., Eds*, 229-245.

Carter P (1971) Spectrophotometric Determination of Serum Iron at the Submicrogram Level with a New Reagent (Ferrozine). *Analytical Biochemistry* 40: 450-458.

Ceylan R, Katanić J, Zengin G, Matic S, Aktumsek A, Boroja T, Stanić S (2016) Chemical and Biological Fingerprints of Two Fabaceae Species *Cytisopsis dorycnifolia* and *Ebenus hirsuta*: Are They Novel Sources of Natural Agents for Pharmaceutical and Food Formulations. *Industrial Crops and Products* 84:254-262.

Chamandy, A. (2021). Etude des molécules bioactives et de leurs activités chez deux espèces d'astragales utilisées dans la médecine traditionnelle : *Astragalus emarginatus* Labill. et *Astragalus coluteoides* Will (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).

Chamandy, A., Zhao, M., Rammal, H., & Ennahar, S. (2022). Hyphenated LC-ABTS•+ and LC-DAD-HRMS for simultaneous analysis and identification of antioxidant compounds in *Astragalus emarginatus* Labill. extracts. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(2), 253-262.

Colman, R. W. (Ed.). (2006). Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Lippincott Williams & Wilkins.

Conway, A., McCarthy, A. L., Lawrence, P., & Clark, R. A. (2015). The prevention, detection and management of cancer treatment-induced cardiotoxicity: a meta-review. *BMC cancer*, 15, 1-16.

Coulidiati, T. H., Millogo-Kone, H., Lamien-Meda, A., Lamien, C. E., Lompo, M., Sebbar, E. H., Naji, I., El Mezgueldi, I., & Choukri, M. (2023). Le stress oxydatif, une agression cellulaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(626), 36-37.

Cuellar JE, Martínez J, Rojano B, Gil J H, Durango D (2020) Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Platy-miscium gracile* Benth.: A species threatened by extinction. *Journal of King Saud University* 32(1):702-708.

## D

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

Dahamna, S., Sekfali, N., and Walker, C.H. (2004): Biochemical indicators of hepatotoxic effects of pesticides. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*, 69(4), 821-828

Damodar, G., Smitha, T., Gopinath, S., Vijayakumar, S., & Rao, Y. A. (2014). An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection Doxorubicin. *Annals of medical and health sciences research*, 4(1), 74-79.

Deghima A, Righi N, Rosales-Conrado N, León-González M E, Gómez-Mejía E, Madrid F (2020) Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. *South African Journal of Botany* 132: 204-214.

Deghima, A. (2021) Étude de la composition chimique et des activités biologiques d'une plante Algérienne *Ranunculus macrophyllus* (Thèse de doctorat, Université A. MIRA-BEJAIA).

Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques (pp. 87-108). Editions Tec & Doc.

Delmas, E. (2014). Régulation de l'apoptose dépendante de p53 par le FGF1 intracellulaire : caractérisation des mécanismes d'action (Doctoral dissertation, Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines).

Demirtas, I., Erenler, R., Elmastas, M., Goktasoglu, A., 2013. Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. *Food Chemistry* 136, 34-40

Dewanto V, Xianzhong W, Kafui KA, Rui HL (2002) Thermal Pro-cessing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemis-try* 50: 3010-3014.

Djabir YY, Arsyad MA, Sartini S, Lallo S. 2017. Potential roles of *Kleinhovia hospita* L. leaf extract in reducing doxorubicin acute hepatic, cardiac and renal toxicities in rats. *Pharmacogn Res.* 9:168–173.

Duric, K., Kovac-Besovic, E. E., Niksic, H., Muratovic, S., & Sofic, E. (2015). Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 15(2), 9.

## E

Ebrahimzadeh H., Niknam v, and Maassoumi A A. 2001. The sterols of *Astragalus* species from Iran: GLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* 9: 393-404.

Ebrahimzadeh, H., Niknam, V., & Maassoumi, A. A. (2000). Mucilage content and its sugar composition in *Astragalus* species from Iran. *Pakistan Journal of Botany*, 32(1), 131-140.

Ekiert H, Piekoszewska A, Muszyńska B, Baczyńska S (2014) Accumulation of p-coumaric acid and other bioactive phenolic acids in in vitro culture of *Rutagraveolens*ssp. *divaricata* (tenore) gams. *Medicina Internacia Revuo* 102: 24-31.

El Rhaffari, L., & Zaid, A. (2002). *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Des sources du savoir aux médicaments du futur*, 1, 293-318.

Elizondo-Luévano, J. H., Rodríguez-Garza, N. E., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Romo-Sáenz, C. I., Tamez-Guerra, P., Verde-Star, M. J., ... & Quintanilla-Licea, R. (2023). Cytotoxic, Anti-Hemolytic, and Antioxidant Activities of *Ruta chalepensis* L.(Rutaceae) Extract, Fractions, and Isolated Compounds. *Plants*, 12(11), 2203.

El-Moselhy, M. A., & El-Sheikh, A. A. (2014). Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(1), 101-110.

El-Sebakhy N A., Asaad A M., Abdallah R M., Toaima S M., Verotta L., Orsini F. 2000. Constituents of Egyptian *Astragalus tribuloides* Del. *Nat. Prod. Sci.* 6, 11-15.

Erdogan SS, Karik U, Baser KH (2014) The determination of antioxidant activity of some sage populations of the Marmara region. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences (special iss. 2)*: 1877–1882

ERDOĞAN, S. S., KARIK, Ü., & BAŞER, K. H. C. (2014). The determination of antioxidant activity of some sage populations of in the Marmara region. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(Özel Sayı-2), 1877-1882.

## F

Favier, A., 'Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique', *Actual. Chim.* (2003) 108–115.

Félix-Silva J, Souza T, Camara RF, Cabral B, Silva-Júnior AA, Moretti Rebecchi IM, Zucolotto SM, Oliveira Rocha HA, Fernandes-Pedrosa MR (2014) In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. *BMC Complementary and Alternative* 14: 405-418.

Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França S, Belebani RO (2013) In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annonamu-ricata* L.(Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental parasitology* 134(3): 327-332.

Fidrianny I, Aristya T, Hartati R (2015) Antioxidant capacities of various leaves extracts from three species of legumes and correlation with total flavonoid, phenolic, carotenoid content. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 7(3): 628-634.

Fitriansyah SN, Fidrianny I, & Ruslan K (2017) Correlation of total phenolic, flavonoid and carotenoid content of *Sesbania sesban* (L. Merr) leaves extract with DPPH scavenging activities. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9(1): 89-94.

Fontaine, J. (2005). Infrastructures et oasis-relais migratoires au Sahara algérien. In *Annales de géographie* (No. 4, pp. 437-448). Cairn/Softwin.

Forgo P, Zupkó I, Molná J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J (2012) Bioactivity-Guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea jacea*. *Fitoterapia* 83: 921-925.

Foudah AI, Soliman GA, Abdel-RahmanRF, Alankus-Caliskan O, Yusufoglu H (2017) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Astragalus echinops* and *Astragalus logopodioides* ethanolic extracts on paracetamol-induced liver injury in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14:31-40.

## G

Gallani, A. (2016). Etude du profil de sécurité des spécialités à base de d'oxorubicine : influence de la forme galénique (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Gao, H., Wang, D., Zhang, S., Xu, M., Yang, W., Yan, P., Liu, Y., Luo, X., Wu, H., Yao, P., Yan H., Liu, L. (2015). Roles of ROS mediated oxidative stress and DNA damage in 3-methyl-2-quinoxalin benzenevinylketo-1, 4-dioxide-induced immunotoxicity of Sprague–Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 587–594

Garza W (2015) Fabaceae classification, nutrient composition and health benefits, Ed. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA.Ghasemzadeh A, Omidvar V, JaafarHZE (2012)



Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato Ipomoea batatas. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 2971-2976.

Gautam, R., & Jachak, S. M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal research reviews*, 29(5), 767-820.

Ghorbel, S., Bkhairia, I., Dhibi, S., Maisto, M., Alghamdi, O. A., Nasri, M., & Tenore, G. C. (2021). Peptides from *Liza aurata*: Natural Source Attenuate Paracetamol Induced Nephrotoxicity by Modulation of the Inflammatory Response and DNA Damage. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 2069-2082.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2011). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.

Grigore A (2017) Plant phenolic compounds as immunomodulatory agents. *Phenolic compounds–Biological activity*. London, UK: IntechOpen 75-98.

Grujic N, Lepojevic Z, Srdjenovic B, Vladic J, Sudji J (2012) Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules* 17: 2518-2528.

Gulcin İ (2020) Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology* 94(3): 651-715.

Guon, T. E., & Chung, H. S. (2016). Hyperoside and rutin of *Nelumbo nucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. *Oncology letters*, 11(4), 2463-2470. Carmaux, S. (2008). *Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).

## H

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10).

Hassan, S. (2018). Etudes pharmacologiques d'un modèle cellulaire 2D/3D dans le cancer hépato-pancréatique (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).

Hassan, S., Peluso, J., Chalhoub, S., Idoux Gillet, Y., Benkirane-Jessel, N., Rochel, N., ... & Ubeaud-Sequier, G. (2020). Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 $\alpha$  and MDR1. *PLoS One*, 15(10), e0240676.

Hassan, S., Peluso, J., Fuhrmann, G., & Ubeaud, G. (2017). Synergistic Effect of the Combination of Polyphenols with Gemcitabine on Pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Journal of pharmaceutical research* 2(1), 2–5.

hepatotoxic effects of pesticides. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*, 69(4), 821-828

Hermetet, F. (2015). La dualité de l'apoptose des cellules du cancer du col de l'utérus ou la face de Janus de l'apoptose : un objectif thérapeutique et une implication dans le transfert horizontal d'oncogènes viraux (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).

Hirofani M., Zhou Y., Lui H., Furuya T. 1994. Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry*. 36: 665-670.

HOFFMANN, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes ; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

Hopkins WG 2003 physiologie végétale édition Debock et lancier p 276

Houlot R. Techniques d'histologie et de cytologie. Paris : Edition Maloine, 1984.

Hozayen, W. G., Abou Seif, H. S., & Amin, S. (2014). Protective effects of rutin and/or hesperidin against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Int J Clin Nutr*, 2(1), 11-7. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>

Hu, B., Liu, X., Zhang, C., & Zeng, X. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.004>

Hu, Y. W., Liu, C. Y., Du, C. M., Zhang, J., Wu, W. Q., & Gu, Z. L. (2009). Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by flavonoids from *Astragalus complanatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2), 293-301.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Hudz, N., Yezerska, O., Shanida, M., Sedláčková, V. H., & Wiczorek, P. P. (2019). Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia*, 66(4), 209-215.

## I

Ibrahim L F, Marzouk M M, Hussein S R, Kawashty SA, Mahmoud K, Saleh NA(2013) Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss. *Natural Product Research* 27(4-5): 386-393.

Iliescu, I. A., Peter, S., Albert, I., Skalicka-Woźniak, K., Miron, A., Luca, S. V., & Wolfram, E. (2020). *Verbascum nigrum*: cytotoxicity evaluation in A431 epidermoid carcinoma cells

and untargeted LC-HR-MS/MS metabolite profiling. *Chemistry & biodiversity*, 17(12), e2000644.

Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 46, 273-307.

## J

Jaradat NA, Zaid AN, Abuzant A, Khalaf S, Abu-Hassan N (2017) Phytochemical and Biological Properties of Four Astragalus Species Commonly Used in Traditional Palestinian Medicine. *European Journal of Integrative Medicine* 9:1-8.

Jayameena, P., Sivakumari, K., Ashok, K., & Rajesh, S. (2018). Rutin: A potential anticancer drug against human colon cancer (HCT116) cells. *Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci*, 7(9), 1731-1745.

## K

Kalaycı, B., Özek, N. Ş., Aysin, F., Özbek, H., Kazaz, C., Önal, M., & Güvenalp, Z. (2023). Evaluation of cytotoxic and apoptotic effects of the extracts and phenolic compounds of *Astragalus globosus* Vahl and *Astragalus breviflorus* DC. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

Kalender, Y., Yel, M. et Kalender, S. (2005). Hépatotoxicité de la doxorubicine et métabolisme hépatique des radicaux libres chez le rat : effets de la vitamine E et de la catéchine. *Toxicologie*, 209 (1), 39-45.

Kara Ali, W., & Abidli, N. (2017). Effet des extraits de la plante médicinale *Ruta montana* (الفجل) sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et sur la multi-drug résistances (MDR) des cellules cancéreuses ovarien (A2780) (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

Karunaweera, N., Raju, R., Gyengesi, E., & Münch, G. (2015). Plant polyphenols as inhibitors of NF-κB induced cytokine production—a potential anti-inflammatory treatment for Alzheimer's disease? *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 24.

Kebieche, M. (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L. : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. *Biochimie, These de Doctorat, Université Mentouri Constantine*.

Kee NLA, Mnonopi N, Davids H, Naudé RJ, Frost CL (2008) An-tithrombotic/anticoagulant and anticancer activities of selected medicinal plants from South Africa. *African Journal of Biotechnology* 17: 217-223.

Kern JK, Geier DA, Adams JB, Garver CR, Audhya T, Geier MR. A clinical trial of glutathione supplementation in autism spectrum disorders. *Med Sci Monit.* 2011;17(12):CR677-CR682. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3628138/>

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 1972, 26(4):239-57

Khalfallah A, Karioti A, Berrehal D, Kabouche A, Lucci M, Bilia AR, Kabouche Z (2014) A new flavonoltriglycoside and other flavonol glycosides from *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae). *Records of Natural Products* 8: 12-18.

Khan, G., Haque, S. E., Anwer, T., Ahsan, M. N., Safhi, M. M., & Alam, M. F. (2014). Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Acta Pol Pharm*, 71(5), 861-868.

Kilani-Jaziri S, Mokdad BI, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, ChekirGL (2017) Immunomodulatory and Cellular Anti-Oxidant Activities of Caffeic, Ferulic, and p - Coumaric Phenolic Acids: A Structure–activity Relationship Study. *Drug and Chemical Toxicology* 40: 416-424.

Kirby AJ, Schmidt RJ (1997) The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs. *Journal of ethnopharmacology* 156: 103-108.

Klausner, A. (1983). Activating the body's blood clot dissolvers: Biotech's new role. *Bio/technology*, 1(4), 330-336.

Kondeva-Burdina, M., Shkondrov, A., Simeonova, R., Vitcheva, V., Krasteva, I., Ionkova, I., (2018) In vitro/in vivo antioxidant and hepatoprotective potential of defatted extract and flavonoids isolated from *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae), *Food and Chemical Toxicology*, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.020.

Kondeva-Burdina, M., Simeonova, R., Shkondrov, A., Krasteva, I., Popov, G., & Manov, V. (2022). Hepatoprotective and antioxidant effects of alcesefoliside from *Astragalus monspessulanus*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58.

Krim, M., Messaadia, A., Maldi, I., Aouacheri, O., & Saka, S. (2013). Protective effect of ginger against toxicity induced by chromate in rats. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 71, No. 2, pp. 165-173).

Kumar, S., Joseph, L., George, M., & Sharma, A. (2011). A review on anticoagulant/antithrombotic activity of natural plants used in traditional medicine. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 8(1), 70-74.

Kwieceń, I., Michalska, M., & Włodek, L. (2006). The selective effect of cystathionine on doxorubicin hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *European journal of pharmacology*, 550(1-3), 39-46.

## L

Labed A, Ferhat M, Labed-Zouad I, Kaplaner E, Zerizer S, Voutquenne-Nazabadioko L, AlabdulMagid A, Semra Z, Kabouche A, Kabouche Z, Öztürk M ( ) Compounds from the Pods of *Astragalus armatus* with Antioxidant, Anticholinesterase, Antibacterial and Phagocytic Activities. *Pharmaceutical Biology* 54: 3026-3032.

Lao J., Madani J., Puértolas T. *et al.* Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *Journal of drug delivery*, 2013, article ID 456409: 12 p.

Lebri, M., Bahi, C., Fofie, N. B. Y., Gnahoue, G., Lagou, S. M., Achibat, H., ... & Khouili, M. (2015). Analyse phytochimique et évaluation de la toxicité aiguë par voie orale chez des rats de l'extrait total aqueux des feuilles d'*Abrus precatorius* Linn (Fabaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1470-1476

Lee YY, Lee S, Jin JL, Yun CHS (2003) Platelet Anti-Aggregatory Effects of Coumarins from the Roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Archives of Pharmacal Research* 26: 723-726.

Lekmine, S., Bendjedid, S., Benslama, O., Martín-García, A. I., Boussekine, S., Kadi, K., ... & Alharthy, S. A. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction, LC-MS/MS analysis, anticholinesterase, and antioxidant activities of valuable natural metabolites from *Astragalus armatus* Willd.: In silico molecular docking and In vitro enzymatic studies. *Antioxidants*, 11(10), 2000.

Li, H. Y., Hao, Z. B., Wang, X. L., Huang, L., & Li, J. P. (2009). Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology*, 100(2), 970-974.

Li, X., Li, K., Xie, H., Xie, Y., Li, Y., Zhao, X., ... & Chen, D. (2018). Antioxidant and cytoprotective effects of the Di-O-Caffeoylquinic acid family: The mechanism, structure-activity relationship, and conformational effect. *Molecules*, 23(1), 222.

Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., ... & Wang, T. (2014). A review of recent research progress on the *astragalus* genus. *Molecules*, 19(11), 18850-18880.

Liu, P., Wu, J., Yu, X., Guo, L., Zhao, L., Ban, T., & Huang, Y. (2023). Metabolomics and Network Analyses Reveal Phenylalanine and Tyrosine as Signatures of Anthracycline-Induced Hepatotoxicity. *Pharmaceuticals*, 16(6), 797.

López-Lázaro, M. (2015). How many times should we screen a chemical library to discover an anticancer drug? *Drug Discovery Today*, 2(20), 167-169.

Lounis, M., Belkessa, S., Abdelhadi, S., Bencherit, D., Samara, K. A., & Barqawi, H. J. (2023). Breast cancer knowledge and practices amongst women in Algeria. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1-10.

## M

Maamria L, Long C, Haba H, Lavaud C, CannacA, Benkhaled M (2015) Cycloartane Glycosides from *Astragalus gombo*. *Phytochemistry Letters* 11: 286-291.

Macdonald, F., Ford, C.H.J., Casson, A.G., *Molecular biology of cancer*. BIOS Scientific Publishers (Oxford), 2003, 277p.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2006). Les composés phénoliques des végétaux. *Sciences des aliments*, 26, 189-190.

Mansouri, E., Jangaran, A., & Ashtari, A. (2017). Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Bratislavské lekárske listy*, 118(5), 273-277.

Markham KR (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*, Ed. Academic Press. Paris, France.

Masad, R. J., Haneefa, S. M., Mohamed, Y. A., Al-Sbiei, A., Bashir, G., Fernandez-Cabezudo, M. J., & Al-Ramadi, B. K. (2021). The immunomodulatory effects of honey and associated flavonoids in cancer. *Nutrients*, 13(4), 1269.

Mazevet, M. (2015). Etude de la cardiotoxicité induite par les traitements anticancéreux : Rôle d'Epac dans la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE)).

Michihiko, U., Yoshihiko, K., Koh-ichi, Y., Nobuyuki, M., Motoyuki, I., Takashi, M., & Iwao, Y. (2006). Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *Journal of pharmacological sciences*, 101(2), 151-158.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.

Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. pp : 13-36.

Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous nonenzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological* 65(1-2):55-63.

## N

Nagai, K., Fukuno, S., Oda, A., & Konishi, H. (2016). Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses. *Anti-cancer drugs*, 27(1), 17-23.

Nagai, K., Oda, A. et Konishi, H. (2015). La théanine prévient l'hépatotoxicité aiguë induite par la doxorubicine en réduisant la réponse apoptotique intrinsèque. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 78, 147-152.

Nair, M. P., Kandaswami, C., Mahajan, S., Chadha, K. C., Chawda, R., Nair, H., ... & Schwartz, S. A. (2002). The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN $\gamma$ ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1593(1), 29-36.

Nikbakht-Brujeni G, Tajbakhsh H, Pooyanmehr M, Karimi I (2013) In Vitro Immunomodulatory Effects of Astragalus versus Olivier. Black Milkvetch: An Immunological Tapestry in Kurdish Ethnomedicine. *Comparative Clinical Pathology* 22: 29-39.

Niknam V, Ebrahimzadeh H (2002) Phenolics content in Astragalus species. *Pakistan Journal of Botany* 34: 283-289.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5, 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

## O

OECD, & (OECD), O. for E. C. and D. (2011). *Guidelines for the testing of chemicals. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method, Test no. 423*

Oguntibeju, O. O. (2018). Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *Journal of inflammation research*, 307-317.

Omar G, Abdallah L, Rahim A, Othman R, Barakat A (2017) Selected Wild Plants Ethanol Extracts Bioactivity on the Coagulation Cas-cade. *Journal of Scientific Research and Reports* 13: 1-10.

Omobowale, T. O., Oyagbemi, A. A., Ajufo, U. E., Adejumobi, O. A., Ola-Davies, O. E., Adedapo, A. A., & Yakubu, M. A. (2018). Ameliorative effect of gallic acid in doxorubicin-induced hepatotoxicity in Wistar rats through antioxidant defense system. *Journal of dietary supplements*, 15(2), 183-196.

Oueslati, S. (2013) Exploration de la variabilité de la composition phénolique et des activités biologiques chez quatre halophytes du genre Suaeda (These de doctorat UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR).

Ould El hadj MD, Hadj-mahammed M, Zabeirrou H, Chehma A (2003) Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional Est algérien). *Annales de l'INRAT* 76 : 225-240.

Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara.

## P

Patil, R. R., Guhagarkar, S. A., & Devarajan, P. V. (2008). Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 25(1).

Payet, V. (2023). Étude bibliographique du stress oxydant et de son implication en pathologie des carnivores domestiques.

Pécheur, È. I., & Polyak, S. J. (2016). La molécule antivirale arbidol inhibe des virus pathogènes de prévalence mondiale. *Médecine/sciences*, 32(12), 1056-1059.

Peña-Morán, O. A., Villarreal, M. L., Álvarez-Berber, L., Meneses-Acosta, A., & Rodríguez-López, V. (2016). Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules*, 21(8), 1013.

Pernin, A. 2018. Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE))

Pincemail, J., Le Goff, C., Charlier, C., Gillion, P., Cheramy-Bien, J. P., Van Honacker, E., ... & Defraigne, J. O. (2009). Evaluation biologique du stress oxydant : application en routine clinique. *Nutr. Endocrinol*, 16-31.

Podlech D (2008) The genus *Astragalus* L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union. *Feddes Repertorium* 119: 310-387.

Ponkshe, C. A., & Indap, M. M. (2002). In vivo and in vitro evaluation for immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis.

Prasad, P., Vasas, A., Hohmann, J., Bishayee, A., & Sinha, D. (2019). Circiliol suppressed epithelial to mesenchymal transition in B16F10 malignant melanoma cells through alteration of the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 608.

Prasanna, P. L., Renu, K., & Gopalakrishnan, A. V. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, 250, 117599.



Pritchett, J. C., Naesens, L., Montoya, J., Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G. R., & Ablashi, D. V. (2014). Treating HHV-6 infections: The laboratory efficacy and clinical use of anti-HHV-6 agents.

## Q

Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

Raiah, M., Terki, K., Benrabah, L., Ammour, F., Lounis, A., & Fouatih, Z. A. (2022). Épidémiologie des cancers en Algérie, 1996–2019. *Bulletin du Cancer*, 109(9), 909-915.

Ramírez-Villalobos, J. M., Romo-Sáenz, C. I., Morán-Santibañez, K. S., Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R., Orozco-Flores, A. A., ... & Gomez-Flores, R. (2021). In vitro tumor cell growth inhibition induced by *Lophocereus marginatus* (Dc.) S. Arias and terrazas endophytic fungi extracts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9917.

## R

Rašković, A., Stilinović, N., Kolarović, J., Vasović, V., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2011). The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16(10), 8601-8613.

Ren, L., Wang, X., Li, S., Li, J., Zhu, X., Zhang, L., ...& Zhou, G. (2018). Effect of gamma irradiation on structure, physicochemical and immunomodulatory properties of Astragalus polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 120, 641-649.  
<https://www.gemmat-thrombose.fr/patients/la-thrombose-veineuse-ou-phlebite/>

Rhouma-Martin, G. B. (2013). Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866–2887.

Rocha LD, Monteiro MC, Junger TA( 2012)Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acid- A Review. *Cancer and Clinical oncology*1: 109-121.

Rochette, L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 17(6), 1-4.

Sahreen S, Rashid Khan M, Ali Khan R (2010) Evaluation of Antioxi-dant Activities of Various Solvent Extracts of Carissa opaca Fruits. *Food Chemistry* 122: 1205-1211.

## S

Salem MA, Farid MM, El-Shabrawy M, Mohammed R, Hussein SR, Marzouk MM (2020) Spectrometric analysis, chemical constituents and cytotoxic evaluation of *Astragalus sieberi* DC. (Fabaceae). *Sci-entific African* :7, e00221.

Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Her-nández-Carlos B, (2019) Antioxidant compounds and their antioxi-dant mechanism. *Antioxidants*. 10:1-29

Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In Emad Shalaby (Ed.), *Antioxidants* (pp. 1–29). <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>

Sarikurkcü, C., Sahinler, S. S., & Tepe, B. (2020). *Astragalus gym-nolobus*, *A. leporinus* var. *hirsutus*, and *A. onobrychis*: phytochemical analysis and biological activity. *Industrial crops and products*, 150, 112366.

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (Eds.). (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Techniques & documentation.

Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>

Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2019). A review of astragalus species as foodstuffs, dietary supplements, a traditional Chinese medicine and a part of modern pharmaceutical science. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(6), 13371-13382.

Shakoor, H., Feehan, J., Apostolopoulos, V., Platat, C., Al Dhaheri, A. S., Ali, H. I., ... & Stojanovska, L. (2021). Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. *Nutrients*, 13(3), 728.

Sies, H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and distress in redox homeostasis. In George Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153–163). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>

Silva EO, Batista R (2017) Ferulic acid and naturally occurring com-pounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive reviews*. In *Food Science and Food Safety* 16: 580-616.

Simeonova, R., Bratkov, V. M., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Manov, V., & Krasteva, I. (2015). Experimental liver protection of n-butanolic extract of *Astragalus monspessulanus* L. on carbon tetrachloride model of toxicity in rat. *Redox Report*, 20(4), 145-153.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1229: 152-178.

Siswanto S, Arozal W, Juniantito V, Grace A, Agustini FD. 2016. The effect of mangiferin against brain damage caused by oxidative stress and inflammation induced by doxorubicin. HAYATI J Biosci. 23:51–55. doi :10.1016/j. hjb.2016.02.001.

Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Totalphenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selectedGreek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46–54.<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>

Soliman G, Abdel-rahman R, Al-saikhan F, Alankuş-çalışkan O, Alqa-soumi S, Yusufoglu H (2013) Hepatoprotective activities of Astragalus persicus and Astragalus tournefortiiethanolic extracts against paracetamol induced liver damage in rats and their in vitro antioxi-dant effects. *FABAD. Journal of Pharmaceutical Sciences* 38: 1-9.

Sreelatha, S., Jeyachitra, A., & Padma, P. R. (2011). Antiproliferation and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1270-1275.

Srivastava, N. S., & Srivastava, R. A. K. (2019). Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine*, 52, 117-128.

Subauste, C. S., de Waal Malefyt, R., & Fuh, F. (1998). Role of CD80 (B7. 1) and CD86 (B7. 2) in the immune response to an intracellular pathogen. *The Journal of Immunology*, 160(4), 1831-1840.

Sun B, Ricardo-da-Silva J M, Sprange rI (1998) Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 46: 4267-4274.

Sung, N. Y., Yang, M. S., Song, D. S., Byun, E. B., Kim, J. K., Park, J. H., ... & Kim, J. H. (2013). The procyanidin trimer C1 induces macrophage activation via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes. *European journal of pharmacology*, 714(1-3), 218-228.

Sunil, M. A., Sunitha, V. S., Ashitha, A., Neethu, S., Midhun, S. J., Radhakrishnan, E. K., & Jyothis, M. (2019). Catechin rich butanol fraction extracted from *Acacia catechu* L.(a thirst quencher) exhibits immunostimulatory potential. *journal of food and drug analysis*, 27(1), 195-207.

## T

Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65(2), 157-170.

Teyeb, H., Zouari, S., Douki, W., Najjar, M. F., & Neffati, M. (2011). Phytochemical Investigation of *Astragalus gombiformis* Pomel (Fabaceae). *Analytical Chemistry Letters*, 1(3), 246-253.

Tigrine, C. (2014). Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica* (Doctoral dissertation, Université de Sétif 1-Ferhat Abbas).

Tigrine, C., Bulzomi, P., Leone, S., Bouriche, H., Kameli, A., & Marino, M. (2013). *Cleome arabica* leaf extract has anticancer properties in human cancer cells. *Pharmaceutical Biology*, 51(12), 1508-1514.

## U

United Nations Economic Commission for Europe. (2023). *Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH): Dixième édition révisée*. UN.

Uygun, R., Aktas, C., Tulubas, F., Alpsyoy, S., Topcu, B., Ozen, O.A., 2014. Cardioprotective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 33, 435–445 <http://dx.doi.org/10.1177/0960327113493304>.

## V

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;266(1-2):37—56.

Van Dalen, E. C., Michiels, E. M., Caron, H. N., & Kremer, L. C. (2006). Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).

Verbeek, R., Plomp, A. C., van Tol, E. A., & van Noort, J. M. (2004). The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochemical pharmacology*, 68(4), 621-629.

Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P. Brumaghim, J.L., 2011. Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 ,.1322-1314

Vuolo, M. M., Lima, V. S., Roberto, M., & Junior, M. (2019). Phenolic compound: Structure, classification, and antioxidant power. In M. R. S. Campos (Ed.), *BioactiveCompounds: Health Benefits and Potential Applications* (1st editio, pp. 33–50). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>

## W

Wang HF, Yih KH, Yang CH (2017) Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis* 25:881-889.

Wang X, Li Y, Yang X, Yao J (2013) Astragalus polysaccharide reduces inflammatory response by decreasing permeability of LPS-infected Caco2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 61: 347-352.

Wang, D.C. (1989). Influence of Astragalus membranaceus polysaccharide on immunologic function of human periphery blood lymphocyte. *Chinese Journal of Oncology*, 11, 180-183.

Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Hu J.M. 1999. Evidence on the monophyly of Astragalus (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. *Syst Bot*, 24: 409-437

Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., & Hahn, A. (2006). Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *European journal of clinical nutrition*, 60(1), 85-91.

Wu, T., Bligh, S. A., Gu, L. H., Wang, Z. T., Liu, H. P., Cheng, X. M., ... & Hu, Z. B. (2005). Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial Radix Astragali by HPLC-UV. *Fitoterapia*, 76(2), 157-165.

## Y

Yildirim A, Mavi A, Kara AA (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4083-4089.

Yimam, M., Jiao, P., Hong, M., & Jia, Q. (2016). Hepatoprotective activity of an herbal composition, MAP, a standardized blend comprising Myristica fragrans, Astragalus membranaceus, and Poria cocos. *Journal of medicinal food*, 19(10), 952-960.

## Z

Zak, A. (2019). Mécanisme de la phagocytose et comparaison avec d'autres processus immunitaires (Doctoral dissertation, Institut polytechnique de Paris).

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

Zeguerrou, R., Guesmia, H., & Lahmadi, S. (2010). Recueil des plantes médicinales dans la région des Ziban. CENTRE DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE SUR LES REGIONS ARIDES Omar El BARNAOUI, 25.

Zhang D, Zhuang Y, Pan J, Wang H, Li H, Yu Y, Wang D (2012). In-vestigation of effects and mechanisms of total flavonoids of Astragalus and calycosin on human erythroleukemia cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Zhang, Y.Y., Meng, C., Zhang, X.M., Yuan, C.H., Ming, D.W., Zhong, C., Dong, D.C., Gao, Y.H., Liu, C., Zhang, Z., 2015. Ophiopogonin D attenuates doxorubicin-induced autophagic cell death by relieving mitochondrial damage in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 352, 166–174. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.114.219261>

Zong S, Ji J, Li J, Yang QH, Ye M (2017) Physicochemical properties and anticoagulant activity of polyphenols derived from *Lachnospira*. *Journal of food and drug analysis* 25(4): 837-844.

<https://www.gemmat-thrombose.fr>



تعتبر نبتة *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge من النباتات المستوطنة في المناطق القاحلة وشبه القاحلة في الجزائر. ويستخدمه السكان المحليون عادة في الطب التقليدي للسمات الثعابين والعقارب لهذا السبب كان اهتمامنا بدراسة الفيلة (هو تصغير كلمة فول نسبة الى جرابه التي تشبه جراب الفول)، لوجود منتجات فعالة تعمل ضد التسمم؛ الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على إمكانات مضادات الأكسدة لهذا النوع في المختبر، وبالتالي استكشاف ومقارنة الأنشطة البيولوجية للأجزاء المحضرة في المختبر، مثل النشاط المضاد للتخثر والنشاط المضاد للتكاثر (اختبار الجذوى MTT)، وكذلك لتقييم التأثيرات الفرماكولوجية (الصيدلانية) واستغلال قوتها المضادة للأكسدة الفعالة في تحفيز الجهاز الشبكي البطاني (SRE) وضد السمية الكبدية التي يسببها الدوكسوروبيسين في الجسم الحي في الفئران. حيث تم في هذه الدراسة، الحصول على المستخلصات العضوية للجزء الهوائي باستخدام النقع في مزيج من الميثانول/الماء بنسبة 20/80 ومستخلص آخر باستخدام النقع في الماء فقط AQAg. كما تم استخدام الميثانول، والبيوتانول، وأسيئات الإيثيل لتجزئة المستخلص الخام الأول بالتجزئة السائلة - السائلة. وقد اعتمدنا على عدة تقنيات منها التحليل بطرق القياس الطيفي والكروماتوجرافي LC-ESI-MS، وتم احصاء 25 مركبا نشطا بيولوجيا في جميع المستخلصات معظمها عبارة عن فلاونويدات وأحماض هيدروكسي سيناميك. الى جانب استخدام عدة طرق في المختبر وداخل الجسم الحي وخارجه لتقييم نشاط مضاد الأكسدة، فأظهر المستخلص AEAg أفضل قدرة اختزال في جميع الاختبارات المنجزة، يليه جزء NBAG. تم تقييم النشاط البلعمي بتقنية اختبار إزالة الكربون واختباران للتخثر (TQ) و (TP). اشارت نتائج اختبار نشاط البلعمة في الدراسة الحالية إلى أن كلا الجزأين (AEAg و NBAG) يعززان نشاط البلعمة عن طريق تحفيز الجهاز الشبكي البطاني (SRE) بطريقة تعتمد على الجرعة، حيث أن جزء أسيئات الإيثيل يعزز الجهاز بشكل أفضل من n- البيوتانول. كما أظهرت نتائج اختبار نشاط مضاد التخثر أنه يمكن تنشيط سلسلة التخثر بواسطة AQAg و NBAG و AEAg. عند اختبار جزء AEAg للتأكد من السمية الخلوية (MTT) ضد خلايا MCF7 و HeLa السرطانية، اثبت انه يمتلك تأثيرا معتبرا مطادا للسرطان بتركيز مثبط عند  $Cl_{50}: 108,8 \pm 1,8$  et  $168,4 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ ، على التوالي، كما أشارت النتائج إلى أن الخلايا السرطانية أكثر حساسية للمستخلص AEAg من الخلايا السليمة لخلايا الكبد الطبيعية للفأر (Aml12). ونتيجة لذلك، أظهر AEAg مؤشر انتقائية كبير (SI) لخلايا الكبد الطبيعية للفأر Aml12. اما تقنية الـ DAPI / AO المشترك فكشفت عن تأثير مهم للمستخلص في موت الخلايا المبرمج بشكل كبير. النتائج التي تم تحقيقها في المختبر *in vitro* شجعتنا كثيرا في اختبار الجزء AEAg اتجاه السمية الحادة وكذلك مدى التأثير الوقائي الكبدي لـ AEAg ضد السمية الكبدية الناجمة عن إعطاء جرعة النكسوروبيسين (15 مجم / كجم من IP) داخل الصفاق للفئران من سلالة Balb/c حيث أنها تسببت في تسمم كبدى ملحوظ. وقد ظهر هذا الخلل في زيادة كبيرة جدا ( $p < 0.001$ ) في إنزيمات الكبد (ALT و AST) و LDH، وزيادة في MDA الكبدى يتبعها انخفاض كبير جدا ( $P < 0.001$ ) في مستويات الجلوتاثيون الكبدى وإنزيم GPx و CAT. أثبتت الدراسة الحالية فعالية المستخلص AEAg في وقاية خلايا الكبد من هجمات الجذور الحرة الناجمة عن تحريض النكسوروبيسين للفئران التي تتلقى علاج مسبق بالمستخلص اسيتات الايثيل في خفض أو القضاء على الإجهاد التأكسدي الحاد مما يمنع حدوث خلل في الكبد ويحافظ على حالة الأكسدة والاختزال المتوازنة في العصارة الخلوية وفي خلايا الكبد. توصلت نتائج هذه الدراسة أن النوع النباتي من فصيلة البقوليات الفيلة، وخاصة المستخلص AEAg انه يتمتع بالقدرة على استخدامه كمصدر جديد للجزئيات النشطة بيولوجيا ذات خصائص منبهة للمناعة ومضادة لتكاثر الخلايا السرطانية، بالإضافة إلى كونها أحد مضادات الأكسدة الطبيعية. **الكلمات المفتاحية:** *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge: المركب الفينولي، تحليل LC-ESI-MS، مضادات الأكسدة، مضادات التخثر، البلعمة، اختبار MTT، موت الخلايا المبرمج، النكسوروبيسين، التأثير الوقائي للكبد.

#### Abstract

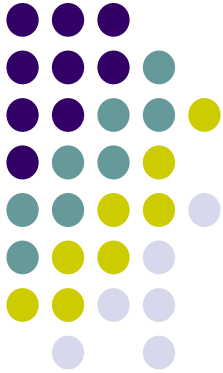
The arid and semi-arid regions of Algeria are home to the endemic species *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge, a plant widely utilized in traditional medicine for treating snake and scorpion stings. This study focused on the extraction of the plant's aerial part using an 80/20 methanol/water mixture and water (AQAg), subsequently fractionating the initial crude extract with methanol, n-butanol (NBAG), and ethyl acetate (AEAg). Analysis via LC-ESI-MS revealed that all fractions contained 25 compound, predominantly flavonoids and hydroxycinnamic acids. Remarkably, AEAg exhibited superior antioxidant activity compared to the positive control, BHA, demonstrating the highest reducing capacity across all conducted assays, closely followed by the NBAG fraction. Both AEAg and NBAG fractions notably increased phagocytic activity, augmenting the reticuloendothelial system. Additionally, these fractions displayed the capability to trigger the coagulation cascade in an anticoagulant activity test. Upon evaluating the AEAg fraction's cytotoxicity against HeLa and MCF-7 cells, it became apparent that cancer cells displayed greater susceptibility to the fraction than healthy cells, indicating a significant selectivity index (SI) for Aml12 mice normal liver cells. Moreover, combined DAPI/AO staining unveiled a pronounced apoptotic effect. Investigating AEAg's protective effects against doxorubicin-induced oxidative stress in Balb/c mice revealed that doxorubicin administration intraperitoneally (15 mg/kg i.p.) induced severe hepatotoxicity. This was evidenced by increased hepatic MDA levels, decreased hepatic reduced glutathione levels, reduced CAT and GPx enzyme activity, and a highly significant ( $p < 0.001$ ) rise in liver enzymes (ALAT and ASAT) and LDH. However, AEAg pretreatment protected mice from doxorubicin-induced ROS aggression in hepatocytes, averting liver malfunction and maintaining a balanced redox state within the cytosol and hepatocytes. In summary, this investigation highlights the potential of *A. gombo*, particularly the AEAg fraction, as a promising source of bioactive compounds with antioxidant, immunostimulant, and antiproliferative properties. **Keywords:** *Astragalus gombo*, phenolic compound, LC-ESI-MS analysis, antioxidant, anticoagulant, phagocytic, MTT test, apoptosis, doxorubicin, hepato-toxicity.

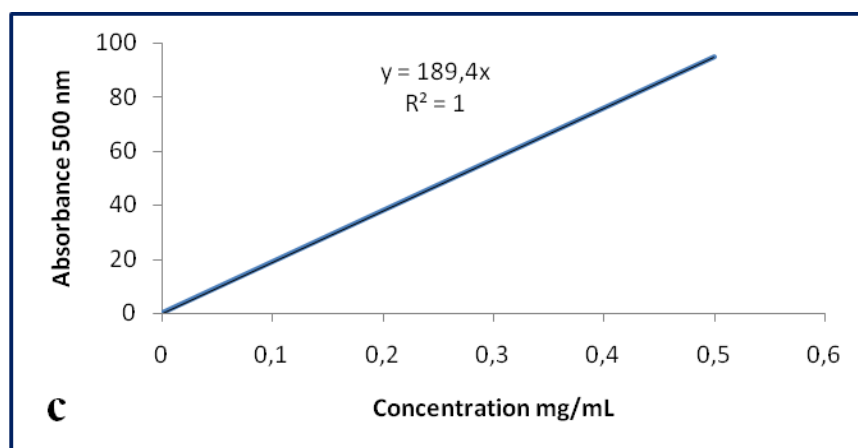
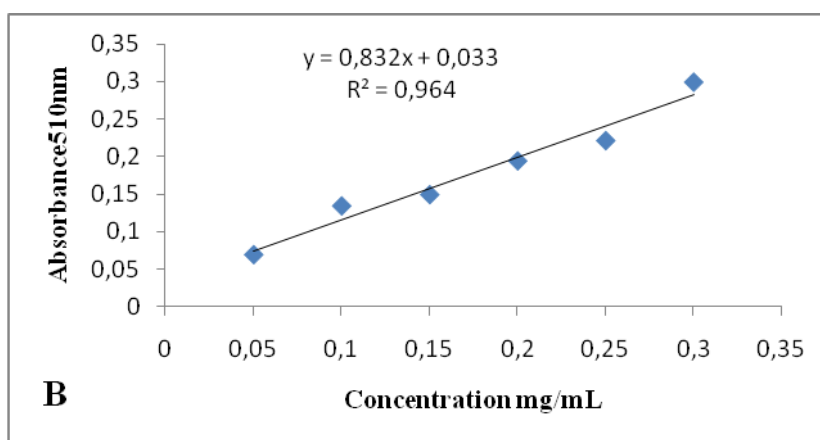
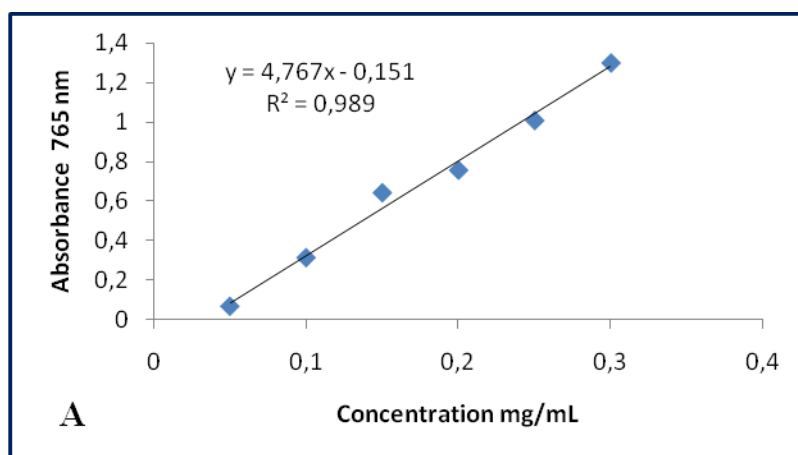
#### Résumé

Les régions arides et semi-arides de l'Algérie abritent l'espèce endémique *Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge, une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les piqûres de serpents et de scorpions. Cette étude s'est concentrée sur l'extraction de la partie aérienne de la plante à l'aide d'un mélange méthanol/eau 80/20 et d'eau (AQAg), suivie du fractionnement de l'extrait brut initial avec du méthanol, du n-butanol (NBAG) et de l'acétate d'éthyle (AEAg). L'analyse par LC-ESI-MS a révélé que toutes les fractions contenaient 25 composés, principalement des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques. Remarquablement, AEAg a présenté une activité antioxydante supérieure au témoin positif, le BHA, démontrant le plus fort pouvoir réducteur dans tous les tests réalisés, suivi de près par la fraction NBAG. Les fractions AEAg et NBAG ont notablement renforcé l'activité phagocytaire, augmentant le système réticuloendothélial. De plus, ces fractions ont montré la capacité de déclencher la cascade de coagulation dans un test d'activité anticoagulante. Lors de l'évaluation de la cytotoxicité de la fraction AEAg contre les cellules HeLa et MCF-7, il est apparu que les cellules cancéreuses étaient plus sensibles à la fraction que les cellules saines, indiquant un indice de sélectivité significatif (IS) pour les cellules hépatiques normales de souris Aml12. De plus, la coloration combinée DAPI/AO a révélé un effet apoptotique prononcé. L'étude des effets protecteurs de l'AEAg contre le stress oxydant induit par la doxorubicine chez les souris Balb/c a révélé que l'administration intrapéritonéale de doxorubicine (15 mg/kg i.p.) entraînait une hépatotoxicité sévère. Cela s'est traduit par une augmentation des niveaux hépatiques de MDA, une diminution des niveaux hépatiques de glutathion réduit, une réduction de l'activité des enzymes CAT et GPx, et une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) des enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) et de la LDH. Cependant, le prétraitement à l'AEAg a protégé les souris de l'agression induite par la doxorubicine sur les hépatocytes, prévenant ainsi un dysfonctionnement hépatique et maintenant un état redox équilibré dans le cytosol et les hépatocytes. En résumé, cette étude met en lumière le potentiel d'*A. gombo*, en particulier de la fraction AEAg, en tant que source prometteuse de composés bioactifs aux propriétés antioxydantes, immunostimulantes, et antiprolifératives. **Mots clé :** *Astragalus gombo*, composés phénoliques, analyse LC-ESI-MS, l'activité antioxydante, phagocytaire et anticoagulante, test MTT, apoptose, doxorubicine, hépato-protecteur



# Annexe





**Figure** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (A), de la quercétine (B) et de la catéchine (C). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (N=3).

**Réactifs fournis pour le dosage de l'activité ASAT (Kit SPINREACT)****Réactif R1**

Tampon Tris pH 7,8.....	80 mmol/l
L-aspartate.....	200 mmol/l

**Réactif R2**

NADH.....	0,18 mmol/l
LDH.....	800 U/l
MDH.....	600 U/l
Oxoglutarate.....	12 mmol/l

**Réactifs fournis pour le dosage de l'activité ALAT (Kit SPINREACT)****Réactif R1**

Tampon Tris pH 7,5.....	100 mmol/l
Alanine.....	500 mmol/l

**Réactif R2**

NADH.....	0,18 mmol/l
LDH.....	1200 U/l
Oxoglutarate.....	15 mmol/l

**Réactifs fournis pour le dosage de l'activité LDH (SPINREACT)****Réactif R1**

Tampon Tris pH 7,2.....	80 mmol/l
Pyruvate.....	1,6 mmol/l
NaCl.....	200 mmol/l

**Réactif R2**

NADH.....	0,2 mmol/l
-----------	------------

**Solution fournie pour le broyage des organes****Tampon TBS**

Tris.....	50 mmol/l
NaCl.....	150 mmol/l
pH 7,4.....	-

**Solutions fournies pour l'histologie****Solution 1: Bouin alcoolique**

Formol	26 ml
Acide acétique	7 ml
Solution à 1% d'acide picrique dans l'alcool 95 °C	45 ml
H <sub>2</sub> O distillée	22 ml

**Solution 2 : Butyle paraffine**

Butanol.....	1 volume
Paraffine filtrée à l'étuve.....	1 volume

**Solution 3 : Hématoxyline**

Hématoxyline.....	5 g
Ethanol absolu.....	50 ml
Alun de potasse.....	100 g
H <sub>2</sub> O distillée.....	1 l
Oxyde mercurique rouge.....	2,5 g

**Solution 4 : Eosine**

Eosine.....	2 g
H <sub>2</sub> O distillée.....	100 ml

**Solutions fournies pour le dosage des protéines**

Solution finale = 50 ml solution 1 + 1 ml solution 2 + 1 ml solution 3

**Solution 1 :**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	2%
NaOH .....	0,1 N

**Solution 2 :**

CuSO <sub>4</sub> .....	1%
-------------------------	----

**Solution 3:**

tartrate double de Na et de K.....	2%
------------------------------------	----

**Solutions fournies pour le dosage des TBARS****TCA-BHT :**

TCA.....	20% (w/v)
BHT.....	1% (w/v)

**Tris-TBA :**

Tris.....	26 mmol/l
TBA.....	120 mmol/l

**REGULAR ARTICLE**

## Phytochemical, Biological and Pharmacological Investigation in Various Extracts from *Astragalus gombo* Coss & Dur L. Ex-Bunge

Leila Bellebcir<sup>1,2\*</sup>, Nacira Abidli<sup>3</sup>, Moncef Nasri<sup>4</sup>, Touhami Khorchani<sup>5</sup>, Mahmoud Mabrouk<sup>6</sup>, Nacim Zouari<sup>4</sup>, Mohamed Hajji<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Animal Physiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Setif I, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Genetics, Biotechnology and Bio-Resources valorisation, Faculty of Natural and Life Sciences, University Mohamed Kheider Biskra, Algeria

<sup>3</sup>Department of Natural Sciences, Ecole Normale Supérieure (ENS) Kouba, Algiers 16006, Algeria

<sup>4</sup>Laboratory of Enzyme Engineering and Microbiology, National School of Engineering of Sfax (ENIS), University of Sfax, Tunisia

<sup>5</sup>Livestock and Wildlife Laboratory, Institute of Arid Regions of Medenine, Tunisia

<sup>6</sup>Central Laboratory of the Institute of Arid Areas of Medenine, Medenine, Tunisia

**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 17 Nov 2021

Revised: 8 Feb 2022

Accepted: 9 Feb 2022

**\*Corresponding Author:**

Email: leila.bellebcir@univ-biskra.dz

Telephone:

**Keywords:** *Astragalus gombo*, phenolic compounds, LC-ESI-MS analysis, antioxidant, anticoagulant, phagocytic, MTT assay

**ABSTRACT**

*Astragalus gombo* Coss. & Dur L. Ex-Bunge is an endemic species of Algerian arid and semi-arid regions, however, is commonly used in traditional medicines. The aerial part was extracted by 80/20 methanol/water and water. The first crude extract was fractionated by ethyl acetate, *n*-butanol and methanol. LC-ESI-MS analysis revealed 25 compounds among all fractions. The major identified phenolic acids in ethyl acetate (EAAg) fraction were the *p*-coumaric followed by *trans*-ferulic acid (1315 and 370 µg/g extract, respectively). Moreover EAAg exhibited high amounts of flavonoides (cirsiol and quercetin-3-O-galactoside by 1155 and 491 µg/g extract, respectively). EAAg fraction was the most effective antioxidant in all assays tested, followed by NBAg fraction. The EAAg exhibited higher antioxidant activity than positive control BHA. Excellent and significant linear correlations were displayed between phenolic compounds and antioxidant capacities. Hence, both of fractions enhanced the phagocytic activity by stimulating the reticuloendothelial system at different doses 50, 70 and 100 mg/kg compared. Results of anticoagulant activity assay revealed that AEAg, EAAg and NBAg prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin. Cytotoxicity assay of EAAg fraction against HeLa and MCF-7 cells revealed an IC<sub>50</sub> values 108.8±1.8 and 168.4±1.6 µg/mL, respectively, after 48h of incubation. Hence, The EAAg fraction displayed significant selectivity index (SI) towards normal mouse liver cells Aml12. The results presented clearly that *A. gombo* have a potential to be used as a natural antioxidant, especially the EAAg fraction, as an original source of bioactive molecules with anti proliferative activities and immunopromising effects.

**1. Introduction**

Oxidative stress, which induced by oxygen radicals is believed to be a primary factor in diverse degen-

erative diseases for the reason that they damage the structures of cells, lipids, membranes, proteins and DNA (Wang et al., 2017). The control of the cytotoxic Reactive Oxygen Species (ROS) is usually provided by antioxidant systems. An antioxidant can be defined as any substance able at relatively low concentration, to compete with other oxidizable substrates, to delay or to prevent their oxidation (Ghasemzadeh et al., 2012; Santos-Sánchez et al., 2019). In order to reduce ROS-induced oxidative damage, antioxidants are shown as the most important effects in the treatment of various health problems (Wang et al., 2017; Santos-Sánchez et al., 2019). Currently, antioxidants are used as food additives for their beneficial effects, such as several synthetic antioxidants like butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). However, in recent decades, Scientifics confirm the noxious and side effects of these synthetic molecules, which require an intense research for new bio-substance and efficient antioxidants (Amoussa et al., 2015). Phenolic compounds are considered the most possible molecules to neutralize free radicals, which gives them an important efficacy in the treatment of various diseases (Gulcin, 2020). Furthermore, many phenolic compounds isolated from plants have important effects as natural antioxidant (Kilani-Jaziri et al., 2017), For example, coumarins have important antiaggregant platelet effects (Lee et al., 2003), hydroxycinnamic acids were reported as anticancer compounds (Rocha et al., 2012), and catechin revealed an immunomodulatory capacity (Sunil et al., 2019).

*Astragalus* genus is an important medicinal plant, used in popular medicine throughout the world, considered the largest legume (Fabaceae) family of flowering plants (Podlech, 2008). They are account over 2000 species noted in several sections, and 15 of those in the Sahara of Algeria (Quezel and Santa, 1962; Ozenda, 2004; Benferdia et al., 2021). *Astragalus gombo* Coss. & Dur is an endemic species, the vernacular name is Feila due to the Arabic name Foul (beans) that relates to its pod shape. Many *Astragalus* species are useful as fodder plants and ornamentals (Ould El hadj et al., 2003), as a medicinal plant, they are a useful source for the production of important drugs (Niknam and Ebrahimzadeh, 2002; Podlech, 2008). During the last two decades, the interest in chemical constituents of various species of the genus *Astragalus* has been increased. Additionally, members of the genus *Astragalus* are chemically investigated, showing the production of many molecules such as poly-

saccharides, flavonoids and saponins (Wang et al., 2013; Benchadi et al., 2013; Khalfallah et al., 2014; Maamria et al., 2015). Moreover, numerous studies have presented biological and pharmacological activities (Labeled et al., 2016; Jaradat et al., 2017; Salem et al., 2020) of various *Astragalus spp.* Also anti-proliferative, cytotoxicity and immunomodulatory activities (Zhang et al., 2012; Ibrahim et al., 2013; Nikbakht-Brujeni et al., 2013; Sunil et al., 2019; Salem et al., 2020) mainly hepatoprotective and chimio protector were reported (Soliman et al., 2013; Foudah et al., 2017).

This work aimed to determine secondary metabolites of aerial parts of *A. gombo* and to screen their phenolic profile by LC-ESI-MS analysis, to investigate the antioxidant properties, phagocytic, anticoagulant and cytotoxic activities of the different fractions. To date, no scientific evidence has yet demonstrated the biological and pharmacological aspect of *A. gombo* phenolic compounds. What is more, this present study investigate the chemical composition of methanolic extract, ethyl acetate and *n*-butanol by LC-ESI-MS analysis, for the first time

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and standards

HPLC grade methanol, ethyl acetate and *n*-butanol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Chemical standards, at the purity > 98%, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Activated partial thromboplastin time (aPTT) reagent, Prothrombin Time (PT) reagent were purchased from Biolabo SAS France.

### 2.2. Plant materials

Aerial part of *A. gombo* were collected from El-hadjeb area (146 m of altitude, 34° 47' 25" N / 5° 35' 49" E) on March, 2017 (Biskra, Algeria). The collected plant was identified at the Technical Institute for the Development of Saharan Agronomy (TIDSA). Voucher specimens (FA-027) were stored in the Herbarium of TIDSA, Biskra, Algeria. All the organs were dried in the shade and protected from humidity, and then were grounded to obtain a fine powder which was used to carry out the various analyses.

### 2.3. Extracts and fraction preparation

Powder of *A. gombo* (40 g) was macerated in 600 mL of water/methanol (80:20 v/v) three times (72

hours), at room temperature (solid-liquid extraction). The mixtures were concentrated under vacuum at 50 °C. The obtained crude extract was dissolved in boiling water for 24 hours, then fractionated successively with ethyl acetate, *n*-butanol and methanol (liquid-liquid extraction) according to Markham (1982).

Aqueous extract was prepared by reflux method; 30g of fine powder was suspended in 300 mL of distilled water then kept at 40° for 30 mn and filtered through Whatman No.4 filter paper (Ferreira et al., 2013). Organic phases and aqueous extract were vacuum-evaporated at 45 °C using Heidolph Rotavapor. The obtained fractions named ethyl acetate (EAAg), *n*-butanol (NBAg), methanol (MEA<sub>g</sub>) and aqueous extract (AQAg) were weighed and stored at 4 °C until analysis.

#### **2.4. Determination of total phenolic compounds (TPC)**

The total phenolic content (TPC) of different samples was determined by the Folin-Ciocalteu reagent assay (Singleton and Rossi, 1999). A 200 µL of each sample was added to 1 mL of Folin-Ciocalteu's reagent and 0.8 mL of 7.5% sodium carbonate solution in a test tube. The mixtures were agitated for 30 min, and by Jenway 6310 UV-vis spectrophotometer, the absorbance was measured at 765 nm. The total phenolic amount was expressed in terms of mg gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

#### **2.5. Determination of total flavonoid (TFC)**

Total flavonoid content (TFC) was measured by a colorimetric assay according to Dewanto et al (2002). A volume of 0.5 mL of each extract was mixed with a 75 µL of NaNO<sub>2</sub> solution, stirring for 6 min, before adding 0.15 mL AlCl<sub>3</sub> (100 g/ L). Then, 0.5 mL of NaOH (1 M) was added, after 5 minutes. The final volume was adjusted to 2.5 mL with distilled water. The absorbance of the mix was measured at 510 nm against the same mixture, without the sample. Total flavonoid content was expressed as mg quercetin/g dry weight (mg QE/ g DW).

#### **2.6. Quantification of total condensed tannins (TCT)**

Proanthocyanidins were measured using the vanillin assay described by Sun et al. (1998) with slight modifications. Diluted samples (50µL) were added to 3 mL of 4% methanol vanillin solution and 1.5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and shaken by vortex. After 15 min at

room temperature, the absorption was measured at 500 nm against extract solvent as a blank. The amount of total condensed tannins was expressed as mg catechin /g dry weight (mg CE/ g DW).

#### **2.7. Liquid Chromatography-electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) Analysis**

The *n*-butanol, ethyl acetate and methanol fractions fine dry powder were dissolved in the corresponding solvent. The resulted solution (4 mg/mL) was filtered through a 0.45 µm film filter, and then injected into the HPLC column. LC-ESI-MS analysis was carried out by LC-MS-2020 quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) powered by an electrospray ionisation source (ESI) and operated in a negative ionization mode. Mass spectrometer was coupled online with an ultra-fast liquid chromatography system consisted of a LC-20AD XR binary pump system, SIL-20AC XR autosampler, CTO-20AC column oven and DGU-20A 3R degasser (Shimadzu, Kyoto, Japan). For analysis, An Aquasil C18 column (Thermo Electron, Dreieich, Germany) (150 mm × 3 mm, 3 µm) connected to an Aquasil C18 guard column (10 mm × 3 mm, 3 µm, Thermo Electron) were used. The mobile phase was contained two solvent: A (0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O, v/v) and B (0.1% formic acid in methanol, v/v) with a linear gradient elution: 0-45 min, 10-100% B; 45-55 min, 100% B. The column temperature was fixed at 40°C, the flow rate of the mobile phase was 0.4 mL/min, and 5 µL for each injection. The spectra were checked in SIM (Selected Ion Monitoring) mode and executed by Shimadzu LabSolutions LC-MS software. The mass spectrometer was operated in negative ion mode with a capillary voltage of -3.5 V, a nebulizing gas flow of 1.5 L/min, a dry gas flow rate of 12 L/min, a DL (dissolving line) temperature of 250°C, a block source temperature of 400°C, a voltage detector of 1.2 V and the full scan spectrum from 50 to 2000 Da.

#### **2.8. Antioxidant activity**

##### **2.8.1. DPPH radical scavenging assay**

The free radical scavenging activities of *A. gombo* fractions were measured by DPPH• method according to Kirby and Schmidt (1997) with some modifications. Briefly, 500 µL of each sample at different concentrations were added to 375 µL of ethanol and 125 µL of a DPPH solution (0.2 mM) in ethanol) as a free radical source. The mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature.

Scavenging capacity was measured by JENWAY 7315 spectrophotometer at 517 nm. The lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity. The scavenging of DPPH radical in percentage was calculated by the following equation

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} + A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{control}})] \times 100$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the control reaction. The blank tube contains all reagents except the DPPH solution, and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of *A. gombo* extracts with the DPPH solution. Quercetin and ascorbic acid were used as positive control. The  $IC_{50}$  was defined as the concentration of the sample necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50%, were calculated from the plot of inhibition percentage against concentration.

### 2.8.2. Ferric reducing antioxidant power

The reducing power of *A. gombo* fractions was determined by the method of Yildirim et al. (2001). Sample solutions (0.5 mL) at different concentrations were mixed with 1.25 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 1.25 mL of 1% (w/v) potassium ferricyanide. The mixtures incubated for 30 min at 50°C. After 15 min incubation at room temperature, 1.25 mL of trichloroacetic acid (10%, w/v) was added and the reaction mixtures were centrifuged for 10 min at 2500 g. A 1.25 mL aliquot of the supernatant from each sample mixture was mixed with 1.25 mL of distilled water and 0.25 mL of 0.1% (w/v) ferric chloride solution. After a 10 min reaction time, the absorbance of the mixture was measured at 700 nm. The higher absorbance of the reaction mixture indicated higher reducing power. Values presented are the mean of triplicate analyses.  $EC_{50}$  value ( $\mu\text{g}$  fraction/mL) is the effective concentration in which the absorbance was 0.5 for reducing power and was obtained by interpolation from linear regression analysis. BHA was used as standard.

### 2.8.3. Ferrous ion-chelating activity

The chelation of ferrous ions by *A. gombo* samples was assessed as described by the method of Carter (1971). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of each extract at different concentrations were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of 2 mM  $\text{FeCl}_2$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$  and incubated at room temperature for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of 5 mM ferrozine solution and 2750  $\mu\text{L}$  of deionized water. The mixture was vigorously shaken and left to stand at room temperature

for 10 min. The absorbance was then measured at 562 nm. The inhibition of ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$  complex formation was calculated as follows:

$$\text{Ferrous ion-chelating activity (\%)} = [(A_{\text{control}} + A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{control}})] \times 100$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the control (without sample),  $A_{\text{blank}}$  is the absorbance of the blank (without ferrozine) and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the mixture containing the extract. EDTA was used as positive control.

## 2.9. Phagocytic activity

### 2.9.1. Animals

Male BALB/c mice (2-2.5 month old) from Pasteur institute Algeria, weighing (28- 32 g) were used to determine the phagocytic activity. The animals were kept under standard laboratory conditions [temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and light (12 h day, 12 h night)]. They are having free access to food and water. Nourishment was provided in the form of dry croquettes (SARL Production, Bouzareah, Algeria). The experiments were performed according to ethical principles and guidelines provided by the Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals (CPCSEA). Authorisation for animal studies has been obtained from the Ethics Review Committee of Faculty of Natural and Life Sciences, University Mohamed Kheider-Biskra, Algeria (approval ref no. 307/V.D.P.G.).

### 2.9.2. Phagocytic index

The phagocytic index was determined *in vivo* by the carbon clearance rate test as described by Biozzi et al. (1953). EAAg and NBAg were prepared at the same concentrations of 50, 70, and 100 mg/kg in 0.9% NaCl. Animals were divided into four groups, containing four mice in each one. Group control ( $G_{\text{control}}$ ) was given only 0.9% NaCl (0.5 mL/mouse),  $G_{50}$ ,  $G_{70}$  and  $G_{100}$  were also administered by intraperitoneal injection with 50, 70 and 100 mg/kg, respectively. After 48 h, the carbon ink suspension was injected via the caudal vein to each mouse at a dose of 0.1 mL /10 g. The mixture contained 3 mL black carbon ink, 4 mL saline solution and 4 mL of 3% gelatin solutions. Blood samples were taken at 5 and 15 min using glass capillaries from the retro orbital vein and mixed with 4 mL of 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution for the lysis of erythrocytes. Then, the absorbance was read at 675 nm. The phagocytic activity is expressed by the phagocytic index K that measures all the reticuloendothelial system func-



tion in the contact with the circulating blood. The clearance rate is expressed as the half-life period of the carbon in the blood ( $t_{1/2}$ , min). Calculations were performed by the following equations:

$$K = \frac{[(\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)]}{t_{1/2}} = 0,693/K$$

where  $OD_1$  and  $OD_2$  are the optical densities at times  $t_1$  and  $t_2$  respectively.

### 2.10. Anticoagulant activity

Anticoagulant activity of phenolic compounds from *A. gombo*, were determined using prothrombin time test (PT) and the activated partial thromboplastin time-Kaolin (aPTT) as exogenous and endogenous coagulation pathway, respectively, as described by the method of Athukorala et al. (2007). Firstly, aliquots of 90  $\mu$ L of plasma were mixed with 10  $\mu$ L of extracts at concentration of 100 mg/mL incubated for 10 min. Then, 200  $\mu$ L of thromboplastin pre-incubated for 10 min at 37 °C was added. Similarly, to assess aPTT, the mixtures of plasma and sample of different solvents were incubated for 1 min at 37 °C. Then 100  $\mu$ L of aPTT reagent was added to the mixture and incubated for 5 min at 37 °C. Thereafter, clotting was induced by adding 100  $\mu$ L  $CaCl_2$  (0.025 M). The clotting times of PT and aPTT were recorded by optical coagulometer until fibrin clot formation. PT and aPTT were expressed in terms of clotting time in seconds. Normal saline solution was used as negative control, heparin and some phenolic compounds such as catechin, quercetin and acid ascorbic were used as positive control at concentration of 20 mg/mL.

### 2.11. Cytotoxicity assay

#### 2.11.1. Cancer cell lines and Healthy cells

Three cell lines were assessed for cytotoxicity assay human cervix adenocarcinoma (HeLa) and human breast adenocarcinoma (Mcf-7) cells and normal mouse liver cells (Aml12). Cell lines were obtained from The American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA.). Grown with Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) and HAMS F 12 (1:1) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine, 100 U/mL of penicillin, and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin (GIBCO, NY, USA). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%  $CO_2$ .

#### 2.11.2. MTT assay

The most potent fraction EAAg was subjected to evaluate the cytotoxic activity by MTT assay ac-

ording to Mosmann (1983), with slight modification. The assay is based on the capacity of viable cells to reduce the yellow substrate MTT into a dark blue formazan product; this product is proportional to the living cell amount and inversely proportional to the amount of cytotoxicity. Briefly, cell lines were seeded for 24 hours in 96-well microplates in 180  $\mu$ L of growth medium with  $1 \times 10^5$  cells in each well in a recommended conditions incubator (37 °C, 5%  $CO_2$ ). The microplates were treated by the ethyl acetate fraction at ten different doses (3.9 to 2000  $\mu$ g/mL) and incubated at 37°C for 48 h in 5%  $CO_2$ . Then, 10  $\mu$ L of MTT was added to each well (5 mg/mL) and the incubation was continued for 4 h. After this, 100  $\mu$ L of DMSO was added to each well. The absorbance (A) was measured at 570 nm by a microplate reader. Cytotoxicity was expressed as the concentration of EAAg inhibiting cell growth by 50% ( $IC_{50}$ ). All doses were tested for 8 replicates; the control twice (cells left untreated) and the experiment three times were evaluated.

Selectivity index was measured by the following equation

$$SI = \frac{[\text{cytotoxicity of the EAAg fraction in normal cells (CC50)}]}{[\text{cytotoxicity of the EAAg fraction in cancer cells (IC50)}]}$$

### 2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Statistica 8.0 software, StatSoft Inc., USA. The mean differences between tests were examined using Tukey test and compared by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at  $p$ -value < 0.05. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) between the TPC, TFC and TCT of the samples and the calculated  $EC_{50}$  values in each antioxidant assay were determined.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Yield and screening of total phenols, flavonoid and tannins of *A. gombo*

*A. gombo* has been extracted with different solvents of varying polarities: ethyl acetate, n-butanol, methanol and water. Yields displayed a large variation among different solvent extracts, as showed in **Table 1**. The highest extraction yield was recorded for the AQAg extract with 18.24%, followed by MEAg fraction, 15.52%, while the lowest proportions were marked by both of fractions EAAg and NBAg (4.54% and 8.13%, respectively).

The amounts of TPC were carried out by Folin-

Ex-tracts	Yield (%)	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	TCT (mg CE/ g DW)
AQAg	18.24%	84.48± 1.58 <sup>c</sup>	10,20± 0.33 <sup>a</sup>	20.71± 2.61 <sup>a</sup>
MEAg	15.52%	98.74± 1.75 <sup>d</sup>	47.84± 1.22 <sup>c</sup>	25.82± 1.39 <sup>a</sup>
EAAg	4.54%	43.50± 1.42 <sup>b</sup>	68.79± 1.09 <sup>d</sup>	N D
NBAg	8.13%	22.52± 0.73 <sup>a</sup>	34.46± 1.02 <sup>b</sup>	N D

**Table 1:** Yield extracts, total polyphenols (expressed as mg GAE/ g, DW), flavonoid and condensed tannin contents (expressed as mg QE/ g, DW and mg CE/ g, DW) respectively in the aerial parts of *A. gombo*.

Values (means of three replicates) of each parameter followed by the same letter are not significantly different at  $P < 0.05$ . ND: not determined. MEAg: methanolic fraction. EAAg: ethyl acetate fraction. NBAg: n-butanol fraction. AQAg : aqueous extract

ciocalteu assay and the results were shown in **Table 1**. The total phenolics ranged from 22.52 to 98.74 mg GAE/ g DW. The highest content of total phenolic was found in methanol fraction (98.74 mg GAE/ g DW) followed by the aqueous extract (84.48 mg GAE/g DW). These results were in agreement with the reports of Niknam and Ebrahimzadeh (2002), in which the content of total phenolic in roots of 20 species of *Astragalus* is higher in the methanol /water (80/20, v/v) extract than those of aqueous extracts. Moreover, total phenolic content in *Phaseolusradiatus* leaves (Fabaceae), studied by Fidrianny et al. (2015) displayed that the highest TPC in the ethanolic extract compared to ethyl acetate extract. Generally, higher phenolic contents are detected when combined organic solvent with water, than total organic solvent (Grujic et al, 2012). Therefore, these variations may be attributed to the polarities of metabolites present in crude materials, mainly to the effect of solvent extraction (Cuellar et al., 2018).

As shown in **Table 1**, the highest content of total flavonoids was found in the EAAg (68.79 mg QE/g DW) followed by MEAg, NBAg and AQAg which contained 47.8, 34.13 and 10.20 mg QE/g DW, respectively. Thus, in agreement with report of Fidrianny et al. (2015), which stated that total flavonoids of ethyl acetate extract from leaves *P. radiatus* (Fabaceae) had higher amounts compared to ethanolic extract. Furthermore, MEAg exhibited the same trend with content of flavonoids from the methanolic extract of four Palestinian *Astragalus* species (Jaradat et al., 2017). In comparison with

the finding of Guettaf et al. (2016), AQAg had higher amounts of flavonoid than the aqueous extract of *Ononis angustissima*, although belongs to the same area even if the same family. Indeed, the present results are in agreement with previous work and corroborate the presence of flavonoids from the aerial parts of Algerian *Astragalus* genus (Benchadi et al., 2013; Khalfallah et al., 2014; Maamria et al., Labed et al., 2016).

The obtained results indicated that both of MEAg and AQAg contained tannins (**Table 1**), the highest amount of tannins was recorded in MEAg (25.82 mg CE/ g DW), while the lowest level was found in AQAg (20.41 mg CE/ g DW). These data are in agreement with the report of Jaradat et al. (2017), who showed that the methanolic extract of *A. boeticus* had a parallel trend with our findings. Besides, aqueous extract of *O. angustissima* (Fabaceae) contained tannins two-fold higher than AQAg (Guettaf et al., 2016). Presence and abundance of secondary metabolites such as, polyphenols, flavonoids in plant material depend on several genetic and environmental factors, such as hot temperature, high solar exposure, drought, salinity (Garza, 2015, Gulcin,2020) as well as to the extraction method, time, storage conditions and to the presence of interfering substances (Gulcin, 2020)

### 3.2. Identification of phenolic compounds of *A. gombo* by LC-ESI-MS analysis

Quantitative analysis of phenolic compounds from *A. gombo* aerial parts extracts revealed that the EAAg more reaches in term of phenolic compounds than MEAg and NBAg (**Table 2**). Thereby, 25 compounds were identified among all solvent, mostly phenolic acids and flavonoids. The major identified phenolic acids in the ethyl acetate fraction were the *p*-coumaric acid recorded as predominant, followed by *trans*-ferulic and quinic acid with a concentration of 1315, 641 and 370 µg/g extract, respectively. Several studies reported that the important therapeutic properties attributed to *p*-coumaric acid were antioxidant, antigenotoxic effects and cosmetic potential (Ekiert et al., 2014). Furthermore, EAAg fraction had higher amounts of 3,4-di-O-caffeoquinic acids and 4,5-di-O-caffeoquinic acids. Correspondingly, to Li et al. (2018), asserted that five di-O-Caffeoylquinic acid derivatives possessed a strong antioxidant and cytoprotective effects towards OH-damaged bone marrow derived mesenchymal stem cells (bmMSCs). Phenolic acids possess appreciated biological properties such as an immunostimulant, hepatoprotective, anticar-

Phenolic acids		MEAg		EAAG		NBAg	
	m/z	Ret Time	CC( $\mu\text{g/g}$ extract)	Ret Time	CC( $\mu\text{g/g}$ extract)	Ret Time	CC( $\mu\text{g/g}$ extract)
Quinic acid	191.00	2.05	314.56	2.05	370.45	2.05	226.82
Gallic acid	169.00	-----	ND	3.97	18.76	----	ND
Protocatechuic acid	153.00	----	ND	6.84	79.96	----	ND
4-O-caffeoylquinic acid	353.00	11.45	5.48	11.51	2.53	11.55	6.24
Caffeic acid	179.00	----	ND	14.30	19.36	14.35	1.20
Syringic acid	197.00	15.82	0.47	15.90	30.90	15.96	7.87
P-coumaric acid	163.00	20.75	61.24	20.79	1315.18	20.90	57.56
Trans frulic acid	193.00	22.89	29.71	22.91	641.78	22.91	7.63
O-coumaric acid	163.00	26.13	2.14	26.07	5.45	26.07	2.56
Salviolinic acid	717.00	-----	ND	28.18	15.40	-----	ND
3,4-di-o-caffeoquinic acid	515.00	24.96	7.24	24.96	17.70	24.84	3.70
4,5-di-o-caffeoquinic acid	515.00	26.83	30.42	27.14	262.33	27.03	27.71
Trans cinnamic acid	147.00	-----	ND	31.88	65.04	-----	ND
<b>Flavonoids</b>							
Catechin (+)	289	-----	ND	10.93	1.67	-----	ND
quercetin-3-O-galactoside	463.00	24.22	61.55	24.30	491.56	24.30	15.53
quercetin-3-O-rhamonosid	ND	----	ND	ND	ND	26.66	17.90
Apegenin-7-O-glucoside	431.00	26.33	29.59	26.33	19.97	26.33	22.33
Quercetin	301.00	----	ND	31.75	75.40	----	ND
Kampherol	285	----	ND	31.76	3.55	-----	ND
Naringenin	271.00	33.74	0.25	33.75	4.9	33.74	0.24
Silymarin	481	----	ND	33.34	9.13	33.67	11.15
Apegenin	269.00	----	ND	34.20	2.60	----	ND
Luteolin	285.00	34.78	23.07	34.77	151.68	34.82	35.18
Cirsiliol	329.00	35.49	140.28	35.50	1155.50	35.48	28.96
Acacetin	ND	---	ND	ND	ND	40.06	0.20

**Table 2: Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry of various fractions from aerial parts *A.gombo*.**

**N.D: not determined. MEAg: methanolic extract. EAAG: ethyl acetate fraction. NBAg: n-butanol fraction**

cinogenic, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant (Silva and Batista, 2017; Awad et al., 2017; Alagawany et al., 2017).

The present finding shows that the flavonoids and their derivatives (**Table 2**) have been attributed to the solvent of extraction. Obviously, results revealed quercetin derivatives such as quercetin-3-O-rhamonosid and quercetin 3-O-galactosid, besides also apegenin-7-O-glucoside, kaempferol, naringenin and silymarin. These results are in line with previous works and corroborated the presence of *Astragalus* flavonoids from the aerial parts (Benchadi et al., 2013, Khalfallah et al., 2014, Maamria et al., 2015). The major identified flavones in EAAG have been cirsiliol followed by luteolin

its amount was 1155 and 151  $\mu\text{g/g}$  extract, respectively. Awad et al. (2017) and Forgo et al. (2012) reported that cirsiliol showed a cytotoxic activity against Hela, MCF-7 and A431 cells. In recent years, phytochemicals (flavonoids, phenolic acids) have a great interest due to the bioavailability, they possess with safer compounds and higher selectivity for killing cancer cells (Forgo et al., 2012; Alagawany et al., 2017; Awad et al., 2017).

### 3.3. Screening of antioxidant properties

#### DPPH radical scavenging assay

Screening of antioxidant properties of various polarity extracts (ethyl acetate, n-butanol, methanol and water) of *Astragalus gombo* had not been re-

Extracts	DPPH assay IC <sub>50</sub> (µg/ mL)	FRAP assay IC <sub>0.50</sub> (µg/ mL)	FIC assay IC <sub>50</sub> (µg/ mL)
AQAg	91.29 ± 0.88 <sup>d</sup>	174.30± 6.97 <sup>d</sup>	321.16±1.5 9 <sup>d</sup>
MEAg	104.53± 2.09 <sup>e</sup>	109.36± 2.73 <sup>b</sup>	510.01±0.3 7 <sup>e</sup>
NBAg	30.55± 1.35 <sup>c</sup>	127.51± 2.56 <sup>c</sup>	114.56±2.7 7 <sup>c</sup>
EAAg	18.18± 0.29 <sup>b</sup>	<b>90.44± 3.80<sup>a</sup></b>	83.005±0.0 09 <sup>b</sup>
BHA	-----	100.56± 5.71 <sup>a,b</sup>	-----
EDTA	-----	-----	51.57±0.00 <sup>a</sup>
Quercetin	6.81± 0.07 <sup>a</sup>	-----	-----
Ascorbic acid	11.29± 0.11 <sup>a</sup>	-----	-----

**Table 3: Antioxidant properties of *A. gombo* solvent extracts.**

Values are means of three replicates for DPPH radical scavenging assay, Ferric reducing antioxidant power activity and ferrous ion chelating assay. Each parameter followed by the same letter is not significantly different at  $P < 0.05$ . MEAg: methanolic fraction. EAAg: ethyl acetate fraction. NBAg: n-butanol fraction. AQAg: aqueous fraction.

ported. The scavenging effects of different fractions on the DPPH radical were influenced significantly by nature of the solvent) (Table 3). The IC<sub>50</sub> values extend more than five times the range. EAAg and NBAg were showing the highest DPPH· scavenging activity as compared to AQAg and MEAg with 18, 30, 91 and 104 µg/ mL, respectively. EAAg and NBAg fractions were found more potent than ethyl acetate and n-butanol extracts from the pods of Algerian *A. armatus* (Labeled et al., 2016). Although, EAAg fraction showed a higher quenching activity close to the positive control ascorbic acid with 18 and 11 µg/ mL, respectively (Li et al., 2009). The high potent antioxidant activity of ethyl acetate is probably due to its richness by phenolic acids and their synergistic effect especially compounds which

Extracts	DPPH	FRAP	Iron chelation
TPC	0.91*	-0.90*	0.96**
TFC	0.97**	-0.98**	0.99***
TCT	0.82*	-0.82*	0.74 <sup>ns</sup>

**Table 4: Pearson correlation coefficient between amount of phenolic compounds in various extract and their IC<sub>50</sub> of antioxidant activities**

( $P < 0.05$ ) ns, no significant; \*, significant ( $P < 0.05$ ); \*\*, high significance ( $P < 0.01$ ); \*\*\*, very highly significant ( $P < 0.001$ ) TPC: Total phenolic content; TFC: Total flavonoid content, TCT: total condensed tannin

are only present within EAAg. In this regard, Fitriany et al. (2017) confirmed that a strong antioxidant capacity by DPPH and FRAP method related to the high amount of total phenolics and flavonoids. Which confirm our correlation study (Table 4), a strong positive correlation between the TPC, TFC, TCT and IC<sub>50</sub> values of DPPH method  $r^2 = 0.91, 0.97$  and  $0.83$ , respectively. Benferdia et al. (2021) noted a medium correlation between TPC and antioxidant activity ( $r^2 = 0.78$ ) in *A. gombo* stem from (Ouargla-Algeria) Recent studies indicated that phenolic acids are considered as the best competent hydrogen donors due to their characteristic carboxylic group, which is easily ionized (Li et al., 2018).

### Ferric reducing antioxidant power

The reducing powers were considered in the following order: EAAg > BHA > MEAg > NBAg > AQAg (Table 3). The EAAg showed the most potent reducer than BHA as a positive control with EC<sub>50</sub> of 90.44 and 100.56 µg/ mL, respectively. The results indicated that the reducing power increased with the concentration of compounds within the extract. Though, no significant difference was observed between BHA (100.56 µg/ mL) and MEAg (109.36 µg/ mL) at the same concentration ( $p < 0.05$ ). This study highlights that EAAg and MEAg have a significant ability to react with free radicals to transform them into more stable (Sahreen et al. 2010). Basically, Pearson's correlation analysis revealed a highly significant and negative correlation between TPC, TFC, TCT and IC<sub>50</sub> values of FRAP ( $r^2 = -0.91, -0.98$  and  $-0.83$ , respectively). These outcomes are in line with those reported by Fidrianny et al. (2015), who demonstrated that TPC in ethyl acetate and ethanolic extracts from *Glycine max* leaves (Fabaceae) had highest and negative correlation with an EC<sub>50</sub> of FRAP capacity. The level of correlation between phenolic compounds and antioxidant activity supports the hypothesis that polyphenols directly contribute to antioxidant capacity. In addition, Deghima et al. (2020) defined phenolic compounds as excellent electron donors.

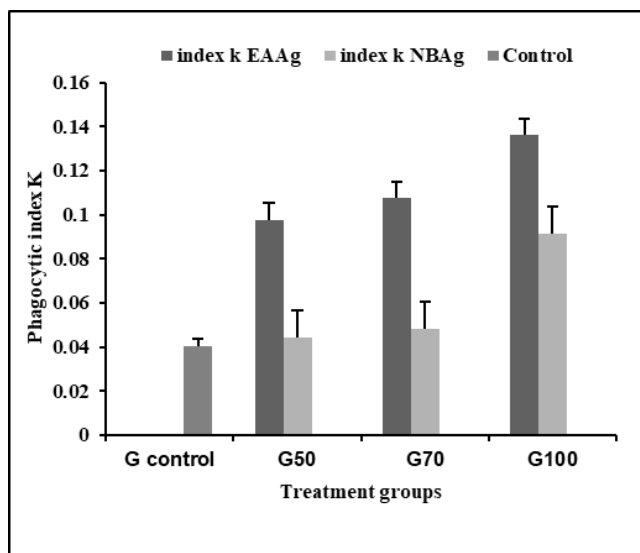
### Ferrous ion-chelating activity

The transition of the metal ions, especially Fe<sup>2+</sup>, is an important mechanism of antioxidant activity, which possess the ability to catalyse hydroperoxide decomposition and Fenton-type reactions. The iron chelating data keep the same ranking as the DPPH radical scavenging test, namely EDTA > EAAg > NBAg > AQAg > MEAg (51, 83, 114, 321

and 510 µg /mL) (**Tab.3**). Ceylan et al. (2016) obtained the same result for methanolic extract of two Turkish (Fabaceae) aerial parts of *Cytisopsis-dorycniifolia* and *Ebenus hirsute*. Previous studies corroborate that aqueous extract exhibited higher ability to chelate transition metal ions than methanol and 70% acetone (Sahreem et al. 2010). Data exhibited a high Pearson's correlation between TPC, flavonoids, tannins and IC<sub>50</sub> values of FIC ability ( $r^2 = 0.97, 0.99$  and  $0.74$ , respectively). Consequently, authors supposed that the major compounds contributors to reducing the power of the plant extracts are phenolic compounds, which is approved by other works (Deghima et al., 2020).

### 3.4. Phagocytic activity

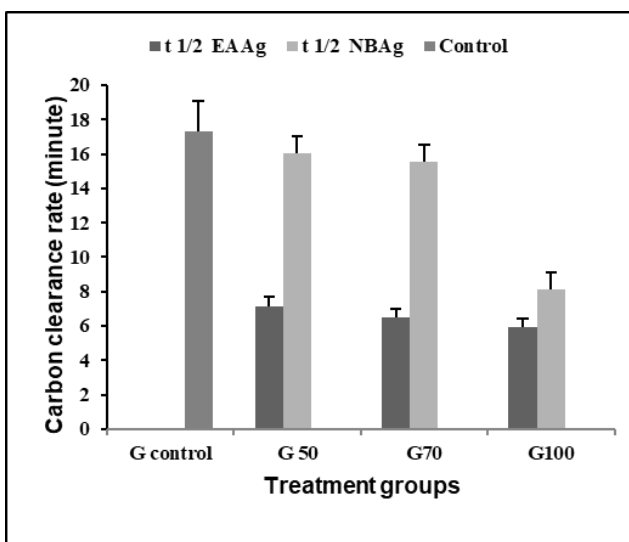
The phagocytic activity of the EAAg and NBAg fractions was evaluated *in vivo* by a carbon clearance rate test; three concentrations were administered 50, 70, and 100 mg/kg. The phagocyte of the reticulo-endothelial system (RES) eliminates all foreign particles or substances such as fibrin aggregates, dead cells and damaged platelets. The potential of the reticulo-endothelial system depends on estimation of the rate of clearance from the blood of foreign materials, such as colloidal carbon (Benmebarek et al., 2013). As shown in (**Fig 1**), cur-



**Figure 1:** Effect of EAAg and NBAg fractions on phagocytic activity  $G_{control}, G_{50}, G_{70}$  and  $G_{100}$  were injected with 0, 50, 70 and 100 mg/kg of EAAg and NbaAg prepared in 0.9% NaCl.

rent data indicate that there are significant differences in the average phagocytic index (K) between the groups of the two fractions with  $p$ -value 0.000 and 0.001 for EAAg and NBAg, respectively. These findings are in agreement with those reported by Labeled et al. (2016), which attested that effect of the phagocytic index of n-butanol extract from Al-

gerian *A. armatus* was higher at dose 100 mg/ kg compared to our data at the same dose. Practically,  $G_{100}$  (0.091) showed a higher effect than  $G_{control}, G_{50}$  and  $G_{70}$  (0.040, 0.044 and 0,047 respectively). Consequently, this explains the rapid clearance of colloidal carbon from the blood, thereby mononuclear phagocyte system plays an important role in non-specific defence (innate immunity) (Benmebarek et al., 2013). Thus, results indicate that both of fractions enhanced the phagocytic activity by stimulating the reticuloendothelial system in a dose dependant effect, where ethyl acetate booster than  $n$ -butanol fraction. According to LC-ESI-MS analysis, the EAAg possess more reaches in term of phenolic compounds than NBAg. These results support the reports of Kilani-Jaziri et al. (2017) which state that hydroxycinnamic acids have a higher immunomodulatory effect, especially obtained by caffeic acid, than ferulic and p-cumaric acids.



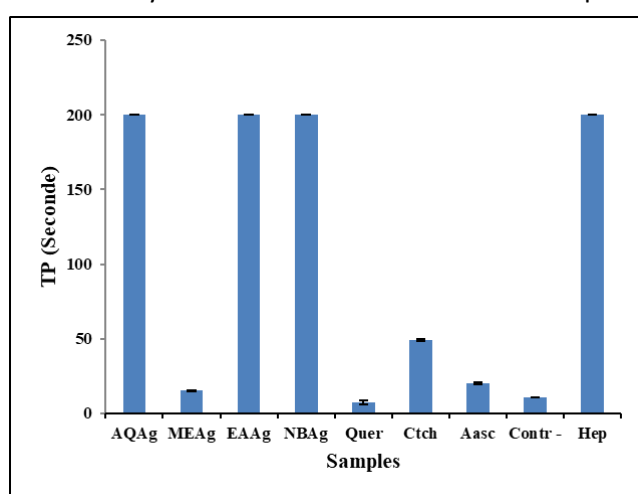
**Figure 2:** Effect of EAAg and NBAg fractions on half time ( $t_{1/2}$ ) of carbon in blood.

As shown in **Figure 2**, EAAg exhibited a clearance rate of carbon faster than NBAg after 48 hours of fractions administration. In addition, the two fractions showed a significant difference between the groups averages ( $G_{control}, G_{50}, G_{70}$  and  $G_{100}$ ) with  $p$ -value of 0,000 and 0.008, respectively. Consequently, the decreasing half-life of carbon clearance was proportional to the increase in phagocytic index activity. Latest studies reported that there is a relationship between immunomodulatory activity of phenolic compounds and their antioxidant capacities (Grigore, 2017; Kilani-Jaziri et al., 2017). Indeed, EAAg fraction ranks first from all antioxidant activities tested, as well, this fraction possessed a highly significant phagocytic activity than NBAg fraction. In the same context, Garza (2015)

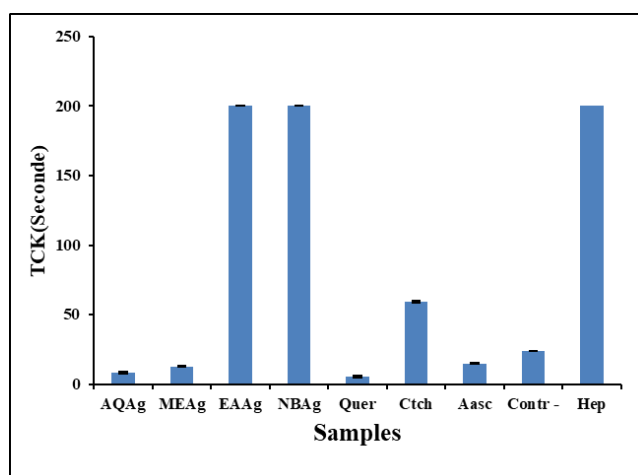
asserted that polyphenols and flavonoids originally from Fabaceae, play a positive role to maintain human wellbeing, to enhance health and to improve immune function for the prevention of specific diseases.

### 3.5. Anticoagulant activity

The anticoagulant activity of the *A. gombo* extract/fractions was evaluated by the PT and aPTT assays, with normal citrated human plasma. As shown in **Figure 3.A**, the PT test of AQAg, EAAg and NBAg revealed significant and high anticoagulant potential, with prolonged clotting time higher than 200 sec parallel to heparin (>200 sec). As regards the aPTT test in **Figure 3.B**, the most potent activity recorded by both of fraction with over 200 sec par-



A. Prothrombin Time test



B. The activated partial thromboplastin time-Kaolin (aPTT) test.

**Figure 3: Anticoagulant activity of MEAg, AQAg extracts and NBAg and EAAg fractions of *A. gombo*.**

Normal saline solution was used as negative control. (Hep) Heparin, (Ctch) catechin, (Quer) quercetin and (Aasc) acid ascorbic were used as positive control at a concentration of 20 mg/mL. Values expressed as mean ± SD with n = 3.

allel to positive control (>200 sec). Moreover, our finding was in agreement with those reported by

Athukorala et al. (2007) and Omar et al. (2017) which recorded the same trend of extended clotting time both PT and aPTT about ethanol extract of *Lupinus pilosus* (Fabaceae) and crude polyphenol fraction from Green algae, respectively. However, it was found that the same sample as well AQAg extract react differently towards PT and aPTT, which was comparable to earlier results of Félix-Silva et al. (2014). On the other hand, numerous reports also studied the anticoagulant activity of some natural extracts affirmed that aqueous extract extended clotting time higher than organic extract (Kee et al., 2008; Félix-Silva et al., 2014). We supposed an action preferentially to the intrinsic and or common pathway of coagulation was adequate for aqueous extract of *A. gombo*. Kee et al. (2008) demonstrated the anticoagulant effect of the tannins of nine plants in South Africa, which resulted in improved anticoagulant activity. So, it's probably that aqueous extract efficiency by domination of polar compounds. Thus, explains the anticoagulant effects of phenolic compounds in various extracts to inhibit or decrease the activity of tissue factors or thrombin (Zong et al., 2017). To the best of our knowledge, there is no study in the literature on the effect of *A. gombo* extracts on anticoagulant activity.

### 3.6. MTT cytotoxicity Assay

The MTT assay is widely used to evaluate cellular metabolic activity as an indicator of cell viability, proliferation and cytotoxicity. The most important advantages of the MTT test are; fast, safe, high reproducibility, and does not require the use of animals. In this investigation, we used the MTT assay to assess the anti-proliferative similarly the cytotoxicity assay. As summarized in **Table 5**, the anti-

Ethyle acetate	Hela	MCF7	AML12
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	108.8±1.8 <sup>a</sup>	168.4±1.6 <sup>b</sup>	>2000 <sup>c</sup>
SI	18.38	11.87	

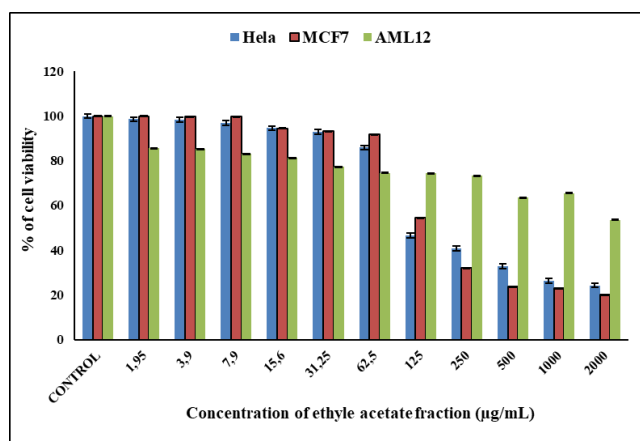
**Table 5: Cytotoxicity and selectivity index of ethyl acetate fraction on cervical (Hela) and breast (MCF-7) cancer cell lines and healthy cell line AML12.**

Selectivity Index (SI): CC<sub>50</sub> against healthy cells/IC<sub>50</sub> against cancer cells. The data were examined using one-way ANOVA tested by Tukey's post-hoc analysis. Each parameter followed by the same letter is not significantly different at P < 0.05.

proliferative evaluation of EAAg fraction against HeLa and Mcf-7 cells presented an IC<sub>50</sub> values: 108.8±1.8 and 168.4±1.6µg/mL, respectively, after

48h of incubation. Ethyl acetate fraction showed more active to inhibit the proliferation of Hela cells. Hence, authors supposed that the EAAg fraction is less potent against MCF-7 cells. However, a new paper confirmed that ethyl acetate fraction from Egyptian *A. sieberi* D C. exhibited an effective cytotoxic activity against MCF-7 with  $IC_{50}$  value  $69.6\mu\text{g}/\text{mL}$ , compared to our results (Salem et al., 2020). In this regard, study by Ibrahim et al. (2013) asserted that the butanolic extract from the Egyptian *A. bombycinus* displayed efficient cytotoxic potential against MCF-7. According to literature, total flavonoids and calycosin from *A. mongholicus* Bunge revealed potent effects on the proliferation of human erythroleukemia cell line with  $IC_{50}$  values 98.63 and  $130.32\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively (Zhang et al., 2012). Regarding the assessment of the anticancer activity of the *Astragalus* polyphenol-compounds against the human cervical cancer, we noted a lack of information, where the present fraction EAAg has marked hopeful results.

Further, to determine the cytotoxicity activity, EAAg fraction was examined against normal mouse liver cells (AML12), outcomes are presented in Fig.4.



**Figure 4: Evaluation of the cytotoxicity of EAAg fraction at different concentration on HeLa, MCF-7 and AML12 cells for 48 incubation.**

The current finding showed that EAAg fraction improved the viability of normal cells AML12, while being non-toxic up to concentration  $CC_{50}$  value  $\geq 2000\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48h of incubation. According to literature, some of the genus *Astragalus* has been exhibited an anticancer activity with a weak cytotoxicity effect against various cancer cell lines (Bedir et al., 2000; Aslanipour et al., 2017). As presented in Table (5), data exhibited high levels of SI. The EAAg fraction showed higher significant selectivity ( $p \geq 0.000$ ) towards HeLa and MCF-7 cancer cell lines with SI value 18 and 11, respectively. Ahmad et al. (2018), reported that the SI value superi-

or or equal to three ( $\geq 3$ ) considered an efficacy selectivity index against cancer cells. The novelty in this paper, that the phenolic compounds of *A. gombo* displayed important anticancer potential, possess a high selectivity index against cancer cells compared to healthy liver cells AML12. These effects propose that *A. gombo* fraction may be considering a promising candidate chemotherapeutic.

#### 4. Conclusion

Based on the investigation carried out in this study, the LC-ESI-MS analysis revealed that flavonoids and hydroxycinnamic acids were the main groups of phenolic compounds in various solvent. Antioxidant, phagocytic, anticoagulant, cytotoxic and anti-proliferative activities could be referred to high concentrations of *p*-coumaric and trans-ferulic acid, also to cirsiol and quercetin-3-O-galactoside, or to the synergistic effect between them, particularly in ethyl acetate fraction. However, future studies are essential to isolate and identify the therapeutic phytochemicals and to explore these active compounds in new pharmaceutical applications and food industrial preparation.

#### Acknowledgment

The authors are grateful to (MESRS, Algeria), for providing their financial support during the study. The authors are also grateful to Dr. Nassima Deghich- Diab Principal Engineer of Section from (TIDSA).

#### References

- Ahmad K, Hafeez ZB, Bhat AR, Rizvi MA, Thakur SC, Azam A (2018) Antioxidant and apoptotic effects of *Callistemon lanceolatus* leaves and their compounds against human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: 1195-1209.
- Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M (2017) Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews* 18:167-176.
- Aslanipour B, Gülcemal D, Nalbantsoy A, Yusufoglu H, Bedir E (2017) Cycloartane-type glycosides from *Astragalus brachycalyx* FISCHER and their effects on cytokine release and hemolysis. *Phytochemistry Letters* 21: 66-73.
- Amoussa AMO, Sanni A, Lagnika L (2015) Antioxidant activity and total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the bark extracts of *Acacia ataxacantha*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4: 172-178.
- Athukorala Y, Lee K, Kim S, Jeon Y (2007) Anticoagulant Activity of Marine Green and Brown Algae Collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource technology* 98: 1711-1716.
- Awad BM, Eman SH, Amany KI, Amira SW, Mohamed MR, Mohamed AH, Mahmoud AE, Safwat AA (2017) Cytotoxic Activity

- Evaluation and Molecular Docking Study of Phenolic Derivatives from *Achilleafragrantissima* (Forssk.) Growing in Egypt. *Medicinal Chemistry Research* 26: 2065-2073.
- Benchadi W, Haba H, Lavaud C, Harakat D, Benkhaled M (2013) Secondary metabolites of *Astragaluscruciatus* Link. And their chemotaxonomic significance. *Records of Natural Products*7:105-113.
- Benferdia S, Rahmani Z, Belfar A, Cherbi R, Messaoudi A, Saïdi M. (2021). Phytochemical composition and antioxidant activity of Algerian *Astragalus gombo* stems. *Bulgarian Chemical Communications*, 307.
- Bedir E, Pugh N, Calis I, Pasco DS, Khan IA,(2000) Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(7): 834-837.
- Benmebarek A, Zerizer S, Laggoune, S, Kabouche, Z (2013) Immunostimulatory activity of Stachysmialhesi de Noé. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 9(1):1-4.
- Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN (1953) Quantitative Study of the Granuloplectic Activity of the Reticulo-Endothelial System. *British Journal of Experimental Pathology* 34: 441-457.
- Carter P (1971) Spectrophotometric Determination of Serum Iron at the Submicrogram Level with a New Reagent (Ferrozine). *Analytical Biochemistry* 40: 450-458.
- Ceylan R, Katanić J, Zengin G, Matić S, Aktumsek A, Boroja T, Stanić S (2016) Chemical and Biological Fingerprints of Two Fabaceae Species *Cytisopsis dorycnifolia* and *Ebenus hirsuta*: Are They Novel Sources of Natural Agents for Pharmaceutical and Food Formulations. *Industrial Crops and Products* 84:254-262.
- Cuellar JE, Martínez J, Rojano B, Gil J H, Durango D (2020) Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Platymiscium gracile* Benth.: A species threatened by extinction. *Journal of King Saud University* 32(1):702-708.
- Deghima A, Righi N, Rosales-Conrado N, León-González M E, Gómez-Mejía E, Madrid F(2020) Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. *South African Journal of Botany* 132: 204-214.
- Dewanto V, Xianzhong W, Kafui KA, Rui HL (2002) Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3010-3014.
- Ekiert H, Piekoszewska A, Muszyńska B, Baczyńska S (2014) Accumulation of p-coumaric acid and other bioactive phenolic acids in in vitro culture of *Rutagraveolens*ssp. *divaricata* (tenore) gams. *Medicina Internacia Revuo* 102: 24-31.
- Félix-Silva J, Souza T, Camara RF, Cabral B, Silva-Júnior AA, MorettiRebecchi IM, Zucolotto SM, Oliveira Rocha HA, Fernandes-Pedrosa MR(2014) In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutic applications. *BMC Complementary and Alternative* 14: 405-418.
- Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França S, Belebani RO (2013) In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annonamuricata* L.(Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental parasitology* 134(3): 327-332.
- Fidrianny I, Aristya T, Hartati R ( 2015) Antioxidant capacities of various leaves extracts from three species of legumes and correlation with total flavonoid, phenolic, carotenoid content. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 7(3): 628-634.
- Fitriansyah SN, Fidrianny I, & Ruslan K (2017) Correlation of total phenolic, flavonoid and carotenoid content of *Sesbania sesban* (L. Merr) leaves extract with DPPH scavenging activities. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9(1): 89-94.
- Forgo P, Zupkó I, Molná J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J (2012) Bioactivity-Guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea jacea*. *Fitoterapia* 83: 921-925.
- Foudah AI, Soliman GA, Abdel-RahmanRF, Alankus-Caliskan O, Yusufoglu H( 2017) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Astragalus echinops* and *Astragalus logopodioides* ethanolic extracts on paracetamol-induced liver injury in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14:31-40.
- Garza W (2015) Fabaceae classification, nutrient composition and health benefits, Ed. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA.Ghasemzadeh A, Omidvar V, JaafarHZE (2012)Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato *Ipomoea batatas*. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 2971-2976.
- Guettaf S, Abidli N, Kariche N, Bellebcir L, BouricheH(2016) Evaluation of antioxidant potential and phytochemical studies of *Ononisangustissima* L (Fabaceae). *World Journal of Pharmaceutical Research* 5 1793-1815.
- Grigore A (2017) Plant phenolic compounds as immunomodulatory agents. *Phenolic compounds–Biological activity*. London, UK: IntechOpen 75-98.
- Grujic N, Lepojevic Z, Srdjenovic B, Vladic J, Sudji J (2012) Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules* 17: 2518-2528.
- Gulcin İ (2020) Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology* 94(3): 651-715.
- Ibrahim L F, Marzouk M M, Hussein S R, Kawashty SA, Mahmoud K, Saleh NA(2013) Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss. *Natural Product Research* 27(4-5): 386-393.
- Jaradat NA, Zaid AN, Abuzant A, Khalaf S, Abu-Hassan N(2017) Phytochemical and Biological Properties of Four *Astragalus* Species Commonly Used in Traditional Palestinian Medicine. *European Journal of Integrative Medicine* 9:1-8.
- Kee NLA, Mnonopi N, Davids H, Naudé RJ, FrostCL(2008) Antithrombotic/anticoagulant and anticancer activities of selected medicinal plants from South Africa. *African Journal of Biotechnology* 17: 217-223.
- Khalfallah A, Karioti A, Berrehal D, Kabouche A, Lucci M, Bilia AR, Kabouche Z (2014) A new flavonoltriglycoside and other flavonol glycosides from *Astragalusarmatus*Willd. (Fabaceae). *Records of Natural Products* 8: 12-18.
- Kilani-Jaziri S, Mokdad BI, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, ChekirGL (2017) Immunomodulatory and Cellular Anti-Oxidant Activities of Caffeic, Ferulic, and p -Coumaric Phenolic Acids: A Structure–activity Relationship Study. *Drug and Chemical Toxicology* 40: 416-424.
- Kirby AJ, Schmidt RJ (1997) The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs. *Journal of ethnopharma-*



colonyl56: 103-108.

Labeled A, Ferhat M, Labeled-Zouad I, Kaplaner E, Zerizer S, Voutquenne-Nazabadioko L, AlabdulMagid A, Semra Z, Kabouche A, Kabouche Z, Öztürk M (2016) Compounds from the Pods of *Astragalusarmatus* with Antioxidant, Anticholinesterase, Antibacterial and Phagocytic Activities. *Pharmaceutical Biology* 54: 3026-3032.

Lee YY, Lee S, Jin JL, Yun CHS (2003) Platelet Anti-Aggregatory Effects of Coumarins from the Roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Archives of Pharmacal Research* 26: 723-726.

Li X, Li K, Xie H, Xie Y, Li Y, Zhao X, Jiang X, Chen D (2018) Antioxidant and Cytoprotective Effects of the Di-O-Caffeoylquinic Acid Family: The Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Conformational Effect. *Molecules* 23: 222-233.

Li HY, Hao ZB, Wang XL, Huang L, Li JP (2009) Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource Technology* 100: 970-974.

Maamria L, Long C, Haba H, Lavaud C, CannacA, Benkhaled M (2015) Cycloartane Glycosides from *Astragalusgombo*. *Phytochemistry Letters* 11: 286-291.

Markham KR(1982) *Techniques of Flavonoid Identification*, Ed. Academic Press. Paris, France.

MosmannT(1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological* 65(1-2):55-63.

Nikbakht-Brujeni G, Tajbakhsh H, Pooyanmehr M, Karimil(2013) In Vitro Immunomodulatory Effects of *Astragalus verus* Olivier. *Black Milkvetch: An Immunological Tapestry in Kurdish Ethnomedicine. Comparative Clinical Pathology* 22: 29-39.

Niknam V, Ebrahimzadeh H (2002) Phenolics content in *Astragalus* species. *Pakistan Journal of Botany* 34: 283-289.

Omar G, Abdallah L, Rahim A, Othman R, Barakat A (2017) Selected Wild Plants Ethanol Extracts Bioactivity on the Coagulation Cascade. *Journal of Scientific Research and Reports* 13: 1-10.

Ozenda P( 2004) *Flore et végétation du Sahara*, Ed. CNRS, Paris, France.

Ould El hadj MD, Hadj-mahammed M, Zabeirrou H, ChehmaA (2003) Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional Est Algérien). *Annales de l'INRAT* 76 : 225-240.

PodlechD(2008) The genus *Astragalus* L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union. *Feddes Repertorium* 119: 310-387.

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

Rocha LD, Monteiro MC, Junger TA( 2012) Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acid-A Review. *Cancer and Clinical oncology* 1:

109-121.

Sahreen S, Rashid Khan M, Ali Khan R( 2010) Evaluation of Antioxidant Activities of Various Solvent Extracts of *Carissa opaca* Fruits. *Food Chemistry* 122: 1205-1211.

Salem MA, Farid MM, El-Shabrawy M, Mohammed R, Hussein SR, Marzouk MM(2020) Spectrometric analysis, chemical constituents and cytotoxic evaluation of *Astragalussieberi* DC. (Fabaceae). *Scientific African* :7,e00221.

Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B, (2019) Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*. 10:1-29

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1229: 152-178.

Silva EO, Batista R (2017) Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive reviews. In Food Science and Food Safety* 16: 580-616.

Soliman G, Abdel-rahman R, Al-saikhan F, Alankuş-çalışkan O, Alqasoumi S, YusufogluH(2013) Hepatoprotective activities of *Astragalus persicus* and *Astragalus tournefortii* ethanolic extracts against paracetamol induced liver damage in rats and their in vitro antioxidant effects. *FABAD. Journal of Pharmaceutical Sciences* 38: 1-9.

Sun B, Ricardo-da-Silva J M, Sprangerl(1998) Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 46: 4267-4274.

Sunil MA, Sunitha VS, Ashitha A, Neethu S, Midhun SJ, Radhakrishnan EK, Jyothism( 2019) Catechin Rich Butanol Fraction Extracted from *Acacia catechu* L. (a Thirst Quencher) Exhibits Immunostimulatory Potential. *Journal of Food and Drug Analysis* 27: 195-207.

Wang X, Li Y, Yang X, Yao J( 2013) *Astragalus* polysaccharide reduces inflammatory response by decreasing permeability of LPS-infected Caco2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 61: 347-352.

Wang HF, Yih KH, Yang CH (2017) Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis* 25:881-889.

Yildirim A, Mavi A, Kara AA(2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4083-4089.

Zhang D, Zhuang Y, Pan J, Wang H, Li H, Yu Y, Wang D (2012). Investigation of effects and mechanisms of total flavonoids of *Astragalus* and calycosin on human erythroleukemia cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Zong S, Ji J, Li J, Yang QH, Ye M( 2017) Physicochemical properties and anticoagulant activity of polyphenols derived from *Lachnumsingerianum*. *Journal of food and drug analysis* 25(4): 837-844.

Appendix 1: Antioxydant Activities

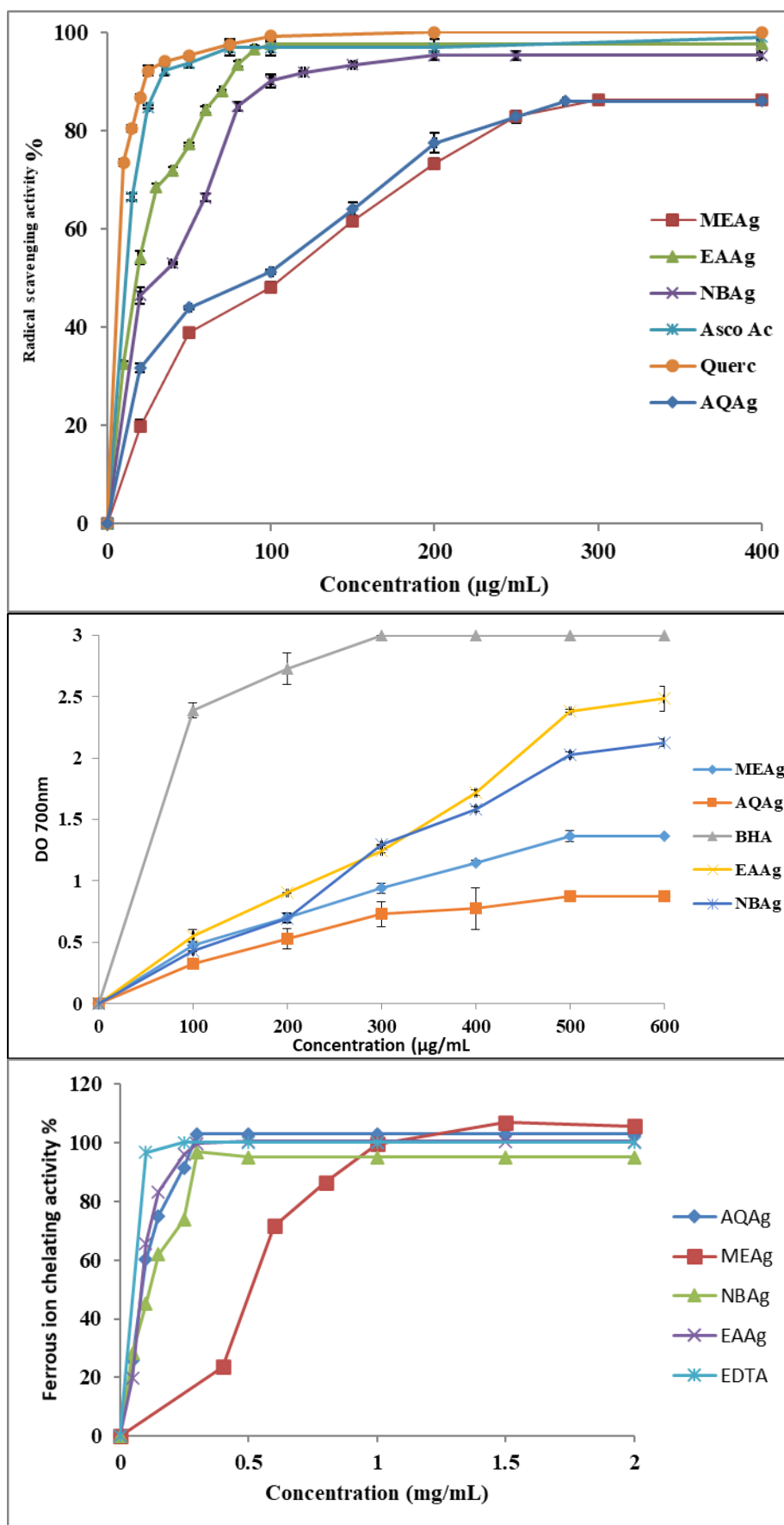


Figure 1: Screening of antioxidant activities of AEAg, MEAg extracts and EAAg and NBAg fractions from *A. gombo* aerial parts as function of their concentrations: (A) DPPH Free radical, (B) Reducing power assay, (C) metal chelating assay.