RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

Université de Toulouse

Doctorat de l'Université de Toulouse

délivré en co-tutelle avec Université de Tunis - El Manar

préparé à Toulouse INP

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

---

Thèse présentée et soutenue, le 30 juin 2023 par

Khouloud NAFTI

École doctorale
SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse

Spécialité
Sciences des Agroressources

Unité de recherche
LCA - Laboratoire de Chimie Agro-industrielle

Thèse dirigée par
Christine RAYNAUD et Sonia MARGHALI

Composition du jury
M. Chaker EL KALAMOUNI, Rapporteur, Université de la Réunion
M. Riadh KSOURI, Rapporteur, Centre de Biotechnologie de Borj Cedria
Mme OLFA MASMOUDI, Examinatrice, FST, Universitaire El-Manar
M. Nicolas FABRE, Examinateur, Université Paul Sabatier, UMR 152 PHARMADEV
Mme Christine RAYNAUD, Directrice de thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse
Mme Sonia MARGHALI, Co-directrice de thèse, Université Tunis Manar
Mme Geraldine GIACINTI, Co-encadrante de thèse, Institut polytechnique de Toulouse

Membres invités
M. Jalloul BOUAJILA, UPS
Mme Neilla Trifi, Université de Tunis El Manar

Papa chéri, mon cœur, cette thèse est le résultat de l'amour inconditionnel que tu m'as toujours prodigué. C'est le fruit de tes sacrifices inlassables et de tes encouragements constants. Le fait que tu ne sois pas à mes côtés est encore difficile à accepter. Je ne pourrai plus contempler ton regard bienveillant, rempli de fierté. Si je pouvais donner ma vie pour te revoir une seule fois de plus, je le ferais sans hésiter. Je t'aime tellement

Tables des matières

Chapitre 1 :

1 Les maladies neurodégénératives 26
2 La maladie d'Alzheimer 26
2.1 Historique 26
2.2 Physiopathologie 27
2.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire 28
2.2.2 Les plaques séniles 33
2.3 Les facteurs impliqués 33
2.3.1 Facteurs environnementaux 33
2.3.2 Facteurs génétiques 34
2.4 Impact socio-économique 35
2.5 Cascade amyloïde 35
2.5.1 Le peptide Aβ 36
2.5.1.1 Origine du peptide Aβ 36
2.5.1.2 Le peptide Aβ et son acheminent 38
2.5.1.3 Peptide Aβ et synapses 39
2.5.1.4 Toxicité du peptide Aβ 40
2.6 Facteurs de risque liés au vieillissement dans la maladie d'Alzheimer 44
2.7 Approche thérapeutique 44
2.7.1 La thérapie proposée par le marché pharmaceutique 44
2.7.1.1 Voie de l'inhibition de l'acétylcholinestérase 44
2.7.1.2 Voie de l'inhibition du système glutamatergique 45
2.7.2 Les solutions proposées par les chercheurs 46
2.8 La neuroprotection par les plantes 47
2.8.1 Cas d'*Astragalus hamosus* L. 49
2.9 Voies thérapeutiques des maladies neurodégénératives identifiées chez les Astragales 49
2.9.1 Modulation des voies de signalisation des neurotransmetteurs et des récepteurs. 49
2.9.2 Modulation des canaux ioniques 50
2.9.3 Clairance des agrégats de protéines 50
2.9.4 Réparation de la gaine de myéline 51
3 Cancer colorectal 52
3.1 Présentation 52
3.2 Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du cancer colorectal 52
3.3 Épidémiologie de la maladie 53
3.4 Étiologie 53
3.5 Cancer colorectal et phytothérapie par des Astragales 55
4 Astragalus hamosus L. 56
4.1 Présentation du genre *Astragalus* 56
4.2 Classification systématique de l'espèce 56
4.3 Description botanique d'*Astragalus hamosus* L. 56
4.4 Caryologie d'*Astragalus hamosus* L. 57

4.5 Métabolites secondaires d'*Astragalus hamosus* L. 58

5 Les molécules d'intérêt : Les saponines 58

5.1 Généralités : Chimie des saponines 58

5.1.1 Les cycloartanes : 61

5.1.2 Les Oléananes 61

5.1.2.1 Soyasaponine 62

5.1.2.1.1 Soyasaponines et cancer 62

5.1.2.1.2 Autres activités des Soyasaponines [131] 63

5.2 Rôles et activités biologiques des saponines 65

5.3 Techniques d'extraction des saponines conformément aux objectifs de recherche 66

5.3.1 Introduction 66

5.3.2 Techniques d'extraction conventionnelles 67

5.3.2.1 Extraction par Macération 67

5.3.2.2 Extractions à reflux et Soxhlet 67

5.3.2.3 Extraction SEBSQUENT (Extraction Séquentielle) 68

5.3.3 Technologies d'extraction vertes 68

5.3.3.1 L'extraction assistée par ultrasons 68

5.3.3.2 Extraction assistée par micro-ondes (MAE) 68

5.3.3.3 Extraction accélérée par solvant (ASE) 69

5.4 Techniques d'extraction des saponines chez des Astragales 71

5.5 Méthodes analytiques utilisées pour l'identification des saponines chez les astragales 72

6 Évaluation des extraits et criblage des saponines par HPTLC 75

6.1 Les étapes d'une HPTLC 75

6.1.1 Préparation des échantillons 75

6.1.2 Le dépôt 76

6.1.3 Le développement chromatographique 77

6.1.3.1 Les cuves 77

6.1.3.2 Modes de développement 79

6.1.4 La détection 81

6.1.4.1 Détection sans traitement chimique 81

6.1.4.2 Visualisation à UV 254 nm 81

6.1.4.3 Visualisation à UV 366 nm 82

6.1.4.4 Détection après traitement chimique ou dérivatisation 82

6.1.5 La documentation 82

6.1.5.1 Imagerie 82

6.1.5.2 La densitométrie 83

6.1.6 Avantages et inconvénients de HPTLC 84

7 Conclusion 84

Chapitre 2 :

1 Matériel végétal 86

1.1 Coordonnées GPS des lieux de collecte 86
1.2 Les spécimens *Astragalus hamosus* L. des quatre populations collectées 87

2 Détermination des taux d'extractibles 88
3 Détermination des taux de matière minérale des 4 populations d'Astragalus hamosus 88
4 Méthodes d'extractions développées pour l'évaluation de la présence de métabolites secondaires dans la plante. 89
4.1 Protocoles d'extraction pour le criblage des saponines :.....89
4.1.1 Description de la méthode d'extraction méthanolique M1.....89
4.1.2 Description du protocole d'extraction P1 :.....90
4.1.3 Description du protocole d'extraction P2 :.....90
4.1.4 Description du protocole d'extraction P3 :.....91
4.1.5 Description du Protocole d'extraction P4 :.....91
4.1.6 Récapitulatif des extraits obtenus par les différent protocoles M1 et P1 à P4 : 91

5 Évaluation des extraits obtenus par analyse HPTLC 93
5.1 Description des paramètres d'analyses HPTLC appliqués : 93
5.2 Séparation des molécules selon leurs polarités et révélation des triterpénoides par l'anisaldéhyde sulfurique 94
5.2.1 Analyses préliminaires pour la mise au point des conditions opératoires d'HPTLC et pour le criblage des saponines triterpénoides 94
5.2.1.1 Analyse HPTLC de BI-25-M1 obtenu par la méthode d'extraction M1 94
5.2.1.2 Analyse HPTLC des extraits SIL-M1, ZA-M1, KAI-M1, et BI-M1 en UV-vis avant dérivatisation à 366 nm et après dérivatisation à l'anisaldéhyde sulfurique.....95
5.2.1.3 Évaluation des volumes de dépôt des échantillons pour l'analyse HPTLC des extraits et sélection de standards 95
5.3 Révélation des triterpénoides et identification de l'Azukisaponine V à l'aide du système de développement multiple 2 (S2) 96
5.3.1 Mise en œuvre de l'analyse HPTLC des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3, P4 et M1 avec le système de développement multiple S2.....96
5.3.2 Optimisation de l'HPTLC de l'extrait ZA obtenu par les différents protocoles d'extraction 97
5.3.3 Identification des saponines dans les extraits BI-P1, SIL-P1, ZAI-P1 et KAI-P1 et suivant le système de développement S2.....97
5.3.4 Identification des saponines dans les extraits BI-P4, SIL-P4, ZAI-P4 et KAI-P4 et suivant le système de développement S2.....97

6 Analyse par spectrométrie de masse trappe d'ions en mode ESI-(SM, SM^2) 97
7 Analyse par couplage HPTLC-SM/UV-vis 98
8 HPTLC préparative pour BI-300 mg -M1 98
9 Analyse quantitative des saponines 99
9.1 Dosage colorimétrique.....99
9.1.1 Limite du dosage colorimétrique des saponines.....99
9.2 Dosage de Soyasapogenol par densitométrie pour ZA-P3 100

10 Criblage des saponines par spectrométrie infrarouge IRTF 100

11 Dosage des polyphénols ***101***
12 Évaluation de l'activité antiradicalaire ***101***
13 Evaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits d'A. hamosus L ***102***
13.1 Évaluation de l'activité anti- acétylcholinestérase 102
13.1.1 Évaluation qualitative par HPTLC-bio autographie de l'activité anti-cholinestérase 102
13.1.2 Évaluation quantitative par dosage spectrométrique de l'activité anti-cholinestérase 102
13.2 Évaluation de la neuroprotection des extraits d'*Astragalus hamosus* L. contre la toxicité du peptide Aβ 103
13.2.1 Culture des cellules PC12 : 103
13.2.2 Entretien des cellules PC12 104
13.2.3 Préparation de la solution de collagène 105
13.2.4 Préparation du peptide Aβ 105
13.2.5 Conditions expérimentales : 105
13.2.6 Principe du test de viabilité et de neuroprotection 106
13.2.7 Révélation 106
14 Évaluation de l'activité anticancéreuse : ***107***
14.1 Culture des cellules HEK293 et CACO-2 107
14.2 Entretien des cellules HEK293 et CACO-2 107
14.3 Conditions expérimentales 107
14.4 Principe du test de cytotoxicité 108
14.5 Révélation 108

Chapitre 3:

1 Caractérisation de la matière végétale Astragalus hamosus ***111***
1.1 Détermination des taux d'extractibles 111
1.2 Détermination des taux de matières minérales des 4 populations d'*Astragalus hamosus* 111
2 Criblage des saponines d'Astragalus hamosus L. ***111***
2.1 Introduction 112
2.2 Matériel et Méthodes 114
2.2.1 Localisation, collecte et conservation des échantillons de plantes 114
2.2.2 Protocoles d'extraction 115
2.2.3 Équipement de chromatographie en couche mince à haute performance (HPTLC) et procédure générale 117
2.2.4 Hydrolyse des extraits par le chlorure d'acétyle 119
2.2.5 Quantification du Soyasapogenol dans les extraits pour densitométrie 119
2.2.5.1 Quantification du Sayasapogenol par spectrophotométrie 119
2.2.5.2 Quantification du Sayasapogenol pour la densitométrie 120
2.3 Resultats et Discussion 120
2.3.1 Extraction des composés d'*Astragalus hamosus* 120
2.3.2 Évaluation préliminaire de l'abondance des métabolites secondaires pour le screening des saponines triterpenoides par HPTLC 121
2.3.2.1 **Optimisation de la purification de la fraction saponine d'*Astragalus hamosus* 122**

2.3.3 Optimisation des systèmes d'élution 126
2.3.3.1 Mise en évidence des triterpénoïdes et détection préliminaire de la soyasaponine à l'aide du système de développement multiple (S2) 126
2.3.3.2 Tentative d'identification des saponines triterpenoïdes dans les populations d'*A. hamosus* de Bizerte, Siliana and Kairouan 129
2.3.4 Hydrolyse des extraits de saponine d'*A. hamosus* 130
2.3.5 Quantification du Soyasapogenol 131
2.3.5.1 Quantification de l'extrait ZA-P3 131
2.3.5.2 Quantification des extraits des 4 populations par spectrophotométrie 132
2.4 Conclusion 133

3 Analyses des extraits d'Astragalus hamosus L. par spectrométrie de masse 133
3.1 Analyse de BI-25-M1 et BI-300-M1 par HPLC-SM^2 134
3.2 Analyse des extraits de Zaghouan par spectromètre de masse en mode ESI^- 135
3.3 Couplage HPTLC - Spectrométrie de masse MSn et UPLC Q-TOF MS 137
3.4 Evaluation de la teneur en polyphénols totaux 145
3.5 Concluions du chapitre: 146

Chapitre 4:

1 Évaluation de l'activité antiradicalaire 149
1.1 Cas des fractions ZA-P1, KAI-P1, BI-P1 et KAI-P1 149
1.2 Cas des fractions ZA-P4, KAI-P4, BI-P4 et KAI-P4 150

2 Activité anti-acétylcholinestérase 151
2.1 Évaluation de l'activité anti-AchE par HPTLC-Biautographie 151
2.2 Évaluation de l'activité anti-Ache par la méthode d'Ellman 151
2.2.1 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la galanthamine 151
2.2.2 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par les 4 Population SI, BI, ZA et KAI 152
2.2.3 Évaluation de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par la soyasaponine et Soyasapogénol B 153

3 Évaluation de la Neuroprotection 153
3.1 Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sur la viabilité des cellules PC12 : 153
3.2 Évaluation des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 sur la viabilité des cellules PC12 154
3.3 Évaluation des extraits obtenus par le protocole P3 d'extraction sur la viabilité des cellules PC12 155
3.4 Évaluation des extraits obtenus par le protocole P4 sur la viabilité des cellules PC12 156
3.5 Évaluation des extraits obtenus par le protocole M1 sur la viabilité des cellules PC12 157
3.6 Évaluation de l'effet du soyasapogénol sur la viabilité des cellules PC12 157
3.7 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 158

3.8 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 159
3.9 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P3 159
3.10 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction P4 160
3.11 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits obtenus par le protocole d'extraction M1 161
3.12 Évaluation de l'effet neuroprotecteur de l'aglycone Soyasapogénol B.....161

4 Évaluation de l'effet cytotoxique sur la lignée CACO-2..... 162

4.1 La lignée CACO-2.....164
4.2 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur Caco-2.....164
4.3 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur Caco-2.....165
4.4 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur Caco-2.....165
4.5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur Caco-2.....166
4.6 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur Caco-2 167
4.7 Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B 167

5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits sur la lignée HEK293 168

5.1 La lignée HEK293 168
5.2 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P1 sur HEK293 168
5.3 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P2 sur HEK293 169
5.4 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P3 sur HEK293 169
5.5 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits P4 sur HEK293 170
5.6 Évaluation de l'effet cytotoxique des extraits M1 sur HEK293.....170
5.7 Évaluation de l'effet cytotoxique de l'aglycone Soyasapogénol B sur HEK293.....171

6 Discussion : 171

6.1 Évaluation de la neuroprotection.....171
6.2 Évaluation de la cytotoxicité 172

7 Conclusion: 173

.....200

Liste des abréviations

Aβ : Peptide β-amyloïde

ACHe : Acétylcholinestérase

AChI : Acétylcholine

AChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine

AMPA : Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

APS : Polysaccharides d'astragale

AR : Récepteur de l'adénosine

ASE : Extraction accélérée par solvant

AS-VI : Astragaloside VI

AR : Récepteur de l'adénosine

AST : "Amyloidosis Suppression Therapy" (Thérapie de suppression de l'amyloïdose)

APOE : Apolipoprotéine E

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

BACE : Enzyme de clivage APP du site bêta

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BDPP : Préparation diététique de polyphénols bioactifs

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BPA : Bisphénol A

BChE : Butyrylcholinestérase

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI50 : Concentration correspondant à 50 % d'inhibition de la réaction par l'échantillon à analyser

COX-2 : Cyclooxygénase-2

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DNF : Dégénérescence neurofibrillaire

DPBS : Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS)

DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl

ELL : Extraction liquide-liquide

EtOAc : Acétate d'éthyle

EtOH : Éthanol

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

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

HSV-1 : Herpes simplex virus 1

INOS : Inductible NO synthase

KAI : Kairouan

LCR : Liquide céphalo-rachidien

M1 : Méthode 1

MA : Maladie d'Alzheimer

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

MCP-1 : Protéine chimio-attractive de monocytes

MAPT : Protéine Tau associée aux microtubules

MAO-B : Monoamine oxydase B

MeOH : Méthanol
Mg EAG.g-1 MS : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche
MTC : Médecine Traditionnelle Chinoise
M1 : Méthode d'extraction M1
nAChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NFT : Enchevêtrement neurofibrillaire
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : Monoxyde d'azote
P1, P2, P3, P4 : Protocoles 1, 2, 3 et 4
PFC : Cortex Préfrontal
PKC : Protéine kinase C
PS1 : Préséniline 1
PS2 : Préséniline 2
RF : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SEP : Sclérose en plaques
SM : Spectrométrie de masse
SIL : Siliana
TH : Tyrosine hydroxylase
TNF-α : Facteur de nécrose tumorale alpha
UHPLC : Ultra High Performance Liquide Chromatography
UV : Ultraviolet
ZA : Zaghouan
5-HT : 5-Hydroxytryptamine (récepteurs de la sérotonine)

Liste des figures

Figure 1: Observation des lésions anatomopathologiques caractéristiques de la MA [6]. ... 27
Figure 2: Mise en évidence des deux marqueurs ... 27
Figure 3: Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires.29
Figure 4: Illustration de l'agrégation d'amyloïde Aβ. Protéines natives incorrectement repliées mènent à la formation de protofibrilles puis finalement à des fibrilles matures qui se retrouvent dans les plaques amyloïdes Image produite par Sara Licea, , Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de (Perl, 2010); « Aβ » : bêta amyloïde. ... 33
Figure 5 : Hypothèse de la cascade amyloïde [36] ... 37
Figure 6: Les deux voies métaboliques principales de APP : la voie amyloïdogénique qui conduit à la production et à la sécrétion du peptide physiologique Abêta, suite à l'action de deux secrétases (BACE1 et la gamma secrétase) et la voie non-amyloïdogénique suite à une coupure de l'alpha secrétase au milieu de Abêta. Dans la maladie d'Alzheimer, on observe une agrégation de Abêta sous forme de plaques qui s'accumulent dans la substance grise corticale [37]. ... 38
Figure 7: Structure de l'Astragaloside IV ... 48
Figure 8: Structure de la rhamnocitrine 4'-β-D-galactopyranoside [71] ... 49
Figure 9: Mécanismes sous-jacents aux effets des saponines et de l'AS-IV sur le dysfonctionnement cognitif. Ils atténuent l'agrégation de la protéine β-amyloïde (Aβ) et la tauopathie (Tau), modulent les anomalies cholinergiques et autres anomalies des neurotransmetteurs, protègent contre l'apoptose neuronale [83] ... 50
Figure 10: Les parties touchées dans le cancer colorectale : Société Française d'Endoscopie Digestive ... 52
Figure 11: Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale saine à l'adénocarcinome invasif. Les interactions étroites ("cross-talk") entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale de l'hôte, contribuent au maintien de l'inflammation chronique au niveau de la zone tumorale et au développement des différentes étapes anatomocliniques de la carcinogénèse du CCR. D'après Brennan et Garrett, 2016 [89]. ... 53
Figure 12: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique [93] ... 54
Figure 13: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire [93] ... 55
Figure 14: Astragalus hamosus L. : partie aérienne [101] ... 57
Figure 15 : Microphotographies des chromosomes de A. hamosus : 2n = 44. a ; métaphase somatique ;b, c – ponts chromosomiques de la télophase. ... 58
Figure 16: Classification des saponines ... 59
Figure 17: Structure des saponines [120] ... 60
Figure 18: Structures des Astragalosides I et II, Isoastragalosides I et II [121] ... 60
Figure 19: Formule chimique des cycloartanes [127] ... 61
Figure 20: Appareil SOXHLET [180] ... 68
Figure 21: Techniques d'extractions actuelles utilisées pour l'extraction des saponines à partir de matières végétales [170] ... 70
Figure 22 : Étapes d'une Analyse HPTLC ... 75

Figure 23: Schémas des différents modes d'application. A : remplissage de la seringue/capillaire et application manuels ; B : remplissage manuel et application automatisée ; C : remplissage de la seringue et application automatisés [237] *76*
Figure 24: Schéma d'une application par contact (A) ou par vaporisation (B). *76*
Figure 25: Exemple de dépôt *77*
Figure 26: Présentation et fonctionnement d'une cuve à fond plat. *77*
Figure 27: Exemples d'utilisation d'une cuve à double fond [237] *78*
Figure 28: Schéma d'une cuve horizontale *78*
Figure 29: Résultat d'une utilisation des deux côtés d'une cuve horizontale *78*
Figure 30: Préparation de la phase stationnaire/développement possible avec 6 phases mobiles différentes *79*
Figure 31: Schéma des différents modes de développement chromatographique. A : linéaire ; B : circulaire (centrifuge); C : circulaire (centripète) [237]. *79*
Figure 32: Les développements multiples peuvent être réalisés automatiquement à l'aide d'un instrument spécifique. Dans ce cas, la plaque est développée de façon répétée dans la même direction. Chaque élution utilise un solvant de migration de force éluante plus plusieurs migrations successives avec une phase mobile identique [244]. *80*
Figure 33: Fonctionnement du développement multiple automatisé (AMD) *80*
Figure 34: Schémas des développements multidimensionnels *81*
Figure 35: Schéma de l'utilisation du mode « sandwich ». A : vue de profil ; B : vue de face *81*
Figure 36: Exemple des Profil HPTLC pris sous lumière blanche, sous UV à 366 et 254 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche à 366 nm après dérivatisation (successivement) *83*
Figure 37: Carte de la Tunisie *86*
Figure 38: Spécimens Bizerte (a) et Siliana (b) *87*
Figure 39: Spécimens Zaghouan (c) et Kairouan (d) *87*
Figure 40: Système Tecator Fibertec M1017 ..... *88*
Figure 41: Schéma simplifié de l'extraction méthanolique solide liquide selon la méthode M1 *89*
Figure 42: Schéma simplifié du protocole d'extraction P1 pour les 4 populations, Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan *90*
Figure 43: Schéma simplifié du protocole d'extraction P2 pour la population Zaghouan *90*
Figure 44: Schéma simplifié du protocole d'extraction P3 pour la population Zaghouan *91*
Figure 45: Schéma simplifié du protocole d'extraction P4 pour la population Zaghouan *91*
Figure 46: Extraits de Bizerte obtenus selon M1 ..... *92*
Figure 47: Extraits des 4 populations Siliana, Bizerte, Zaghouan et Kairouan, obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4. ..... *92*
Figure 48: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 de l'extrait de Bizerte (25 mg)(a) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), senégnine (Piste 3), et digitonine (Piste 4) et de de Bizerte (300 mg). Système d'élution S1. ..... *95*
Figure 49: Profil HPTLC des 4 extraits de Zaghouan obtenus selon P1 (piste1), P2 (piste 2), P3 (piste 3)et P4 (piste 4)en triplicata (4, 6 et 10 µL successivement pour une isocencentration de 5 g/L), ainsi que les standards, solanine (piste 5), (piste 6), digitonine (piste 7), glucose-fructose

(piste 8) et l'acide oléanolique (piste 9) avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (b) sous lumière blanche. 96
Figure 50: Spectromètre de masse trappe d'ions 98
Figure 51: : Interface CAMAG pour couplage HPTLC-SM 98
Figure 52: Courbe d'étalonnage de Soyasapogénol 99
Figure 53: Courbe d'étalonnage du Soyasapogenol en fonction des aires des pics à 500 nm100
Figure 54: Courbe d'étalonnage d'acide gallique 101
Figure 55: Courbe CI50 du TROLOX 102
Figure 56 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman 103
Figure 57 : Microscope droit 104
Figure 58 : Lignée cellulaire PC12 de la médullo-surrénale de rat après 10 jours d'incubation 104
Figure 59 : Mise en place du test de neuroprotection 106
Figure 60 : Schéma des plaques pour tester la viabilité et la neuroprotection 106
Figure 61: Réduction de l'anneau de tétrazolium en formazan de couleur violette en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale 107
Figure 62: Détermination des taux d'extractibles à l'éthanol et à l'eau des 4 populations .. 111
Figure 63: Taux de matière minérale 111
Figure 64: Article publié dans Molecules (Nafti et al., 2022). 112
Figure 65 : Schémas des protocoles d'extraction de P1 à P4. Une délipidation préliminaire a été réalisée avec de l'hexane dans les protocoles P2 et P4 116
Figure 66: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 de l'extrait de Bizerte (25 mg) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), senégnine (Piste 3), et digitonine (Piste 4). Système d'élution S1 121
Figure 67: Profils HPTLC des 4 extraits des 4 populations obtenus selon la méthode d'extraction M1 ainsi que les standards pris avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 sous lumière blanche (b) selon le système d'élution S1.. Piste 1 (Bizerte, Piste 2 (Kairouan), Piste 3 (Zaghouan), Piste 4 (Siliana), Piste 5 (Solanine), Piste 6 (senégnine) et Piste 7 (digitonine), Piste 8 (glucose-fructose), Piste 9 (acide oléanolique). 122
Figure 68 : Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation (a) et après révélation à l'anisaldehyde-H2SO4 (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 1), P2 (piste 2), P3(piste 3), P4 (piste 4) et selon le M1 (piste 5), ainsi que des standards, Piste 6 (Solanine), Piste 7 (senégnine) et Piste 8 (digitonine), piste 9 (glucose-fructose), piste 10 (acide oléanolique). 123
Figure 69: Densitogramme des extraits de Zaghouan (Pistes 1–5) et les standards (Pistes 6–10): solanine (Piste 6), senegenine (Piste 7), digitonine (Piste 8), glucose-fructose (Piste 9), et acide oléanolique (Piste 10) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldéhyde 123
Figure 70 : Densitogrammes de l'acide oléanolique (A), de la sénégénine (B), de la solanine (C), de la digitonine (D) et du glucose-fructose (E) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 125
Figure 71 : Densitogrammes des extraits de Zaghoun obtenus avec les protocols d'extraction P1 (1), P2 (2), P3 (3), P4 (4) et M1 (5) à 600 nm après revelation avec l'anisaldehyde-H2SO4126
Figure 72: Structure de l'Azukisaponine V 127

Figure 73: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapogenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Senégnine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), aux trois étapes du système d'élution multiple SS1, SS2 et SS3 128

Figure 74: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 (b) des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapogenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Sénégénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), selon le système d'élution S2)..... 128

Figure 75: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation sous UV (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 successivement (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon la méthode M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapogenol (piste 6), et soyasaponine (piste 7), selon le système d'élution S2..... 129

Figure 76: c) Densitogramme de soyasaponine à 600 nm au RF= 0.2 et (d) densitogramme de soyasapogenol au RF 0,95 suivant le système d'élution S2..... 129

Figure 77: Profil HPTLC obtenu avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 (b), des 4 populations : Zaghouan (piste 1), Siliana (piste 2), Bizerte (piste 3) et Kairouan (piste 4) selon P1 ainsi que les standards, Soyasaponine (piste 5), et Soyasapgenol (piste 6) selon le système d'élution S2..... 130

Figure 78: : Profil HPTLC obtenu après révélation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 en utilisant le système SS2. Phases chloroforme du standard de sojasaponine hydrolysé (Piste 1) et de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (Pistes 2 et 3) et de l'extrait de Zaghouan-P3 non hydrolysé (Piste 4). 131

Figure 79: : Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde- H2SO4 de Soyasapogenol (piste 1-2 µg),(piste 2-1 µg),(piste 3-0.5 µg),(piste 4-0.25 µg),(piste 5-0.125 µg),(piste 6-0.625 µg),phase chloroforme ZA-P3(piste 7-8),ZA-P3 (piste 9), Soyasaponine (piste 10), Glu-fru (piste 11) selon le système d'élution S2..... 132

Figure 80: Densitogrammes du soyasapogénol obtenus à 6 concentrations différentes après révélation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 et développement SS2, qui ont servi à calculer la courbe d'étalonnage 132

Figure 81: Histogramme de quantité de saponines dans les extraits SIL-P1, ZA-P1, BI-P1 et KAI-P1 133

Figure 82: Formule chimique de la saponine soyasaponine I et de son aglycone et soyasapogenol. 134

Figure 83: Chromatogramme TIC (Total Ionic Current) de l'extrait BI-300 mg-M1. 135

Figure 84: Spectre SM2 (ESI-) de l'ion m/z 941,88 de l'extrait de ZA-P1..... 136

Figure 85: Spectre SM2 (ESI-) de l'ion m/z 942,32 de l'extrait de ZA-P2..... 136

Figure 86: Hypothèse de fragmentation de la saponine azukisaponine dans les extraits de Zaghouan obtenus par le protocole P4 (Spectre SM2 (ESI^-) de l'ion m/z 942,02. 137

Figure 87: Principe du couplage HPTLC-SMn. Transfert direct du spot vers le spectromètre de masse ou bien récupération de la silice suivie d'une extraction méthanolique avant injection HPLC-MS. *138*
Figure 88: : Spectres de masse en mode ESI + de Soyasaponine (a), Soyasapogenol (b), ZA-P1 (c), ZA-P2 (d) et ZA-P4 (e). *138*
Figure 89: Zone chromatographique Rf=0,2 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF). *140*
Figure 90: Zone chromatographique Rf=0,8 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) (spot d'hydrolyse). *141*
Figure 91: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (zoom à m/z=459). *142*
Figure 92: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (m/z =50 à m/z=550). *143*
Figure 93: Standard Soyasaponine ESI MS NEG (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 5 000. ..... *143*
Figure 94: : Standard Soyasaponine ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) comparatif facteurs de dilution 5 000 et 1 000. ..... *144*
Figure 95: Quantité des polyphénols totaux dans les extraits d'Astragalus hamosus L. obtenus selon P1, P4 et M1 en mg EAG.g-1 MS *145*
Figure 96: Première voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par inhibition de l'AchE *148*
Figure 97: : Deuxième voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par neutralisation du peptide Aβ. *149*
Figure 98: Activité anti radicalaire des 4 populations obtenus selon P1, exprimée en CI50 en µg/m/L *149*
Figure 99: Activités anti radicalaires des SIL-P4, ZA-P4, BI-P4 et KAI-P4 exprimées en CI50 en µg/m/L *151*
Figure 100: Dépistage de l'inhibition de l'AChE par HPTLC-Biautographie des extraits SIL-P1 (piste), BI-P1 (piste 2), ZA-P1(piste 3) et KAI-P1(piste 4), ainsi que la soyasapogenol B (piste 5) et la soya saponine B (piste 6). *151*
Figure 101: Diminution de la CI50 de la galanthamine en fonction du temps *152*
Figure 102: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par les 4 extraits, Siliana, Bizerte, Kairouan et Zaghouan selon P1 (bleue) et selon P4 (orange) à 168 secondes de la réaction d'Ellman *152*
Figure 103: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par la Soyasaponine et le Soyasapogénol B *153*
Figure 104: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des différentes fractions Butanol obtenues par le protocole d'extraction P1 pour les 4 populations à différentes concentrations (n=9) *154*
Figure 105: : Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des deux fractions ZA-P2 (butanol) et ZA-P2-HEX (hexane), obtenues au cours du procédé d'extraction P2, à différentes concentrations (n=9). *155*

Figure 106: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions butanol de KAI-P3, SIL-P3, ZA-P3 et BI-P3 (n=9) *156*
Figure 107: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence des fractions obtenues par P4 (n=9) *157*
Figure 108 :Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions obtenus par M1(n=9) *157*
Figure 109: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B (n=9). *158*
Figure 110: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence des extraits P1(n=9) et du peptide Aβ. Différence significative de neuroprotection pour les concentrations 5 µg/mL et 1 µg/mL (p< 0,05) pour ZA-P1 ..... *159*
Figure 111: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9)). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentration 5 et 1 µg/mL. *159*
Figure 112: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité de PC12 en présence des extraits P3 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentrations 5 et 1 µg/mL..... *160*
Figure 113: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits issus du protocole d'extraction P4 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentration 5 et 1 µg/mL. *161*
Figure 114: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus avec le protocole d'extraction M1 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9) *161*
Figure 115: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité de PC12 en présence du Soyasapogénol B et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentrations 5 et 1 µg/mL. *162*
Figure 116 : Le nombre de saponines tritérpeniques testées en tant qu'agents cytotoxiques et le nombre de rapports publiés dans la période couverte 2009/2021[309]. *163*
Figure 117:Début de confluence des cellules Caco-2après 15 jours de culture *164*
Figure 118 : Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P1 (n=9) *165*
Figure 119: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P1 (n=9) *165*
Figure 120: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P3 ..... *166*
Figure 121: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P4 (n=9) *167*
Figure 122: Histogramme de représentation des CI50 des cellules Caco-2 par les extraits M1(n=9) *167*
Figure 123:Histogramme représentant l'CI50 des cellules Caco-2 de l'aglycone Soyasapogénol B (n=9) *168*
Figure 124:Confluence des cellules HEK293 après une semaine de culture (n=9)..... *168*

Figure 125: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les extraits P1 (n=9) *169*
Figure 126: Histogramme représentant la CI50 des cellules HEK293 par la fraction ZA-P2 et les pourcentages d'inhibition de la fraction ZA-P2/HEX (n=9) *169*
Figure 127: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P3 (n=9) *170*
Figure 128:Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P4 (n=9) *170*
Figure 129: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions M1 (n=9) *171*
Figure 130: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par le Soyasapogénol B (n=9) *171*

Listes des tableaux

Tableau 1: Agents anti-Tau pour le traitement de la MA dans les essais cliniques (ABADA, 2022) *30*

Tableau 2: Vaccins et anticorps monoclonaux anti-amyloïdes pour le traitement de la MA dans les essais cliniques *42*

Tableau 3: Classification d'Astragalus hamosus..... *56*

Tableau 4: Exemples d'activités d'extraits et de métabolites d'Astragalus hamosus..... *58*

Tableau 5: Tableau récapitulatif des effets des soyasaponines sur le cancer *63*

Tableau 6: Activités biologiques des soyasaponines *63*

Tableau 7: Choix de techniques d'extraction selon l'objectif scientifique *71*

Tableau 8: Techniques d'extraction des saponines chez les Astragales *72*

Tableau 9: Exemples de techniques d'analyses utilisées et d'activités biologiques étudiées chez le genre Astragalus *73*

Tableau 10: Exemple de révélateurs utilisés en HPTLC, leurs composés cibles et leurs colorations obtenues...... *82*

Tableau 11: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de l'utilisation de l'HPTLC84

Tableau 12: Les extraits obtenus selon la méthode d'extraction M1 et leurs utilisations dans les analyses ultérieures..... *90*

Tableau 13: Fractions obtenues aux différentes phases d'extraction des protocoles P1, P2, P3 et P4. ..... *93*

Tableau 14: Résultats du rendement d'extraction par rapport à la matière sèche pour les protocoles M1, P1, P2, P3 et P4. ..... *120*

.Tableau 15: Composés détectés dans BI-300mg-M1 ..... *135*

Tableau 16: Analyse des extraits d'Astragalus hamosus L. de la population de Zaghouan par spectrométrie de masse MSn en mode ESI négatif...... *135*

Tableau 18: Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition des extraits d'Astragalus hamosus L. sur les lignées Caco-2 et HEK293 ..... *174*

Tableau 19: Tableau récapitulatif des pourcentages de variabilité et de neuroprotection des PC12 en présence des extraits et de Aβ 5 µM..... *175*

Remerciements

Par ces quelques lignes, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé, de près et de loin, à l'aboutissement de mon projet de thèse :

Mme Christine RAYNAUD, Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre rôle exceptionnel en tant que directrice de ma thèse. Votre nature humaine, votre professionnalisme, ainsi que votre confiance et votre soutien indéfectibles ont été des éléments cruciaux dans la réussite de mon projet de recherche. Votre humanité et votre capacité à comprendre mes préoccupations, mes doutes et mes aspirations ont créé un environnement de travail empreint d'empathie et de respect mutuel. Je tiens également à exprimer ma gratitude pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé.
Votre professionnalisme exemplaire a été une source d'inspiration pour moi. Votre expertise dans votre domaine, votre rigueur méthodologique et votre engagement envers l'excellence ont été des références solides sur lesquelles j'ai pu m'appuyer. Vos conseils éclairés et vos critiques constructives ont grandement contribué à l'amélioration de ma recherche. Votre soutien constant tout au long de ma thèse a été d'une importance capitale. Vous avez été présente à chaque étape, guidant mes réflexions, m'encourageant à persévérer et me fournissant les ressources nécessaires pour mener à bien mes recherches. Votre dévouement et votre implication ont été une source d'inspiration pour moi et ont renforcé ma détermination.
Je tiens à vous remercier du fond du cœur pour votre humanité, votre professionnalisme, votre confiance et votre soutien tout au long de ma thèse. Vous avez été bien plus qu'une directrice, vous avez été une mentore exceptionnelle qui a façonné ma trajectoire académique et professionnelle. Je suis reconnaissante pour votre soutien exceptionnel surtout lors de la correction des articles, la rédaction du manuscrit de thèse et la préparation de l'oral. Je garderai toujours un souvenir précieux de l'impact positif que vous avez eu sur ma vie. Je suis honorée d'avoir eu la chance de travailler avec vous et je suis reconnaissante de vous avoir eu comme guide et modèle.

Mme Sonia MARGHALI, Je tiens à prendre un moment pour vous exprimer ma profonde gratitude pour votre rôle déterminant dans ma formation. En tant que ma directrice en master, vous avez été celle qui m'a fait découvrir la plante sur laquelle je travaille aujourd'hui. Je me souviens de votre engagement à m'inspirer et à m'encourager à explorer les différentes facettes de la recherche. Votre confiance en mes capacités a été un moteur pour prendre le risque et partir et aller plus loin dans les recherches.
Même si vous n'étiez pas physiquement présente lors de ma thèse, votre influence a continué à se faire sentir. Votre encouragement à chercher une collaboration et à élargir mes horizons de recherche a été un tournant décisif dans mon parcours académique. Votre soutien inconditionnel et votre confiance en mes compétences ont été une force motrice qui m'a aidé à persévérer face aux défis rencontrés.

Prendre la décision de faire une thèse en chimie après un long parcours en biologie moléculaire n'a jamais été une décision facile, mais je l'ai prise en sachant que vous étiez un pilier essentiel dans ce choix.
Je vous remercie pour vos encouragements lors de la rédaction de ma thèse et la préparation de l'oral.
Je tiens à exprimer ma sincère gratitude pour votre contribution à mon projet de recherche, malgré les problèmes de santé auxquels vous avez dû faire face.
Je tiens également à vous remercier d'avoir facilité les problèmes administratifs en Tunisie liés à mon projet de recherche. Votre soutien et votre assistance dans ces démarches ont été d'une aide précieuse et je suis reconnaissante de la façon dont vous avez allégé le processus pour moi.

Ma chère Géraldine, Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre rôle essentiel en tant qu'encadrante de ma thèse. Votre accompagnement précieux lors de mes manipulations a été d'une importance capitale pour mon développement en tant que chercheure.
Je suis reconnaissante de votre patience, de votre expertise et de votre dévouement à m'enseigner les fondamentaux de la chimie. Votre capacité à simplifier des concepts complexes et à les rendre accessibles a été une source d'inspiration pour moi. Grâce à vos explications claires et à vos démonstrations pratiques, j'ai pu acquérir les compétences nécessaires pour mener à bien mes manipulations en toute confiance.
Votre présence constante à mes côtés lors de mes manipulations a été d'une valeur inestimable. Votre accompagnement attentif, vos conseils éclairés et votre soutien m'ont permis de progresser dans mes expérimentations avec assurance. Votre disponibilité pour répondre à mes questions et résoudre les difficultés rencontrées a été un soutien précieux tout au long de ma thèse.
Merci d'être la même quand vous étiez malade. Je n'oublierai jamais vos beaux gestes et votre implication dans ma thèse. Merci d'avoir un cœur si généreux.

Mr Jalloul BOUAJILA, Je suis profondément reconnaissante de l'opportunité d'avoir travaillé sous votre direction et de bénéficier de votre encadrement. Votre influence a contribué de manière significative à l'avancement de ma thèse.

Mr Riadh ELKSOURI et Mr Chaker el KALAMOUNI, Je suis reconnaissante de l'attention que vous avez portée à ma thèse, ainsi que des commentaires constructifs et des suggestions que vous avez formulés.
Je suis consciente du temps et de l'énergie que vous avez investie dans cette évaluation et je vous suis profondément reconnaissante pour votre engagement et votre précieuse contribution à ma thèse.

Mr Nicolas FABRE et Mme OLfa MASMOUDI, je tiens à vous remercier anticipativement pour l'attention que vous porterez à mon travail, ainsi que pour vos

futurs commentaires constructifs. Votre évaluation objective et éclairée sera d'une importance capitale pour l'évolution de ma recherche.
Je suis honorée d'avoir la chance de soumettre mon travail à votre examen et je suis reconnaissante de votre rôle dans ce processus.

Mme Neila TRIFI, je vous adresse mes sincères remerciements pour votre rôle essentiel en tant que directrice du laboratoire et de l'école doctorale, ainsi que pour votre présence et votre soutien lors de ma soutenance de thèse. Votre confiance en moi, vos encouragements constants et votre aide précieuse pour faciliter les procédures administratives ont été d'une valeur inestimable tout au long de mon parcours de recherche.
Je suis honorée de savoir que vous serez présente en tant qu'invitée à ma soutenance. Votre présence témoigne de votre intérêt pour mon travail et de votre engagement envers la réussite de vos étudiants. Je suis reconnaissante de l'opportunité de pouvoir présenter mes travaux devant vous et de bénéficier de votre expertise lors de cette étape importante de ma thèse. Merci à tout le personnel du LCA pour maintenir une ambiance aussi détendue.

Un remerciement spécial à **Mme Valérie SIMON.** Vous étiez un rayon de soleil au laboratoire, merci pour votre sourire et votre gentillesse. Merci de m'avoir acceptée dans vos cours.

Merci à mes collègues doctorants, merci en particulier à ceux qui ont partagé mon bureau : Doua, Rozen, Leticia, Julia et Mohamed. Merci pour votre bonne humeur et les bons moments partagés.
Merci à mes collègues du LGC pour l'ambiance extraordinaire au laboratoire, Jawher, Amal, Yosra…Vous étiez formidables !

Enfin et surtout, je souhaiterais exprimer ma gratitude envers ma famille, mon pilier. À travers ces mots, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon mari. Tu as été bien plus qu'un simple conjoint aimant, tu as été mon soutien inébranlable. Ton amour et tes encouragements ont été des piliers indispensables qui m'ont permis de surmonter chaque obstacle sur cette voie.
Lorsque la vie a été marquée par la douloureuse perte de mon père, tu as pris le relais avec une force et une détermination admirables. Tu as pris soin de moi, soutenu mes rêves et veillé à ce que je puisse continuer à avancer malgré le chagrin qui nous enveloppait. Maman, que dire de la vie sans toi ? Tous les mots du monde, dans toutes les langues, ne peuvent décrire ce que tu es pour moi.
Ma sœur, la prunelle de mes yeux et mon frère, j'ai de la chance de vous avoir et de voir à quel point vous êtes fiers de moi. Je vous aime de tout mon cœur.

Introduction générale

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

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

Dans ce cadre, nous nous sommes interessés à une plante *Astragalus hamosus* L. appartenant à la famille des fabaceae en Tunsie dont les effets biologiques sont encore peu connus par rapport à d'autres espèces du même genre telles que *Astragalus gombo, Astragalus membranaceus ou Astragalus radix, Astragalus polaris.*

Ces dernières années, les espèces du genre *Astragalus* ont fait l'objet d'avancées scientifiques notables en raison de leur teneur en saponines.

Plusieurs études suggèrent que les saponines ont des effets neuroprotecteurs significatifs sur l'atténuation des troubles du système nerveux central, tels que les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Cet effet neuroprotecteur peut être dû à l'inhibition de l'acétylcholinestérase ou à de nombreux autres mécanismes.

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

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

Dans un **premier** chapitre, un bilan bibliographique des connaissances sur la maladie d'Alzheimer, sur la plante *Astragalus hamosus* L. ainsi que sur les techniques d'extraction des molécules saponines et sur la purification des extraits par HPTLC a été établi. En particulier, nous décrirons dans ce chapitre la maladie d'Alzheimer, sa physiopathologie ainsi que les voies

thérapeutiques et la neuroprotection par les plantes. Nous présenterons également l'espèce *Astragalus hamosus* L., sa taxonomie, ses molécules d'interet et son utilisation médicinale.

Nous nous sommes intéressés à la description des saponines à savoir la chimie de ces molécules d'intérêt, leur classification, leurs effets biologiques. Etant donné la complexité de l'extraction et la purification des saponines, les techniques d'extraction mentionnées dans la littérature ainsi que les étapes méthodologiques de l'HPTLC ont été détaillées.

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

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

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

Nous terminerons par une conclusion générale et discuterons quelques perspectives.

Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Introduction

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

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

1- Quelles sont les saponines sécrétées par l'espèce *Astragalus hamosus* L. provenant des régions Tunisiennes?

2- Ces saponines peuvent-elles inhiber les maladies neurodégénératives, et particulièrement la maladie d'Alzheimer ?

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

Nous commençerons par un bilan général des maladies neurodégénératives, quelques statistiques récentes, puis nous passerons à la démence la plus fréquemment rapportée, à savoir la maladie d'Alzheimer. Nous mentionnerons son histoire, ses facteurs, son impact ainsi que sa physiologie.

Le deuxième point à aborder dans la synthèse bibliographique est la plante *Astragalus hamosus*, pour laquelle nous mettons en valeur son aspect botanique par sa description végétale et moléculaire et par la description de ses métabolites. Ensuite, nous soulignerons les molécules d'intérêt, les saponines, et irons directement à l'objectif principal qui est la relation entre ces molécules et le traitement des maladies neurodégénératives.

Parallèlement, le rôle des astragales dans le traitement du cancer colorectal est décrit dans ce chapitre. Nous aborderons de plus le thème de l'extraction des saponines et évoquerons les différentes techniques utilisées dans la littérature. Nous finirons par une description détaillée de l'HPTLC.

1 Les maladies neurodégénératives

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

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

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

2 La maladie d'Alzheimer

2.1 Historique

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

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

Les scientifiques se rendent compte finalement dans les années 1980 que cette distinction entre démences présénile et sénile n'a pas de sens. Les progrès de la médecine permettent d'identifier une seule et même pathologie : "la maladie d'Alzheimer". Et même si on l'observe plus souvent chez les personnes âgées, elle n'est plus tenue comme la conséquence logique du vieillissement

des individus. Elle n'a rien à voir avec de simples troubles de la mémoire qui apparaissent parfois avec l'âge.

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

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

2.2 Physiopathologie

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

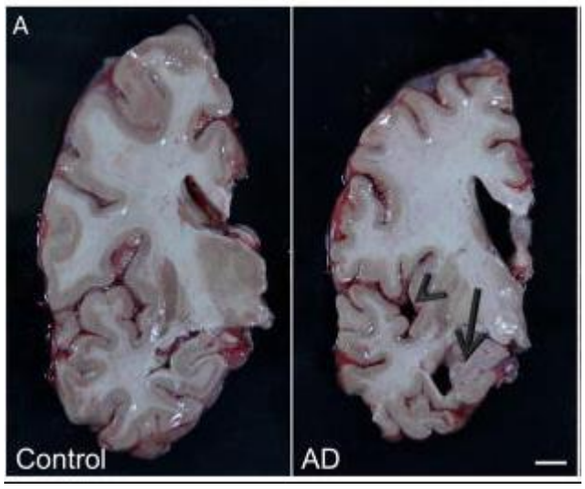


Figure 1: Observation des lésions anatomopathologiques caractéristiques de la MA [6].

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

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

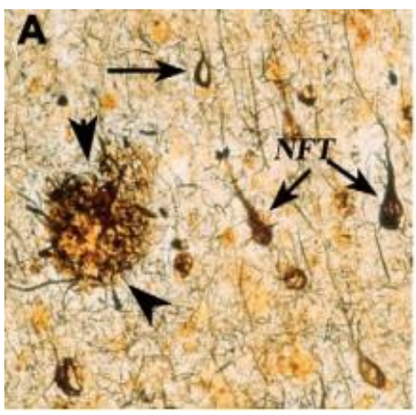


Figure 2: Mise en évidence des deux marqueurs

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

2.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire

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

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

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

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

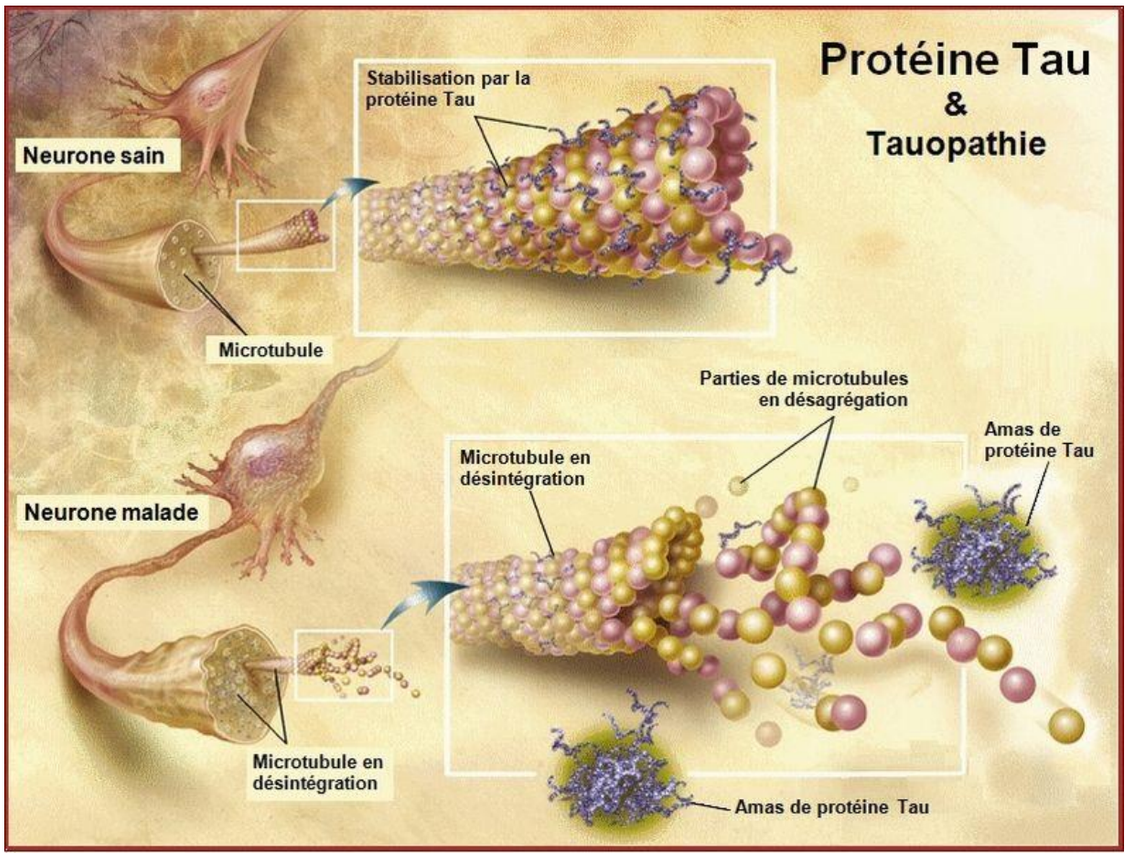


Figure 3: Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

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

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

Anticorps monoclonal	Description	Essai clinique
Semorinemab (Ro705705)	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine Tau extracellulaire	En janvier 2021 un essai clinique de phase II a conclu à l'absence d'amélioration des symptômes de patients Alzheimer et s'est soldé par un échec. Un nouvel essai clinique est actuellement en cours.
BIIB076	Anticorps monoclonal detype IgG1 ciblant le domaine central de Tau	Un essai clinique de phase I a été complété enMars2020 pour évaluer sa pharmacocinétique.
Gosuranemab	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la partie N-terminale extracellulaire de Tau dansle liquide interstitiel et le liquide céphalorachidien.	Un essai clinique de phase II a conclu que la neutralisation de la partie N terminale de Tau ne se traduisait pas par une amélioration clinique, ce qui freina la poursuite d'autres essais cliniques.
Tilvonemab (ABBV-8E12)	Anticorps monoclonal ciblant la protéine Tau extracellulaire sous formeagrégée.	Un essai de phase II visant à évaluer sonefficacité s'est soldé par un échec.
Bepranemab	Anticorps monoclonal humanisé ciblant la région centrale de Tau.	Un essai de phase II est actuellement encours pour évaluer son efficacité et son innocuité.
Zagotenemab (LY3303560)	Anticorps monoclonal dirigécontre une conformation pathologique de Tau.	Un essai clinique de phase II sur des patients Alzheimer symptomatiques a échoué aboutissant à l'interruption de son développement.
JNJ-63733657	Anticorps monoclonal humanisé ciblant la région de liaison aux microtubules de Tau	Un essai clinique de phase II est actuellement en cours pour évaluer son efficacité sur le déclin cognitif.
E2814	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'épitope HVPGG de Tau	Essai clinique de Phase II en cours.
LuAF87908	Anticorps monoclonal humanisé ciblant les régions pSer 396 et p Ser 404 de Tau	Un essai clinique de phase I estactuellement en cours.
PNT001	Anticorps monoclonal dirigécontre le Cis-isomère de la protéine Tau phosphorylée au niveau de la thréonine 231.	Un essai clinique de phase I a été complété dont les résultats ne sont pas encore publiés.
RG7345	Anticorps monoclonal dirigé contre le fragment pSer422 de Tau.	L'essai clinique sur des volontaires sains aété arrêté à cause du développement d'une réponse inflammatoire.

ScFv-h3D6	N-Terminale Obtenu à partir d'un anticorps monoclonal (Bapineuzumab).	Il a pu inhiber la cytotoxicité du peptide Aβ et prévenir la formation de fibrilles dans un modèle cellulaire. Des études *In Vivo* indiquent également des résultats positifs sur les fonctions cognitives et une réduction des taux d'Aβ sansinduction de réaction inflammatoire
ScFv-IC16	N-Terminale	Dirigé contre les différentes formes agrégées d'Aβ. Il pourrait être utilisé comme outil moléculaire pour le diagnosticet le traitement de la MA
A8 scFv	N-Terminale	Il prévient l'agrégation d'Aβ *in Vitro*
HT7	N-Terminale Obtenu d'une libraire d'anticorps humains.	Il cible les oligomères, les protofibrilles et les fibrilles d'Aβ 42 Il permet de désagréger l'Aβ 42 *In vitro* et d'inhiber sa toxicitédans un modèle cellulaire
B4.4	Centrale	Inhibe la toxicité des oligomères et fibrilles d'Aβ42 dans un modèle cellulaire
H1v2	Centrale	Inhibe l'agrégation d'Aβ et prévient ses effets toxiques dans un modèle cellulaire
1 E8	Centrale	Diminue la formation de fibrilles d'Aβ dans un modèle cellulaire
ScFv 4.8 et ScFv 3.20	Centrale	Préviennent la toxicité des oligomères d'Aβ42 dans des culturescellulaires. Ils identifient et diminuent les dépôts d'Aβ dans un modèle murin.
B6 et D4	Centrale	Restreint l'agrégation d'Aβ 42 et diminue sa toxicité dans unmodèle cellulaire.
ScFv 42.2	C-Terminale	Protège contre le déficit de mémoire et la perte neuronale dans un modèle de *drosophilia* Il a une action synergique avec le ScFv 9.
ScFv 17	C-Terminale	Diminue les oligomères d'Aβ dans un modèle murin
W8,W9, W20, WC2	Oligomères	Préviennent la formation de fibrilles d'Aβ dans un modèlecellulaire

A4 ScFv	Oligomères	Restreint l'agrégation d'Aβ et diminue sa toxicité dans un modèle cellulaire et tissulaire de cerveau humains.
C6ScFv, etNuSc1	Oligomères	Ciblent les oligomères d'Aβ dans des tissus de cerveaux humains.
ScFv MO6	Oligomères	Se lie spécifiquement à l'Aβ 42. Il diminue les taux d'oligomèresd'Aβ42 en prévenant leur formation et en favorisant leur désagrégation dans un modèle cellulaire.
ScFv AS	Oligomères/protofibrilles	Il diminue les taux d'oligomères d'Aβ en prévenant leur formationet en favorisant leur désagrégation dans un modèle cellulaire.
ScFv HT6	Oligomères	Se lie à l'Aβ 42. Il permet sa désagrégation et l'inhibition de sa progression et donc la diminution de sa cytotoxicité.

2.2.2 Les plaques séniles

Les plaques séniles sont constituées principalement de peptides Aβ assemblés en fibrilles et agrégés dans le milieu extracellulaire. C'est en 1983 que ce peptide a été isolé pour la première fois à partir du cortex préfrontal provenant de cerveaux de patients atteints de la MA [19]. Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer. En effet, des plaques amyloïdes peuvent être également observées pour la maladie à corps de Lewy, la maladie de Huntington ou encore les maladies à Prion. Cependant, les protéines impliquées dans la formation des fibres amyloïdes sont différentes dans les deux derniers cas [20]. Les principaux facteurs responsables de la formation d'Aβ sont la mutation des gènes APP ou PS1 et PS2 ou du gène ApoE. Toutes les mutations associées aux protéines APP et PS peuvent conduire à une augmentation de la production de peptides Aβ, en particulier la forme plus amyloïdogène, Aβ42 [21].

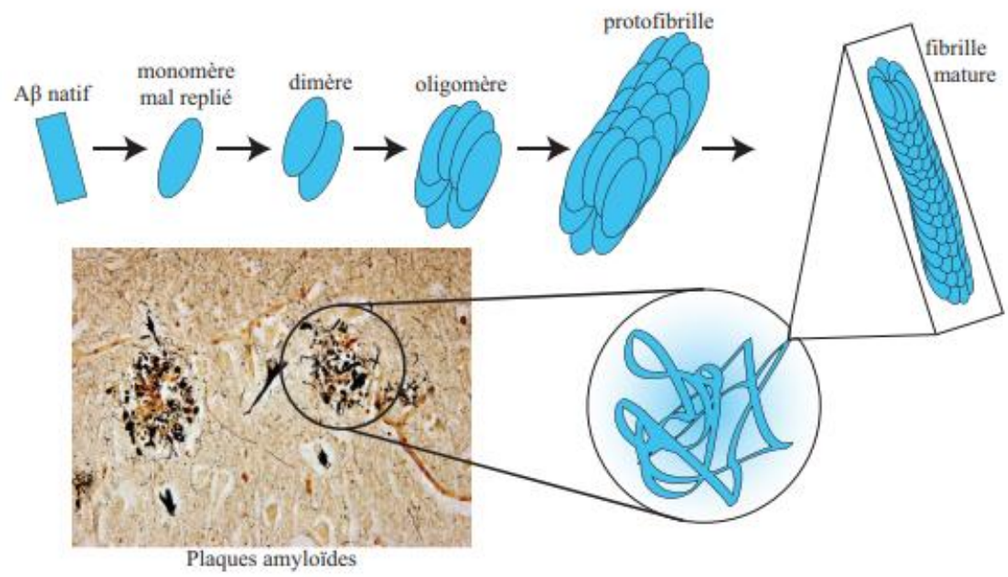


Figure 4: Illustration de l'agrégation d'amyloïde Aβ. Protéines natives incorrectement repliées mènent à la formation de protofibrilles puis finalement à des fibrilles matures qui se retrouvent dans les plaques amyloïdes Image produite par Sara Licea, , Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de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

2.3 Les facteurs impliqués

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

2.3.1 Facteurs environnementaux

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

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

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

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

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

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

2.3.2 Facteurs génétiques

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

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

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

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

Les gènes des présénilines sont associés à environ la moitié des formes précoces de MA avec actuellement 54 mutations décrites pour PS1 et seulement trois pour PS2. Environ 70 % des mutations des gènes présénilines semblent génétiquement spécifiques à un individu ou une famille, ce qui rend irréaliste tout dépistage systématique des formes précoces de MA [11]. En France, on estime à environ 1000 le nombre de cas de MA précoce à transmission dominante autosomique.

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

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

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

2.4 Impact socio-économique

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

2.5 Cascade amyloïde

On s'accorde généralement sur le fait que la cascade amyloïde est le facteur étiologique central de la maladie d'Alzheimer [29]. Cela a mené à l'élaboration de l'hypothèse dite de «la cascade amyloïde», selon laquelle les agrégats d'Aβ42 sont à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant à la mort neuronale et à la démence (Figure 5) [30]. Dans des conditions non pathologiques, le peptide Aβ est dégradé par des enzymes protéolytiques ou évacué par des mécanismes de transport. Il s'agit d'un déséquilibre entre les mécanismes de production et les

mécanismes de dégradation/évacuation de l'Aβ qui serait à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant à la dégénérescence des neurones et à la démence.

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

2.5.1 Le peptide Aβ

2.5.1.1 Origine du peptide Aβ

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

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

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

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

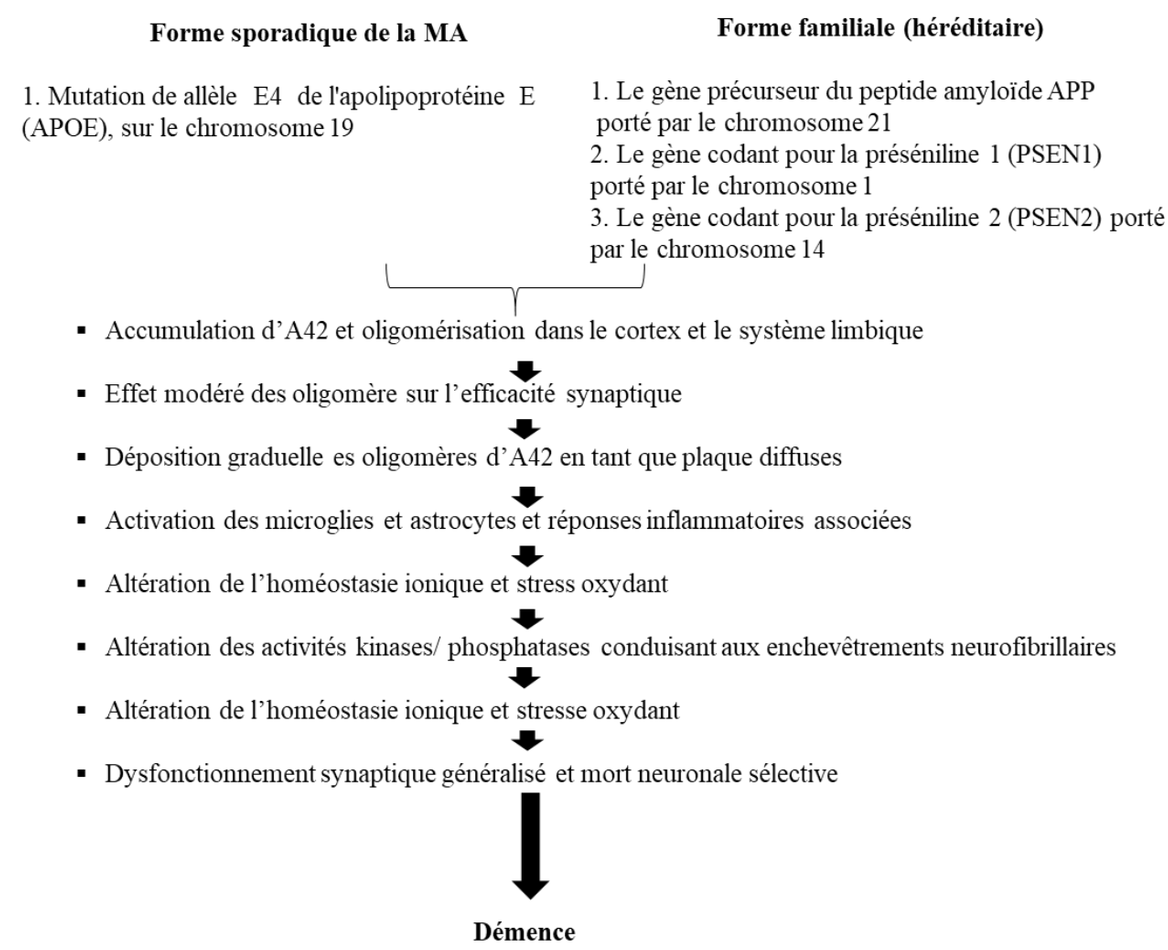


Figure 5 : Hypothèse de la cascade amyloïde [36]

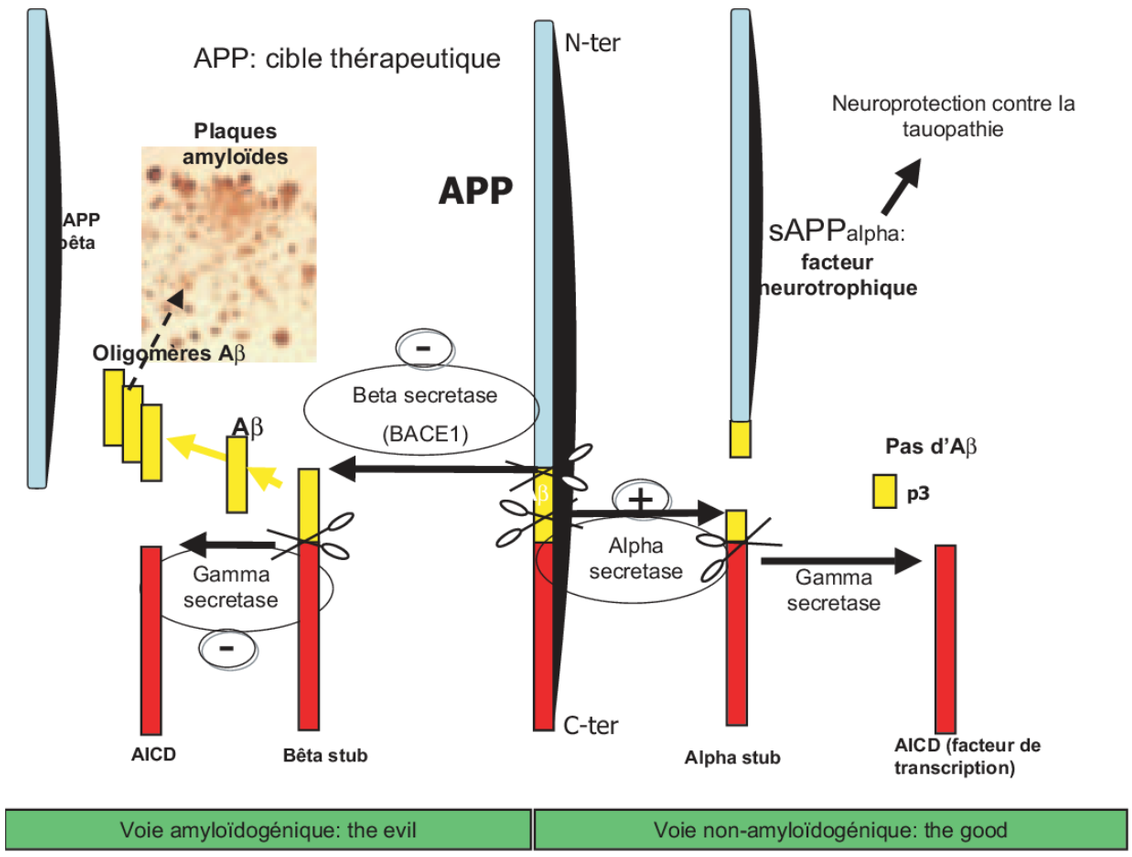


Figure 6: Les deux voies métaboliques principales de APP : la voie amyloïdogénique qui conduit à la production et à la sécrétion du peptide physiologique Abêta, suite à l'action de deux secrétases (BACE1 et la gamma secrétase) et la voie non-amyloïdogénique suite à une coupure de l'alpha secrétase au milieu de Abêta. Dans la maladie d'Alzheimer, on observe une agrégation de Abêta sous forme de plaques qui s'accumulent dans la substance grise corticale [37].

2.5.1.2 Le peptide Aβ et son acheminent

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

Les processus enzymatiques responsables du métabolisme de l'APP en Aβ sont maintenant raisonnablement bien compris. L'APP est séquentiellement clivée par deux activités endoprotéases liées à la membrane, la β- et la γ-sécrétase. La β-sécrétase clive d'abord l'APP pour libérer un grand dérivé sécrété, la sAPPβ. Un fragment de 99 acides aminés (CTFβ, qui commence par le résidu aspartyle N-terminal de Aβ) reste lié à la membrane et est à son tour rapidement clivé par la -sécrétase pour générer Aβ. Le clivage par la γ-sécrétase est quelque peu imprécis, ce qui entraîne une hétérogénéité C-terminale de la population peptidique résultante. Ainsi, il existe de nombreuses espèces Aβ différentes, mais celles se terminant en position 40 (Aβ40) sont les plus abondantes (~80-90%), suivies de 42 (Aβ42, ~5-10%). Les formes légèrement plus longues d'Aβ, en particulier Aβ42, sont plus hydrophobes et fibrillogènes.

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

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

2.5.1.3 Peptide Aβ et synapses

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

oligomères Aβ affectent aussi l'expression de récepteurs NMDA à la surface des neurones et facilitent la DLT, bien que les données à ce sujet soient contradictoires. Les oligomères Aβ pourraient en fait induire une dépression synaptique en perturbant la recapture de glutamate dans la synapse et en promouvant l'activation de récepteurs NMDA extrasynaptiques. Ces études concernent des effets à relativement court terme d'une augmentation de la concentration de peptide Aβ, et il semble nécessaire de réévaluer cette question dans des conditions d'augmentation chronique du taux de peptide Aβ plus proches de la pathologie.

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

Les mécanismes moléculaires par lesquels Aβ affecte la transmission synaptique restent très mal connus. Sur des neurones en culture, des oligomères synthétiques de Aβ se lient sur des sites synaptiques et déclenchent un processus pathologique qui se traduit par un changement de morphologie des épines dendritiques et une perte de récepteurs NMDA. Des études biochimiques indiquent une interaction directe de Aβ avec les récepteurs de l'acétylcholine (récepteurs nicotoniques a7), et potentiellement les récepteurs du glutamate (NMDA et mGluR). Il apparaît clairement que les oligomères Aβ modifient l'expression synaptique des récepteurs du glutamate, par différents mécanismes directs ou indirects, impliquant par exemple le trafic membranaire ou intracellulaire de ces récepteurs.

En conclusion, un ensemble important de résultats récents montre que, bien avant la dégénérescence neuronale, la structure, la fonction et la plasticité des synapses sont altérées par une surproduction de peptides β-amyloïdes sous forme d'oligomères. Il en découle un dysfonctionnement des régions impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Bien que ce constat soit clairement établi, la compréhension des mécanismes moléculaires et des conséquences des altérations de la fonction synaptique sur l'activité des réseaux neuronaux est encore limitée. Pourtant, connaître ces mécanismes ouvrirait des possibilités thérapeutiques visant au rétablissement [38].

2.5.1.4 Toxicité du peptide Aβ

Le peptide Aβ est produit par le métabolisme neuronal et peut être détecté dans le plasma ou LCR des personnes non atteintes de la MA [39].

Dans ces conditions, la présence physiologique de ce peptide n'induit pas de processus neurodégénératifs. Des études montrent qu'en conditions physiologiques on retrouve une production « normale » du peptide Aβ mais la proportion des différentes formes de ces peptides Aβ diffère de celle retrouvée en conditions pathologiques. En particulier, le ratio $A\beta_{1\text{-}40}/A\beta_{1\text{-}42}$ est

modifié en conditions pathologiques. Des études suggèrent que le ratio $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ constitue un facteur déterminant dans la toxicité, la fibrillogénèse et la distribution pathologique d'Aβ et montrent que les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ ont des rôles différents. Le peptide $A\beta_{1-42}$ promeut l'accumulation et le dépôt de peptides amyloïdes contrairement au peptide $A\beta_{1-40}$ [40]. En conditions pathologiques, le ratio $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ est réduit. Notamment, un certain nombre d'études montrent que dans la MA, la production du peptide $A\beta_{1-42}$ est augmentée ce qui est dû à une sur-activation de la voie amyloïdogénique et/ou à des mutations affectant les acteurs de cette synthèse à la fois dans des modèles animaux mais aussi chez l'Homme [41] et/ou à des dysfonctionnements au niveau des mécanismes d'élimination du peptide Aβ. D'autres travaux montrent que la quantité d'Aβ dans le LCR varie selon l'activité synaptique [42] et les cycles [43], notamment l'inhibition de l'activité synaptique décroît la quantité de peptides Aβ sécrétés dans le milieu extracellulaire alors qu'une augmentation de l'activité synaptique ou des dysfonctionnements du cycle circadien provoquent une augmentation de la sécrétion d'Aβ dans le milieu extracellulaire.

Les effets neurotoxiques synergiques sur d'autres pathologies constituent un autre argument solide en faveur du rôle crucial de l'Aβ. Il a été montré que les plaques formées par l'agrégation Aβ activaient la microglie et entraînaient des changements neuronaux progressifs et des neurites dysmorphiques dans des modèles in vivo [44]. Aβ est considéré comme une force motrice pour la propagation de Tau. Par exemple, l'injection de Aβ42 dans le cerveau de souris transgéniques Tau mutantes P301L a accéléré la formation des symptômes de la MA [45]. Cela a été confirmé par le test de croisement de souris transgéniques rTgTauEC avec des souris APP/PS1, dans lequel le dépôt d'amyloïde a considérablement augmenté la propagation de Tau, ainsi que la perte de neurones induite par Tau [46].

La cascade amyloïde était également supposée être une force motrice de l'hyperexcitation neuronale dans la MA. Une étude récente a révélé que l'Aβ induisait une hyperexcitation dans les neurones sensibles et entretenait le cercle vicieux de l'hyper activation neuronale [47]. Une autre étude a révélé que l'APP sécrétée (sAPP) se liait spécifiquement à GABABR1a et supprimait la libération synaptique. L'interaction pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie des circuits neuronaux [48].

L'hypothèse de la cascade amyloïde a obtenu un soutien continu pendant près de 30 ans. De plus, le ciblage du transport amyloïde, de l'enzyme APP sécrétase et de l'agrégation et de la clairance amyloïde a été suggéré comme stratégie thérapeutique viable [49]. Les thérapies ciblant Aβ ont été étudiées de manière extensive et intensive. Les essais cliniques anti-amyloïdes en cours sont résumés dans le tableau 2. Dans ces stratégies anti-amyloïdes, le ciblage de la clairance amyloïde semble plutôt reconnu. Il existe 10 immunothérapies dans 18 essais cliniques visant à éliminer les monomères Aβ, les oligomères et les plaques. Parmi elles, 4 immunothérapies font actuellement l'objet de 10 études de phase 3 [18].

Tableau 2: Vaccins et anticorps monoclonaux anti-amyloïdes pour le traitement de la MA dans les essais cliniques

Vaccins et anticorps monoclonaux	**Description**	**Essai clinique**
CAD106 où Amilomotide	Il est obtenu à partir de fragments du peptide Aβ de façon à produire des anticorps spécifiques sans provoquer de réactions inflammatoires.	- Les études indiquent une réponse positive contre les plaques amyloïdes sans effets indésirables majeurs. - En 2021, l'étude « Alzheimer's prevention initiative generation study » a testé le CAD 106 sur des malades d'Alzheimer homozygotes pour le gène APOE (ε4), et affirme que c'est la première immunothérapie active à pouvoir freiner le dépôt d'Aβ chez l'humain avec une balance bénéfice/risque positive.
ACI-24	Il repose sur l'utilisation du peptide Aβ1-15 entouré d'un liposome et d'adjuvant pour permettre l'obtention d'une forte réponse sans activer les lymphocytes T.	- Une étude datant de Février 2022 a exploré l'optimisation de l'ACI-24 pour générer des anticorps anti-pyroglutamate Aβ qui est une forme très neurotoxique d'Aβ et a obtenu des résultats positifs.
UB311	Il comprend deux peptides Aβ1-14 fusionnés à des peptides de lymphocytes T.	- Il a également prouvé pouvoir générer une forte réponse immunitaire sans induire de cytotoxicité. - Une étude clinique de phase II de l'UB311 rapporte une efficacité à réduire les plaques amyloïdes et une amélioration de la connectivité neuronale chez des patients atteints d'Alzheimer de forme légère à modérée.
Lu AF20513	C'est un trimère du fragment Aβ1- 12 séparé par des séquences d'épitopes de toxines tétanique. Cet assemblage permet d'activer une réponse spécifique des lymphocytes T à la toxine tétanique grâce à une immunisation préexistante par le vaccin antitétanique et ainsi aboutir à une production spécifique d'anticorps anti Aβ.	- Bien qu'il soit bien toléré, les titres de ce vaccin étaient plus réduits chez l'homme comparé au modèle animal ce qui a freiné la poursuite des essais cliniques.
Vaccin à ADN Codant pour Aβ42	L'injection cutanée d'ADN codant pour un trimère d'Aβ42, permet son expression in vivo et stimule une réponse immune au niveau des nœuds lymphatiques, ce qui aboutit à l'obtention de divers anticorps contre différents épitopes sans générer d'inflammation cytotoxique.	- L'étude de Rosenberg et al réalisée en 2018 affirme que ce vaccin permet non seulement de réduire la pathologie Aβ mais agirait aussi sur la réduction de la pathologie Tau.

Donanemab (LY3002813)	Anticorps monoclonal humanisé qui se lie spécifiquement à l'épitope N Terminal pyroglutamate des dépôts d'Aβ.	- Un essai clinique de phase II (TRAILBLAZER- ALZ) a indiqué une réduction des plaques amyloïdes et une amélioration conséquente de la cognition des patients. - Une étude de Phase III (TRAILBLAZER-ALZ2) est en cours avec 1800 participants pour évaluer sa capacité à prévenir la maladie chez des patients à un stade débutant. - Une 2ème étude de phase III avec 3300 participants Alzheimer visera également à déterminer son efficacité.
Lecane mab (BAN2401)	Anticorps monoclonal humanisé qui se lie préférentiellement aux formes agrégées d'Aβ (oligomères, protofibrilles et fibrilles)	- Un essai clinique de phase II (BAN2401-GOOO- 201) indique une réduction d'Aβ et du déclin cognitif après 18 mois de traitement. -Ainsi un essai clinique de Phase III (Clarity AD) est en cours pour évaluer son efficacité
Solanezumab (LY2062430)	Anticorps monoclonal humanisé ciblant le domaine Aβ13-28.	- Divers essais cliniques de phase III se sont soldés parsoldés par un échec et n'ont pu démontrer l'efficacité du Solanezumab sur des patients atteint d'Alzheimer léger à modéré. - Un nouvel essai clinique de phase III (A4) est en cours pour évaluer son efficacité sur des patients asymptomatiques ou à un stade débutant d'Alzheimer
Crenezumab (RG7412)	Anticorps monoclonal humanisé ciblant de multiples formes d'Aβ (monomères compris) avec une plus haute affinité pour les oligomères.	- Divers essais cliniques de phase III ont été arrêtés avant leur fin, due aux résultats d'analyses intermédiaires qui prédisaient leur échec. - Actuellement une étude de phase II est en cours pour évaluer son efficacité sur des patients atteints d'Alzheimer de forme génétique (mutation du gène PSEN1).
Gantenerumab (RO4909832)	Anticorps monoclonal humanisé se liant aux formes agrégées d'Aβ avec une haute affinité et permet leur clearance par phagocytose.	- Un essai clinique de phase II DIAN-TU-001 effectué chez des patients Alzheimer de la forme familiale (ayant des mutations génétiques) a démontré une diminution des plaques amyloïdes mais sans effets sur la cognition des patients. - Actuellement deux essais cliniques de phase III (GRADUATE 1 et 2) étudient son efficacité chez des patients dont la forme d'Alzheimer n'est pas due à des mutations génétiques.

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

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

Plusieurs études ont montré qu'il y avait des cytokines et des chimiokines inflammatoires élevées et une microglie activée accumulée dans la région endommagée des cerveaux atteints de MA [53]. Ces dernières années, des études d'association à l'échelle du génome ont identifié plusieurs polymorphismes mononucléotidiques à risque de la maladie d'Alzheimer associés ou liés à la fonction microgliale, notamment au niveau des gènes TREM2, CD33, CR1, CLU, CD2AP, EPHA1, ABCA7 et INPP5D. En effet, Spangenberg et Green, (2017) [54], indiquent que la microglie a joué un rôle essentiel dans le développement de la MA. De plus, une méta-analyse mise à jour de la cohorte de l'année 1995 à 2016 a démontré que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens était significativement associée à la réduction du risque de MA [55].

2.7 Approche thérapeutique

2.7.1 La thérapie proposée par le marché pharmaceutique

Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, il existe de façon conjointe un déficit en acétylcholine et un excès de glutamate au niveau des synapses. Les recherches thérapeutiques ont pris en compte ces données afin de développer les molécules qui agissent sur les signes cliniques de l'affection [56].

2.7.1.1 Voie de l’inhibition de l’acétylcholinestérase

Il n’existe pas encore de traitement cible sur les mécanismes cellulaires de la MA, à savoir la production du peptide amyloïde par protéolyse du précurseur APP et les protéines Tau pathologiques. L’observation d’un déficit de la transmission cholinergique dans la MA a conduit au développement des premiers agents approuvés pour traiter les symptômes de démence et les inhibiteurs de l’acétylcholinestérase. En effet, l’hypothèse cholinergique propose un rôle central du déficit d’acétylcholine dans les symptômes cognitifs, fonctionnels et comportementaux observés dans la MA. Il apparait que les noyaux cholinergiques sont altérés ainsi que les indices biochimiques de la fonction cholinergique et que cette altération est corrélée avec la sévérité de la démence. Les inhibiteurs d’acétylcholinestérase qui tendent à préserver les niveaux endogènes d’acétylcholine, sont donc les médicaments les plus fréquemment utilisés dans la MA. Les plus connus sont la tacrine, le donepezil, la rivastigmine et la galanthamine. Les essais cliniques ont démontré les avantages des inhibiteurs de la cholinestérase pour le traitement de la maladie d’intensité légère à modérée d’Alzheimer. On ne connait pas les bienfaits du traitement après la progression du stade modère à sévère de la maladie. Les patients affectés acceptant de continuer le donepezil, par rapport à ceux affectés et ayant interrompu le donepezil, avaient un score sur le Mini Mental State Examination (MMSE) qui était plus élevé en moyenne de 1,9 point (intervalle de confiance à 95 % [IC], 1,3 à 2,5) et une note sur les Basic Activities of Daily Living Score

(BADLS) qui était inferieure (indiquant moins la dépréciation) de 3,0 points (IC 95 %, 1,8 à 4,3) ($p < 0,001$ pour les deux comparaisons). Les patients affectés acceptant de recevoir la memantine, par rapport à ceux affectés ayant reçu un placebo, avaient un score sur le MMSE qui était en moyenne de 1,2 point plus élevé (95 % CI, 0,6 à 1,8 ; $p < 0,001$) et un score sur les BADLS qui était inférieur de 1,5 point (95 % CI, 0,3 à 2,8 ; $p = 0,02$). L'efficacité du donepezil et de la memantine n'a pas différé par la présence ou l'absence de l'autre. Il n'y avait aucune différence significative avantageuse de la combinaison de donepezil et memantine par rapport au donepezil. La poursuite du traitement par le donepezil chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer modérée à sévère a été associé à des avantages cognitifs qui dépassent le minimum et avec des avantages fonctionnels au cours de 12 mois. La combinaison de donepezil et memantine a montré des bénéfices additionnels qu'après 52 semaines d'utilisation. Il existe un travail intéressant qui pourrait être considéré comme innovant, directement lié à l'approche décrite ci-dessus. En effet, Fu et al. (2005) ont inhibé par une approche d'ARN anti-sens, l'expression du gène codant pour l'acétylcholinestérase. Ces auteurs ont montré que cette approche améliorait les performances cognitives chez l'animal transgénique. Ces résultats sont intéressants, mais sont pour l'instant restreints aux modèles animaux [11].

2.7.1.2 Voie de l'inhibition du système glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Le glutamate peut être produit à partir de la glutamine par la glutaminase et est le précurseur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur. Le L-Glutamate est l'acide aminé libre le plus abondant dans le cerveau et le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés. La neurotransmission glutamatergique joue un rôle important dans la LTP, qui est considérée comme extrêmement importante pour l'apprentissage et la formation de la mémoire [57]. Les récepteurs du glutamate sont classés en deux familles: les récepteurs métabotropiques du glutamate couplés aux protéines G (mGluR) et les récepteurs ionotropiques du glutamate ligand-dépendants (iGluR) [58]. La liaison du glutamate aux mGluR conduit à la production de phosphate d'inositol et à la signalisation d'un second message, affectant plusieurs voies de signalisation dans les cellules. La liaison du glutamate aux iGluR [qui comprennent trois sous-familles : les récepteurs AMPA, les récepteurs kaïnate et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA)] produit des courants excitateurs rapides. Les récepteurs AMPA et les récepteurs kaïnate sont des récepteurs extrêmement rapides à des concentrations élevées de glutamate. Les récepteurs AMPA sont perméables au Na^+ et les récepteurs Ca^{2+} et kaïnate sont principalement perméables à Na^+ et K^+. Les récepteurs NMDA présentent une activation plus lente et une perméabilité au Ca^{2+} plus élevée que les récepteurs AMPA et kaïnate. Le glutamate, associé au co-agoniste du récepteur (glycine ou D-sérine) se liant aux récepteurs NMDA, combiné à une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique pour libérer les ions magnésium (Mg^{2+}) bloquent les canaux récepteurs. Les récepteurs NMDA ouverts permettent le flux de Na^+, K^+ et Ca^{2+} dans la cellule conduisant à un courant post-synaptique excitateur.

Des pertes de synapses et des dysfonctionnements glutamatergiques avec une régulation négative des récepteurs AMPA et des récepteurs NMDA dans l'hippocampe ont été observés chez des patients atteints de MA [59]. Cependant, le développement de médicaments contre la MA ciblant

la neurotransmission glutamatergique s'est principalement concentré sur la réduction de la neurotransmission glutamatergique. L'activation inappropriée de la signalisation glutamatergique (principalement par l'activation des récepteurs NMDA) entraîne une excitotoxicité. Le dépôt d'amyloïde a augmenté l'activation de Fyn pour phosphoryler la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (NMDAR), et par la suite pour renforcer l'activité des NMDAR, par lesquels des niveaux excessifs nocifs d'ions calcium ont afflué dans les neurones post-synaptiques et altéré les fonctions synaptiques [60]. Sur la base de cette théorie, la mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA a été développé et approuvé pour le traitement de la MA modérée à sévère en clinique. Il existe des agents dans les essais cliniques pour le développement de médicaments contre la MA pour exercer un effet neuroprotecteur via la réduction de la libération de glutamate.

2.7.2 Les solutions proposées par les chercheurs

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

Des données récentes en 2022 suggèrent un rôle du microbiote intestinal dans l'humeur et la fonction cognitive, bien que les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Dans ce contexte, des chercheurs explorent l'impact de la composition du microbiote intestinal sur la progression de la MA. En effet, ils montrent, dans un modèle murin transgénique de la MA, une altération de la composition bactérienne intestinale et un changement de la signature bactérienne cérébrale des souris MA par rapport aux congénères saines. De plus, une série d'expériences a été effectuée visant à restaurer la composition du microbiote intestinal via des modulateurs microbiens, des interventions diététiques, une transplantation de microbiote fécal et des agents pharmacologiques. Collectivement, les résultats suggèrent que la dysbiose intestinale peut influencer la progression de la maladie d'Alzheimer, ouvrant de nouvelles voies pour l'identification de biomarqueurs et le développement de traitements basés sur une modulation du microbiote intestinal [61].

2.8 La neuroprotection par les plantes

En raison de différentes situations environnementales contraignantes et pathologiques ainsi que certaines habitudes comportementales, un excès de radicaux libres peut s'accumuler pouvant entraîner un désordre dans les structures cellulaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques et ainsi provoquant un dysfonctionnement du métabolisme des cellules conduisant à la mort cellulaire [62]. Ainsi, il est reconnu que plusieurs maladies sont associées au stress oxydatif et par conséquent à l'accumulation des radicaux libres. Ces derniers ont été identifiés comme des médiateurs contribuant au vieillissement cellulaire, à la mutagenèse, à la carcinogenèse, aux pathologies cardio-vasculaires, au diabète, à la dystrophie musculaire et à la neurodégénérescence comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [63]. La neuroprotection se réfère aux stratégies et aux mécanismes relatifs capables de lutter au niveau du système nerveux central contre les dommages neuronaux causés par divers troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, l'anxiété, les troubles cérébro-vasculaires, les convulsions, la maladie de Parkinson, etc... Les maladies neurodégénératives pourraient devenir la deuxième cause la plus fréquente de décès chez les personnes âgées en 2040 [64].

La phytothérapie constitue une méthode complémentaire et alternative à la médecine moderne, se référant à l'utilisation des composants végétaux (feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits et graines) pour leurs propriétés essentiellement préventives et curatives. En général, les produits à base de plantes contiennent une variété de composés phytochimiques bioactifs, y compris les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les saponines et les composés phénoliques. Dans la lutte contre les maladies neurodégénératives, le monde scientifique est à la recherche de principes actifs, à partir de certaines plantes médicinales. Les antioxydants naturels peuvent avoir un rôle neuroprotecteur en réduisant ou en inversant les dommages cellulaires et en ralentissant la progression de la dégénérescence des cellules neuronales [65].. En effet, de nombreux composés naturels se sont révélés exercer une action neuroprotectrice sur des cellules isolées et des modèles animaux. Les polyphénols, les isoprénoïdes, les alcaloïdes et les acides gras sont des composants actifs trouvés dans de nombreuses plantes médicinales et qui ont la capacité de réguler une variété d'enzymes, ainsi que des récepteurs cellulaires. Notamment, la galanthamine appartenant à la classe des alcaloïdes, obtenue de *Narcissus tazetta, Galanthus nivalis* et *Leucojum aestivum*, est capable de stimuler les récepteurs nicotiniques, d'inhiber l'activité cholinestérase et d'améliorer la cognition et la mémoire [66]. Parmi les triterpénoïdes connus pour leurs effets neuroprotecteurs, on trouve les ginsénosides. , qui sont des composés extraits de racines et des rhizomes de plantes telles que P. ginseng et P. notoginseng, reconnus pour leur potentiel neuroprotecteur. Une étude a examiné l'extrait aqueux de P. ginseng et son impact sur la cytotoxicité provoquée par MPP+ dans des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Les résultats ont montré que l'extrait réduisait la production excessive de radicaux d'oxygène réactifs (ROS), la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase-3, tout en améliorant le rapport Bax/Bcl-2, ce qui favorisait la survie cellulaire.

De plus, le ginsénoside Rg1 a été étudié pour son effet protecteur contre la cytotoxicité induite par H2O2 dans les cellules PC12, ce qui peut être attribué à son activité antioxydante. Il a également

été observé que le ginsénoside Rg1 protège les cellules contre les dommages causés par H2O2 en régulant négativement l'ERK1/2 (extracellulaire signal-regulated kinases) et en particulier l'activation de la voie de signalisation NF-κB. De plus, des recherches ont montré que le ginsénoside Rg1 agit sur la régulation du fer, en particulier la réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial induite par le fer, en inhibant la régulation positive de DMT1-IRE (protéine importatrice de fer avec un élément sensible au fer) induite par la 6-OHDA, en particulier l'expression de DMT1-IRE et en tout cas l'expression de la ferroportine-1 [67]

Cas des Astragales

L'extrait de racine *Astragalus membranaceus* (20 et 40 mg kg^{-1}) a montré un effet protecteur chez des souris mâles de 12 mois sur les troubles de l'apprentissage et de la mémoire et l'apoptose des neurones similaires aux symptômes de la maladie d'Alzheimer [68]. L'astragaloside IV (40 mg L^{-1}) (Figure 7) a inhibé la transmission synaptique spontanée et a supprimé efficacement l'excitabilité neuronale. Cette modulation de l'activité neuronale indique que la saponine peut agir comme un neuroprotecteur [69]. Des effets neuroprotecteurs de l'astragaloside IV (100 µM) ont été signalés dans des cultures de cellules nigrales primaires traitées à la 6-hydroxydopamine.

Par ailleurs, Luo et al (2004) ont fourni pour la première fois la preuve d'un effet neuroprotecteur à partir d'un extrait purifié d'*Astragalus membranaceus*, contenant de l'astragaloside IV, dans un modèle *In vivo* de lésion cérébrale ischémique. L'utilisation de cette saponine (40 $mg.kg^{-1}$) a réduit la sévérité des lésions ischémiques en diminuant les niveaux de malondialdéhyde et en augmentant les niveaux d'enzymes antioxydantes [70].

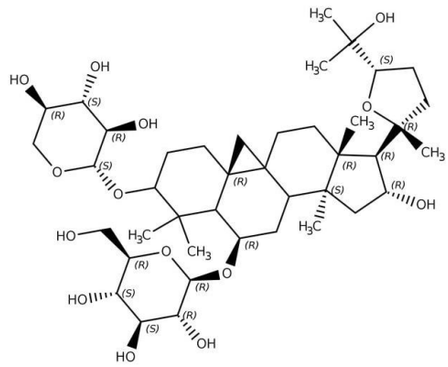


Figure 7: Structure de l'Astragaloside IV

De plus, les effets de la rhamnocitrine 4-β-D-galacto pyranoside (RGP) (Figure 8), isolée à partir d'*Astragalus hamosus* L. ont été évalués sur des synaptosomes de cerveau de rat isolés, préparés par le réactif de Percoll, isolés par perfusion de collagénase en deux étapes. Il a été démontré que dans les synaptosomes, le RGP a eu un effet protecteur statistiquement significatif, similaire à celui de la silymarine, sur le stress oxydatif induit par la 6-hydroxy (OH)-dopamine [71].

L'extrait d'*A. kahiricus* présente une activité considérable contre la cholinestérase et le stress oxydatif, qui jouent tous deux un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MA. L'extrait d'*A. kahiricus* peut être un agent prometteur pour le traitement de la MA et pourrait même retarder sa progression [72].

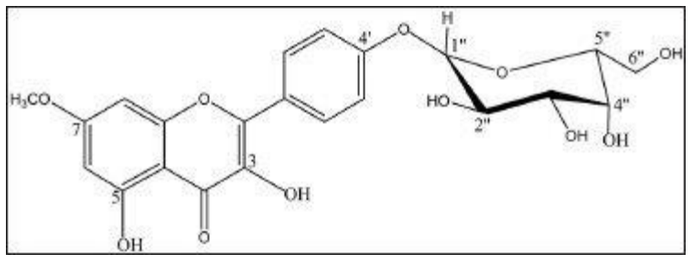


Figure 8: Structure de la rhamnocitrine 4'-β-D-galactopyranoside [71]

2.8.1 Cas d'*Astragalus hamosus* L.

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

Ces résultats suggèrent que l'utilisation des extraits d'*Astragalus hamosus* L. en phytothérapie peut être envisagée pour diminuer les symptômes liés à la MA et le traitement d'autres troubles neurodégénératifs [73].

2.9 Voies thérapeutiques des maladies neurodégénératives identifiées chez les Astragales

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

Il a été signalé que les modifications de la neurotransmission causées par la variation des niveaux de neurotransmetteurs et de récepteurs apparentés jouent un rôle clé dans la neurodégénérescence et la neuroprotection. Les actions neuroprotectrices des saponines peuvent être obtenues en régulant les neurotransmetteurs. En effet, les saponines, par exemple, protègent le système nerveux en régulant les neurotransmetteurs amines biogènes et en modulant les récepteurs N-méthylD-aspartate (NMDA), adénosine ou acide aminobutyrique (GABA), qui sont tous liés à une neurogenèse améliorée [74]. Les niveaux de DA et de 5-HT dans le PFC, l'hippocampe et le striatum sont restaurés après une supplémentation quotidienne en saponine d'*A. spinosus* ou en AS-IV en association avec du BPA. Ainsi, l'expression de la TH est activée, ce qui inhibe potentiellement l'apoptose induite par les mitochondries et favorise la croissance des neurites.

Les saponines aident également à restaurer les déficiences en neurotransmetteurs en modifiant les niveaux de neurotransmetteurs, les récepteurs des neurotransmetteurs et les voies de signalisation du second messager. En conséquence, les saponines ont diverses bioactivités [70, 71]. Essawy et al. (2021) ont découvert que la co-administration de saponines extraites de *A. spinosus* ou AS-IV a inversé la surproduction de NO et de glutamate et a augmenté les concentrations de glutamine

induites par le BPA dans le PFC, l'hippocampe et le striatum, suivies d'une excitabilité du glutamate, d'une diminution de l'influx de Ca^{2+}.

De plus, les animaux ayant reçu AS-IV ou *A. spinosus* présentaient des niveaux d'expression plus faibles des sous-unités des récepteurs ionotropes NMDA (NR2A et NR2B) dans les zones cérébrales touchées par le BPA. Ce changement pourrait être dû au blocage des récepteurs NMDA par l'AS-IV et à une diminution de l'excitabilité neuronale du glutamate [77]. Les saponines, d'autre part, ont amélioré la fonction des récepteurs NMDA par une interaction compétitive directe avec le site de liaison du récepteur à la glycine et ont exercé un puissant effet inhibiteur sur les dommages excitotoxiques en bloquant l'interaction des récepteurs NMDA avec le glutamate pour prévenir la toxicité du glutamate [78].

2.9.2 Modulation des canaux ioniques

La détérioration de la signalisation extrasynaptique du glutamate est un puissant contributeur à diverses conditions physiopathologiques telles que l'hyperexcitabilité, l'excitotoxicité, la neuroinflammation, la neurodégénérescence et la démyélinisation [79]. Dans les neurones hippocampiques en culture, l'AS-IV supprime l'excitabilité neuronale. Une explication des effets inhibiteurs de l'AS-IV sur l'excitabilité globale de la membrane est que la transmission synaptique est réduite, les courants Na^+ et K^+ voltage-dépendants sont supprimés et les courants Ca^{2+} sont inhibés aux bornes présynaptiques, ce qui entraîne une réduction du transmetteur excitateur dépendant du Ca^{2+}. Ce type de modulation de l'activité neuronale pourrait apporter une nouvelle preuve des propriétés neuroprotectrices de l'AS-IV [77].

2.9.3 Clairance des agrégats de protéines

La thérapie AST améliore l'apprentissage et la mémoire, diminue l'expression de l'APP, de la β-sécrétase et de l'ARNm $A\beta_{1–40}$ dans la région CA1 de l'hippocampe et protège contre les dommages en réponse à l'exposition à la dexaméthasone + $A\beta_{25–35}$ [80]. L'AS-IV, en particulier, fonctionne comme un agoniste naturel, inhibant l'activité de BACE1 chez les souris APP/PS1, comme indiqué dans la figure 9 [80, 81].

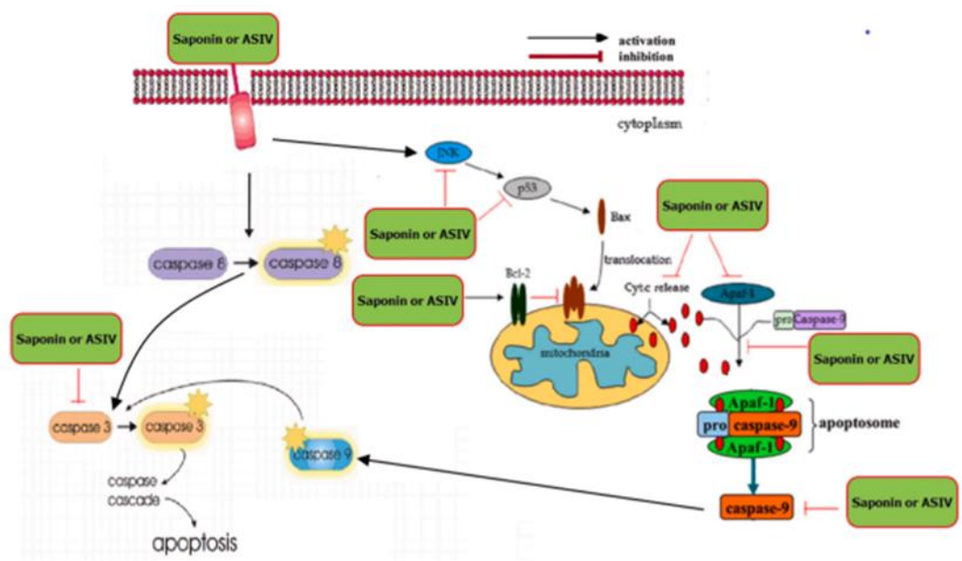


Figure 9: Mécanismes sous-jacents aux effets des saponines et de l'AS-IV sur le dysfonctionnement cognitif. Ils atténuent l'agrégation de la protéine β-amyloïde (Aβ) et la tauopathie (Tau), modulent les anomalies cholinergiques et autres anomalies des neurotransmetteurs, protègent contre l'apoptose neuronale [83]

2.9.4 Réparation de la gaine de myéline

Le traitement thérapeutique des maladies neurodégénératives nécessite la reconstruction des réseaux cérébraux. Il a été découvert que les saponines, ainsi que l'AS-IV, augmentaient la croissance des neurites, indiquant une activité potentielle de régénération des axones et des synapses, atténuant ainsi les troubles de la mémoire [77, 83].

Étant donné que les oligodendrocytes sont le seul type de cellules formant de la myéline dans le SNC, la différenciation dirigée des cellules souches neurales (NSC) en oligodendrocytes plutôt qu'en astrocytes pourrait représenter une bonne stratégie pour augmenter la remyélinisation et traiter la SEP [85].

De plus, chez les souris atteintes de démyélinisation induite par la cuprizone (CPZ), l'APS a atténué les dysfonctionnements neurologiques et favorisé la remyélinisation. Les mécanismes de la remyélinisation améliorée par l'APS pourraient être liés à la prolifération et à la différenciation des NSC en oligodendrocytes et en neurones. In vitro, l'APS a augmenté la prolifération des NSC primaires de rat et favorisé la différenciation en neurones dopaminergiques, selon Gao et al. (2018) [14] et Zheng et Zhao (2018) [86]. De nombreuses voies de signalisation cellulaires, dont la Wnt/β-caténine, protéine morphogénétique osseuse (BMP), Janus kinase (JAK)/transducteur de signal et activateur de transcription (STAT), MAPK, récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et récepteur X rétinoïque (RXR), régissent la différenciation des NSC en oligodendrocytes [85]. Par ailleurs, l'une des voies moléculaires impliquées dans le développement des oligodendrocytes régulées par l'APS *In vivo* et *In vitro* pourrait être l'activation de la voie de signalisation Sonic hedgehog (Shh) [85].

3 Cancer colorectal

3.1 Présentation

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

Ces tumeurs bénignes sont fréquentes et sans gravité. Cependant, certaines d'entre elles, les adénomes, peuvent se développer et se transformer en cancer. Cette transformation est lente, en moyenne plus de 10 ans. Environ 60 % des cancers colorectaux touchent le côlon et 40 % le rectum avec pour localisation principale : le sigmoïde (dernière partie du côlon) [87] (Figure 10).

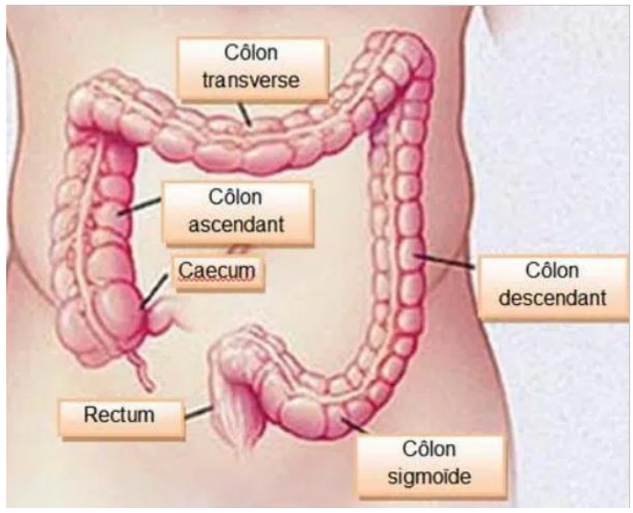


Figure 10: Les parties touchées dans le cancer colorectale : Société Française d'Endoscopie Digestive

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

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

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

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

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

Cependant, il est probable que la communauté bactérienne entière, ainsi que les composés qu'elle produit, joue un rôle dans la carcinogenèse plutôt qu'une seule bactérie responsable (Figure 11) [88].

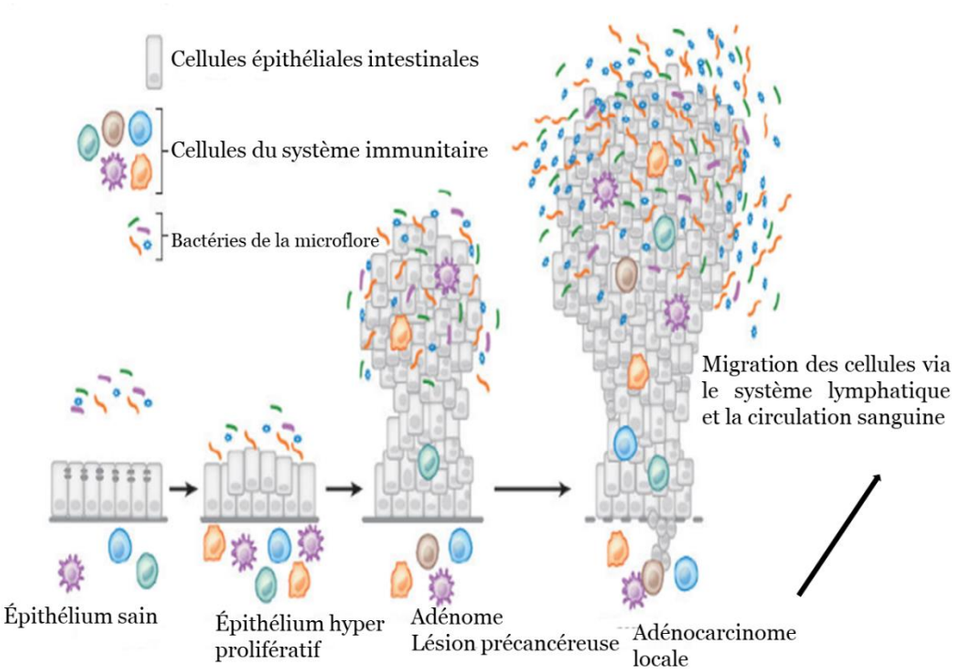


Figure 11: Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale saine à l'adénocarcinome invasif. Les interactions étroites ("cross-talk") entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale de l'hôte, contribuent au maintien de l'inflammation chronique au niveau de la zone tumorale et au développement des différentes étapes anatomocliniques de la carcinogénèse du CCR. D'après Brennan et Garrett, 2016 [89].

3.3 Épidémiologie de la maladie

Le cancer du côlon (CC) est la troisième cause de décès lié au cancer chez les patients adultes aux États-Unis. On estime que 106 180 nouveaux cas de CCR et 52 580 décès sont attendus en 2022. Bien que de nouveaux traitements aient amélioré les résultats, la survie relative à cinq ans reste médiocre à seulement 64,7 %. Les chances sont plus faibles pour les patients atteints d'une maladie métastatique puisque leur taux de survie à cinq ans est inférieur à 20 % [90].

Le cancer colorectal se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi interne du côlon ou du rectum. Le plus souvent, ces tumeurs malignes proviennent de la formation d'adénomes non malins appelés polypes adénomateux qui évoluent lentement et finissent par devenir cancéreux [91].

3.4 Étiologie

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

Les mutations ponctuelles, qui apparaissent au cours de la vie, ne sont pas associées à des syndromes héréditaires et n'affectent que les cellules individuelles et leurs descendants. Les

cancers dérivés de mutations ponctuelles sont appelés cancers sporadiques et représentent 70 % de tous les cancers colorectaux. La pathogenèse moléculaire du cancer sporadique est hétérogène car les mutations peuvent cibler différents gènes. Cependant, environ 70% des cas de CCR suivent une succession spécifique de mutations qui est ensuite traduite en une séquence morphologique spécifique, commençant par la formation d'un adénome et se terminant à l'état de carcinome. En effet, l'invalidation du gène APC (*adenomatous polyposis coli*) est responsable de l'initiation tumorale, alors que l'acquisition d'altérations supplémentaires des gènes K-ras (oncogène), p53 ou SMAD4 et DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) par exemple, intervient secondairement et favorise la progression tumorale (Figure 12) [92]. On s'attend à ce qu'environ 15 % de ces adénomes soient promus à l'état de carcinome dans un délai de dix ans.

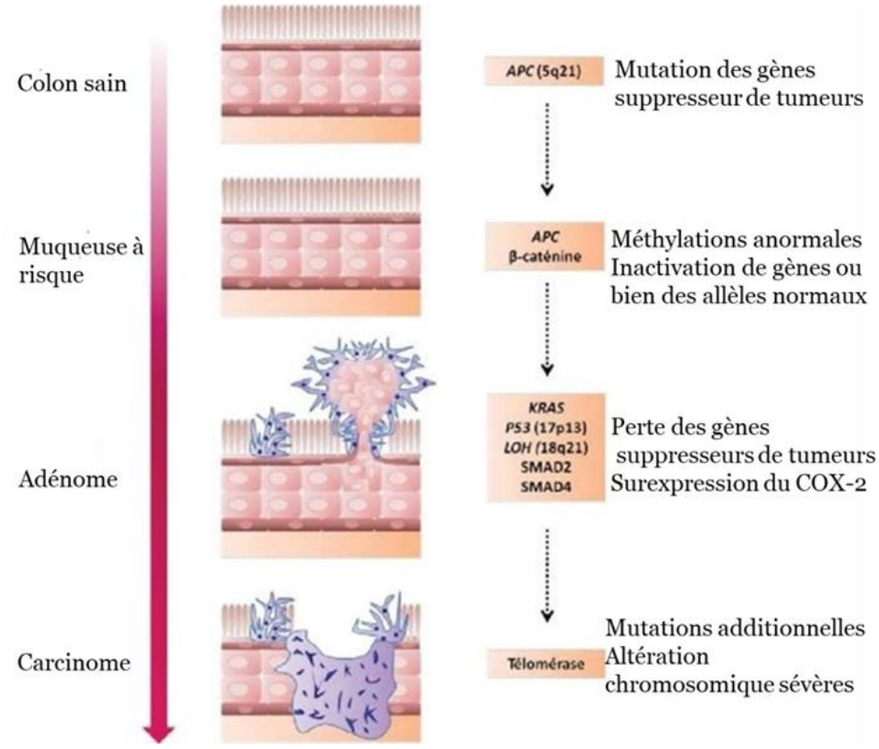


Figure 12: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique [93]

Les cancers héréditaires ne représentent que 5 % de tous les cas de CCR. Ces cancers sont causés par des mutations héréditaires qui affectent l'un des allèles du gène muté, ce qui signifie qu'une mutation ponctuelle dans l'autre allèle déclenchera l'apparition de la cellule tumorale et, par la suite, du carcinome. Afin de générer une classification plus précise des cancers héréditaires, deux groupes, à savoir les formes polyposiques et non polyposiques, ont été établis. La variante de la polypose implique principalement la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Figure 13) [92].

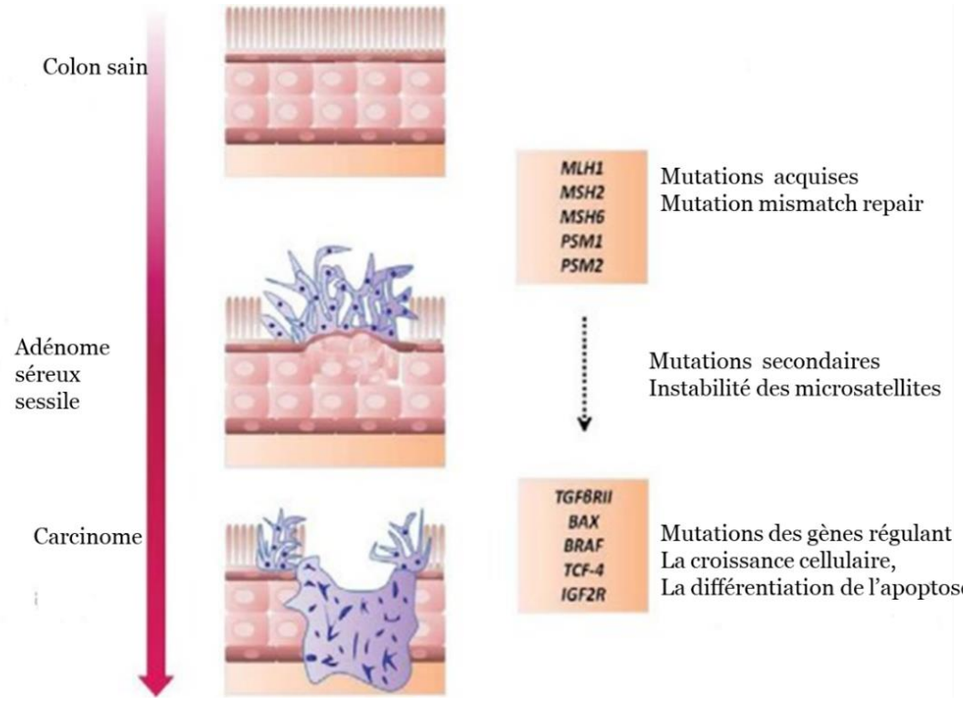


Figure 13: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire [93]

3.5 Cancer colorectal et phytothérapie par des Astragales

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

Dans une étude réalisée par Mandy et al. (2007), les effets anti-cancérigènes de l'extrait de saponine d'astragale ont été évalués dans des cellules cancéreuses du côlon humain HT-29 et des xénogreffes tumorales. Ces chercheurs ont montré que les saponines des astragales (AST) inhibent la prolifération cellulaire par accumulation en phase S et arrêt G2/M, avec suppression concomitante de l'expression de p21 et inhibition de l'activité kinase cycline-dépendante. En outre, les AST favorisent l'apoptose dans les cellules HT-29 par l'activation de la caspase 3 et le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase, ce qui est indiqué par la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine nucléaire. Les auteurs démontrent également les effets anti-tumorigènes des AST *In vivo*, dont la réduction du volume tumoral ainsi que les effets pré-apoptotiques et antiprolifératifs dans la xénogreffe de souris nu de HT-29 sont comparables à ceux produits par le médicament chimio thérapeutique conventionnel le 5-fluorouracile (5-FU). De plus, les effets secondaires (baisse de poids corporel et mortalité) associés à l'association médicamenteuse 5-FU et oxaliplatine ne sont pas induits par les AST. Ces résultats indiquent que les AST pourraient être des agents chimio thérapeutiques efficaces dans le traitement du cancer du côlon, qui pourraient également être utilisées comme adjuvant en combinaison avec d'autres médicaments chimiothérapeutiques pour réduire les effets secondaires de ces derniers composés [94]

4 *Astragalus hamosus* L.

4.1 Présentation du genre *Astragalus*

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

Le genre *Astragalus*, décrit pour la première fois par LINNE en 1753, est classé dans la sous famille des papilionacées et appartient à l'embranchement des spermaphytes, sous embranchement des angiospermes, classe des dicotylédones, sous classe des dialypétales [97].

4.2 Classification systématique de l'espèce

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

Tableau 3: Classification d'Astragalus hamosus

Règne	**Plantea**
Sous-règne	Viridiplantea
Division	Trachiophyta
Classe	Magnioliopsida
Orde	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Papillonadeae
Genre	*Astragalus*
Espèce	*Astragalus hamosus* L.

4.3 Description botanique d'*Astragalus hamosus* L.

Astragalus hamosus L. appelée communément astragale à gousses en hameçons [98] ou encore Bousennara [99], a été signalée par Zouari (1987) en Tunisie et définie comme étant une plante liée aux sols bruns calcaires, aux marnes profondes ou superficielles de texture moyenne à fine, aux sols sablo-limoneux à limoneux profonds, aux alluvions de texture fine et de bonne structure à alcalis dans les étages de végétation subhumide à semi-aride à variante tempérée, douce et chaude [99].

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

milieu, vaginées-connées, sur les bords et souvent couvertes de poils apprimés. Les fleurs sont d'un blanc jaunâtre, de 7 à 9 mm de long, groupées par 9-12 en grappes longuement pédonculées, d'abord serrées puis lâches, plus courtes que la feuille axillante. Les gousses sont cylindriques de 1-3 cm, à la fois glabrescentes, à sillon superficiel fortement arqué, à bec droit, portées sur un pédicelle réfléchi. Le calice est tubulaire, de 4−7 mm de long, librement à densément recouvert de poils courts apprimés noirs ou noirs et blancs ou parfois seulement blancs; dents étroitement triangulaires, 2−4 mm de long. L'ovaire est sessile, peu velu et le tube d'étamine est coupé obliquement à l'embouchure. La floraison se déroule entre avril et mail comme la majorité des plantes fourragères [100].

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

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



Figure 14: Astragalus hamosus L. : partie aérienne [101]

4.4 Caryologie d'*Astragalus hamosus* L.

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer le nombre de chromosomes des espèces d'*Astragalus*. Il s'avère que toutes les espèces d'*Astragalus* qui poussent en Amérique présentent des nombres de chromosomes aneuploïdes tandis que les espèces d'*Astragalus* qui poussent en Europe sont généralement des groupes euploïdes. Une étude plus récente a permis de déterminer le nombre de chromosomes chez des spécimens d'*Astragalus hamosus* L. comme étant de 2n = 2x = 44. D'autres données ont permis de mettre en évidence un nombre de chromosomes différent (2n = 40, 42, 44, 46, 48) rapporté chez des populations bulgares. L'ensemble de ces résultats indiquent clairement qu'*Astragalus hamosus* L. est une espèce aneuploïde et que de probables irrégularités mitotiques en sont la cause [102].

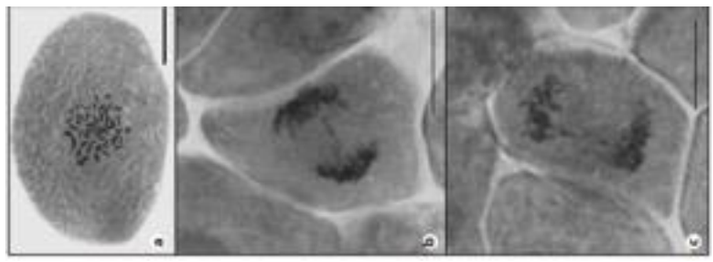


Figure 15 : Microphotographies des chromosomes de A. hamosus : 2n = 44. a ; métaphase somatique ;b, c – ponts chromosomiques de la télophase.

4.5 Métabolites secondaires d'*Astragalus hamosus* L.

Les principaux composés bioactifs du genre *Astragalus* sont les saponines, les flavonoïdes et les polysaccharides, les acides phénoliques, les stérols, les lignanes, les coumarines et les complexes sesquiterpéniques-flavonoliques, les acides aminés et les alcaloïdes. Chez *Astragalus hamosus* L., plusieurs types de métabolites secondaires sont extraits en fonction des organes tels que des saponines et des stérols au niveau des racines, de l'acide 3 nitropropionique au niveau des feuilles [103]. On trouve également au niveau de la plante des flavonols, notamment de l'hyperoside, de l'isoquercitrine, de l'astragaline et de la rhamnocitrine, 4'-beta-D-galactopyranoside, le glycoside 7-0-méthyl-kaempférol 4'-bêta-Dgalactopyranoside (rhamnocitrin 4'-bêta-D galactopyranoside), l'isoquercitrine et l'astragaline [104].

Tableau 4: Exemples d'activités d'extraits et de métabolites d'Astragalus hamosus

Métabolites secondaires/ Extraits	**Activités**
Rhamnocitrin -4-0-D-galactopyranoside [104]	Hépato protecteur, Antioxydant Un effet antiprolifératif qui empêche le processus de carcinogenèse dans le foie Activité cytotoxique [105].
Astragalin (kaempferol-3-O-glucoside) [104]'	-
Isoquercitrin [104]	-
Hyperoside (quercetin-3-O galactoside [104]	-
Rutin	-
Falcosid C	-
Muritianin	-
Propinosid complanatosid	-
Rhamnocitrin (7-methylkaempferol)	Activité antioxydante Activité cytotoxique sur les tumeurs cérébrales et lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire [106].
Rhamnetin 3-O- glucoside	-
Quercetin-3- Robinobioside	-
Peregrinoside I + Azukisaponine V	Activités cytotoxiques sur plusieurs lignées cellulaires du cancer du sang : HL-60 (IC50=63,4 µg/mL), HL-60/Dox (IC50=25,3 µg/mL), SKW-3 (IC50= 84,2 µg/mL), OPM-2(IC50= 116,5 µg/mL), U-266 (IC50=119,8 µg/mL) [106]
Extrait d'*Astragalus hamosus*	Activité cytotoxique sur la lignée MCF-7 du cancer du sein (IC50=253,2 µg/mL) [107]
Extrait d'*Astragalus hamosus*	Effet anti-angiogéniques sur les cellules HUVEC [108]. Les extraits d'*Astragalus hamosus L.* ont arrêté le cycle cellulaire des cellules HUVEC en phase G0/G1

5 Les molécules d'intérêt : Les saponines

5.1 Généralités : Chimie des saponines

Le nom « saponine » est dérivé du mot latin sapo , qui signifie « savon », car les molécules de saponine forment des mousses semblables à du savon lorsqu'elles sont mélangées avec de l'eau [109].

Les saponines sont largement distribuées dans les espèces végétales, étant signalées dans près de 100 familles. Il s'agit d'hétérosides naturels que l'on trouve principalement, mais pas exclusivement dans le règne végétal. Ils sont constitués d'une unité non-glycosylée appelée aglycone, couplée à des chaînes glycosylées [110] .

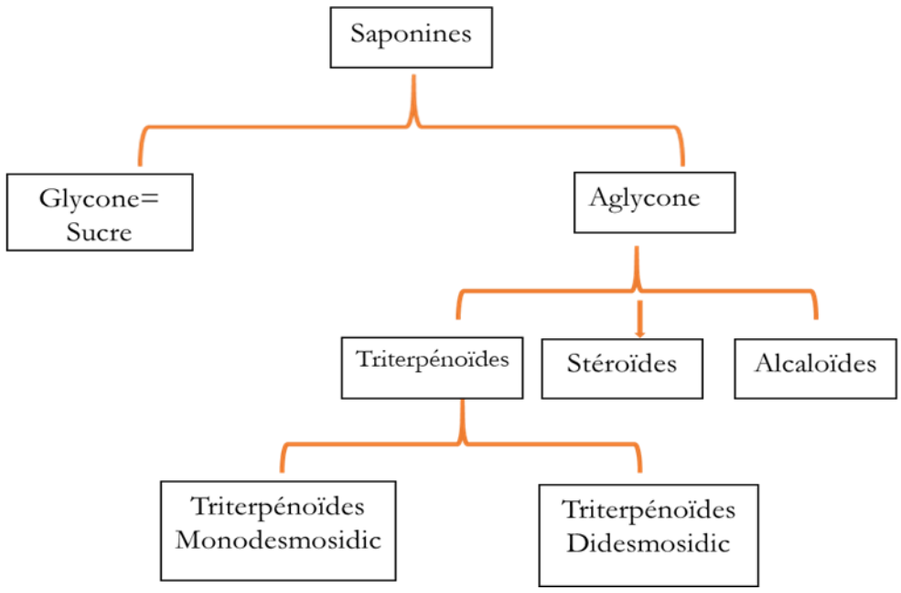


Figure 16: Classification des saponines

Les aglycones ou génines peuvent être divisées en plusieurs types triterpénoïdes ou stéroïdiens selon les différences de sapogénine : la sapogénine de la saponine triterpénoïde (C30) est un triterpène, alors que pour la saponine stéroïdienne la génine a un noyau stéroïdien en C27 [112].
Certains auteurs incluent également dans les saponines des glycoalcaloïdes stéroïdiens. Toutes les classes d'aglycones peuvent avoir un certain nombre de groupes fonctionnels (-OH, -COOH, -CH 3) provoquant une grande diversité naturelle due uniquement à la structure aglycone. Plus de 100 stéroïdiens et probablement encore plus de sapogénines triterpéniques ont été identifiés [113] . Cette diversité peut être encore multipliée par la composition des chaînes de sucre, le nombre de sucres, les modèles de ramification et le type de substitution. Cette diversité structurelle et la large gamme de polarités qui en résulte rendent la détermination des saponines individuelles très difficile.
Les astragalosides I, II et IV, ainsi que les isoastragalosides I et II (Figures 17 et 18), représentent environ 80 % du total des saponines présentes chez l'Astragale [114].
L'Astragaloside IV (AS-IV; $C_{41}H_{68}O_{14}$), une saponine isolée à partir des plantes d'*Astragalus* sp., exerce différents effets thérapeutiques sur la prévention des maladies neurodégénératives en raison de ses activités anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-apoptotiques [115].
Les espèces d'Astragales sont une source de saponines de type cycloartane, dérivées du cycloarténol par oxydation en C-6, C-16, C-20, C-23, C-24, suivie d'éventuelles cyclisations avec formation d'un 20,24- époxyde (cycloastragénol ou cyclogalegénine) ou un 20,25-époxyde, ou un 16,24-20,24-diépoxyde (cycloalpigénine), ou un 16,23-16,24-diépoxyde (cycloorbigénine B). Environ 100 saponines principalement des dérivés de la forme 20(*R*), 24(*S*) du cycloastragénol [3β, 6α, 25-tétrahydroxy-20(*R*), 24(S)-époxy-9,19-cyclolanostane], (astragalosides ou

astraversianines), et plus rarement des 20(*S*), 24(*R*) (cyclogalegenin), ont été isolées. Certaines espèces contiennent également des saponines de type trihydroxyoléan-12-ène [116].

Les constituants biologiquement actifs connus des racines d'astragale représentent deux grandes classes de composés chimiques : les polysaccharides et les saponines [117]. Les polysaccharides d'astragale sont connus pour avoir des propriétés immunitaires dans des expériences *In vitro* et *In vivo* [118].

Des études chimiques sur les saponines d'Astragales ont rapporté la présence de glycosides triterpénoïdes de type cycloartane qui se sont révélés exercer des activités biologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, diurétique, hypotenseur et sédatif [119].

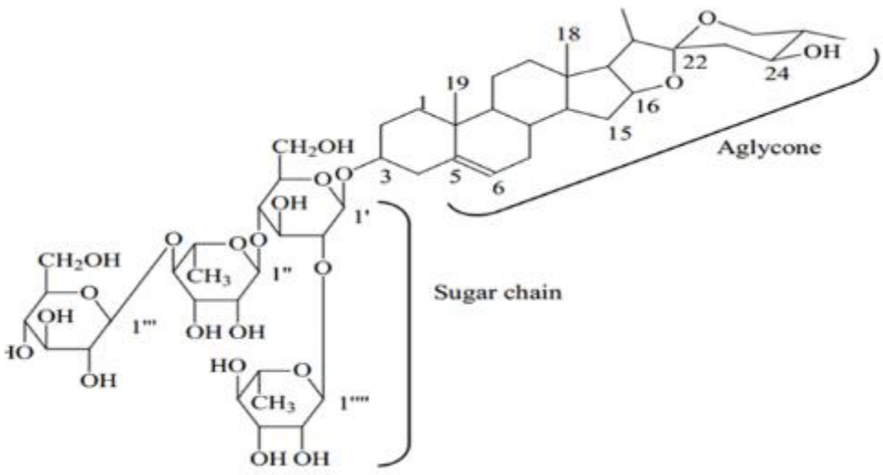


Figure 17: Structure des saponines [120]

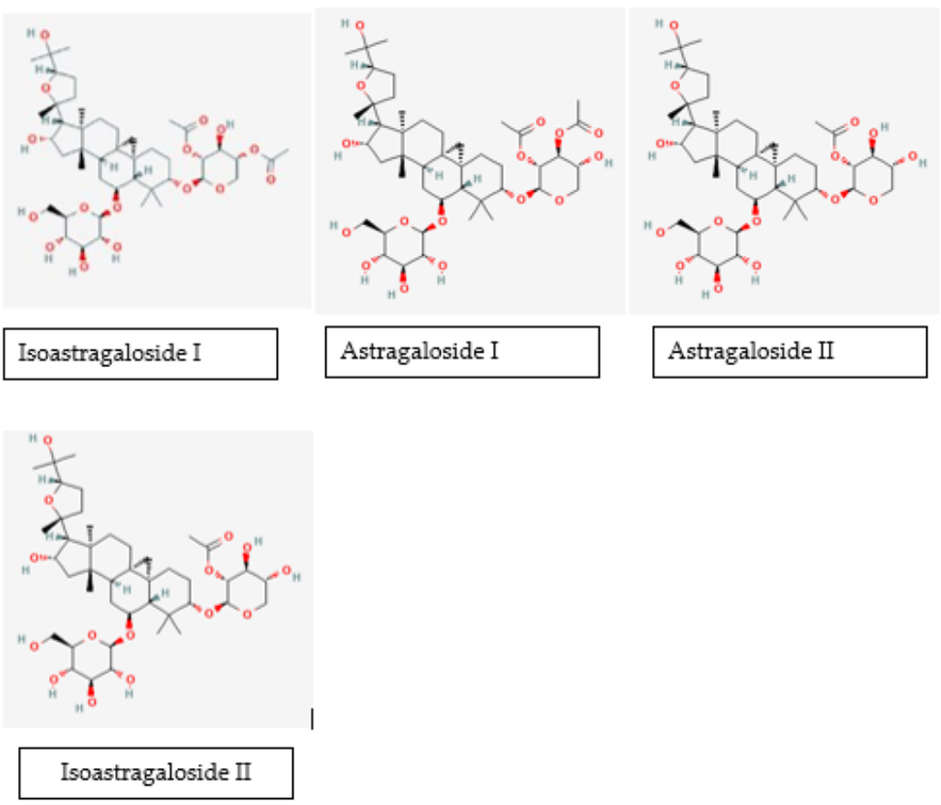


Figure 18: Structures des Astragalosides I et II, Isoastragalosides I et II [121]

5.1.1 Les cycloartanes :

À ce jour, plus de 140 saponines de type cycloartane provenant de différentes espèces d'Astragales ont été identifiées. Les cycloartanes sont constitués de 9β,19-cyclolanost-24-ène-3bole substitué par des groupes hydroxyliques à différentes positions. Tous sont des dérivés cycloarténoliques oxydés à des positions distinctes (principalement C-6, C-16, C-20, C-23, C24) et cyclisés en 20,24-époxyde (cycloastragénol, cyclogalegigénine) ou en 20,25 -époxyde [119]. En plus de ces squelettes, des sapogénines ont également été rapportées, comme le 16,24, 20,24-diépoxyde (cycloalpigénine) [122] et le 16,23-/16,24-diépoxyde (cycloorbigénine B), [123]. Les principaux fragments de sucre substitués sont le β-D-glucopyranosyle, le β-D-xylopyranosyle, l'α-L-rhamnopyranosyle et l'α-L-arabinopyranosyle. De plus, les fragments β-D-fucopyranosyl, β-D-glucuronopyranosyl et β-D-apiofuranosyl sont également présents dans les glycosides de cycloartane isolés du genre *Astragalus* [124].

L'un des principaux constituants bioactifs de l'astragale est l'astragaloside (AST), qui se distingue par la présence de fractions de glucose couplées en 3, 6 et/ou 25 avec une formule moléculaire $C_{14}H_{68}O_{14}$.

De plus, une variété de composants structurellement uniques (par exemple, AST I-IV) a été identifié dans les saponines totales d'*A. membranaceus*, qui ont longtemps été largement utilisées dans la MTC, et l'AS-IV est considéré comme le principal constituant actif [125]. Parmi les types de triterpénoïdes cycloartanes, 5 saponines majeures constituent plus de 80 % de la teneur totale en saponines, notamment les astragalosides I, II et IV et les isoastragalosides I et II [126].

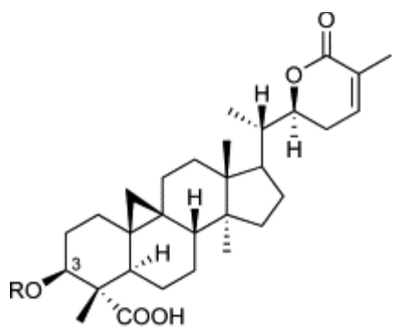


Figure 19: Formule chimique des cycloartanes [127]

5.1.2 Les Oléananes

Bien que plusieurs centaines de triterpénoïdes de type cycloartane aient été identifiées, un nombre limité de saponines oléananes a également été extrait d'astragale sp. Quatre principales sapogénines ont été caractérisées sur la base du squelette aglycone : le soyasapogénol B (le plus courant), l'azukisapogénol, l'épikudzusapogénol et la camplogénine. Les caractérisations structurales de ces saponines ont montré qu'elles étaient remplacées par un groupe β-hydroxyméthyle au lieu d'un groupe méthyle en position C-23. Les squelettes aglycones ont un site de glycosylation en C-3, qui est constitué d'acide glucuronique et se lie fréquemment à un trisaccharide contenant le rhamnose et les pentoses (arabinose ou xylose). Cependant, le deuxième site de glycosylation dans la saponine bidesmosidique est plus visible en C-22 et parfois en C-29.

Zhang et al. (2016) [128] ont rapporté que six saponines à génine oléananes caractérisées par une oxydation en C-29 et une cétone en C-22 ont été extraites d'*A. membranaceus*. De plus, quatre saponines oléananes non décrites auparavant, les astraisoolesaponines A1, A2, A3 et B ont été purifiées à partir d'*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao [129].

5.1.2.1 Soyasaponine

Les saponines de soja se trouvent dans le soja (Glycine max) et d'autres légumineuses, comme les lentilles (*Lens culinaris*) et les pois verts (*Pisum sativum* L). Les soyasaponines sont des glycosides triterpénoïdes oléananes amphiphiles avec des chaînes de sucre polaires conjuguées à un cycle pentacyclique non polaire [130] et sont généralement classés en quatre principaux groupes selon leurs aglycones (soyasapogénols) : groupes A, B, E et DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-méthyl-4H pyran-4-one). Les saponines de soja du groupe A sont caractérisées comme ayant un groupe hydroxyle en C-21 et deux fractions de sucre fixé séparément aux positions C-3 et C-22 du soyasapogenol A, avec un composé exceptionnel, A, qui contient une fraction de sucre à C-3. En plus d'un résidu glucoronyle, la chaîne latérale C-3 a un ou deux autres résidus de sucre, et le fragment sucre C-22 contient deux sucres résidus : un arabinosyle et un xylosyle ou glycosyle.
Les saponines de soja du groupe A peuvent être regroupées en formes acétylées et désacétylées. Les saponines de soja du groupe B diffèrent de ceux du groupe A par la présence d'un atome d'hydrogène en C-21 et un seul sucre en position C-3 du soyasapogénol B, à l'exception de trois soyasaponines qui, en plus de la chaîne de sucre C-3, contiennent une fraction de sucre à C-22. Les soyasapogénols A, B et E ne sont pas présents naturellement mais peuvent être formés par une hydrolyse acide ou bien alcaline des saponines de soja et peuvent donc exister dans des produits à base de soja. Les soyasapogénols C et D peuvent résulter de l'hydrolyse acide du soyasapogénol B et ne sont pas de véritables aglycones des saponines de soyasapogénol B [131].
Généralement, les plantes stockent les saponines sous forme de glycosides, généralement sous forme bidesmosidique, qui peuvent être hydrolysées en formes monodesmosidiques et il a été rapporté que ce changement de bidesmoside à monodesmoside améliore la bioactivité des saponines [132] .

5.1.2.1.1 Soyasaponines et cancer

Les rôles des soyasaponines dans l'inhibition de lignées cellulaires cancéreuses in vitro sont présentés de manière synthétique dans le tableau ci-dessous :

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

Lignée cancéreuse	Saponines	Observations/Mécanismes d'inhibition de la prolifération des cellules malignes / CI50	Références Bibliographiques
MCF-7(cancer du sein)	Soyasaponin I		[133]
HCT-15(cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Formation de vésicules cytoplasmiques et déformation du plasma et de la membrane nucléaire. Inconnu, peut-être dû à l'interaction membrane cellulaire et les saponines.	[134] [135]
HCT-15(cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Suppression de la prolifération dose-dépendante et provoque la macro autophagie induite à 100 µg/mL après 24 h. Cellules retardées en phase S du cycle cellulaire.	[136]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponines du groupe B	Suppression de l'activité PKC et induction de la différenciation.	[137]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélanges des Soyasaponine du groupe B	Régulation à la baisse de l'expression de la COX-2 et de la PKC.	[138]
HT-29 (cancer du côlon)	Soyasaponin I Saponine III Soyasapogénol B	Soyasaponin I n'est pas actif sur la lignée HT-29. Saponine III supprime la croissance à 50 µg/mL après 72 h. Le sapogénol B montre une suppression dose-dépendante de 6 à 50 µg/mL après 72 h. La suppression de la croissance cellulaire est intensifiée avec l'augmentation de lipophilie. (Sapogénol B > Saponine III > Saponine I).	[139]
HT-29 (cancer du côlon)	Mélange Groupe-B soja saponine	Diminution de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante, suppression de l'activité PKC.	[140]
HT-29	Soyasapogénol A et Soyasapogenol B	Suppression de la prolifération de la lignée HT-29.	[139]
Caco-2	Soyasaponin I Soyasapogénol B	La soyasaponine I n'a eu aucun effet sur la viabilité cellulaire Le soyasapogénol B a significativement réduit la viabilité cellulaire à 230 et 1375 µg/mL après 4 h.	[141]
Caco-2	Mélanges des Soyasaponine du groupe B Soyasapogénol B	Les saponines de soja du groupe B n'ont eu aucun effet sur La croissance cellulaire. Le soyasapogenol B a considérablement réduit la croissance cellulaire à 25, 50 et 100 µg/mL.	[142]
HCT-116 (cancer du côlon)	Soyasaponine I	CI50=161,4 µM Les résultats ont indiqué que l'effet de la soyasaponine I sur HCT116 pourrait être exercé en influençant le métabolisme des acides aminés et la voie de signalisation des œstrogènes.	[143]
Héla	Soyasaponine II	le SS-II pouvait inhiber efficacement la prolifération des cellules Hela et présentait des manières évidentes dépendantes de la concentration et du temps à des concentrations de 100 à 800 µg/mL.	[144]
Hela	Extrait totale de sojasaponine	CI50= 0,6 µg/mL L'extrait totale de sojasaponine a réduit la croissance cellulaire par l'induction de l'apoptose.	[144]
Hep-G2 (carcinome hépatocellulaire)	Soyasapogénol A et Soyasapogénol B	Déclenchement de la mort cellulaire apoptotique. Les CI50 ont été déterminées comme étant de 0,05 ± 0,01 µg/mL pour le soyasapogenol A et de 0,13 ± 0,01 µg/mL pour le soyasapogenol B.	[145]

5.1.2.1.2 Autres activités des Soyasaponines [131]

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

Tableau 6: Activités biologiques des soyasaponines

Soyasaponines	**Mécanismes**
Soyasaponines totales	Inhibition de la production de TNF-α, MCP-1, PGE2, NO, COX-2 et iNOS.
	Inhibition de la mutagénicité induite par l'aflatoxine B_1 en éliminant les électrophiles.
	Inhibition la formation d'adduits à l'ADN induits par l'aflatoxine B_1.
	Diminution de la peroxydation des lipides dans le foie.
	Protection de l'intégrité de la membrane plasmique ; augmenter la capacité de régénération du foie; Activation du système. Antioxydant hépatique; prévenir la nécrose, l'inflammation.
	Diminuer les teneurs sériques en NO et ROS.
Soyasaponine Ac	Inhibition de la production de TNF-α, PGE2, NO et IL-1β, et la liaison du LPS au TLR4.
	Inhibition le raccourcissement du côlon, l'activité de la myéloperoxydase, l'expression de TNF-α, IL-1β, COX-2, iNOS et TLR4.
Soyasaponine A_1 A_2	Diminution TNF-α, NO. et d' iNOS
	Diminution la peroxydation des lipides dans le foie.
	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1
Soya saponines A_3	Inhiber l'expression induite par le TNF-α d'ICAM-1.
	Protection contre la cytotoxicité induite par l'aflatoxine B_1.
	Réduire le nombre de cellules inflammatoires infiltrantes dans le foie et les corps apoptotiques.
	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponine B + E + DDMP	Inhibition des dommages à l'ADN induits par l'interception de molécules réactives.
	Inhibition de l'α-glucosidase.
	Augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires totaux et des stérols neutres.
Soyasaponine I	Inhibition de la production de TNF-α, IL-1β, PGE2, NO, COX-2 et iNOS .
	Activité anti complémentaire
	Inhibition du raccourcissement du côlon, l'activité de la myéloperoxydase, l'expression de TNF-α, IL-1β, COX-2, iNOS, PGE2 et IL-6
	Protection contre les lésions hépatiques immunologiques.
	Diminution la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	Inhibition de l'activité de la rénine.
	Réduction de la pression artérielle.
	Inhibition de la croissance.
	Piégeage des radicaux DPPH ; inhiber la peroxydation des lipides dans les liposomes.
	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1.
	Réduction du poids des reins, la teneur en eau et les taux plasmatiques de créatinine et d'urée ; Entrave de l'élargissement des reins et la croissance des kystes.
Soyasaponine II	Diminution de la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	Inhibition de l'activité de la rénine.
	Activité anti-HSV-1.
	Stimulation des réponses des anticorps anti ovalbumine totale-IgG et IgG1.

Soyasaponine III	Diminution de la peroxydation des lipides dans le foie en augmentant la sécrétion d'hormones thyroïdiennes.
	Stimulation des réponses des anticorps antiovalbumine totale-IgG et IgG1.
Soyasapogénol B	Inhibition de l'expression induite par le TNF-α d'ICAM-1.
	Inhibition des dommages à l'ADN induits par en interceptant les molécules réactives.
	Inhiber la prolifération.
	Protéger contre la cytotoxicité induite par l'aflatoxine B 1. Augmenter le MLR (rapport lymphocyte/monocyte).
	Activité anti-HSV-1.
sojasapogénol C	Inhibition de l'expression induite par le TNF-α d'ICAM-1.
	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponines E	Inhibition de l'α-glucosidase.
Sojasapogénol E	Activité anti-HSV-1.
Soyasaponine βg	Piégeage des radicaux O_2^- et DPPH.

5.2 Rôles et activités biologiques des saponines

Les saponines sont le principal type de constituant chimique du genre *Astragalus* [146]. L'utilisation principale de ce genre dans la médecine traditionnelle est due à son contenu et à sa teneur en saponines [96]. En effet, les saponines de types cycloartane et oléanane qui en sont extraites ont montré des propriétés biologiques intéressantes. Comparés aux cycloartanes, les oléananes sont relativement rarement distribués au sein du genre [96], et les saponines de type oléanane présentes dans les espèces d'Astragales sont basées essentiellement sur le soyasapogenol B comme aglycone [96]. Elles agissent comme une barrière chimique ou un bouclier dans le système de défense des plantes contre les agents pathogènes et les herbivores [147].

La découverte des activités biologiques des saponines ne se limite pas seulement aux utilisations traditionnelles, mais plus récemment, également dans les applications pharmaceutiques [148]. Ces molécules ont des activités hémolytiques [131, 132] molluscicides, anti-inflammatoires, antifongiques ou anti-levures, antibactériennes ou antimicrobiennes, antiparasitaires, antivirales [151], anticancéreuses [134, 135, 136], antioxydante [137, 138, 139] et comme adjuvent immunologique aussi [158]. Le ginsénoside Rg1 pourrait également améliorer les déficits de mémoire induits par la scopolamine en inhibant l'activité AChE [159].

De plus, les kalopanaxsaponines A et B améliorent en partie les déficits de mémoire en inhibant l'activité AChE [160]. L'administration orale de sojasaponine-I a montré des effets significatifs d'amélioration de la mémoire dans les tests d'évitement passif, de labyrinthe en Y et de labyrinthe aquatique de Morris [161].

Plusieurs études ont rapporté les potentiels neuroprotecteurs des saponines. En effet, chez *Astragalus glycyphyllos*, une nouvelle saponine a permis de bloquer l'expression de l'enzyme impliquée dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [162].

Chez *Astragalus glycyphylloides*, l'administration de saponines a montré un effet neuroprotecteur significatif dans un modèle de stress oxydatif [163].

La saponine triterpénoïde de type oléanane de *Momordica cymbalaria* a montré également une activité neuroprotectrice [164].

Les saponines totales de *Dipsacus asperoides* (tSDA) exerçaient une action neuroprotectrice et ces molecule tSDA protégeaient les neurones contre la toxicité de A bêta, très probablement en soulageant le stress oxydatif ou en inhibant le processus de A bêta, induisant la génération de radicaux libres [165].

Récemment, la sarsasapogénine isolée d'*Asparagus racemosus* a été signalée comme inhibant les cholinestérases (AcetylChE IC_{50}=9,9 µM, ButycylChE IC_{50}=5,4 µM), l'enzyme de clivage bêta-amyloïde 1 (BACE1) et les enzymes monoamineoxydase-B (MAO-B) de manière dose-dépendante. Cette saponine a inhibé la fibrillation de l'amyloïde bêta (Aβ 42) jusqu'à 68 % à une concentration de 40 µM [166]. Il a été constaté que la théasaponine E1 inhibait l'hyperphosphorylation de tau et diminuait les niveaux d'Aβ [167]

Chez *Astragalus hamosus*, un mélange de deux saponines, a montré une activité antinéoplasique aux seins de deux lignées cellulaires de carcinome récepteur des œstrogènes MCF-7 (RE) positif et MDA-MB 231- RE négatif [104, 166].

Deux saponines de type oléanane, le Peregrinozide I et l'Azukisaponine V d'*Astragalus hamosus* L. ont montré une modulation dose-dépendante de la prolifération lymphocytaire dans 3 types de cancer, BC1 (cancer du sein humain), Lu1 (cancer humain du poumon), Col2 (cancer du côlon humain) et LNCaP (cancer de la prostate humaine) [169].

L'importance des propriétés pharmacologiques des saponines, en particulier dans la lutte contre le cancer, a provoqué l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour faire face à la demande croissante [170].

5.3 Techniques d'extraction des saponines conformément aux objectifs de recherche

5.3.1 Introduction

Les progrès récents dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matériel végétal ont été examinés de manière approfondie [171], [172] et cela pourrait être dû à la sensibilisation accrue du public aux soins de santé préventifs qui pourraient être promus par le biais de la consommation d'extrait de matière végétale. En général, les techniques d'extractions employées dans l'extraction des saponines peuvent être classées en deux catégories, **les technologies conventionnelles** et **les technologies vertes**. Les techniques d'extraction conventionnelles sont la macération, et l'extraction par reflux dont par soxhlet, et les technologies vertes sont l'extraction assistée par ultrasons, assistée par micro-ondes et accélérée par solvant vert (ASE) [173]. L'extraction conventionnelle repose sur la solubilité du soluté des matières végétales dans le solvant. Par conséquent, souvent un grand volume de solvant est utilisé pour extraire le soluté souhaité ainsi qu'une température élevée par chauffage ou bien une agitation mécanique, sont des paramètres qui favorisent l'extraction. D'autre part, les techniques d'extraction verte impliquent des produits chimiques plus responsables [171]. La conception des technologies d'extraction verte est régie par ces mesures. Par conséquent, l'eau est utilisée comme solvant d'extraction en manipulant la pression et la température du système d'extraction, comme dans l'extraction liquide sous pression.

L'importance des saponines en tant que propriétés pharmacologiques, en particulier dans la lutte contre le cancer, a provoqué l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour faire face à la demande croissante. La figure 21 montre clairement que les chercheurs sont plus enclins à sélectionner les techniques d'extraction conventionnelles (70%), par rapport aux technologies vertes (30%), même si les techniques vertes utilisent un minimum de solvant. La sélection de ces méthodes est généralement régie par l'objectif de recherche des études menées. Pour analyser plus en détail les sélections de différentes techniques d'extraction faites par les chercheurs, le tableau 8 présente un aperçu des techniques d'extractions conformément à leurs objectifs de recherche. Pour l'isolement de nouvelles saponines et les études de propriétés pharmacologiques, les chercheurs utilisent les méthodes d'extractions conventionnelles. Cependant, dans les travaux axés sur les études de rendement et d'optimisation, les chercheurs visent des technologies d'extraction verte. Il convient également de noter que l'extraction assistée par ultrasons est la technologie d'extraction verte la plus sélectionnée dans les études de quantification, ce qui a donné une implication de sa capacité et de son efficacité à obtenir des rendements significatifs en saponine.

5.3.2 Techniques d'extraction conventionnelles

5.3.2.1 Extraction par Macération

L'extraction par macération est une extraction solide-liquide où le composé bioactif (soluté) à l'intérieur du matériel végétal est extrait en trempant le matériel végétal dans un solvant spécifique pendant une période de temps [174]. L'efficacité du processus de macération est déterminée par deux facteurs principaux, la solubilité et la diffusion efficace. La solubilité est régie par la règle de base du « comme se dissout comme » qui indique que les composés polaires se dissolvent dans les solvants polaires et que les composés non polaires se dissolvent dans les solvants non polaires [175]. Le taux de dissolution d'un soluté dans le solvant d'extraction est déterminé par le taux de transfert de masse d'un soluté de la matière végétale au solvant [174]. En raison du gradient de concentration à l'interface solide-liquide, le transfert du soluté à l'intérieur du matériel végétal se produit montrant qu'une diffusion efficace a lieu [174]. Aucun ustensile et équipements compliqués ne sont nécessaires pour la mise en place d'un système d'extraction par macération qui en a fait un outil de choix pour les chercheurs. Le seul facteur primordial auquel il faut prêter attention pour améliorer l'extractabilité est la connaissance de la similitude de l'intérêt des composés bioactifs pour le solvant et de sa polarité. L'éthanol et le méthanol étaient les solvants d'extraction utilisés pour extraire les saponines du matériel végétal, et l'éthanol préféré probablement en raison d'un souci de respect de l'environnement. La durée du temps d'extraction est longue , par conséquent, l'extraction par macération est souvent aidée par une agitation mécanique [161, 162], ou agitation magnétique pour raccourcir le temps d'extraction [178].

5.3.2.2 Extractions à reflux et Soxhlet

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

renvoyer les vapeurs condensées dans le ballon d'origine [179]. L'éthanol est généralement le solvant le plus utilisé dans l'extraction par reflux.

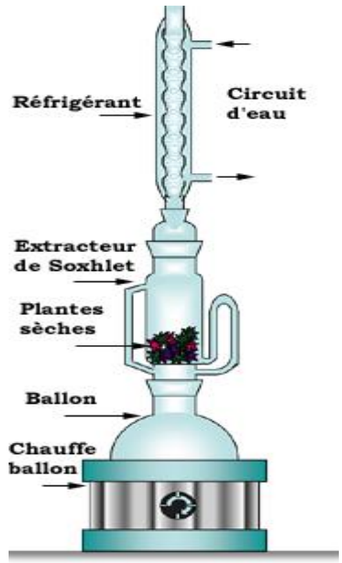


Figure 20: Appareil SOXHLET [180]

5.3.2.3 Extraction SEBSQUENT (Extraction Séquentielle)

De nombreuses études ont été menées sur l'extraction des saponines à l'aide de deux méthodes d'extraction successives. Le but de l'utilisation de deux méthodes d'extraction consécutives est de permettre une purification de l'extrait avant de le soumettre à une analyse HPLC pour l'isolement et l'identification d'une saponine à partir du matériel végétal. Pour la méthode subséquente au Soxhlet et au reflux, l'extraction au Soxhlet est d'abord effectuée pour éliminer les lipides du matériel végétal à l'aide d'un solvant tel que le chloroforme [166, 167] et l'hexane [183] .

5.3.3 Technologies d'extraction vertes

5.3.3.1 L'extraction assistée par ultrasons

Le phénomène des ultrasons en créant des bulles de cavitation dans le solvant en agissant comme un micro-jet pour dénaturer la paroi cellulaire de la plante entraine un rendement d'extraction plus important des composés bioactifs. Peu de chercheurs ont examiné l'effet des ultrasons sur les propriétés technologiques et la bioactivité des aliments [184] et les applications de l'extraction assistée par ultrasons sur les principes bioactifs des herbes [185] de l'industrie alimentaire et de la transformation [186]. Bien que l'extraction assistée par ultrasons soit couramment utilisée pour de nombreuses extractions de composés bioactifs [172, 173], seules quelques-unes font état de l'extraction des saponines.

5.3.3.2 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes avec une gamme de fréquences de 0,3 à 300 GHz [158, 159]. Récemment, le MAE a attiré l'attention sur l'extraction de composés bioactifs à partir de matériel végétal en raison du temps d'extraction court, de l'utilisation minimale de solvant et de son mécanisme de chauffage spécial [173]. Les applications récentes du MAE de métabolites secondaires végétaux tels que les flavonoïdes, les quinones, les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les saponines ont été examinées [189]. Les micro-ondes sont capables de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec des

molécules polaires telles que l'eau à l'intérieur des matériaux. La profondeur de pénétration des micro-ondes dans la matrice végétale dépend de la constante diélectrique, de la teneur en humidité, de la température et de la fréquence du champ électrique [190]. L'eau contenue dans une matière végétale est responsable de l'absorption de l'énergie micro-ondes qui a entraîné un surchauffe interne et une perturbation de la structure cellulaire, et par conséquent, facilite la diffusion de composés bioactifs à partir de la matrice végétale [174]. L'efficacité du MAE repose sur l'effet des micro-ondes sur le solvant d'extraction et la structure cellulaire de la matrice végétale [174].
Bien que l'application potentielle de l'extraction par micro-ondes pour les flavonoïdes ait été examinée de manière approfondie [191], seuls quelques travaux d'extraction de saponine utilisant le MAE ont été mentionnés dans la littérature [175, 176].

5.3.3.3 Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'extraction accélérée par solvant a été considérée comme une technique verte dans la préparation d'échantillons de matériel végétal avant l'analyse chromatographique [156, 158]. Cette technique a été introduite par Dionex Corporation en 1995. Elle est également connue sous le nom d'extraction liquide sous pression, d'extraction de solvant sous pression et d'extraction de solvant améliorée. Parfois, on parle d'extraction d'eau chaude sous pression, d'extraction d'eau sub-critique ou d'extraction d'eau surchauffée, lorsque l'eau est utilisée comme solvant [194]. Il s'agit d'une technique d'extraction rapide automatisée qui utilise un minimum de solvant à température et pression élevées. Le mérite de l'utilisation d'une température accrue est d'améliorer la solubilité et le transfert de masse du soluté au solvant, et une pression élevée maintient le solvant en dessous de son point d'ébullition, permettant une extraction rapide, sûre et efficace des analytes cibles des matières végétales dans le solvant d'extraction [195]. Un processus d'extraction est généralement terminé en 15 à 25 minutes en utilisant seulement 15 à 45 mL de solvant. Par conséquent, elle a été largement appliquée dans les domaines de la recherche environnementale, alimentaire, polymère et pharmaceutique.
L’ASE comprend deux configurations principales, à savoir les instruments statiques et dynamiques [194]. La configuration statique est le remplacement du solvant entre les cycles si le processus d'extraction consiste en un ou plusieurs cycles d'extraction. Une pompe haute pression est nécessaire pour pomper le solvant d'extraction à travers le récipient d'échantillon en continu dans la configuration dynamique. Les paramètres affectant l'efficacité de l'ASE sont la température, la pression, le type et la composition des solvants, des modificateurs et des additifs, la composition de la matrice et le mode d'extraction [196]. La température et la pression de fonctionnement les plus couramment appliquées pour l'ASE sont de 100 °C à 1500 psi [195]. Bien que l'ASE soit une technologie verte dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matières végétales, l'application dans l'extraction de saponine est encore rare. Worth a noté que cette méthode est principalement utilisée pour extraire le ginsénoside du ginseng [180, 181, 182, 179] et cela pourrait être dû à la valeur précieuse du produit.

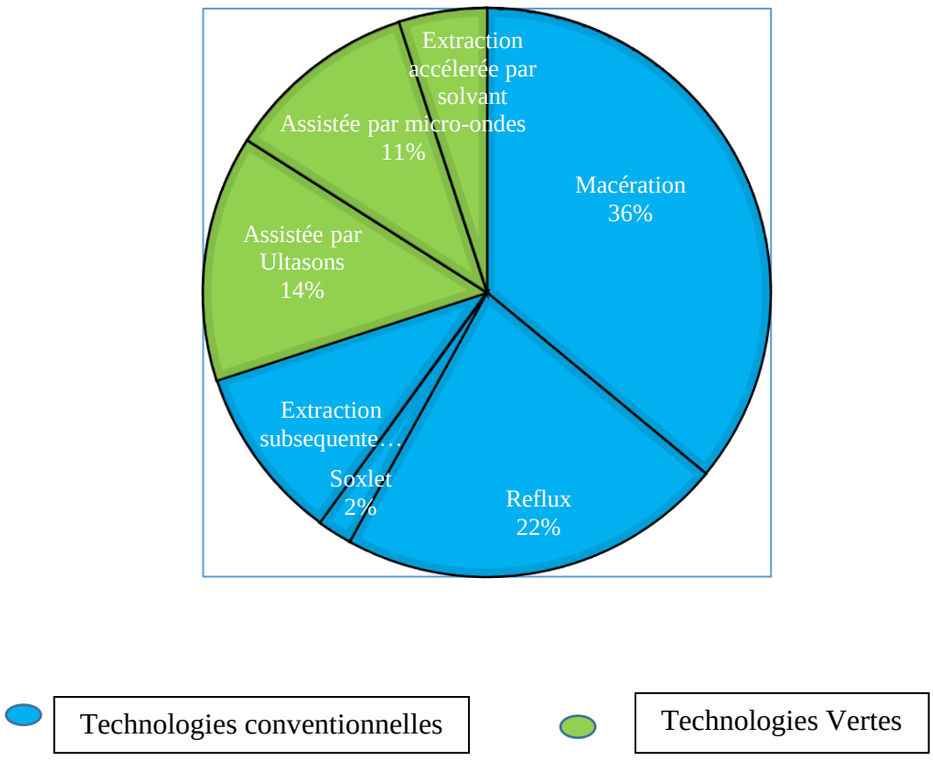


Figure 21: Techniques d'extractions actuelles utilisées pour l'extraction des saponines à partir de matières végétales [170]

Tableau 7: Choix de techniques d'extraction selon l'objectif scientifique

Plante	Techniques d'extractions des saponines	Solvant	Objectifs d'extraction des saponines	Références
Caulophyllum thalictroides	Sonication.	MeOH	Comparer les performances chromatographiques de la HPLC et de l'UPLC dans la détermination des saponines des racines.	B. Avula et al [200].
Chiococca alba	Extraction assistée par Ultrason	EtOH	Isoler cinq saponines triterpénoïdes des racines. Étudier leurs activités inflammatoire in vitro	R. M. Borges et al [201].
Bacopa monniere	Sonication (10 min).	MeOH	Séparer et isoler les saponines triterpénoïdes	M. Ganzera et al [202].
Platycodi Radix	Sonication (10 min).	H_2O MeOH	Déterminer et quantifier dix saponines majeures	Y. W. Ha et al [203].
***Gleditsia sinensis* Lam.**	Extraction assistée par Ultrason	MeOH	Déterminer le contenu en saponines	X.-Y. Lian et al [204].
Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, *Paris polyphylla* var. *chinensis	Sonication (30 min).	MeOH	Isoler et quantifier les saponines stéroïdiennes.	T. Zhang et al [205].
Panax notoginseng	Extraction assistée ultrasons pendant 20 min	MeOH	Analyser les saponines dans P. *notoginseng* cru et cuit à la vapeur	A.-J. Lau et al. [206].
***Genista ulicina* Spach**	Macération	MeOH	Caractériser les saponines de neuf espèces différentes de Légumineuses à l'aide de l'UPLC	N. Boutaghane et al [207]
Panax notoginseng	Macération	EtOH	Étudier les mécanismes des effets anti-hyper glycémiques et anti-obésité des saponines de Panax notoginseng (PNS) chez les souris KK-Ay.	C. Yang et al [208].
***Entada phaseoloides* L**	Macération	EtOH	Évaluer les effets thérapeutiques potentiels des saponines totales d'Entada *phaseoloides* contre le diabète de type 2.	Zhang et al [189].
Espèces légumineuses	Macération	MeOH	Caractériser les saponines de neuf espèces différentes de Légumineuses à l'aide de l'UPLC	T. J. Ha et al [209].
Guar meal	Extraction par reflux	MeOH	Isoler l'extrait riche en saponine. Pour évaluer ses fractions pour les activités hémolytiques et antibactériennes contre deux bactéries à Gram positif.	S. M. Hassan et al [149].
Panax japonicus	Extraction par reflux	EtOH	Étudier les effets cardioprotecteurs des saponines.	He et al [210].
Momordica charantia	Extraction par reflux	EtOH	Étudier leur activité anti-VIH in vitro Étudier deux classes de saponines, à savoir les triterpénoïdes de type cucurbitane et oléanane, pour le potentiel de réduire la viabilité des pré adipocytes, l'accumulation de lipides et l'expression de l'adiponectine dans les cellules 3T3-L1	Chen et al [211].
Aralia taibaiensis	Extraction par reflux	EtOH	Isoler quatre nouvelles saponines triterpénoïdes. Étudier leurs activités anti oxydantes et antiglycation.	Bi et al [212].
***Medicago sativa* var. Boja**	Extraction par reflux	MeOH	Déterminer la présence de saponines individuelles	Oleszek et al [213].

5.4 Techniques d'extraction des saponines chez des Astragales

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

Tableau 8: Techniques d'extraction des saponines chez les Astragales

Plante	Partie utilisée	Solvant	Saponines identifiées	Nature chimique	Technique d'extraction	Références
A. hareftae	Plante entière	Hexane MeOH	5 (Hareftoside A-E)	Triterpenoide (4 cycloartane et 1 oleanane)	Extraction par reflux	Haro et al [214].
A. glycyphylos	Racine 160 g	éther de pétrole, MeOH H_2O	(Askendoside C) (Askendoside F)	Triterpene glycoside	Percolation	Linnek et al [215].
A. sempervire	Racine (320 g)	MeOH / H_20	3-O-α-L- (Trojanoside H)	Cycloartane	Macération	Linnek et al [215].
A. gombo	P.A 1 kg	EtOH/ H_20	Gombosides A–F.	Cycloartane : triterpène glycosides	Macération	Maamria et al [216].
A. tephrosioides-	P.A (20 kg)	MeOH	1 saponine 6β-acétyloxy-3-O-β-d-glucopyranosyloxy-cycloartan-11α, 24ξ, 25-triol	Cycloartane glycoside	Sans précision	Ahmad et al [217].
A.membranaceu	Racine (549 g)	MeOH BuOH	5 saponines Agroastragaloside I et 4 astragalosides connus, l'astragalosideI, II, III et IV (identifiées aussi chez A. *mongholicus*)	Cycloartane glycoside : triterpénoïde	Extraction par à reflux	M.Hirotani et al [218].
A. caspicus	Racine	MeOH BuOH	2 nouvelles saponines: Caspicuside I Caspicuside II 2 connues Cycloastragénol Astragaloside IV	Glycoside triterpénique: cycloartane	Macération	F.Fathiazad et al [219].
A.verrucosus Moris	P.A (1100 g)	$CHCl_3$ MeOH EtOAc BuOH	1 nouvelle saponine- astraverrucine VII cycloaraloside D (peregrinoside II)	Triterpène glycoside de type cycloartane	Soxhlet	l.Pistelli et al [220].
A.membranaceusvar. mongholicus et A. membranaceus	Racine(150 g)	MeOH HCOOH	Nouvelles Astragalosides	tritérpenique	Sonication	Li et al [221].

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

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

Tableau 9: Exemples de techniques d'analyses utilisées et d'activités biologiques étudiées chez le genre Astragalus

Techniques analytiques	**Saponines identifiées**	**Activités biologiques**	**Test Biologique**	**Références**
Couplage HPLC/QTOF-MS TLC et HPLC	Astragalosides de I à V. Astragalosides I et IV	1 Protection du système cardiovasculaire 2 Antitumorales 3 Hépato protectrices	1 in vivo : modèle souris In vitro : Test histoaptholgique 2 in vivo : modèle murin. in vitro : test de cytotoxicité	C. Chu et al [222], Ma et al [223]. Zhang et al [224], Kathy K et al [225].
HPTLC et RP-HPLC	Hareftosides A–D	Non mentionnées		Haro et al [226].
UHPLC-MS	Cycloartane : Askendoside C et oléanane : Soyasapogenol B et 3 β ,22 β ,24-trihydroxyolean-12-ene-19-one	Antihypertenseur, diurétique, anti-inflammatoire, anti-tumoral, laxatif, expectorant, etc. Antinéoplasique		A.Shkondrov et al [227].
MPLC	Askendoside C (Askendoside F	Non mentionnées		Linnek et al [134].
MPLC	Trojanoside H	Activité cytotoxique contre HCT 116 et HT-29 cancer du côlon humain		Linnek et al [215].
HPLC semi-préparative	6 nouveaux glycosides triterpéniques de type cycloartane :Gombosides A–F.	Non mentionnées		Maamria et al [216].
CCM HPLC	Un nouveau lacéioside glycoside de cycloartane	Non mentionnées		Ahmad et al [217].
HPLC-MS HPLC/**ESI-MS**/MS	Acétylastragaloside I, l'astragaloside 1, l'astragaloside III et l'astragaloside IV, Mongholicoside A, Mongholicoside B	Non mentionnées		M.Hirotani et al [218], Yu et al [228].
LC – MS Chromatographie liquide sous vide (VLC)	Deux nouveaux glycosides de type cycloartane, le caspicuside I et le caspicuside II	A. *caspicus Bieb* est un remède contre un large éventail de maladies telles que la néphrite, le diabète , l'hypertension, la cirrhose, la leucémie et le cancer de l'utérus+activités		E. Graf et al [229].

Chromatographie préparative sur couche mince (PTLC)	+ deux saponines connues, le cycloastragénol et l'astragaloside IV.	antimicrobiens,anti-transpirants,anti-inflammatoires, diurétiques et toniques.		
TLC-MS	Un nouveau glycoside triterpénique de type cycloartane : astraverrucine VII. été +le cycloaraloside D (peregrinoside II) et le cycloaraloside C (astrailienine A).			Pistelli et al [220].
TLC Spectroscopie infrarouge HPLC RMN	Un nouveau triterpénoïde de type cycloartane, le 3β-acétoxy-9β,19-cyclolanost-24 *E* -ène-1α,16β-diol-27- *O* -β- d -glucopyranoside (**1**) Et 3 cycloartanes déjà identifiés (2-4)	Activité antifongique contre *Alternaria solani*		Guo et al [230].
TLC HPLC	Nouvelles saponines triterpéniques de type oléanane : 3β- *O* -[*O* -4-oxo-pentopyranosyl-(1 → 2)-β l'acide -d-glucopyranosyl]-21α-hydroxy-yoléan-12-ène-28-oïque; acide 21α-hydroxyoléan-12-ène-28-oïque 3β-4-oxo-pentopyranoside et 19α–hydroxy-yoléan-12-ène-28, 21β–olide 3-β-d-xylopyranoside .	Non mentionnées		Mitcheva et al [231].
HPTLC	Azukisaponin v/Soyasapogenol B Perigrinosid II	Modulation de la prolifération des lymphocytes [169].		Inkova et al [96], Nafti et al [232] L. Verotta et al [169].

6 Évaluation des extraits et criblage des saponines par HPTLC

6.1 Les étapes d'une HPTLC

L'HPTLC est une technique séquentielle qui implique plusieurs étapes (Figure 22). Les étapes clés sont la préparation de l'échantillon, l'application, le développement chromatographique et l'interprétation des résultats (identification/quantification). Des étapes optionnelles sont possibles : le choix et le nettoyage de la phase stationnaire, le pré conditionnement et la révélation pré/post chromatographique, et la documentation. [233].

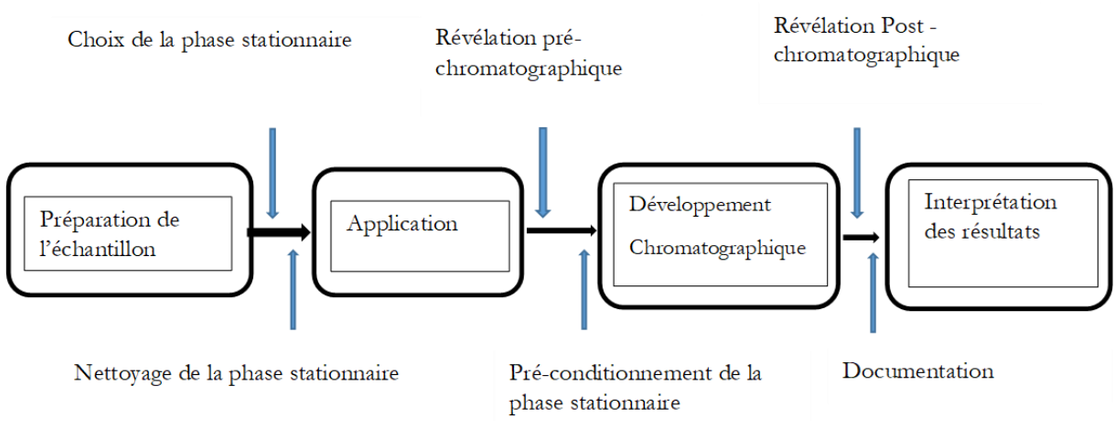


Figure 22 : Étapes d'une Analyse HPTLC

6.1.1 Préparation des échantillons

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

Dans certains cas, suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'analyse, un traitement préliminaire est utile afin de séparer la matrice de l'analyte lorsque sa présence risque d'interférer avec la détection. Cette étape peut être réalisée de différentes manières suivant la nature liquide ou solide de l'échantillon. De plus, une étape de concentration est nécessaire lorsque l'analyte recherché est dilué, notamment lorsqu'un large volume de solvant est utilisé pour l'extraction. Suivant la quantité d'échantillon et le type de composés désirés, la technique de concentration sera choisie : évaporateur rotatif, concentrateur de type Kuderna-Danish (concentrateur permettant une évaporation du solvant sans conduire à la perte de la majeure partie des composés volatils), évaporation sous flux d'azote… Les techniques d'extraction et d'isolement communément employées lors de la préparation d'échantillon sont détaillées dans le chapitre suivant : L'HPTLC et l'étape de la préparation d'échantillon [234]. Dans tous les cas la procédure idéale doit être rapide, simple, répétable et reproductible, et sans conduire à la perte d'analyte(s). Le solvant choisi ne doit pas contenir ou former d'artefact, avoir une faible toxicité, être économique et facilement évaporable.

6.1.2 Le dépôt

L'application est une étape déterminante pour la qualité du résultat chromatographique et nécessite donc de la rigueur et des conditions opératoires bien définies. Elle peut se faire manuellement ou automatiquement [235]. Lors d'une application manuelle, il est recommandé d'utiliser une micro-seringue, ou un capillaire de 1-2 µL qui donnera un dépôt de 3-4 mm (Figure 23, A). Pour un meilleur résultat, il est important de ne pas endommager la phase stationnaire, si possible en évitant tout contact. Pour éviter toute dégradation, l'application peut être automatisée ou semi-automatisée: le remplissage de la micro-seringue s'effectue manuellement (Figure 23, B) ou automatiquement (Figure 23, C), puis est suivi par une application automatisée réalisée par vaporisation ou par contact (Figure 24) [236].

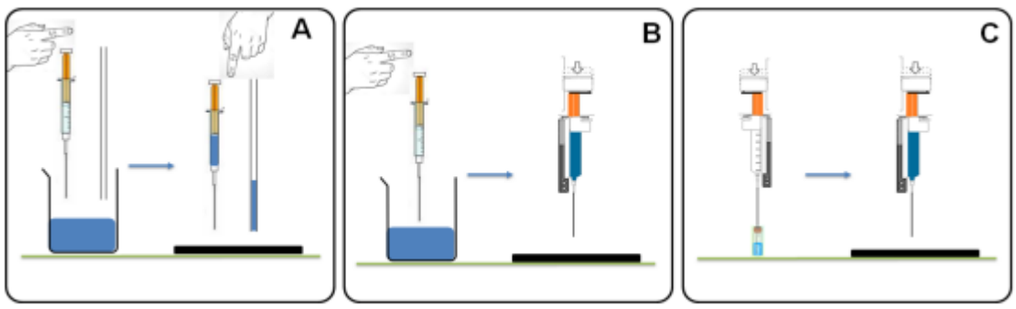


Figure 23: Schémas des différents modes d'application. A : remplissage de la seringue/capillaire et application manuels ; B : remplissage manuel et application automatisée ; C : remplissage de la seringue et application automatisés [237]

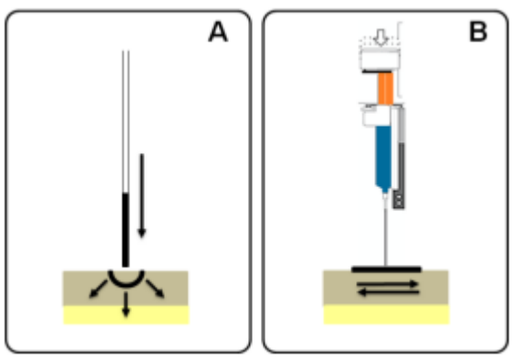


Figure 24: Schéma d'une application par contact (A) ou par vaporisation (B).

Lors de cette étape, trois paramètres sont déterminants : le volume d'application, l'état de la phase stationnaire et la zone d'application [238]:

- Le volume d'application doit être optimisé pour éviter un phénomène de saturation pouvant altérer le profil chromatographique
- La phase stationnaire ne doit pas être endommagée, ce qui induit l'utilisation préférentielle d'une application par vaporisation plutôt que par contact
- L'échantillon doit être appliqué de façon que la zone soit la plus fine possible afin d'éviter le phénomène de diffusion directement à la zone d'application. Pour une analyse qualitative, aucune séquence d'application n'est recommandée, mais pour l'analyse quantitative, il est recommandé d'appliquer deux fois toutes les solutions séparées par la moitié de la longueur de la plaque (Figure 25) [239]

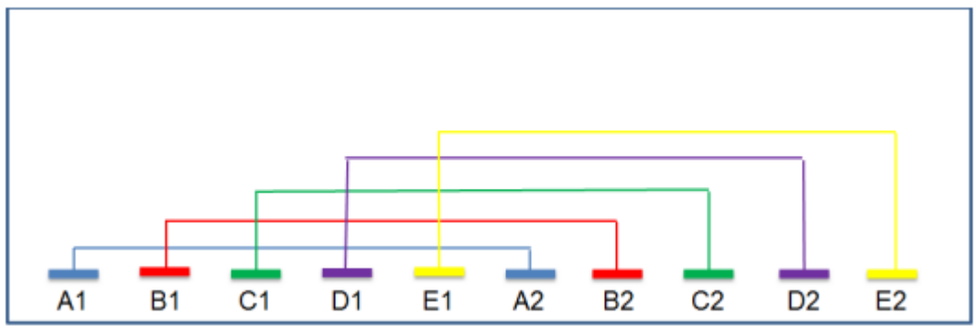


Figure 25: Exemple de dépôt

6.1.3 Le développement chromatographique

Cette étape consiste en la progression d'un solvant ou mélange de solvants (phase mobile) le long de la phase stationnaire. La migration du solvant entraine la migration des substances appliquées [236]. Il existe une multitude de cuves conçues pour contrôler les paramètres influençant le développement chromatographique.

6.1.3.1 Les cuves

Les cuves à fond plat (Figure 26) sont les chambres les plus simples. Elles sont utilisées avec ou sans saturation. Une fois la phase mobile versée au fond de la cuve, celle-ci est recouverte. Dès lors, la phase gazeuse se sature progressivement avec les vapeurs de la phase mobile. Au bout de quelques minutes, la partie inférieure de la cuve est complètement saturée, la partie médiane à 75 % et la partie supérieure beaucoup moins. Lorsque la plaque est placée à l'intérieur de la cuve, la phase stationnaire est directement mise en contact avec la phase gazeuse saturée et s'en imprègne. Simultanément, la phase mobile migre par capillarité le long de la phase stationnaire [233].

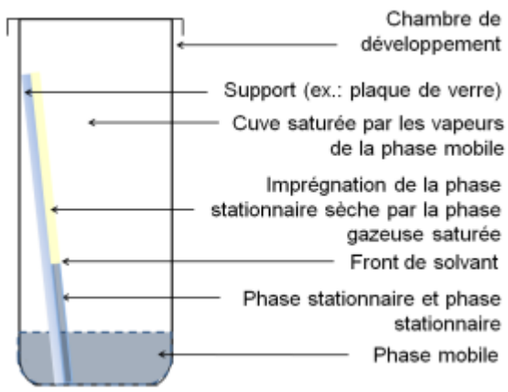


Figure 26: Présentation et fonctionnement d'une cuve à fond plat.

Il existe également des cuves à double fonds qui dérivent des cuves à fond plat par la création de deux espaces distincts. Cette modification permet d'utiliser la cuve de la même façon qu'une cuve à fond plat (Figure 27, A), mais permet également d'imprégner la phase stationnaire de vapeur de solvant (pré-conditionnement) (Figure 27, B), ou bien d'effectuer la migration dans une phase saturée de vapeur de solvant (Figure 27, C). En mode pré-conditionnement, le solvant est introduit dans un bac alors que la plaque est placée dans l'autre. La phase stationnaire est ainsi mise en

contact pendant un temps défini avec les vapeurs [236]. L'utilisation d'une cuve à double fond dans les modes saturation et pré-conditionnement permet de rendre l'analyse plus reproductible.

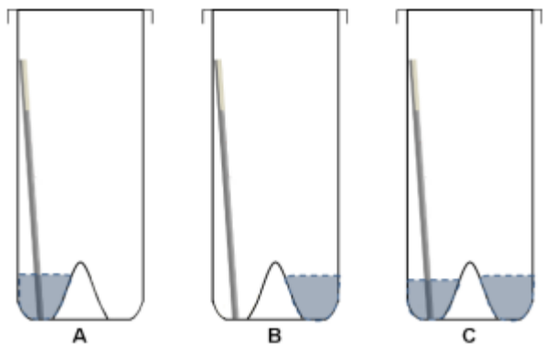


Figure 27: Exemples d'utilisation d'une cuve à double fond [237]

Les cuves horizontales, comme les deux cuves précédentes, peuvent s'utiliser avec ou sans saturation suivant l'utilisation d'une contre-plaque et d'un solvant placé dans le réservoir central (c.f. le mode « sandwich »). La phase stationnaire est placée face en bas, et la phase mobile est introduite dans les réservoirs. La lamelle est ensuite poussée avec la vis jusqu'à former un film capillaire le long de celle-ci. Ce film capillaire est par la suite transféré sur la couche (Figure 28). L'utilisation de cette cuve permet d'utiliser les deux cotés simultanément et ainsi doubler le nombre de dépôts.



Figure 28: Schéma d'une cuve horizontale

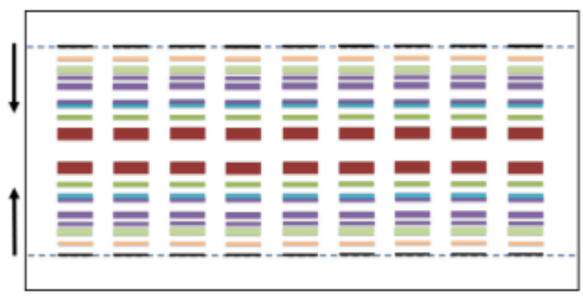


Figure 29: Résultat d'une utilisation des deux côtés d'une cuve horizontale

Dans la lignée des cuves horizontales, il existe les cuves Vario conçues pour la recherche de phase mobile. Ces cuves contiennent six compartiments indépendants permettant le test simultané de six phases mobiles différentes. Si une phase de conditionnement est requise, le réservoir prévu à cet effet est alors rempli. Ensuite, la phase stationnaire est préparée pour obtenir six canaux. Le développement a lieu avec le même principe de fonctionnement que les cuves horizontales classiques [236], [240].



Figure 30: Préparation de la phase stationnaire/développement possible avec 6 phases mobiles différentes

Enfin, il existe les cuves automatiques permettant de rendre plus répétable/reproductible le développement. Dans ce cas, le niveau de migration est suivi à l'aide d'un capteur, qui lorsque la migration atteint la distance souhaitée, relève la plaque et commence le séchage. Parmi les cuves automatiques, il existe les cuves à flux forcé (over-pressurized liquid chromatography OPLC) avec lesquelles la phase stationnaire est placée dans une enceinte fermée sous pression. La phase mobile est ensuite introduite par flux forcé dans la phase stationnaire. L'influence de la phase gazeuse est donc ignorée [241].

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

6.1.3.2 Modes de développement

Il existe différents modes de développement : linéaire, circulaire ou anti-circulaire (Figure 31). En ce qui concerne le développement linéaire, la migration peut s'effectuer verticalement ou horizontalement suivant le type de chambre utilisée. Lors d'une migration verticale, l'échantillon est appliqué en bas de la plaque (Figure 31, A), alors que lors d'une migration horizontale l'échantillon est appliqué des deux côtés de la plaque. La majorité des analyses utilisent le développement linéaire avec une migration verticale. Après l'application, la plaque est immergée sur quelques millimètres, puis par capillarité, la phase mobile migre jusqu'à la distance de migration souhaitée. Les développements circulaires utilisent les forces centrifuges ou centripètes pour éluer la phase mobile à travers la phase stationnaire en faisant tourner la plaque autour d'un axe central. Les développements circulaires induisent souvent des RF plus élevés que des développements linéaires (Figure 31, B : centrifuge, C : centripète) [239].

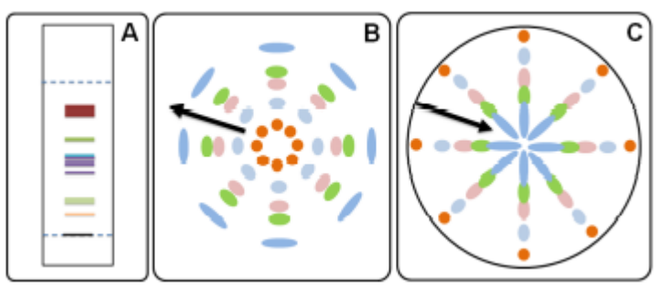


Figure 31: Schéma des différents modes de développement chromatographique. A : linéaire ; B : circulaire (centrifuge); C : circulaire (centripète) [237].

A ces développements s'ajoutent les développements multiples et les développements multidimensionnels. Les développements multiples consistent à faire subir à la phase stationnaire des développements successifs. Pour cela, une première migration est opérée jusqu'à une distance de migration définie. La plaque est ensuite retirée et séchée, puis elle subit un deuxième développement utilisant une phase mobile identique ou différente, sur une distance de migration

identique au premier développement ou différente. La Figure 32 donne des exemples d'utilisation des développements multiples. Le cas (A) est utilisé lorsque des composés apolaires doivent être séparés. Pour cela, ils sont élués en haut de plaque à l'aide d'une première migration. Lors du deuxième développement, la distance de migration est plus courte. Dans le cas où les composés polaires doivent être éliminés (B), une première migration est opérée sur une courte distance avec un solvant très polaire. Puis une seconde migration est réalisée avec une phase mobile moins polaire. De cette façon, les composés polaires sont retenus en bas de plaque. Le cas (C), est par exemple utilisé pour augmenter la résolution entre des composés. Ce type de développement a été utilisé pour séparer les propyl-, éthyl-, et méthylparaben. Pour cela, la plaque est développée 3 fois avec la même phase mobile sur une même distance de migration [242]. Le même procédé a été utilisé pour la séparation de l'hexose et du déoxyhexose à l'aide de trois développements consécutifs avec le même solvant de développement [243].

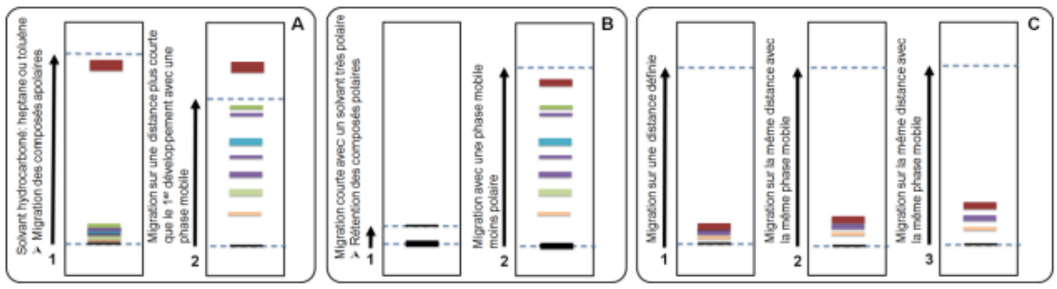


Figure 32: Les développements multiples peuvent être réalisés automatiquement à l'aide d'un instrument spécifique. Dans ce cas, la plaque est développée de façon répétée dans la même direction. Chaque élution utilise un solvant de migration de force éluante plus plusieurs migrations successives avec une phase mobile identique [244].

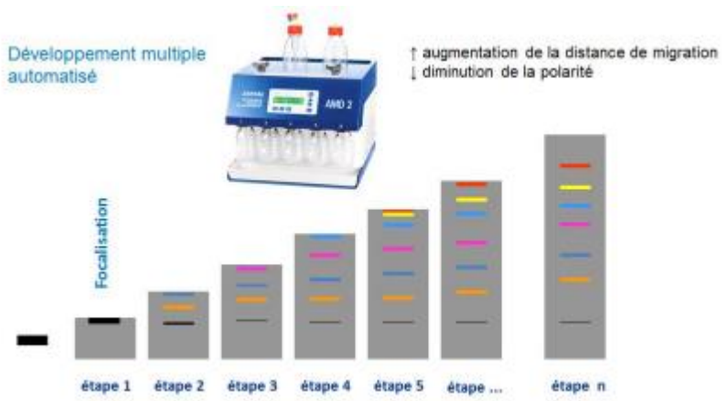


Figure 33: Fonctionnement du développement multiple automatisé (AMD)

De façon générale, lors des développements multidimensionnels, l'échantillon est appliqué sous forme d'une tache sur la phase stationnaire dans un coin inférieur de la plaque (Figure 34, A1). La phase stationnaire est ensuite développée dans une première dimension (Figure 34, A2). Ensuite, après séchage, elle est tournée de 90° et développée dans une deuxième dimension avec une deuxième phase mobile (Figure 34, A3). Le cas B de la Figure 34, un développement multidimensionnel est utilisé pour l'analyse des aflatoxines, mais cette fois en faisant pivoter la phase stationnaire de 180°, c'est-à-dire en inversant le sens de l'élution [245].

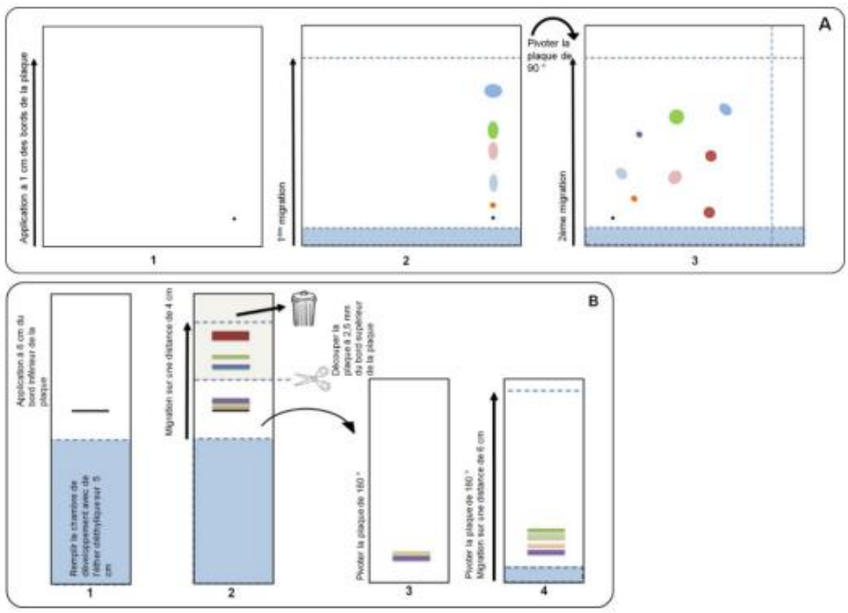


Figure 34: Schémas des développements multidimensionnels

Le développement en mode « sandwich » est réalisé en recouvrant la phase stationnaire d'une contre plaque en verre maintenue par des pinces. De cette façon, la phase gazeuse est occultée (Figure 35) ce qui permet de ne pas tenir compte du phénomène de saturation en vapeurs de solvant dans la cuve de développement. Le mode « sandwich » peut être adapté aux cuves à fond plat, aux cuves à double fond, et aux cuves horizontales [241].



Figure 35: Schéma de l'utilisation du mode « sandwich ». A : vue de profil ; B : vue de face

6.1.4 La détection

6.1.4.1 Détection sans traitement chimique

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

6.1.4.2 Visualisation à UV 254 nm

F254 doit être décrit comme une extinction de phosphorescence. Dans ce cas, la fluorescence reste pendant une courte période après la suppression de la source d'excitation. C'est très court, mais plus de 10 secondes [246]. L'indicateur fluorescent F254 est excité avec une longueur d'onde UV à 254 nm et émet une fluorescence verte [247]. Les composés absorbant le rayonnement à 254 nm réduisent cette émission sur la couche, et une tache violet foncé sur fond vert est observée là où se situent les zones composées [250, 251]. Cette extinction est causée par tous les composés avec des

doubles liaisons conjuguées. Anthraglycosides, coumarines, flavonoïdes, polyphénols dans les huiles essentielles, certains types d'alcaloïdes tels que l'indole, les alcaloïdes d'isoquinoléine et de quinoléine, etc. devraient être détecté sous 254 nm [252, 253].

6.1.4.3 Visualisation à UV 366 nm

F366 doit être caractérisé comme un processus de trempe de fluorescence, caractérisé par l'extinction de la fluorescence après l'excitation initiale[246]. Cette trempe est montrée par tous les anthraglycosides, coumarines, flavonoïdes, Acides phénolcarboxyliques, certains types d'alcaloïdes (Rauwolfia, alcaloïdes Ipecacuanha) [250].

6.1.4.4 Détection après traitement chimique ou dérivatisation

La dérivatisation peut être définie comme une technique qui modifie principalement la fonctionnalité d'un analyte afin de permettre sa séparation chromatographique et son identification. La dérivatisation peut être réalisée soit par immersion des plaques soit par pulvérisation des plaques avec un réactif approprié (Tableau 10) [254, 248, 255]. Pour une meilleure reproductibilité, l'immersion est privilégiée comme technique de dérivatisation.

Tableau 10: Exemple de révélateurs utilisés en HPTLC, leurs composés cibles et leurs colorations obtenues.

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

6.1.5 La documentation

6.1.5.1 Imagerie

L'imagerie consiste à illuminer la plaque sous lumière blanche, ou sous UV à 254 ou 366 nm puis à sauvegarder électroniquement l'image qui en résulte (Figure 36). De cette façon, le chromatogramme HPTLC peut être facilement archivé, édité et retraité [237].

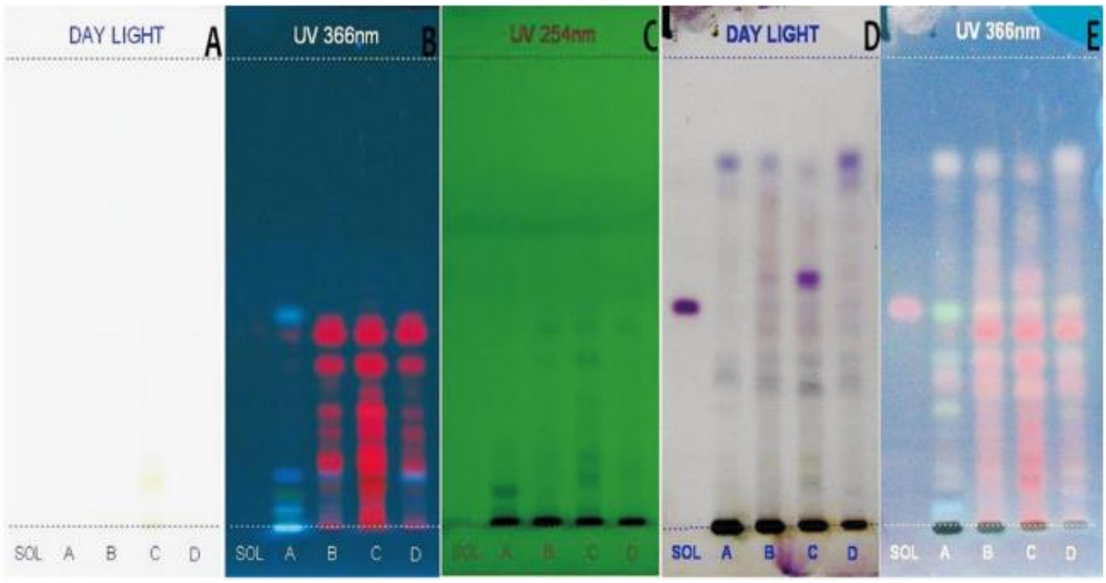


Figure 36: Exemple des Profil HPTLC pris sous lumière blanche, sous UV à 366 et 254 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche à 366 nm après dérivatisation (successivement)

6.1.5.2 La densitométrie

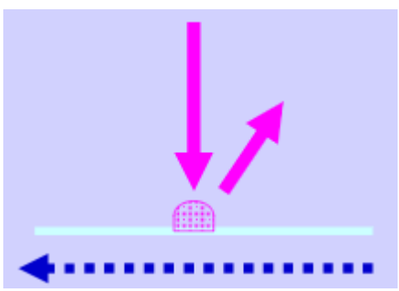
La chromatographie instrumentale en couche mince doit être capable de recourir à la fois à la densitométrie classique et à l'acquisition électronique d'images. La densitométrie utilise une lumière monochromatique et une fente de longueur et de largeur sélectionnables pour balayer les pistes d'un chromatogramme,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

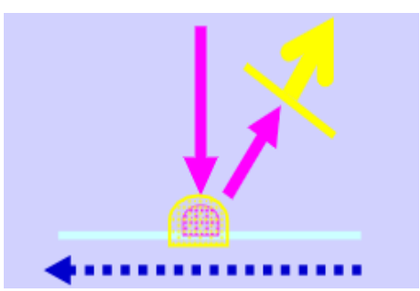
Le scanner TLC utilise toute la gamme spectrale de 190 à 900 nm avec une sélectivité spectrale élevée pour l'acquisition de données.

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

Les points forts de la densitométrie classique sont les résolutions de la source lumineuse et reproductibilité plus élevée de déterminations quantitatives [252].

La densitométrie peut être effectuée en deux modes : absorbance ou fluorescence. En mesure d'absorbance, la lumière réfléchie de manière diffuse à partir de la plaque représente la ligne de base qui est réduite lorsque le faisceau lumineux frappe une zone d'absorption. La mesure de la fluorescence nécessite un filtre pour éliminer efficacement la lumière utilisée pour l'excitation. La lumière fluorescente peut, elle, passer le filtre et atteindre le détecteur [254].





En absorbance la mesure est négative, et donc ne peut pas être linéaire sauf dans les faibles concentrations de molécule sur la plaque. Il est conseillé d'utiliser des courbes de Michaelis-Menten Y=ax+b	En fluorescence, on ne mesure que la lumière réémise au-delà de la longueur d'onde du filtre. La mesure est positive, et donc est linéaire sauf dans les cas de 'quenching' (saturation). La sensibilité est très importante (pas de bruit de fond)

6.1.6 Avantages et inconvénients de HPTLC

Tableau 11: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de l'utilisation de l'HPTLC

Avantages	Inconvénients
• Technique visuelle • Analyse simultanée de plusieurs échantillons • Consommation de solvant faible • Chaque étape peut être manuelle ou automatisée • Chaque étape est indépendante des autres (off-line) • La préparation de l'échantillon n'est pas contraignante • La phase stationnaire est un consommable • Trois types d'applications possibles • Large gamme de volume d'injection possible (0,5 à 500 µL) • Grand nombre de phases stationnaires commercialisées • Le processus chromatographique est visible et peut être arrêté par l'opérateur en temps réel • La totalité de l'échantillon appliqué sur la plaque est analysée (pas de rétention, la zone d'application est prise en compte) • Plusieurs détections possibles (transformation chimique, réaction microbiologique, couplage analytique …) permettant de détecter des composés non visibles (sous UV ou en lumière visible, ou encore d'accroitre la détection de certains	• Chacune des étapes a une influence sur la suivante • L'application d'un trop grand volume peut entraîner un début de séparation pendant le dépôt • Application peut prendre du temps • Le profil chromatographique est difficile à décrire et à prédire • Résolution • Limite de détection • Nombre de fournisseurs limité, prix des équipements élevé

7 Conclusion

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

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

Chapitre 2 : Matériel & Méthodes

.

Introduction :

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

1 Matériel végétal

4 populations ont été choisies, provenant de 4 localisations géographiques différentes en Tunisie (Figure 37):

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



Figure 37: Carte de la Tunisie

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

1.1 Coordonnées GPS des lieux de collecte

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

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



Figure 38: Spécimens Bizerte (a) et Siliana (b)



Figure 39: Spécimens Zaghouan (c) et Kairouan (d)

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

2 Détermination des taux d'extractibles

La détermination du potentiel en composés extractibles est réalisée selon une méthode gravimétrique au moyen du Système Fibertec Tecator M1017- Hot extractor (Figure 40).

Les extractions sont réalisées en triplicata moyennant deux solvants choisis qui sont l'eau et l'éthanol d'après le protocole suivant :

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

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

Avec

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

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

m_t = masse du fritté vide (en g)

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

MS = matière sèche



Figure 40: Système Tecator Fibertec M1017

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

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

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

Avec

M0 = masse du creuset vide (en g)

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

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

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

4.1 Protocoles d'extraction pour le criblage des saponines :

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

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

4.1.1 Description de la méthode d'extraction méthanolique M1

Une méthode M1 d'extraction solide liquide simple a été mise en œuvre selon la méthode de Khakimov et al. (2016) [255] avec quelques modifications, pour les 4 populations, Bizerte, Siliana, Kairouan et Zaghouan (Figure 41).

Différentes quantités de matière première ont été évaluées pour la population de Bizerte : 25, 50, 100, 150, 200, 250, et 300 mg de matière sèche broyée en poudre fine. La poudre végétale a été mélangée avec 1,5 mL de MeOH 85% dans des tubes Eppendorf et ensuite chauffée à 100° C et agitée dans un Vortex en alternance pendant 5 minutes. Il faut signaler que cette étape a été choisie pour remplacer l'utilisation de thermo mixeur par rapport à l'article d'origine [255]. Cette étape a été suivie d'une centrifugation à 15000 g pendant 3 minutes. Ensuite les surnagent récupérés ont été analysés par HPTLC. Cette population a été choisie dans un premier temps pour l'étude préliminaire de mise au point des paramètres analytiques (quantité de matière et concentration des extraits).

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

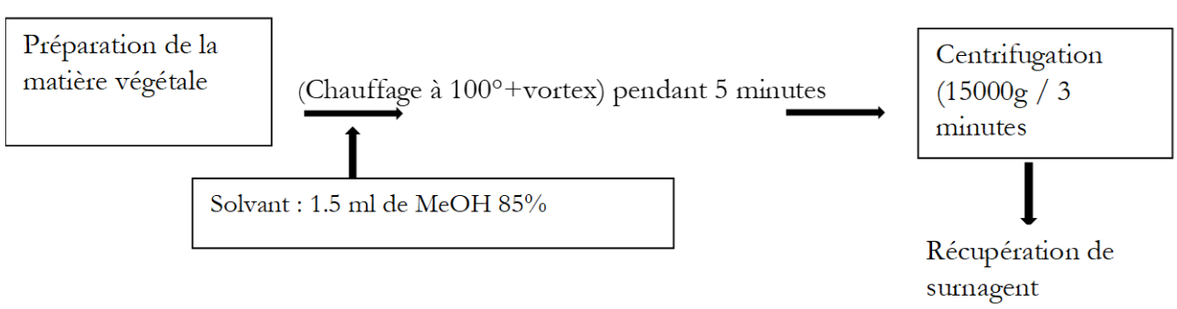


Figure 41: Schéma simplifié de l'extraction méthanolique solide liquide selon la méthode M1

Tableau 12: Les extraits obtenus selon la méthode d'extraction M1 et leurs utilisations dans les analyses ultérieures

Population	Extraits dans 1,5 mL de MeOH 85%	Code échantillon	Analyse
Bizerte	25 mg 50 mg 100 mg 150 mg 200 mg 250 mg 300 mg	BI-25 mg - M1 BI-50 mg - M1 BI-100 mg - M1 BI-150 mg - M1 BI-200 mg - M1 BI-250 mg - M1 BI- 300 mg - M1	HPTLC • Test d'ELLMAN • Extraits BI à 25 et 300 mg : HPLC-SM² • Extrait BI-300 mg : HPTLC Semi Préparative couplée HPLC-SM² •
Siliana	25 mg	SIL- 25 mg- M1	• HPTLC • Ellman • Activité cytotoxique • Activité neuroprotectrice • Activité antiradicalaire
Kairouan	25 mg	KAI- 25 mg- M1	
Zaghouan	25 mg	ZA-25mg- M1	

4.1.2 Description du protocole d'extraction P1 :

Le protocole d'extraction P1 a été adapté à partir des travaux de Ma et al. (2002) [223].

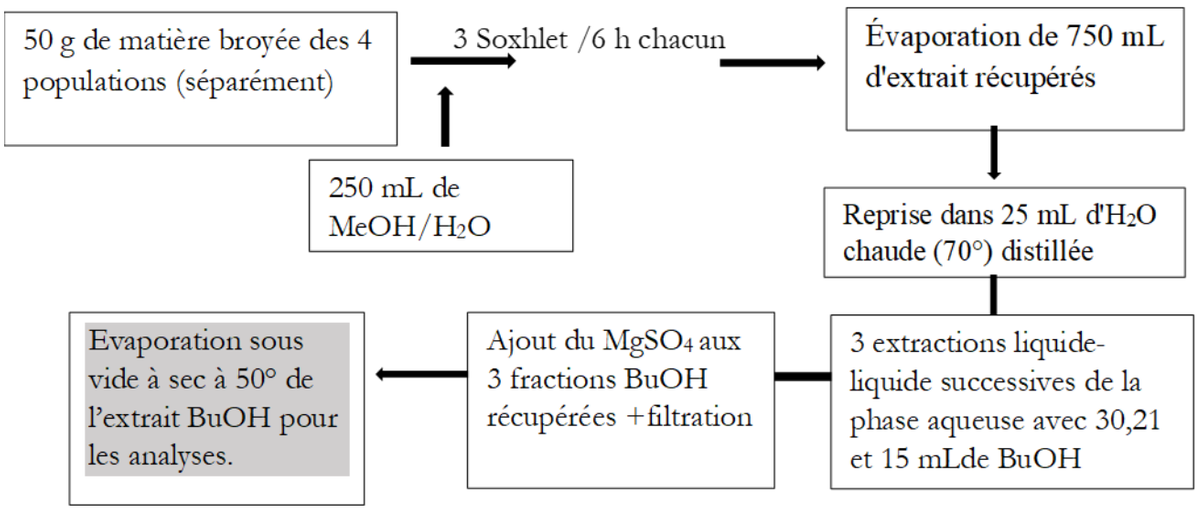


Figure 42: Schéma simplifié du protocole d'extraction P1 pour les 4 populations, Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan

4.1.3 Description du protocole d'extraction P2 :

Le protocole d'extraction P2 utilisé est celui de Kambouche et al. (2011) [256].

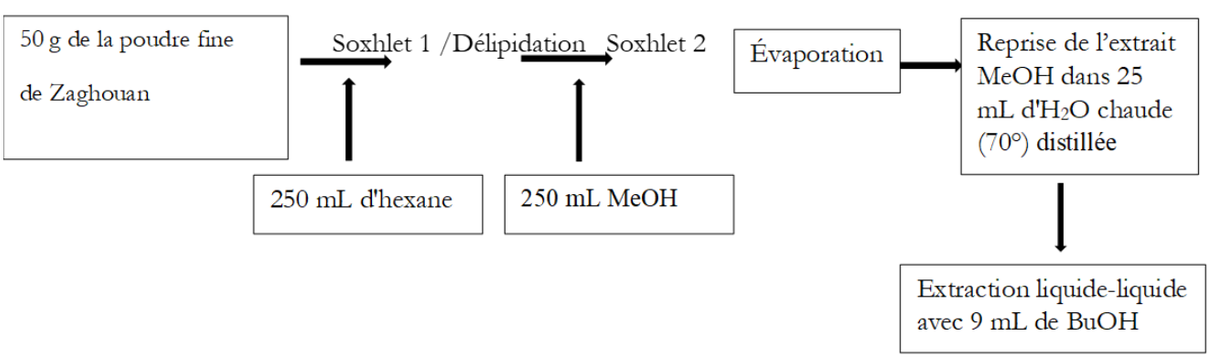


Figure 43: Schéma simplifié du protocole d'extraction P2 pour la population Zaghouan

4.1.4 Description du protocole d'extraction P3 :

Le protocole d'extraction P3 est celui de Maamria et al. (2015) [216].

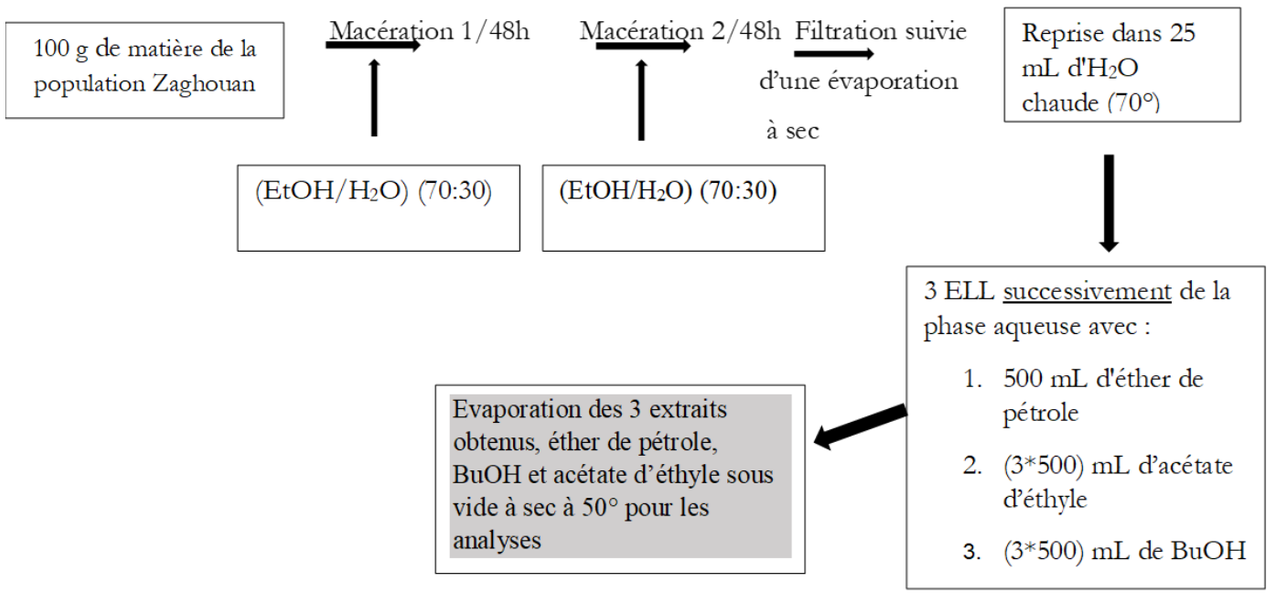


Figure 44: Schéma simplifié du protocole d'extraction P3 pour la population Zaghouan

4.1.5 Description du Protocole d'extraction P4 :

Le protocole d'extraction P4 est celui de Pistelli et al. (2003) [220].

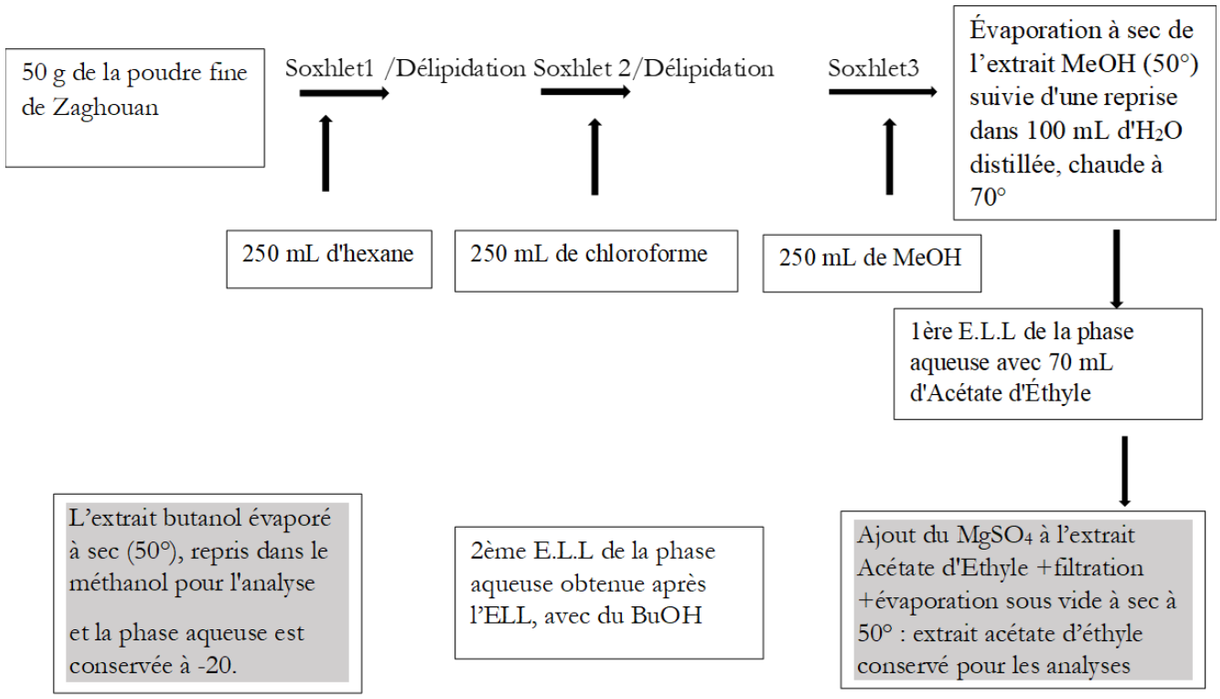


Figure 45: Schéma simplifié du protocole d'extraction P4 pour la population Zaghouan

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

Les différents protocoles mis en œuvre ont fourni au total 26 fractions qui sont visualisées par les figures 41 et 42 et récapitulées dans le tableau 13.

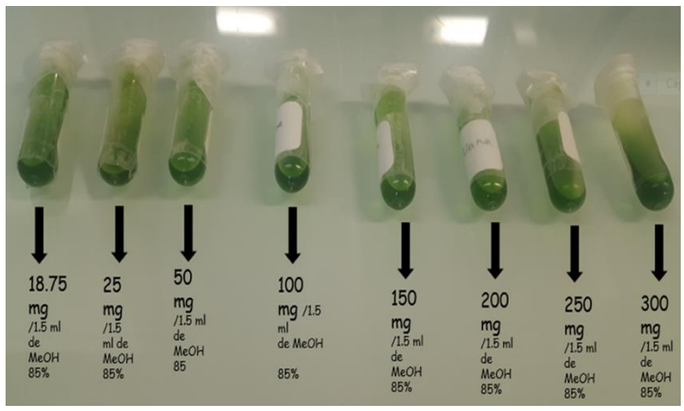


Figure 46: Extraits de Bizerte obtenus selon M1



Figure 47: Extraits des 4 populations Siliana, Bizerte, Zaghouan et Kairouan, obtenus selon les protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4.

Les extraits obtenus par P1, P2, P3 et P4 pour analyse sont récapitulés dans le tableau 13.

Tableau 13: Fractions obtenues aux différentes phases d'extraction des protocoles P1, P2, P3 et P4.

Protocoles	Population	Code échantillon	% MS	Extrait	Solvant d'extraction	Solvant pour analyse	Volume solvant repris pour analyse (mL)	Masse finale de la matière extraite (g)	Concentration en g/L	Rendement (m/m%)
P1	ZA	ZA_1M	90,46	$MeOH/H_20$ (750 mL)	3 soxhlets $MeOH/H_20$ (4/1) + 3 ELL $BuOH/H_2O$					
	SIL	SIL_1M	89,92	$MeOH/H_20$ (750 mL)						
	BI	BI_1M	89,28	$MeOH/H_20$ (750 mL)						
	KAI	KAI_1M	90,25	$MeOH/H_20$ (750 mL)						
	ZA	**ZA-P1**		BuOH		MeOH	5	2,86	572	6,3
	SIL	**SIL-P1**		BuOH		MeOH	12	3,69	307	8,1
	BI	**BI-P1**		BuOH		MeOH	10	3,6	369	8
	KAI	**KA-P1**		BuOH		MeOH	200	2,83	70	6,3
P2	ZA	ZA_2M	90,46	MeOH	Soxhlet hexane + soxhlet MeOH/ + ELL BuOH					
		ZA-P2-HEX		Hexane		Hexane	5	2,04	203	4,45
		ZA-P2		BuOH		MeOH	5	2,08	416	4,53
P3	ZA	ZA_3E	90,46	$EtOH/H_2O$	2 macérations successives $EtOH/H_2O$ + ELL éther de pétrole + ELL Acétate d'ethyle + ELL BuOH					
		ZA_3EP		EP						
		ZA_3AE		AE						
		ZA-P3		BuOH		MeOH	5	4,47	890	4,84
	SIL	**SIL-P3**		BuOH		MeOH	5	3,32	664	
	KAI	**KAI-P3**		BuOH		MeOH	6	4,11	685	
	BI	**BI-P3**		BuOH		MeOH	5	3,89	778	
P4	ZA	ZA_4M		MeOH	3 soxhlets successifs : hexane, chloroforme et MeOH +2 ELL successives AE + ELL butanol					
		ZA_4H		Hexane		Hexane	5	2,15	430	4,71
		ZA_4Ch		Chloroforme		Chloroforme	10	2,1	201	4,6
		ZA_4AE		AE		MeOH	5	3,52	704	7,72
		ZA-P4		BuOH		MeOH	5	2,04	408	4,47
	SIL	**SIL-P4**		BuOH		MeOH	6	0,5	83.3	1,09
	BI	**BI-P4**		BuOH		MeOH	10	0,86	86	1,88
	KAI	**KAI-P4**		BuOH		MeOH	5	0,58	116	1,28

5 Évaluation des extraits obtenus par analyse HPTLC

5.1 Description des paramètres d'analyses HPTLC appliqués :

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

Deux systèmes de développement différents ont été choisis :

a. Système de développement S1 : (30 mL de chloroforme/15 mL d'hexane/5 mL de méthanol)

b. Système de développement S2 : 3 systèmes de solvants.

Les systèmes de solvants sont (en volume) :

- SS1 –Dichlorométhane et MeOH (92:8) jusqu'à 26 mm pour les méthylxanthines (ou 2 min de développement);
- SS2 - EtOAc, toluène, acide formique et H2O (8,7:1,3:1,7:0,4) jusqu'à 70 mm pour les composés phénoliques.
- SS3 - EtOAc, toluène, acide formique et H2O (9:1:2,5:1) jusqu'à 70 mm pour les saponines.

Pour les deux Systèmes 1 et 2 :

Les développements ont été effectués dans une chambre de développement à doubles fonds. Le mélange de solvant est déposé dans les deux fonds (20 mL coté plaque et 10 mL coté solvant) pour saturer la chambre en gaz de solvant pendant deux heures avant de commencer l'élution. Pré

dosage volume 1000 nL, volume excédentaire 5000 nL, volume de rétraction 100 nL, vitesse de livraison 150 nL.s^{-1},vitesse de remplissage 500 nL.s^{-1}, temps de rinçage 10 s, volume de compression 300 nL, compression temps 10 s, volume de décompression 240 nL. La première position d'application X a été fixée à 15 mm et la position d'application Y à 10 mm. La distance entre les pistes a été calculée automatiquement à partir du nombre de dépôts. Le mode d'application par pulvérisation a été utilisé, avec une bande vitesse de 5 mm.s^{-1} et une temporisation de démarrage de 50 ms. La longueur de la bande a été fixée à 4 mm. Les photos des plaques non dérivatisées ont été prises à 254 et 366 nm en utilisant le Visualizer (CAMAG, Muttenz, La Suisse) et les photos de plaques derivatisées ont été prises sous de la lumière blanche.

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

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

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

Pour la dérivatisation, les plaques ont été plongées dans une solution d'anisaldéhyde sulfurique (anisaldehyde-H2SO4) avec un TLC Immersion Device III CAMAG (Muttenz, Suisse), à une vitesse d'immersion de 2 cm.s^{-1}, avec un temps d'immersion de 2 s. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve à 100 °C pendant 8 min à 10 min.

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

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

5.2 Séparation des molécules selon leurs polarités et révélation des triterpénoides par l’anisaldéhyde sulfurique

5.2.1 Analyses préliminaires pour la mise au point des conditions opératoires d’HPTLC et pour le criblage des saponines triterpénoides

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

Différents essais de dépôt HPTLC ont été réalisés à différentes teneurs en extraits allant de 25 à 300 mg (dans 1,5 mL de méthanol/eau (85/15)). Seuls les dépôts à 25 mg (Figure 48-a) et 300 mg (Figure 48-b) sont présentés.

La plaque utilisée est en gel de silice. L’élution a été réalisée selon le premier système de développement S1 et la détection est faite par révélation à l’anisaldéhyde sulfurique sous lumière

blanche. 10 µL d'extrait ont été déposés en duplicata, et 5 µL pour les standards solanine, senégnine et digitonine dont la concentration est 1 g/L (0,005 mg de matières).

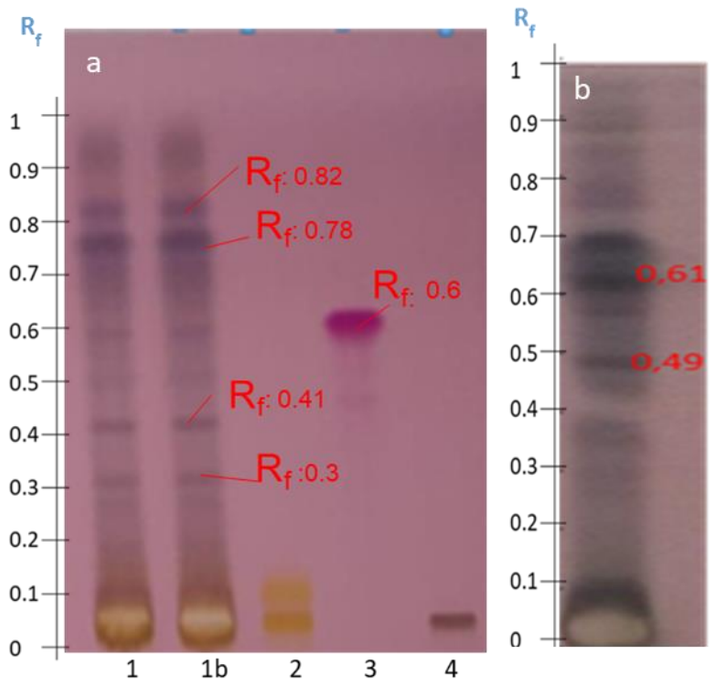


Figure 48: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 de l'extrait de Bizerte (25 mg)(a) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), senégnine (Piste 3), et digitonine (Piste 4) et de de Bizerte (300 mg). Système d'élution S1.

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

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

Les extraits obtenus selon M1, des 4 populations sont analysées conjointement sur une même plaque BI-25-M1, SIL-25-M1, ZAI-25-M1 et KAI-25-M1. 10 µL d'extrait et 5 µL des standards senégnine, digitonine et solanine dont la concentration est 1 g/L (0,005 mg de matière pour 5 µL de dépôt). La plaque utilisée est en gel de silice 20*10 cm. L'élution a été réalisée selon le premier système de développement S1. L'interprétation des résultats a été faite par la visualisation de la plaque à 366 nm avant dérivatisation et sous lumière blanche après la dérivatisation par l'anisaldéhyde sulfurique et par densitométrie de 200 à 500 nm avant la dérivatisation et à 500 et 600 nm après la dérivatisation.

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

Pour cette étude, les extraits de la population de Zaghouan obtenus par les différents protocoles P1, P2, P3 et P4 sont utilisés à isocencentration de 5 g/L. Trois volumes différents 4, 6 et 10 µL pour chaque extrait ont été déposés, ils correspondent successivement aux dépôts de 0,02, 0,03 et 0,05 mg de matière. La solanine, la senégnine et la digitonine ont été déposées deux fois, à 6 et 10 µL (0,006 mg et 0,01 mg de matière). Un 4ème standard a été ajouté, l'acide oléanolique qui est l'aglycone d'une saponine triterpénique dont la concentration est 1,02 g/L. 6 et 10 µL ont été déposés (0.006 et 0.01 mg successivement). En plus des standards de type saponine, un standard de sucre a également été ajouté, un mélange de glucose/fructose dont la concentration est de 0.5

g/L, a été déposé deux fois à 6 et 10 µL (0,003 et 0,005 mg successivement). La plaque utilisée est en gel de silice 20*10 cm. L'élution a été réalisée selon le premier système de développement S1.

La plaque de silice a été visualisée sous lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique et sous UV à 366 nm avant dérivatisation (Figure 49). Après l'étude de cette HPTLC et d'autres complémentaires mais non montrées dans le manuscrit, il a été décidé que 10 µL seraient déposés préférentiellement pour le screening des saponines d'*Astragalus hamosus L.* pour les extraits issus des protocoles M1, P1, P2 et P4 correspondant à 0,05 mg de matière. Cependant, pour les extraits issus du protocole d'extraction P3, 25 µL seraient déposés correspondant à 0,125 mg de matière, tout en gardant une solution mère de concentration à 5 g/L. 10 µL des standards solanine, sénégnine, digitonine, acide oléanolique et glucose-fructose, seront déposés pour les analyses HPTLC.

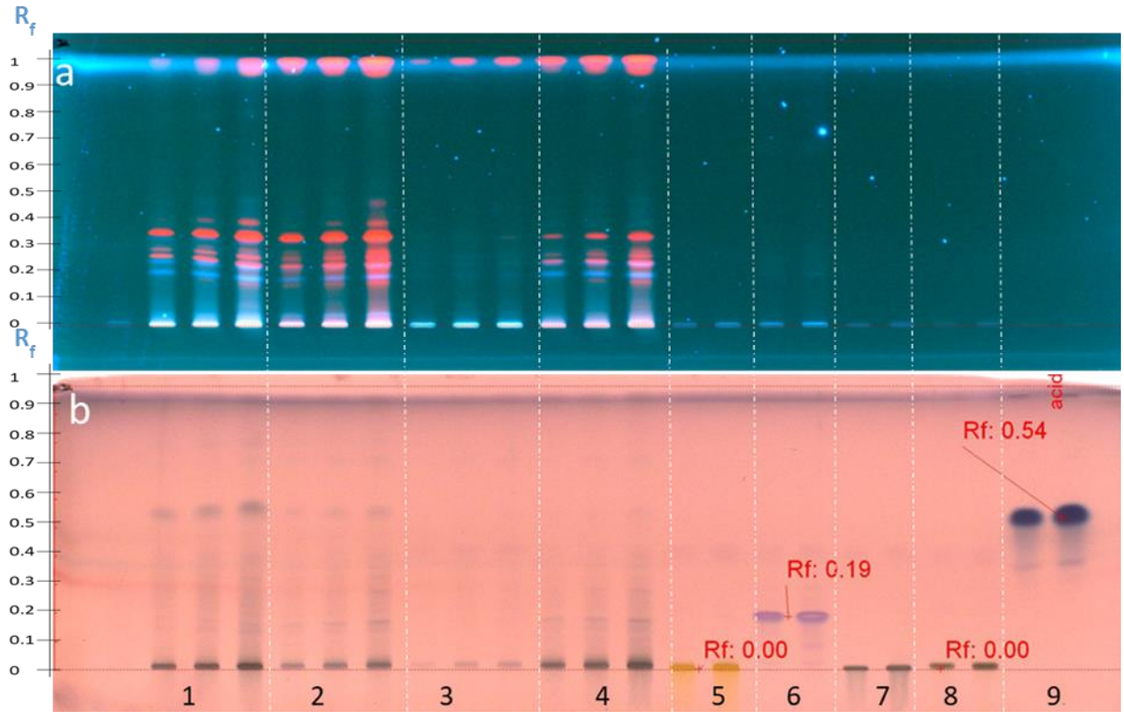


Figure 49: Profil HPTLC des 4 extraits de Zaghouan obtenus selon P1 (piste1), P2 (piste 2), P3 (piste 3)et P4 (piste 4)en triplicata (4, 6 et 10 µL successivement pour une isocencentration de 5 g/L), ainsi que les standards, solanine (piste 5), (piste 6), digitonine (piste 7), glucose-fructose (piste 8) et l'acide oléanolique (piste 9) avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (b) sous lumière blanche.

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

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

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

10 µL des extraits de Zaghouan obtenu selon P1, P2, P3 et P4 et selon M1 (0,05 mg de matière) ont été déposés sur plaque de silice. Ont été déposés 10 µL de soyasaponine B dont la

concentration est de 1 g/L (0,01 mg de matière), 5 µL de Soyasapogénol dont la concentration est de 1,86 g/L (0,0093 mg de matière), 5 µL pour les standards solanine, senégnine et digitonine dont la concentration est de 1 g/L (0,005 mg de matière) et finalement 10 µL d'acide oléanolique dont la concentration est de 1,02 g/L (0,01 mg de matière). Le système de développement est S2 et la détection a été mise en œuvre par la dérivatisation à l'anisaldéhyde et avant dérivatisation sous UV à 366 nm.

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

Les mêmes extraits cités précédemment ont été analysés une deuxième fois en gardant les mêmes paramètres HPTLC mais en augmentant le volume de dépôt pour ZA-P3 (25 µL).

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

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

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

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

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

6 Analyse par spectrométrie de masse trappe d'ions en mode ESI-(SM, SM^2)

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

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

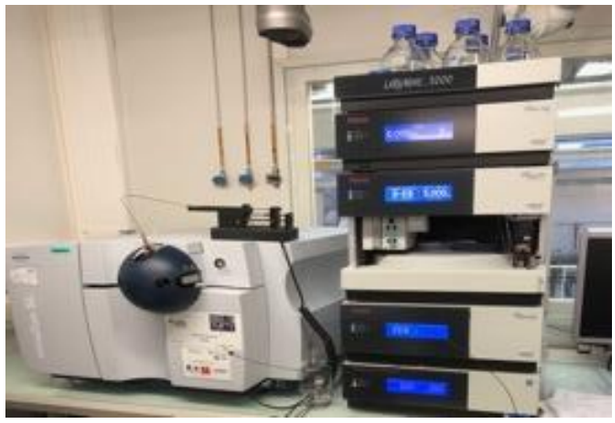


Figure 50: Spectromètre de masse trappe d'ions

7 Analyse par couplage HPTLC-SM/UV-vis

Pour le couplage HPTLC-SM, les spots localisés à R_F = 0,2 pour ZA-P1, ZA-P2, ZA-P3 et ZA-P4 ont été adsorbés directement de la plaque grâce à l'interface CAMAG (Figure 51).

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

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

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



Figure 51: : Interface CAMAG pour couplage HPTLC-SM

8 HPTLC préparative pour BI-300 mg -M1

L'extrait BI-300 mg obtenu par la méthode d'extraction M1 a été analysé, purifié par HPTLC, selon les conditions décrites dans la partie 5.2.1.1. Après élution et séchage, le spot correspondant

au R_F= 0,6 a été désorbé par grattage manuel de la plaque de silice puis extrait avec 1 mL de MeOH. L'extrait obtenu a été analysé par UPLC.

9 Analyse quantitative des saponines

9.1 Dosage colorimétrique

La détermination quantitative des saponines des extraits des 4 populations obtenus par le protocole d'extraction P1 (B1-P1, ZA-P1, KAI-P1 et SIL-P1), ainsi que l'extrait ZA-P3 a été réalisée suivant la méthode de Ncube et al (2011) modifiée [183]. En microplaque 96 puits, 25 µL d'échantillon ou bien le standard soyasapogénol à différentes concentrations : 10, 25, 50,80 et 100 mg sont introduits, puis 25 µL de la vanilline (8%) et 250 µL d'acide sulfurique à 72%. L'ensemble est mis à incuber à 45° C pendant 15 minutes. Après refroidissement la lecture se fait à 544 nm.

La quantité des saponines pour chaque population est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de soyasapogénol (Figure 52) suivante :

$$\boldsymbol{y = 0,0056x + 0.1075}$$

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

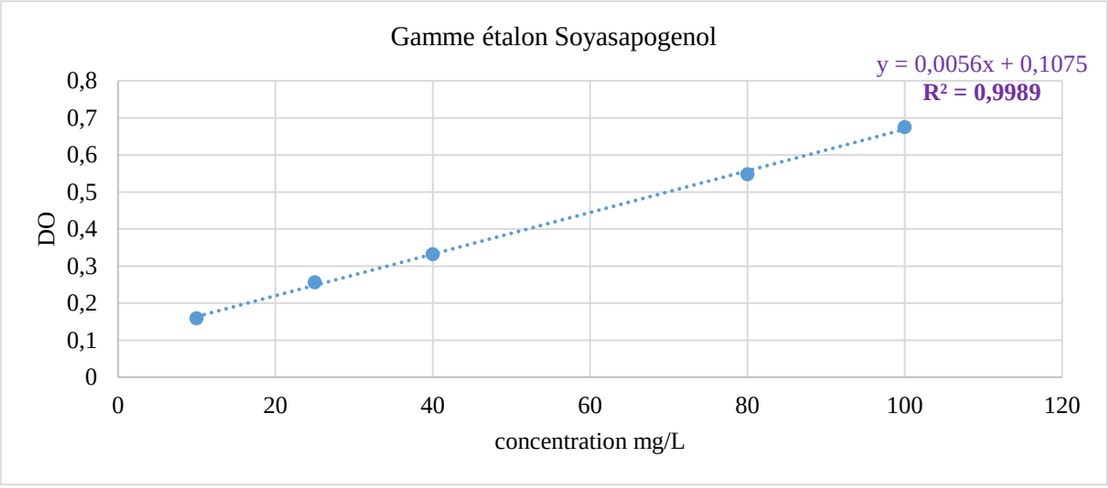


Figure 52: Courbe d'étalonnage de Soyasapogénol

9.1.1 Limite du dosage colorimétrique des saponines

Le dosage des saponines par la réaction de la vanilline et de l'acide sulfurique a été utilisé selon la procédure rapportée par Hiai et al. (1976) [257].

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

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

9.2 Dosage de Soyasapogenol par densitométrie pour ZA-P3

2 µL d'une gamme de concentrations de soyasapogenol : 1 g/L, 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,125 g/L, 0,0652 g/L et 0,0312 g/L correspondant aux dépôts de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 et 0,0625 µg, ont été déposés sur une plaque de silice 10 × 10 cm. De même, deux réplicas de la phase chloroforme de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (15 µL) et de l'extrait de Zaghouan-P3 avant et après hydrolyse (25 µL) et le standard de la saponine de soja (5 µL d'un 1,73 g/L) ont été déposés. Après élution SS2 et révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique, la courbe d'étalonnage a été calculée à partir des aires des pics des 6 concentrations différentes du soyasapogenol de référence. Le coefficient de corrélation R^2 était de 0,9929 et l'équation utilisée est la suivante : **y = 2156,6x + 200,45** (Figure 53).

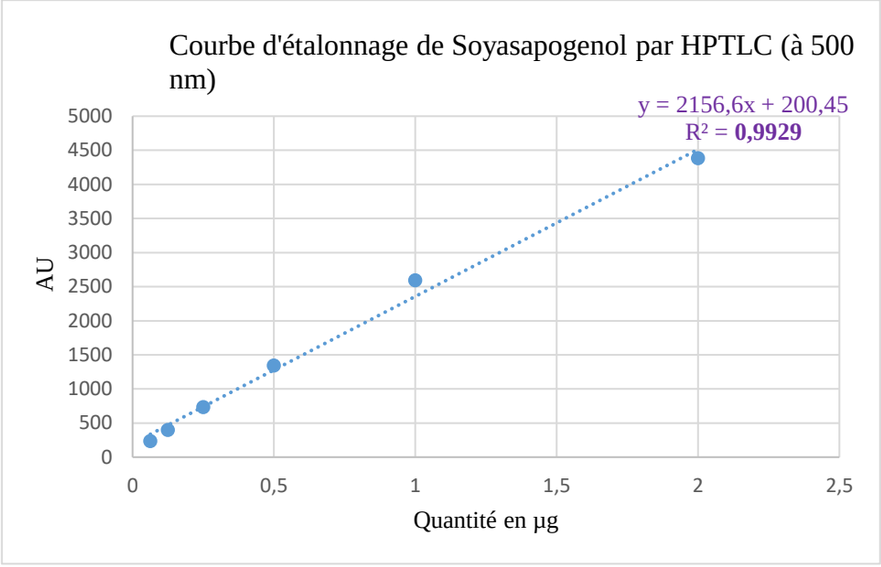


Figure 53: Courbe d'étalonnage du Soyasapogenol en fonction des aires des pics à 500 nm

10 Criblage des saponines par spectrométrie infrarouge IRTF

a. Principe

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

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

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

b. Appareillage

- Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (domaine spectral minimal : 4000 cm^{-1} - 200 cm^{-1}).
- Un logiciel d'acquisition et de traitement des spectres infrarouge permettant de déterminer les surfaces des bandes d'absorption.
- Un accessoire permettant de réaliser des analyses infrarouges par Réflexion Totale Atténuée (ATR) muni d'un cristal dont le domaine spectral minimal est compris entre 4000 cm^{-1} et 200 cm^{-1}.
- Une lamelle transparente aux rayons infrarouges dans le domaine spectral de l'étude (bromure de potassium (KBr).

- Une cuve scellée avec fenêtre en KBr de 0,1 cm de trajet optique pour la spectrométrie infrarouge.
- Seringues de remplissage des cuves infrarouges.

11 Dosage des polyphénols

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

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

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

Pour effectuer la mesure, dans chaque puits, sont ajoutés 20 µL d'étalon de concentration initiale comprise entre 10 et 80 µg/mL ou 20% d'échantillon, 10 µL de réactif de Folin (VWR). L'ensemble est agité pendant 20 secondes puis 170 µL de base Na2CO3 à 2,36% sont ajoutés et le tout est agité pendant 10 secondes. Chaque échantillon est analysé dans 8 puits distincts et la lecture d'absorbance est réalisée à 700 nm et 45°C pour un temps de réactions de 45 minutes.

Après analyse, l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 54) suivante est obtenue : $\mathbf{x_1=y-b/m}$

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

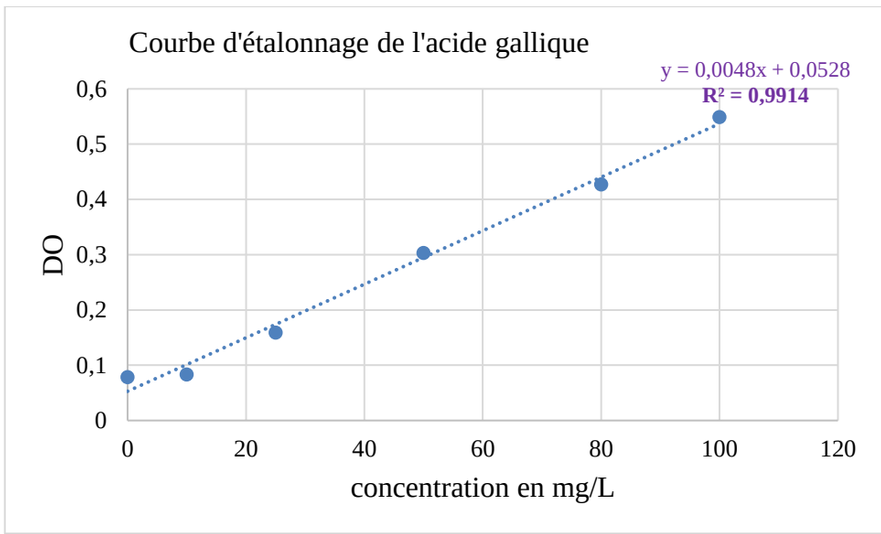


Figure 54: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

12 Évaluation de l'activité antiradicalaire

Description du protocole

L'activité antioxydant des extraits des 4 populations obtenus par les protocoles optimisés numéro 1 et 4, est déterminée avec la méthode au radical 2.2-diphénil-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Brand-williams et al, 1995) [258].

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

La mesure s'effectue en microplaque en quartz de 96 puits, en utilisant le méthanol comme blanc et comme standard un mélange de 150 µL de solution de DPPH et 150 µL d'échantillon plus le méthanol pour arriver à un volume de 300 µL par puit. Le standard de référence utilisé est le Trolox qui représente le contrôle positif (Figure 55) avec un IC 50 mesuré de 4,5 µg/mL.

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

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

F(MSi)=1-A/A0

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

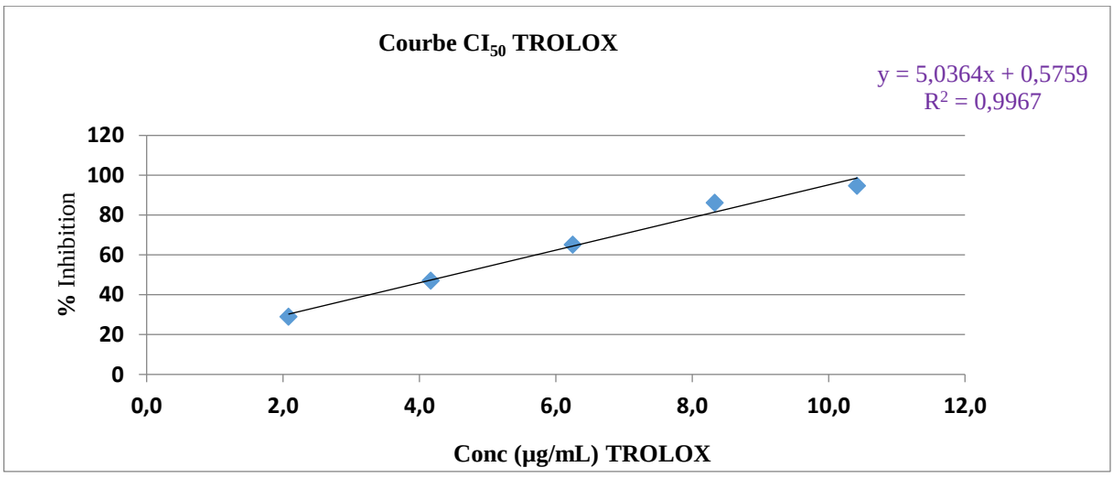


Figure 55: Courbe CI50 du TROLOX

13 Evaluation de l'effet neuroprotecteur des extraits d'A. hamosus L

13.1 Évaluation de l'activité anti- acétylcholinestérase

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

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

Après séchage à l'air libre la plaque a été pulvérisée avec le réactif DTNB/ATCI (DTNB 1 mM et ATCI 1 mM dans le tampon A (Tris HCL 0,005 M, PH8, 0,1 % de BSA)) jusqu'à ce que la silice soit saturée avec le solvant, mais sans que les taches s'écoulent. La plaque a été laissée sécher à nouveau pendant 3 à 5 min, puis 3 U/mL de solution enzymatique acétylcholinestérase ont été pulvérisées. Un fond jaune est apparu, avec des taches blanches pour les composés inhibiteurs qui deviennent visibles après environ 5 min. Ceux-ci ont été observés et enregistrés dans les 15 minutes car ils disparaissent en 20 à 30 minutes [259].

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

L'activité anti-cholinestérase AChE a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits basé sur la méthode d'Ellman (Figure 56). L'enzyme hydrolyse le substrat acétylthiocholine, en acide acétique et thiocholine, qui réagit avec le réactif d'Ellman (DTNB) pour produire du 2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine et du 5-thio-2-nitrobenzoate qui peuvent être détectés à 405

nm. Avant de commencer, deux tampons ont été préparés, le tampon A (Tris HCL 0,005 M, PH8, 0,1 % de BSA) et le tampon B (Tris HCL 0,05 M, PH8, contenant 0,1 M NaCL, 0,02 $MgcL_2*6H_2O$). Dans les plaques à 96 puits, 25 µL d'ATCI (15 mM dans l'eau), 125 µL de DTNB (3 mM dans le tampon B), 50 µL de tampon B, 25 µL d'échantillon ont été ajoutés, (les extraits ZA-P1, SIL-P1, BI-P1, KAI-P1, ZA-P4, SIL-P4, BI-P4 et KAI-P4 ont été évaporés, repris dans du DMSO et dilués dans le tampon A pour obtenir les concentrations suivantes : 1, 0,5, 0,5, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015, 0,0078 et 0,0039 g/L. Nous avons utilisé un blanc contenant tous les réactifs sans l'acétylcholinestérase, un contrôle avec tous les réactifs sauf l'extrait et un témoin positif représenté par la galanthamine.

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

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

I (%) = 100 - (A échantillon / A contrôle) *100

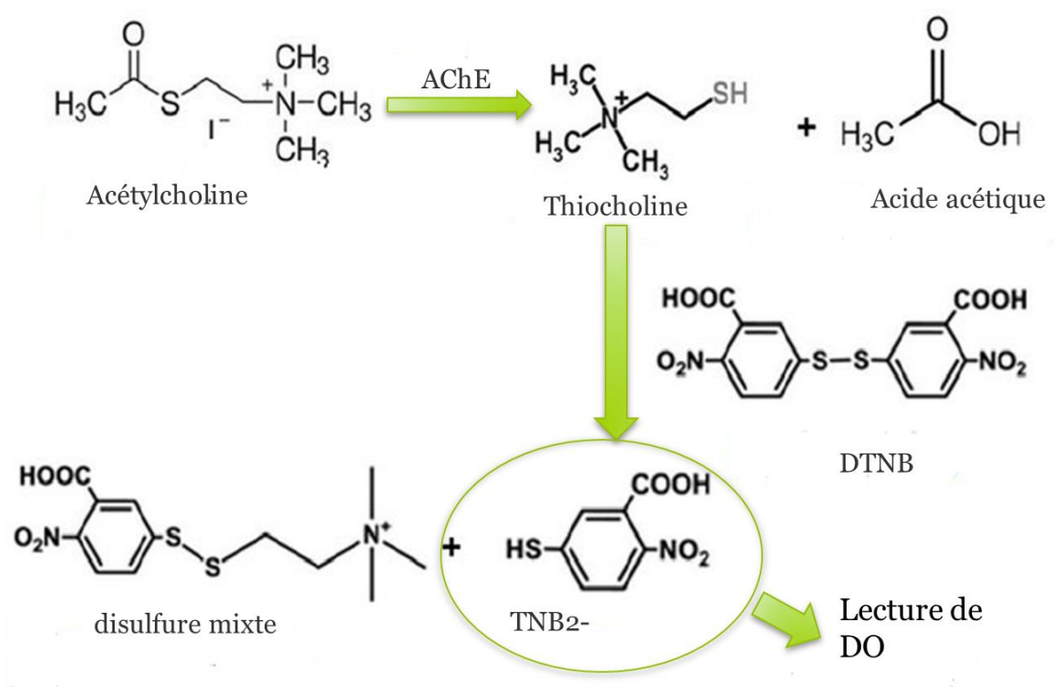


Figure 56 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman

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

13.2.1 Culture des cellules PC12 :

Les cellules PC12 (Sigma Aldrich) sont ensemencées dans des flasques de 75 cm^2 et cultivées dans un milieu contenant 85% de "Roswell Park Memorial Institute medium" (RPMI). Ce milieu est complémenté de 10% de sérum fœtal de veau FBS et de 5 % de glutamine et aucun antibiotique n'a été ajouté au milieu. Les cellules sont incubées à 37°C à 5% de saturation en CO_2 en atmosphère humide. Le milieu est renouvelé toutes les 48 à 72 h. Toutes les manipulations ont été faites en conditions stériles.

Dans le cadre de cette étude, l'observation des cellules PC12 a été réalisée à l'aide d'un microscope droit, en suivant des paramètres rigoureux pour garantir des résultats précis et informatifs. Les échantillons cellulaires ont été soigneusement préparés, fixés et montés sur des lames de microscope avant d'être soumis à l'analyse microscopique. Les objectifs choisis ont été adaptés en fonction des besoins de l'observation, en utilisant principalement des objectifs à faible grossissement pour la localisation initiale des cellules, puis des objectifs, à plus fort grossissement pour une visualisation détaillée (grossissement x10 à x40). La mise au point a été intégrée avec précision pour obtenir des images nettes, et des réglages d'éclairage appropriés ont été appliqués pour optimiser la qualité des images (Figure 57).



Figure 57 : Microscope droit

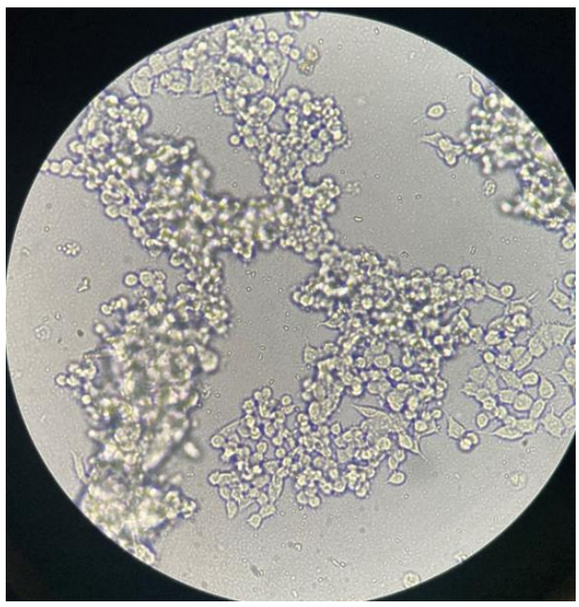


Figure 58 : Lignée cellulaire PC12 de la médullo-surrénale de rat après 10 jours d'incubation

13.2.2 Entretien des cellules PC12

Les cellules PC12 adhèrent très mal au plastique, elles sont alors récupérées par centrifugation. Le culot contient les cellules mortes et le peu de cellules qui s'adhèrent au plastique ont été traitées

par trypsinisation. 2 mL de trypsine ont été ajoutées dans une flasque de 75 cm^2, laquelle est incubée pendant 3 à 4 minutes à l'étuve. La trypsine se neutralise en ajoutant le milieu de culture. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du DPBS avant de remplir les puits.

13.2.3 Préparation de la solution de collagène

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

13.2.4 Préparation du peptide Aβ

Le peptide $A\beta_{25–35}$ (Sigma-Aldrich) a été préparé dans de l'eau ultra pure à 1% d'acide acétique. Une solution mère à 1 M a été préparée. Le flacon a été incubé à 37 °C pendant 7 jours pour induire l'agrégation et les concentrations souhaitées de 25 µM, 15 µM et 5 µM ont été préparées immédiatement dans le RPMI avant leur utilisation dans les expériences [260].

13.2.5 Conditions expérimentales :

Pour le besoin des expériences, les cellules PC12 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits induites par le collagène IV à raison de $30*10^3$ par puits. À 100 µL de la suspension cellulaire, 100 µL de milieu RPMI sont ajoutés. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les puits sont vidés et les cellules sont mises en présence des extraits/fractions riches en saponines à différentes concentrations pour le test de viabilité et en présence des fractions et du peptide β-amyloïde (Aβ) à 5 µM dilué dans le milieu de culture RPMI pour le test de neuroprotection. Le Aβ utilisé est le peptide $A\beta_{25-35}$ contenant la séquence 25-35, séquence minimale nécessaire pour induire la mort cellulaire in vitro [261]. Après la mise en contact avec l'extrait et le peptide, les plaques sont incubées 48 h à 37°C.

Les plaques ont été préparées comme suit (Figure 59) :

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

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

Témoin positif (c) : Dans toutes les plaques, seul le peptide Aβ est introduit à différentes concentrations (3 répétitions pour chaque concentration : 25, 15 et 5 µM.

Expérience (d 1-4) : il s'agit du test de neuroprotection : Dans la moitié des plaques, les extraits à tester sont ajoutés (3 répétitions pour chaque extrait) avec le peptide Aβ à 5 µL dans tous les puits.

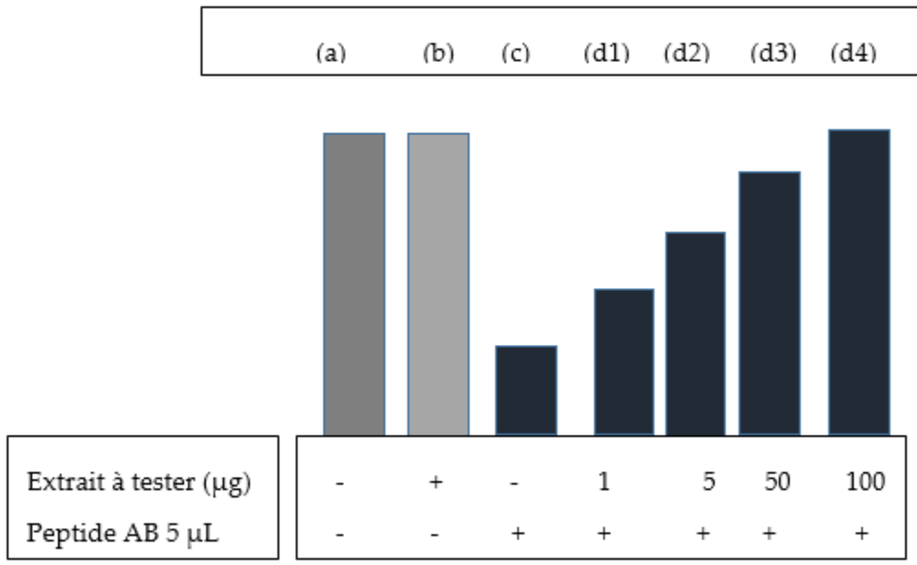


Figure 59 : Mise en place du test de neuroprotection

Test de viabilité cellulaire

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
B	H_2O	Contrôle PC12+ RPMI	100 µL	d'extrait	+ 100 µL	RPMI						H_2O
C	H_2O											H_2O
D	H_2O											H_2O
E	H_2O											H_2O
F	H_2O											H_2O
G	H_2O		AB 25 µmol			AB 15 µmol			AB 5 µmol			H_2O
H	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O

Test de Neuroprotection cellulaire

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
B	H_2O	Contrôle PC12+ RPMI	100 µL	d'extrait	+ 100 µL	AB (5 µmol)						H_2O
C	H_2O											H_2O
D	H_2O											H_2O
E	H_2O											H_2O
F	H_2O											H_2O
G	H_2O		AB 25 µmol			AB 15 µmol			AB 5 µmol			H_2O
H	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O

Figure 60 : Schéma des plaques pour tester la viabilité et la neuroprotection

13.2.6 Principe du test de viabilité et de neuroprotection

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

13.2.7 Révélation

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

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

Les % de viabilité ont été évalués comme suit :

% de viabilité = (Abs Éch / Abs Contrôle) *100

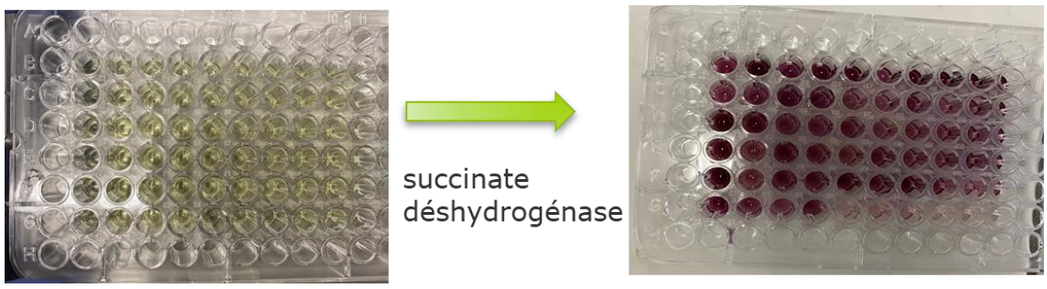


Figure 61: Réduction de l'anneau de tétrazolium en formazan de couleur violette en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale

14 Évaluation de l'activité anticancéreuse :

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

14.1 Culture des cellules HEK293 et CACO-2

Les cellules des deux lignées HEK293 et CACO-2(Thermo Fisher) sont ensemencées dans des flasques de 75 cm^2 et cultivées dans un milieu contenant 82.5% de " Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM). Ce milieu est complémenté de 10% de sérum fœtal de veau FBS et de 5 % d'acides aminées et 2,5 % d'un mélange pénicilline-streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C à 5% de saturation en CO2 en atmosphère humide jusqu'à atteindre au moins 85 % de confluence cellulaire.

14.2 Entretien des cellules HEK293 et CACO-2

Après le retrait du milieu de culture, les cellules ont été lavées avec 3,3 mL de DPBS. Les deux lignées sont adhérentes alors l'entretien se fait par l'ajout de 2 mL de trypsine qui permet la rupture des liaisons entre les cellules et le support de culture lors des passages. Les flasques sont incubées durant 3 à 4 minutes à l'étuve. La trypsine est neutralisée par l'ajout de 6 mL de DMEM.
Une centrifugation 400 tours/10 minutes permet de récupérer les cellules vivantes et les cellules mortes seront jetées avec le surnageant.

14.3 Conditions expérimentales

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

14.4 Principe du test de cytotoxicité

Le sel de tétrazolium MTT a été utilisé pour développer un test colorimétrique quantitatif pour la survie et la prolifération des cellules de mammifères. En effet, ce sel contient un anneau de tétrazolium qui est réduit en formazan de couleur violette en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale. L'intensité de la couleur est alors proportionnelle à l'activité de la succinate déshydrogénase et donc de cellules vivantes [262]. Le test de cytotoxicité détecte uniquement les cellules vivantes, et non les cellules mortes.

14.5 Révélation

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

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

% d'inhibition = 100-((Abs Éch / Abs Contrôle) *100

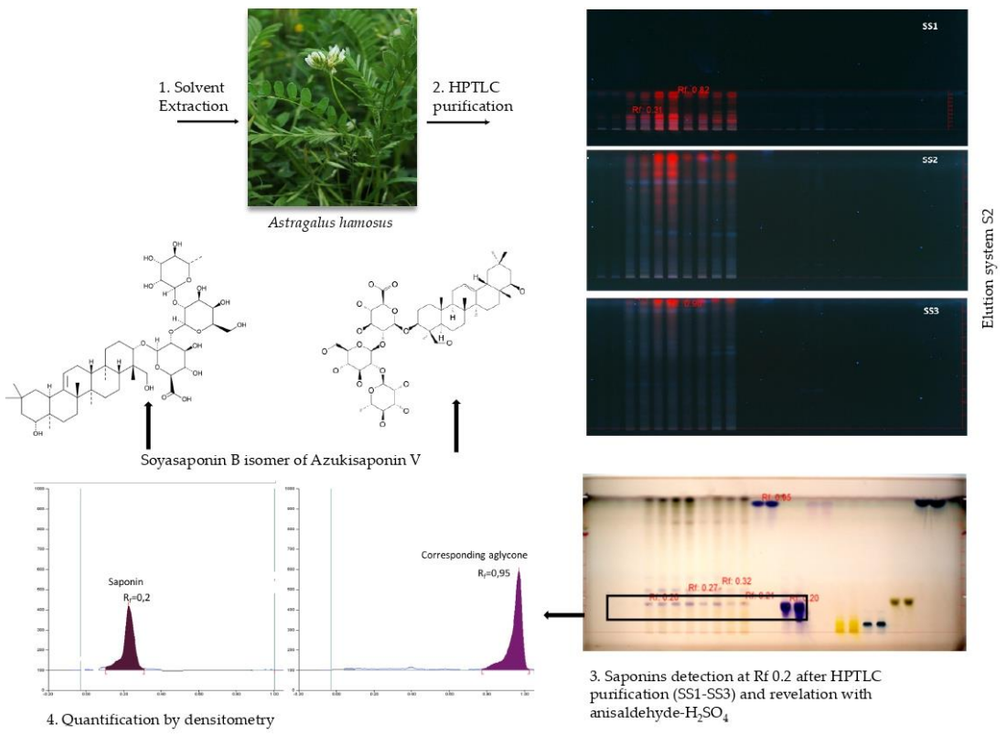
Chapitre 3 : Extraction et Caractérisation de quatre populations tunisiennes d'*Astragalus hamosus* L. – Hypothèse d'identification des saponines triterpenoïdes.

Introduction :

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

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

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



1 Caractérisation de la matière végétale *Astragalus hamosus*

1.1 Détermination des taux d'extractibles

Les taux d'extractibles à l'eau et à l'éthanol ont été déterminés selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Les taux d'hydrosolubles sont plus élevés que ceux des extractibles à l'éthanol. Ceci note une plus grande présence de molécules polaires dans les extractibles. L'échantillon de Siliana exhibe les valeurs en extractibles les plus faibles (Figure 62).

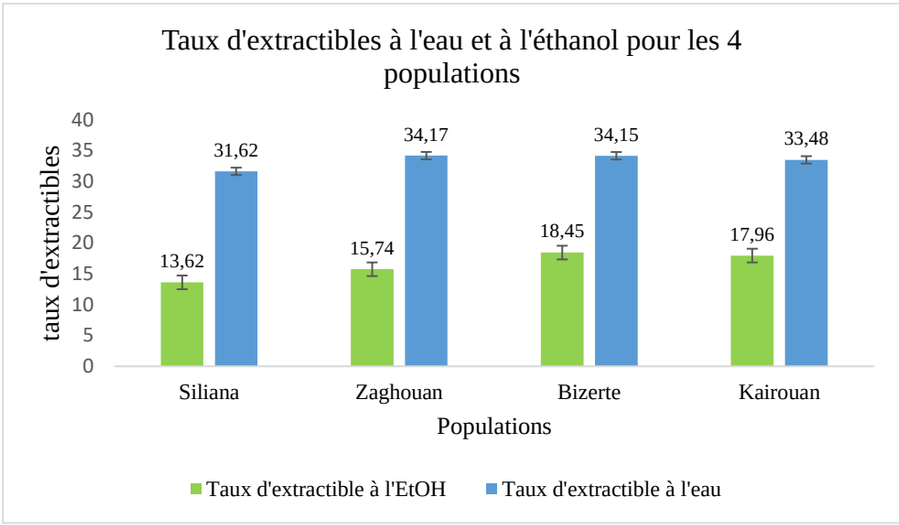


Figure 62: Détermination des taux d'extractibles à l'éthanol et à l'eau des 4 populations

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

Les taux de matière minérale ont été déterminés selon le protocole opératoire décrit dans le chapitre 2. Ces taux varient de 14 à 20% pour les 4 populations (Figure 63), Siliana et Zaghouan étant les plus riches en minéraux. Bizerte et Kairouan quant à elles ont une teneur proche et plus faibles.

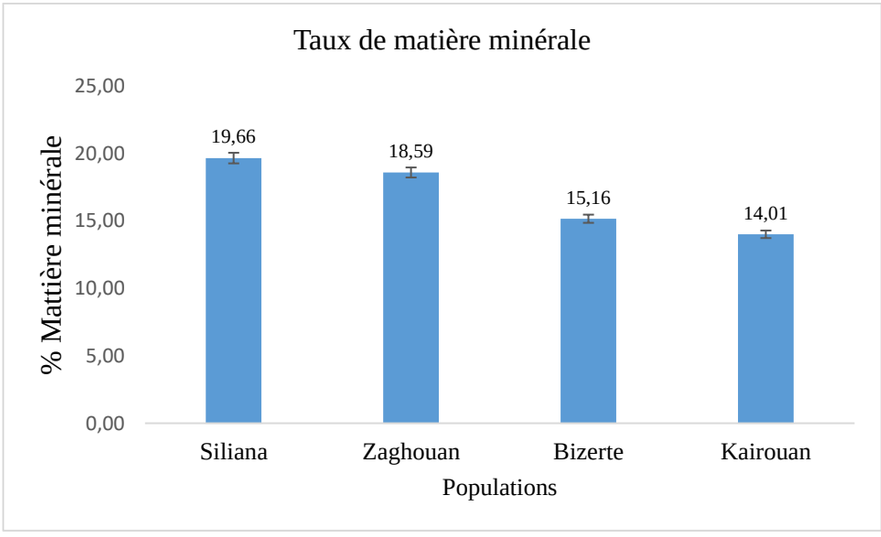


Figure 63: Taux de matière minérale

2 Criblage des saponines d'*Astragalus hamosus* L.

Différents protocoles adaptés de la littérature ont été mis en œuvre pour tenter d'isoler les saponines d'*Astragalus hamosus* L. Les extraits obtenus ont alors été purifiés et analysés par HPTLC après optimisation des systèmes de développement et de révélation. La stratégie mise en place afin d'isoler les saponines d'*Astragalus hamosus* L. a fait l'objet d'une publication intitulée

« Screening for *Astragalus hamosus* L. Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods : Prior Identification of Azukisaponin Isomers » dans le journal *Molecules* (Nafti et al., 2022*)*. (Figure 64).

molecules

MDPI

Article

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

Khouloud Nafti [1,2,*], Geraldine Giacinti [1,3], Sonia Marghali [2] and Christine Delgado Raynaud [1,3,*]

[1] Laboratoire de Chimie Ago-Industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRAe, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France
[2] Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis 1068, Tunisia
[3] Centre d'Application et de Traitement des Agro-Ressources (CATAR), Toulouse-INP, ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France
* Correspondence: khouloud.nafti@toulouse-inp.fr (K.N.); christine.raynaud@toulouse-inp.fr (C.D.R.)

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

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

check for updates

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

Academic Editor: Roberto Mandrioli

Received: 22 July 2022
Accepted: 21 August 2022
Published: 23 August 2022

1. Introduction

Plants are a valuable source of a wide range of secondary metabolites which are used as pharmaceuticals, agrochemicals, flavors, fragrances, dyes, biopesticides, and food additives. In the early 19th century, many sensitive ingredients were isolated and introduced into medical practice. *Astragalus* L. is one of the largest genera of flowering plants in the Fabaceae family. As annual or perennial grasses, *Astragalus* L. plants are widely distributed in temperate and arid regions. Until now, it is estimated that the genus contains from 2000 to 3000 species and more than 250 taxonomic sections worldwide [1].

Astragalus hamosus L. is a prostrate or ascending annual or biennial herbaceous plant

Figure 64: Article publié dans Molecules (Nafti et al., 2022).

2.1 Introduction

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

Astragalus hamosus L. est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, prostrée ou ascendante, répandue dans le sud de l'Europe, la Méditerranée, le Caucase, l'Asie centrale et l'Asie du Sud-Ouest. Cette plante se présente sous la forme d'une herbe, avec des feuilles paripennées ou impari-pennées. Son inflorescence est racémisée, les ombelles sont en forme d'épi ou solitaires, et les pédoncules sont généralement axillaires. Ses fleurs sont bractéolées ; des bracteoles sont présentes.

Les étamines sont diadelphes, sans étamines vexillaires, et les anthères sont uniformes. L'ovaire est sessile ou pédonculé. Ses fruits sont sessiles avec deux valves uniloculaires ou partiellement ou totalement biloculaires par une membrane intrusive. Ses graines sont souvent réniformes [263] *Astragalus hamosus* L. est l'une des plantes appartenant au genre *Astragalus* qui a été utilisée dans la phytothérapie et la médecine traditionnelle indienne et iranienne. Hachim et al , et Shojaii et al, ont démontré l'activité anti-inflammatoire significative des extraits alcooliques de gousses d'*Astragalus hamosus* L. sur des modèles animaux[266, 267]. En outre, l'analyse par Western blot de la cyclooxygénase-2, de l'interleukine-1 et du facteur de nécrose tumorale a montré que l'*A. hamosus* avait des effets renforcés contre la neuroinflammation causée par l'Aß dans un modèle de rat de la maladie d'Alzheimer [73]. Les travaux récents de Mahmoodi et al. ont mis en évidence les effets anti-prolifératifs de l'extrait d'*Astragalus hamosus* L. sur les cellules cancéreuses du sein [107].

Ces dernières années, la recherche sur les espèces d'astragale a progressé en raison de leur teneur en polyphénols [268, 269] et en saponines. Les espèces d'astragale contiennent à la fois des saponines cycloartane et oléanane, des structures basées sur l'aglycone B de sapogénol [96].

Les saponines sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Elles agissent comme une barrière chimique ou un bouclier dans le système de défense des plantes contre les pathogènes et les herbivores [147]. Les saponines constituent un vaste groupe de glycosides largement répandus dans les plantes supérieures. Ce sont leurs propriétés tensioactives qui distinguent ces composés des autres glycosides. Elles se dissolvent dans l'eau pour former des solutions colloïdales qui moussent lorsqu'on les agite [268]. Les saponines sont des molécules polaires constituées d'un aglycone triterpénique ou stéroïdien avec une ou plusieurs chaînes de sucre. Elles constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés de produits végétaux naturels [269]. Les saponines sont incomplètement solubles dans deux solvants différents, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe [270].

La découverte des activités biologiques des saponines ne s'est pas limitée aux utilisations traditionnelles, mais aussi, plus récemment, à des applications pharmaceutiques [192]. Ces molécules ont des activités hémolytiques [143, 144], molluscicides, anti-inflammatoires, antifongiques ou anti-levures, antibactériennes ou antimicrobiennes, antiparasitaires, antitumorales et antivirales [151], anticancéreuses [135, 136, 161], et antioxydantes [149, 151], et peuvent également agir comme adjuvant immunologique [271].

Dans l'*Astragalus hamosus,* un mélange de deux saponines a montré une activité antinéoplasique contre deux lignées cellulaires de carcinome mammaire (récepteurs d'œstrogènes MCF-7 (ER) positifs et MDA-MB 231-ER négatifs) [162, 163]. Deux saponines de type oléane, Peregrinozide I et Azukisaponin V *d'A. hamosus,* ont montré une modulation dose-dépendante de la prolifération des lymphocytes dans quatre types de cancer : BC1 (cancer du sein humain), Lu1 (cancer du poumon humain), Col2 (cancer du côlon humain) et LNCaP (cancer de la prostate humain) [169]. L'importance des saponines en tant qu'agents pharmaceutiques, en particulier dans la lutte contre le cancer, a conduit à l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal pour répondre à la demande croissante [170]. Étant donné que les saponines sont généralement présentes dans les plantes sous la forme d'un mélange de formes structurellement apparentées avec des polarités très similaires, leur séparation reste un défi [272]. C'est pourquoi,

il est généralement nécessaire de combiner plusieurs techniques (par exemple, CCM, chromatographie sur colonne, chromatographie flash, chromatographie Sephadex et CLHP) afin d'obtenir des composés purs pour la détermination de la structure et de l'activité biologique [274, 275]. En outre, l'absence de chromophore empêche leur confirmation et leur quantification par UV [274].

Un autre problème qui peut également être souligné est que la teneur en saponines est facilement affectée par la situation géographique, la méthode de culture, les phases de récolte et de nombreux autres facteurs, qui conduisent tous à une qualité non qualifiée, à une activité biologique réduite et à des applications cliniques limitées. Compte tenu des difficultés liées à la détermination des saponines, les chercheurs du monde entier ont proposé différentes méthodes d'analyse des saponines [221].

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

La méthode de criblage HPTLC présente les avantages d'une analyse multi-échantillons avec une grande capacité de charge et une multiplicité de phases mobiles, ce qui en fait une technologie de séparation simple, rapide, efficace et stable [221]. En outre, l'HPTLC est devenue l'une des principales méthodes de détermination des saponines dans les médicaments et préparations naturels [275] et donne des résultats comparables à ceux de l'HPLC [276].

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

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

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Localisation, collecte et conservation des échantillons de plantes

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

La plante a été récoltée en mars 2019 en Tunisie dans quatre lieux géographiques différents du nord du pays : Zaghouan (36,3632487° N, 9,8998366° W), Siliana (36,0914446° N, 9,5667337° W), Bizerte (37,2529341° N, 9,7477197 ° O), et Kairouan (35,8476563° N, 9,5932661° O) (Figure 37). *Astragalus hamosus* L. a été identifié par le Pr. A. Zoghlami (Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Tunis, Tunisie), un spécimen de chaque population (22101,

22102, 22103 et 22104) a été déposé au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA, Université de Toulouse, INRAE, Toulouse, France), et un échantillon est disponible sur demande. Tout le matériel végétal a été séché à l'air libre puis broyé en une poudre fine dans un mélangeur à glissière. La poudre fine de chaque population a été conservée dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à température ambiante.

2.2.2 Protocoles d'extraction

Cinq protocoles d'extraction ont été choisis dans la littérature et adaptés pour extraire les saponines d'*Astragalus hamosus*, allant d'un simple protocole en une étape (M1) à des protocoles plus complexes en plusieurs étapes (P1, P2, P3 et P4) (Figure 65)

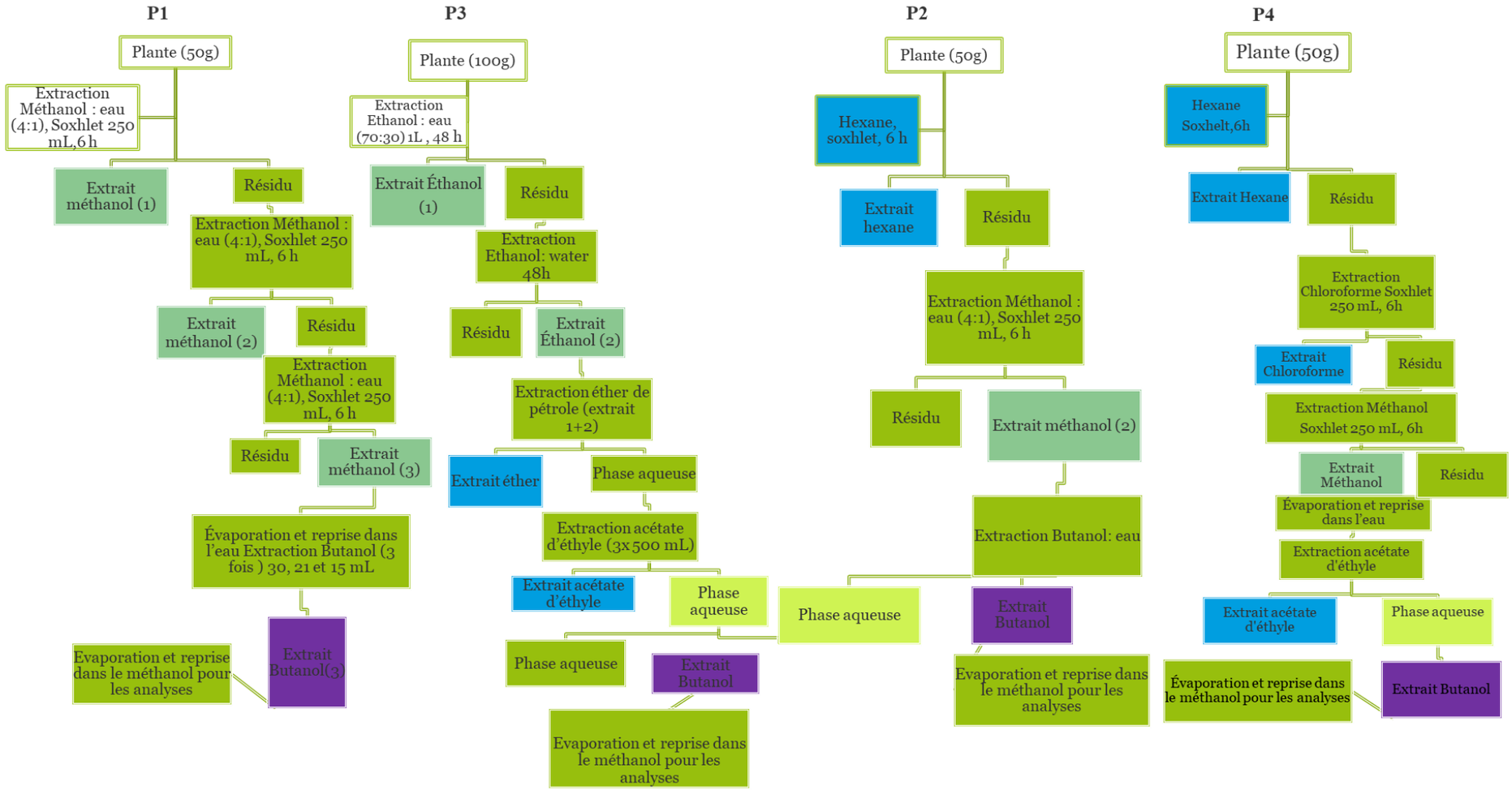


Figure 65 : Schémas des protocoles d'extraction de P1 à P4. Une délipidation préliminaire a été réalisée avec de l'hexane dans les protocoles P2 et P4

La première méthode d'extraction liquide-solide adaptée de Khakimov et al [255] été mis en œuvre pour les 4 populations d' *Astragalus hamosus* L. provenant des 4 lieux géographiques : Bizerte, Siliana, Kairouan et Zaghouan.

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

Le protocole d'extraction P1 a été adapté des travaux de Ma et al [278]. Pour cela, 50 g de poudre de chaque population ont été extraits et ont subi 3 cycles d'extraction Soxhlet pendant 6 h avec 250 mL de MeOH/H_2O (4:1). Les 3 extraits obtenus ont été réunis et évaporés à sec puis ajoutés à 25 mL d'eau distillée chaude à 70°C. Ensuite, 3 extractions liquide-liquide de la phase aqueuse avec 30, 21 et 15 mL successivement ont été réalisées. Les 3 fractions obtenues sont réunies, filtrées et évaporées à sec à 50°C.

Pour les autres protocoles d'extraction mis en place (P2-P4), seule la population de Zaghouan a été utilisée. Le protocole d'extraction P2 est celui de Kambouche et al [256]: 50 g de poudre ont été extraits successivement avec 250 mL d'hexane, puis avec 250 mL de MeOH. Après élimination du solvant sous vide, le résidu de méthanol a été dissous dans de l'eau et réextrait avec 9 mL de n-BuOH.

Le protocole d'extraction P3 est celui de Maamria et al [216] : Cent grammes de la population de Zaghouan ont été macérés deux fois pendant 48 h dans 1 L d'EtOH/H_2O (70:30). Les 2 L récupérés ont été filtrés, séchés sous évaporation et placés dans 25 mL d'eau chaude distillée. Ensuite, 3 extractions liquide-liquide successives ont eu lieu avec 500 mL d'éther de pétrole, 500 mL d'acétate d'éthyle 3 fois, puis 500 mL de BuOH 3 fois. L'extrait butanolique a été conservé pour analyse. Le protocole d'extraction P4 est celui de Pistelli et al. [220]. Cinquante grammes de la population de Zaghouan ont été extraits 3 fois dans un appareil Soxhlet avec 250 mL de n-hexane, 250 mL de $CHCl_3$ et 250 mL de MeOH successivement. Le *n*-hexane et extraits de CHCl3 ont été conservés et congelés. L'extrait méthanolique a été filtré et évaporé, puis placé dans 100 mL d'eau distillée. Par la suite, une extraction liquide-liquide de cette phase aqueuse a été réalisée avec 70 mL d'acétate d'éthyle. L'extrait d'acétate d'éthyle résultant a été stocké et congelé et l'extrait aqueux a été extrait à nouveau avec du n-butanol. L'extrait butanolique obtenu a été conservé au froid pour analyse.

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

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

Les échantillons ont été appliqués sur des plaques de silice avec l'échantillonneur automatique ATS3 CAMAG (Muttenz, Suisse). Deux systèmes de développement différents ont été choisis : (i) Système S1 (30 ml de chloroforme, 15 mL d'hexane et 5 ml de méthanol) [279]et (ii) Système S2 (SS1, SS2 et SS3) [280]:

- SS1 : Dichlorométhane et MeOH (92 : 8) jusqu'à 26 mm pour les méthylxanthines
- SS2 : EtOAc, toluène, acide formique et H_2O (8,7 : 1,3 : 1,7 : 0,4) jusqu'à 70 mm pour les composés phénoliques
- SS3 : EtOAc, toluène, acide formique et H_2O (9 : 1 : 2,5 : 1) jusqu'à 70 mm pour les saponines.

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

Pour la dérivatisation, les plaques ont été immergées dans une solution d'anisaldéhyde-H_2SO_4 avec un CAMAG TLC Immersion Device III (Muttenz, Suisse) à une vitesse d'immersion de 2 cm s^{-1} pendant 2 s. Ensuite, les plaques ont été séchées dans une étuve à 100°C pendant 8 min ou 10 min.

Les plaques ont été scannées à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 500 nm avant dérivatisation, et à 500 et 600 nm après dérivatisation avec de l'anisaldéhyde-H_2SO_4 dans un TLC Scanner 3 SC3 CAMAG, avec des lampes au deutérium et au tungstène (Muttenz, Suisse). La taille de la fente a été fixée à 4 × 0,1 mm, la vitesse de balayage à 5 mm.s^{-1}. La rémission et l'absorption ont été sélectionnées comme type et mode de mesure, respectivement. Un filtre optique de second ordre a été utilisé et le mode et la sensibilité du détecteur étaient automatiques. Les valeurs du facteur de retardement $R_F$ont été évaluées comme la position de la substance par rapport à la position du front de solvant mesurée à partir de la position d'application de l'échantillon. L'échantillonneur automatique et le scanner HPTLC, ainsi que l'acquisition et le traitement des données ont été contrôlés avec le WinCats 1.4.6. 2002 Responsable Chromatographie Planaire de CAMAG.

Les 4 extraits des 4 populations (Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan) obtenus selon M1 ont été analysés en déposant 10 µL de chacun et 10 µL des solutions étalons à 1 g/L de solanine, sénégnine et digitonine. Les élutions ont été réalisées par S1 (Figure 66et Figure 67) et également

par S2 pour l'extrait de Zaghouan (Figure 68). Les plaques ont été scannées à 366 nm sous UV avant dérivatisation chimique et après dérivatisation chimique sous lumière blanche avec de l'anisaldéhyde-H_2SO_4.

Ensuite, 10 µL des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3, et P4, et M1 ont été déposés deux fois sur une plaque de couverture, correspondant à des dépôts de 0,05 mg du matériau, et 10 µL de solanine, sénégnine et digitonine a été déposé deux fois (0,01 mg du matériau). En plus des standards de saponine, l'acide oléanolique triterpénoïde a été ajouté, à une concentration de 1,02 g/L ; 10 µL ont été déposés (0,01 mg). Un mélange de glucose-fructose à une concentration de 0,5 g/L a été ajouté et 10 µL (0,005 mg) ont été déposés deux fois (Figure 68). La plaque utilisée est constituée d'un gel de silice de 20 x 10 cm. L'élution a été effectuée selon le système de développement S1 et la détection s'est faite par visualisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique.

Puis, 10 µL des extraits de Zaghouan obtenus selon P1, P2, P3 et P4 (0,05 mg de matériel) et 25 µL de l'extrait de Zaghouan-P3 ont été déposés pour analyse (Figure 74 et Figure 75). Pour les étalons : 10 µL de Soyasaponine B à une concentration de 1 g/L (0,01 mg de matière) ; 5 µL de soyasapogénol à une concentration de 1,86 g/L (0,0093 mg de matière) ; 10 µL de sénégénine, solanine, digitonine ou un mélange glucose-fructose (1 g/L) ; enfin 10 µL d'acide oléanolique à une concentration de 1,02 g/L (0,01 mg de matière) ont été déposés. L'élution a été réalisée selon le système de développement S2. La détection a été réalisée après dérivatisation à l'anisaldéhyde sulfurique sous lumière blanche et avant dérivatisation sous UV à 366 nm.

Pour finir, les extraits de toutes les populations (Zaghouan, Siliana, Bizerte et Kairouan) obtenus par le protocole P1 ont été déposés en utilisant le système de développement S2. Pour cela, 10 µL (5 g/L, 0,05 mg de matière) de chaque extrait ont été prélevés. Pour les standards, 10 µL de soyasapogenol (1 g/L, 0,01 mg de matière) et 5 µL de soyasaponine (1,86 g/L, 0,0093 mg de matière) ont été ajoutés. La détection a été réalisée par visualisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique sous lumière blanche et sous UV à 366 nm avant dérivatisation (Figure 77).

2.2.4 Hydrolyse des extraits par le chlorure d'acétyle

Un millilitre de l'extrait de Zaghouan (15 g/L) obtenu selon le protocole 3 a été placé dans un tube Eppendorf avec 50 µL de chlorure d'acétyle. Le mélange est incubé 1h à 100°C puis évaporé à sec sous azote. Après évaporation, 1 mL d'eau et 500 µL de chloroforme ont été ajoutés et vortexés. Après décantation, la phase chloroformique a été analysée par HPTLC. La même procédure a été appliquée à une solution standard de soyasaponine (1,86 g/L) pour laquelle 15 µL de la phase chloroformique ont été déposés pour chaque échantillon hydrolysé sur une plaque de silicate en plus de l'extrait de Zaghouan-P3 non hydrolysé (20 µL). L'élution a été effectuée après SS1 et SS2 uniquement (Figure 78).

2.2.5 Quantification du Soyasapogenol dans les extraits pour densitométrie

2.2.5.1 Quantification du Sayasapogenol par spectrophotométrie

Le dosage quantitatif du soyasapogénol de l'extrait de Zaghouan-P3 avant et après hydrolyse a été réalisé selon la méthode de Ncube et al. [183] modifié pour une microplaque 96 puits : 25 µL de l'échantillon ou une solution de soyasapogenol à différentes concentrations, 25 µL de vanilline (8%) et 250 µL d'acide sulfurique (72%) ont été ajoutés. La plaque a été incubée à 45°C pendant 10 min et laissée refroidir et la lecture a été prise à 544 nm. L'appareil utilisé était BMG-Labtech

Spectrostar-Nano. La quantité de saponines a été calculée selon l'équation d'étalonnage DO en fonction de la concentration (Voir § 9.1).

2.2.5.2 Quantification du Sayasapogenol pour la densitométrie

Une gamme de différentes concentrations de soyasapogenol (2 µL (1 g/L, 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,125 g/L, 0,0652 g/L et 0,0312 g/L)) ont été déposées sur une plaque de silice de 10*10 cm ainsi que deux réplicats de la phase chloroformique de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (15 µL) et de l'extrait de Zaghouan-P3 avant hydrolyse (25 µL) et le standard de la saponine de soja (5 µL d'un 1,73 g/L). Après élution SS2 et révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique, la courbe d'étalonnage a été calculée à partir des aires des pics des 6 concentrations différentes du soyasapogenol de référence (Figure 80). Le coefficient de corrélation R^2 était de 0,9929 et l'équation utilisée est : $y = 2156{,}6x + 200{,}45$ (Voir § 9.2).

2.3 Resultats et Discussion

2.3.1 Extraction des composés d'*Astragalus hamosus*

Comme attendu, le rendement en extractible diffère en fonction du protocole d'extraction utilisé (Tableau 14). La plus grande différence est observée entre l'extraction au méthanol et les autres protocoles mis en œuvre afin d'essayer d'être plus sélectif dans la récupération des saponines. Le rendement d'extraction a diminué entre l'extrait de méthanol (M1) et les protocoles P1 à P4, démontrant ainsi la sélectivité initiale des composés par le choix du protocole d'extraction. Le protocole M1 est une simple extraction méthanolique du matériel végétal broyé et séché, alors que les protocoles P1 à P2 utilisent plusieurs solvants organiques de polarités différentes en plus de l'eau : $-0{,}77 < \log P < 3{,}5$.

Tableau 14: Résultats du rendement d'extraction par rapport à la matière sèche pour les protocoles M1, P1, P2, P3 et P4.

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

En raison de leurs propriétés amphiphiles, les saponosides sont généralement extraits à l'eau ou à l'alcool en utilisant différentes techniques [170], [281]. Il a été démontré que le butanol et le méthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction des saponines triterpénoïdes des graines de gac [37]. Le butanol a également été signalé comme étant le solvant de choix pour l'extraction des saponines de la coque des graines de *Chenopodium quinoa* [281], tandis que le méthanol a été largement utilisé pour extraire les saponines d'une gamme étendue de matrices végétales [170], [192]. Le méthanol (logP = -0,77) utilisé à 85% est le plus polaire des solvants organiques sélectionnés dans ce travail et il a permis d'extraire non seulement les saponines mais aussi toutes

les molécules ayant des caractéristiques hydrophiles [282]. Cependant, si les saponines représentent les molécules bioactives qui semblent être les plus intéressantes dans le genre *Astragalus*, elles n'y sont pas abondantes. Le protocole P1 était basé uniquement sur l'extraction [méthanol (logP = -0,77) - butanol (logP = 0,84)], alors que les protocoles P2 à P4 utilisent d'abord des solvants organiques tels que l'hexane (logP = 3,9), le chloroforme ((logP = 2), l'éther de pétrole (logP = 0,84), ou l'éthylacétate (logP = 0,73) pour éliminer les molécules lipophiles avant le fractionnement final avec le butanol, comme dans le protocole P1 [283]–[285]. Comme la plante de la population de Zaghouan présentait le rendement d'extraction méthanolique le plus élevé, tous les protocoles d'extraction ont d'abord été évalués avec cette matière première.

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

L'analyse HPTLC préliminaire a fourni des informations initiales sur l'abondance des métabolites secondaires présents dans l'extrait méthanolique et sur le pouvoir de séparation et de détection du premier système de développement sélectionné, S1. Huit taches ont pu être observées et ont été retardées à différentes valeurs R_F (0-0,85) sur la première plaque (Figure 66). Cette analyse a été comparée à des standards pour les trois familles de saponines, à savoir un saponoside stéroïdien, la digitonine, une saponine glycoalcaloïde, la solanine, et une saponine aglycone triterpénoïde, la sénégénine. La solanine et la digitonine, qui sont glycosylées, sont restées à R_F = 0, tandis que l'aglycone sénégénine a migré à R_F= 0,6 en raison de sa polarité plus faible et de son affinité plus élevée avec le solvant d'élution. Les saponines sont très polaires, pareillement à la silice. Les solvant constituants S1 ne permettent probablement pas de les éluer.

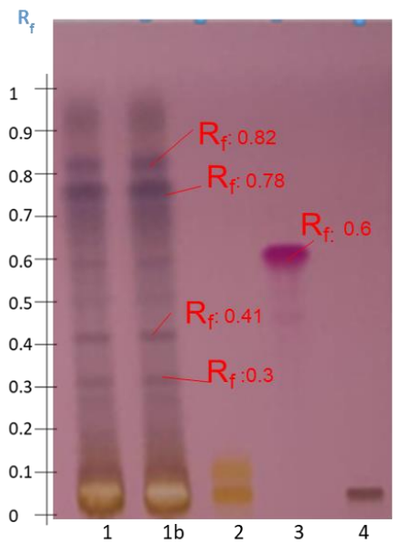


Figure 66: Profil HPTLC obtenu après migration et révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 de l'extrait de Bizerte (25 mg) selon le Protocole M1 (Pistes 1 et 1b) et comparé aux standards: solanine (Piste 2), senégnine (Piste 3), et digitonine (Piste 4). Système d'élution S1

La méthode d'extraction M1 a ensuite été comparée entre les quatre populations d'*Astragalus hamosus* L. sélectionnées (Figure 67). (Voir conditions analytiques HPTLC § 5.2.1.2). L'extrait de la population de la région de Siliana semble être enrichi en certains composés extractibles au méthanol. Quatre taches plus intenses sont apparues à 366 nm aux R_F de 0,47 ; 0,65 ; 0,69 et 0,78 puis, après visualisation avec l'anisaldéhyde-H_2SO_4, parmi celles-ci seules celles retardées à des valeurs de R_F=0,47 ; 0,65 et 0,78 sont observées. Les étalons glycosylés, la solanine, la digitonine

et les sucres de glucose-fructose sont restés au point de dépôt (R_F = 0), mais les étalons de type aglycone tels que la sénégénine et l'acide oléanolique, un triterpénoïde, ont migré. Comme tous les étalons sélectionnés n'étaient détectables qu'après visualisation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 sous lumière blanche et non sous UV à 366 nm, les taches avant et après dérivatisation ne peuvent pas être associées à des molécules de saponine. Seule l'étape de dérivatisation a pu mettre en évidence des molécules de la famille des saponines qui n'absorbent pas l'UV à 366 nm. A l'inverse, certains spots détectables sous UV à 366 nm n'apparaissent plus après dérivatisation, à savoir les spots à R_F = 0,72 et R_F = 0,8. Ces résultats montrent que les molécules de saponine des extraits sont probablement restées au niveau du dépôt de l'échantillon sur la plaque HPTLC et que si des aglycones étaient présentes dans l'extrait de méthanol, elles ont coéluées avec d'autres molécules. Les molécules semblent être coéluées au même R_F de 0,66 que l'acide oléanolique dans tous les extraits.

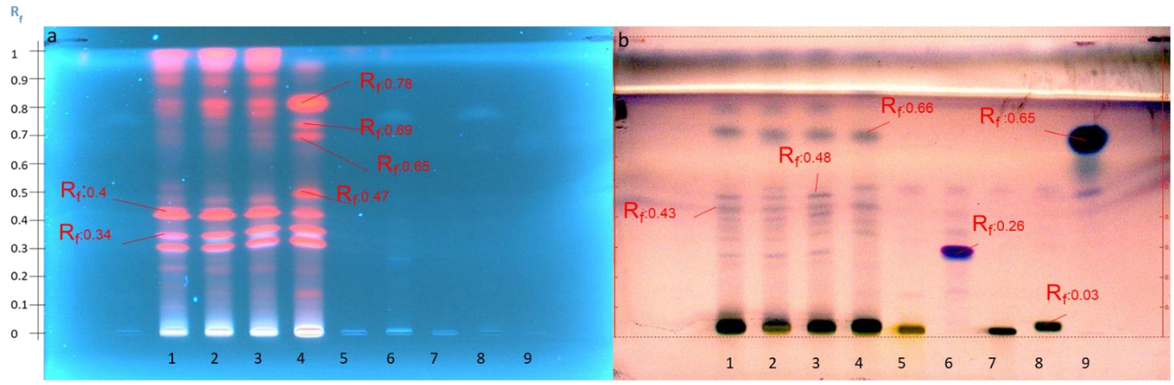


Figure 67: Profils HPTLC des 4 extraits des 4 populations obtenus selon la méthode d'extraction M1 ainsi que les standards pris avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 sous lumière blanche (b) selon le système d'élution S1.. Piste 1 (Bizerte, Piste 2 (Kairouan), Piste 3 (Zaghouan), Piste 4 (Siliana), Piste 5 (Solanine), Piste 6 (senégnine) et Piste 7 (digitonine), Piste 8 (glucose-fructose), Piste 9 (acide oléanolique).

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

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

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

Le fractionnement méthanolique en une seule étape ayant révélé la présence de nombreuses molécules dans l'analyse HPTLC, d'autres protocoles de purification ont été explorés, comme le montre le tableau 14. La population de Zaghouan présentant le rendement le plus important en méthanol extractible, cette plante a été choisie comme matrice modèle pour le criblage des protocoles d'extraction en plusieurs étapes (Figures 68 à 77).

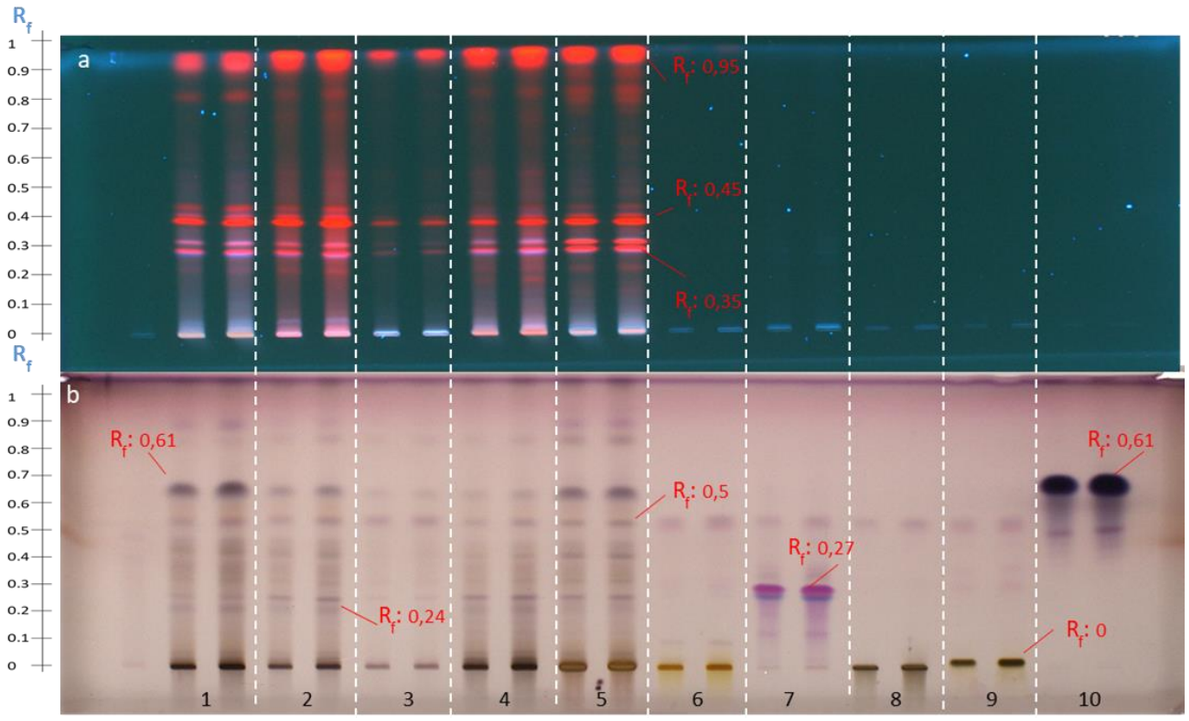


Figure 68 : Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation (a) et après révélation à l'anisaldehyde-H2SO4 (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 1), P2 (piste 2), P3(piste 3), P4 (piste 4) et selon le M1 (piste 5), ainsi que des standards, Piste 6 (Solanine), Piste 7 (senégnine) et Piste 8 (digitonine), piste 9 (glucose-fructose), piste 10 (acide oléanolique).

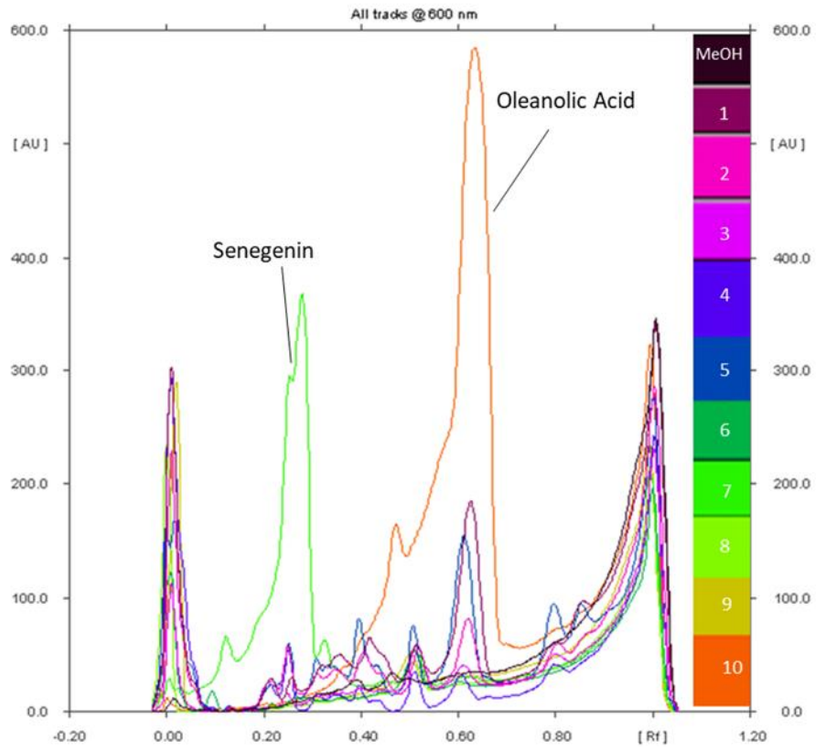


Figure 69: Densitogramme des extraits de Zaghouan (Pistes 1–5) et les standards (Pistes 6–10): solanine (Piste 6), senegenine (Piste 7), digitonine (Piste 8), glucose-fructose (Piste 9), et acide oléanolique (Piste 10) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldéhyde

La délipidation préalable à l'hexane/ chloroforme avant l'extraction méthanolique a été réalisée par les protocoles d'extraction P2 et P4. Le protocole P4 est basé sur l'élimination successive des fractions avec des solvants organiques de polarité croissante (logP(hexane) = 3,5 < logP(chloroforme) = 2,0 < logP(éthylacétate) = 0,8). Ces protocoles ont permis d'augmenter la concentration en certains métabolites plus polaires dans les extraits et d'améliorer leur détection à 366 nm (R_F = 0,31 ; R_F = 0,40 ; et R_F = 0,95) (Figure 75). Cependant, ces molécules, tout en étant

également détectables après visualisation à l'anisaldéhyde-H2SO4, sont restées en faible quantité et ont disparu dans l'extrait P3.

Le protocole de fractionnement P3 semble être plus sélectif que les autres. Cette extraction a également mise en œuvre des solvants organiques de polarité plus faible que l'éthanol ou le méthanol qui ont été utilisés quant à eux après l'extraction initiale à l'éthanol, comme l'acétate d'ethyle et l'ether de pétrole, ce qui a permis l'élimination de certains composés par rapport aux protocoles P1 ou M1 qui n'utilisent que des solant polaires comme le montrent les figures 70 et 71. Le densitogramme 3 de la figure 62 montre l'élimination des pics par rapport aux autres densitogrammes. Deux hypothèses peuvent être proposées : soit la fraction finale avait une concentration plus faible en composés chimiques et le seuil de détection de ces molécules a été atteint, soit elle était effectivement plus sélective et les composés coélués ont été éliminés.

Après visualisation à l'anisaldéhyde-H2SO4, les quatre extraits ont présenté des bandes HPTLC similaires, avec des densitogrammes d'intensités différentes à R_F= 0,24, R_F = 0,40, R_F= 0,50, et R_F = 0,61. Les composés élués à R_F= 0,61 ont été quantitativement réduits dans les extraits P2, P3 et P4, alors que les composés retardés à R_F = 0,4 semblent avoir été éliminés par le protocole de purification P3. Les saponines triterpénoïdes, telles que l'acide oléanolique, ont été apparemment détectées à R_F= 0,66 dans tous les extraits et doivent être confirmées.

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

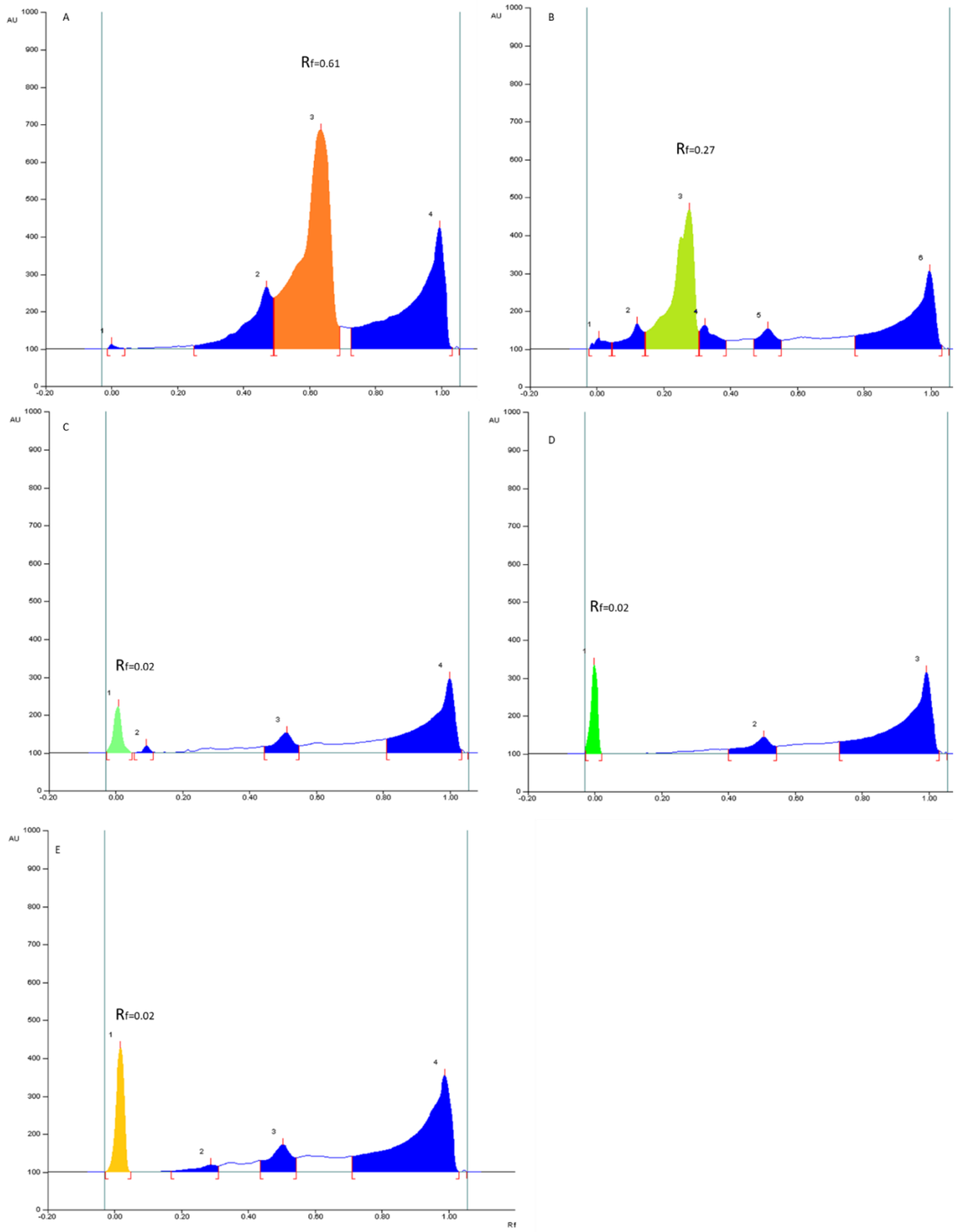


Figure 70 : Densitogrammes de l'acide oléanolique (A), de la sénégénine (B), de la solanine (C), de la digitonine (D) et du glucose-fructose (E) à 600 nm après visualisation avec l'anisaldéhyde-H2SO4

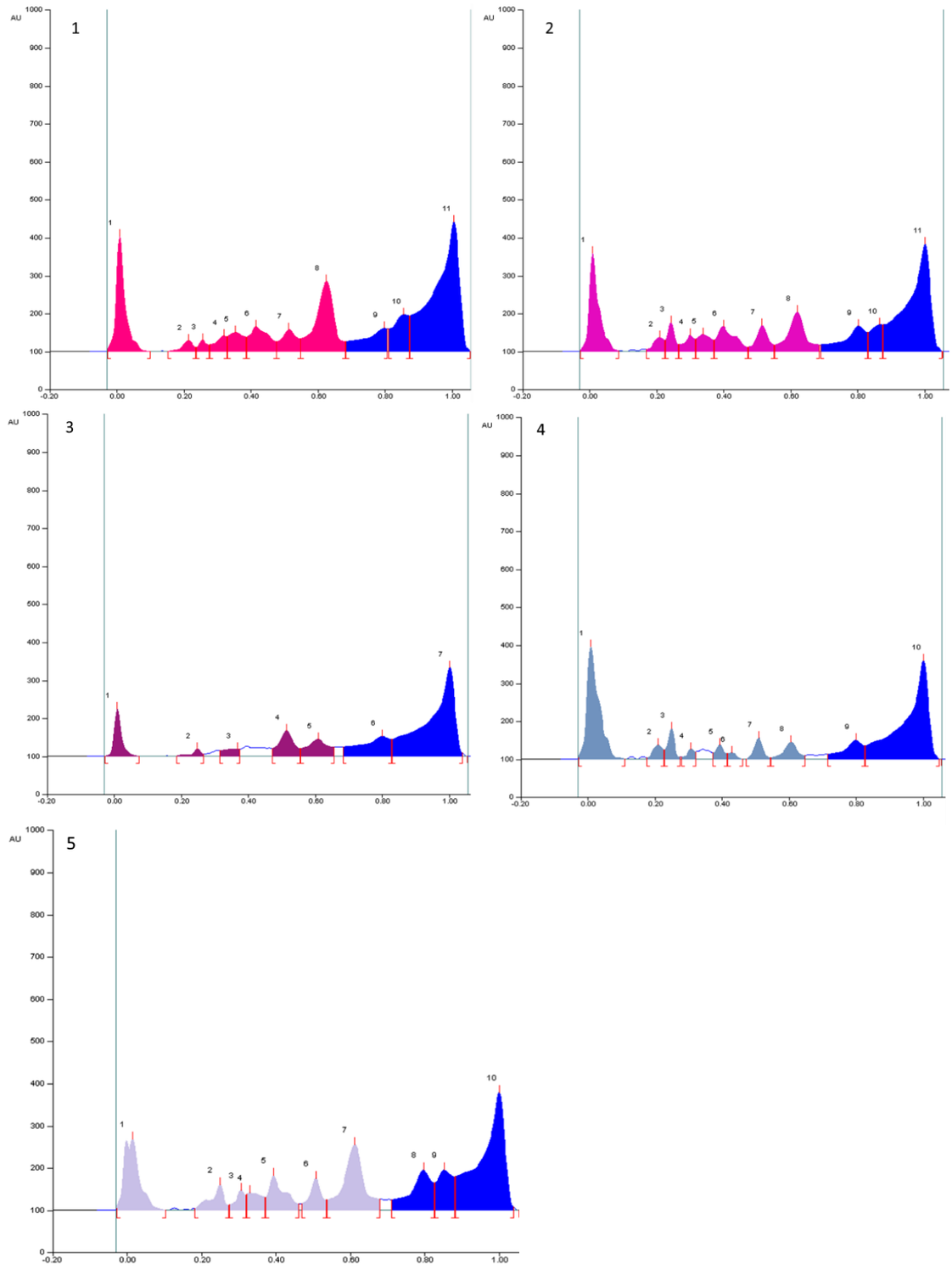


Figure 71 : Densitogrammes des extraits de Zaghoun obtenus avec les protocols d'extraction P1 (1), P2 (2), P3 (3), P4 (4) et M1 (5) à 600 nm après revelation avec l'anisaldehyde-H2SO4

2.3.3 Optimisation des systèmes d'élution

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

L'utilisation de plusieurs systèmes d'élution a permis de séparer successivement les molécules en fonction de leur affinité pour des éluants de polarité croissante. Les premiers résultats ont montré que le système S1 ne permettait pas d'éluer les saponines qui restaient à une valeur de R_F d'environ

0. Les saponines sont des molécules polaires et la phase stationnaire, la silice, est également polaire [286].

Une seconde élution avec un système plus polaire (S2) que le précédent a permis de mettre en évidence de nouveaux spots détectables à une longueur d'onde d'absorption de 366 nm suite à la purification de certaines bandes qui étaient déjà détectables à cette longueur d'onde (Figures 74 et 75). Douze spots ont été détectés de R_F = 0 à R_F = 0,9. Toutes les molécules révélées par des taches rouges et qui étaient nombreuses dans les analyses HPTLC précédentes avec le système S1 semblent avoir migré vers le front du solvant. Par conséquent, le nouveau système d'élution a permis la migration des molécules polaires qui étaient restées sur la ligne de dépôt dans les analyses précédentes. L'augmentation de la force d'élution dans le système S2 de SS1 à SS3 (Figure 73) a permis au système d'éluer les molécules moins polaires jusqu'au front du solvant et a retardé les molécules les plus polaires à une valeur R_F de 0,2, comme observé après visualisation avec l'anisaldéhyde-H_2SO_4 (Figure 75-b).

L'analyse HPTLC des extraits de Zaghouan (P1-P4, M1) a ensuite été comparée aux standards de saponine spécifiques d'*Astragalus*, c'est-à-dire la soyasaponine, un isomère de l'azukisaponine déjà identifié dans *Astragalus hamosus* L. [151, 268] et son aglycone, le soyasapogénol, en plus des standards précédents (solanine, sénégénine et digitonine) utilisés spécifiquement pour développer la méthode d'extraction par solvant organique (Figure 75). La soyasaponine a été détectée à R_F= 0,2 avec une tache violette intense, tandis que l'acide oléanolique, le soyasapogénol et la sénégénine ont été détectés par deux taches violettes intenses à R_F= 0,95. Comme attendu, les standards de saponine ne sont pas détectables à 366 nm.

La présence d'une tache retardée à la valeur R_F de 0,2 avec la même valeur R_F que la soyasaponine après visualisation avec l'anisaldéhyde-H_2SO_4 a suggéré la présence des saponines, cependant certaines molécules ont également été détectées à 366 nm à cette même valeur Rf retardée pour tous les extraits, à l'exception de l'extrait P3 Zaghouan (Figure 75-b). L'augmentation de la force éluante du système d'élution a permis de séparer d'autres métabolites.

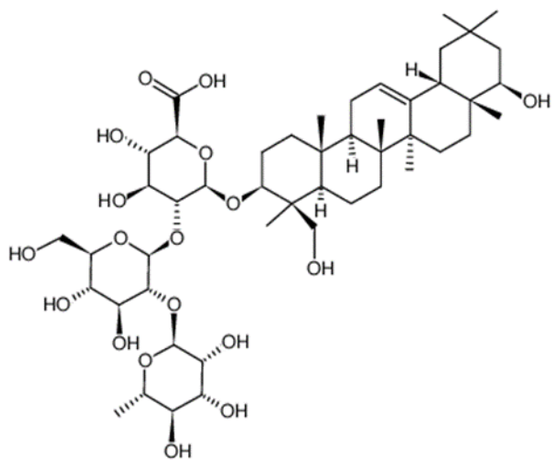


Figure 72: Structure de l'Azukisaponine V

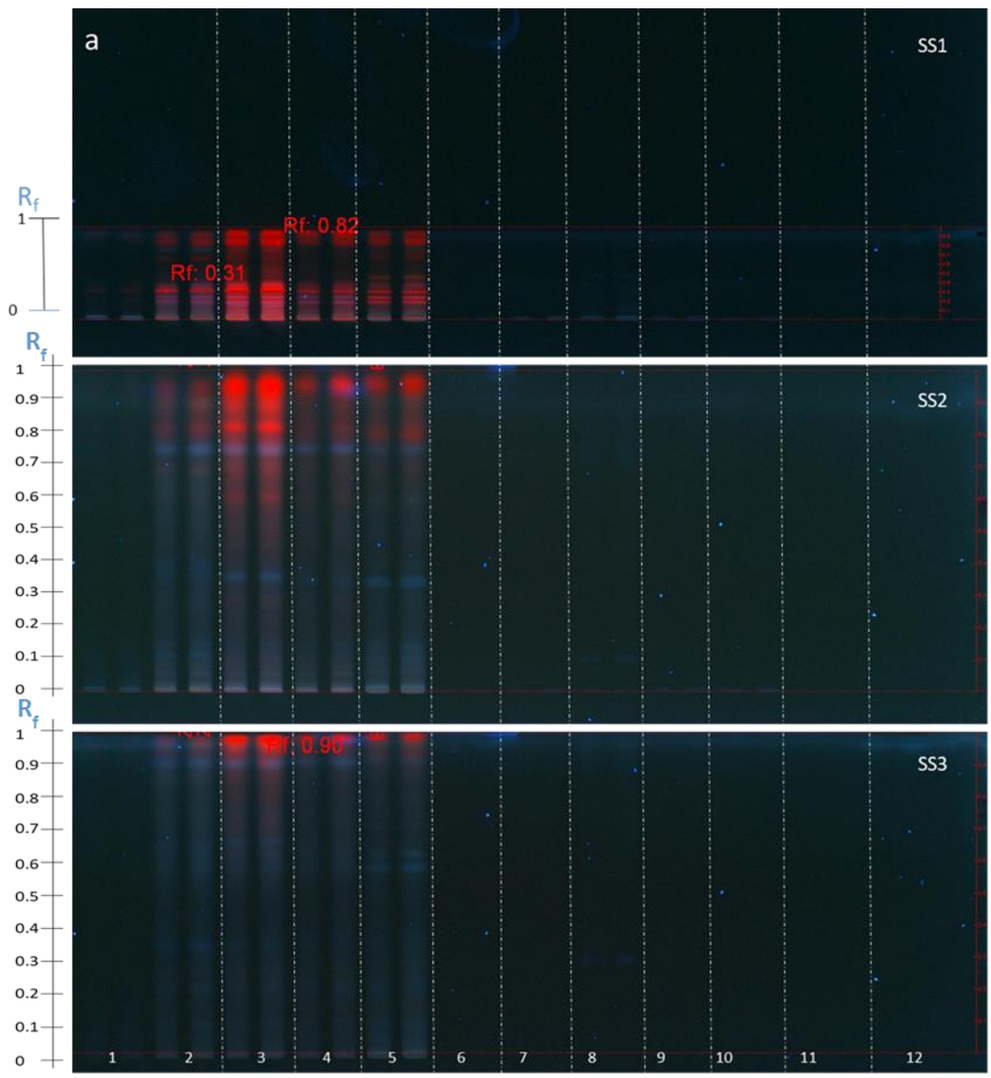


Figure 73: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapogenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Senégnine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), aux trois étapes du système d'élution multiple SS1, SS2 et SS3 .

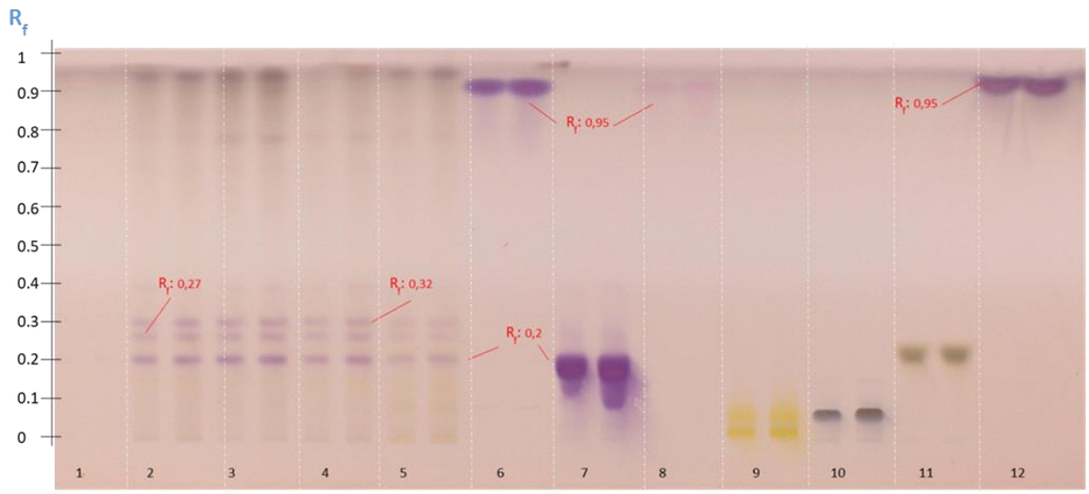


Figure 74: Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 (b) des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon le M1 (piste 5), ainsi que les standards,

Soyasapogenol (piste 6), et Soyasaponine (piste 7), Sénégénine (piste 8), Solanine (piste 9), Digitonine (piste 10), Glucose-fructose (piste 11) , et acide oléanolique (piste 12), selon le système d'élution S2)

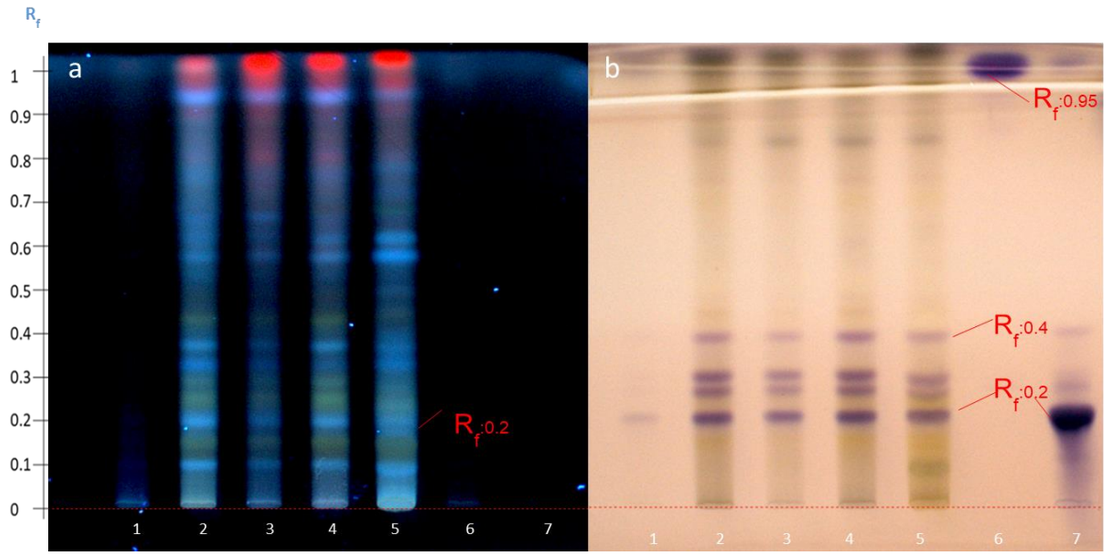


Figure 75: Profil HPTLC obtenu à 366 nm avant révélation sous UV (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 successivement (b), des 4 extraits de Zaghouan selon P1 (piste 2), P2 (piste 3), P3 (piste 1), P4 (piste 4), et selon la méthode M1 (piste 5), ainsi que les standards, Soyasapogenol (piste 6), et soyasaponine (piste 7), selon le système d'élution S2

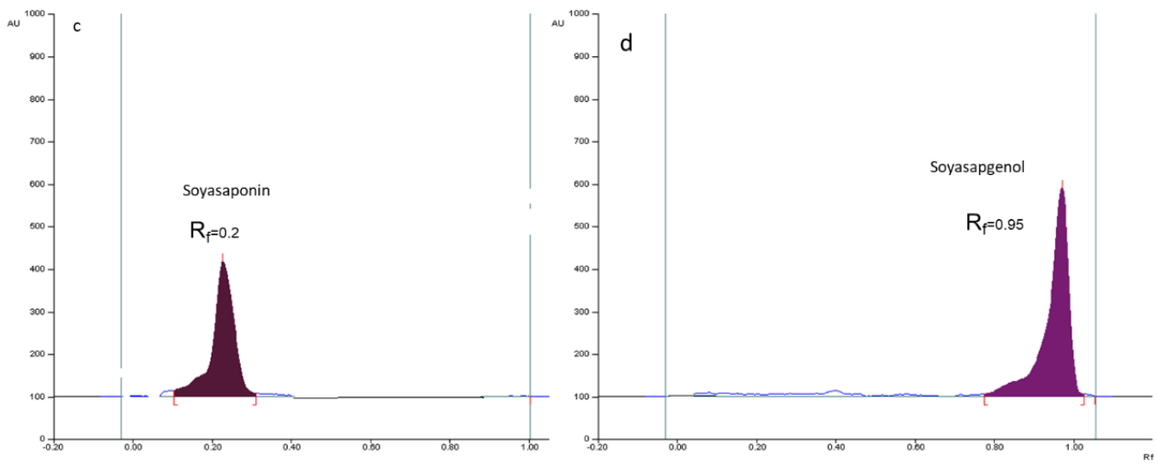


Figure 76: c) Densitogramme de soyasaponine à 600 nm au RF= 0.2 et (d) densitogramme de soyasapogenol au RF 0,95 suivant le système d'élution S2

Le profil de l'extrait de Zaghouan obtenu selon P3 n'a montré aucun spot après le dépôt de 10 µL (Piste 1, Figure 74) mais après l'augmentation du volume à 25 µL (Piste 1, Figure 75), une seule tache violette à R_F = 0,2 a été détectée après développement et seule une seule tache bleue à R_F = 0 (Figure 75-a) a été observée à 366 nm. Ce protocole d'extraction semble finalement être le protocole le plus sélectif pour la purification des saponines.

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

Les profils HPTLC des populations de Bizerte, Siliana et Kairouan obtenus selon P1 après visualisation avec un réactif anisaldéhyde-H_2SO_4 sont similaires (Figure 77). En effet, trois spots violets majeurs ont été détectés: le premier au même R_F que la soyasaponine (RF = 0,2), un

deuxième à R_F= 0,28, et une troisième à R_F = 0,32. Le spot retardé à une valeur R_F de 0,4 dans l'extrait de Zaghouan observé dans la figure 63 était beaucoup moins intense dans cette analyse. Le soyasapogénol a été détecté comme d'habitude à R_F = 0,95.

Les saponines ne contiennent pas de doubles liaisons conjuguées pouvant former des chromophores, et sont donc difficilement détectables sous UV [289, 290]. L'utilisation d'un révélateur tel que l'anisaldehyde sulfurique [289], induit la formation de couleurs bleues, jaunes, vertes ou violettes par les saponines [87, 88].

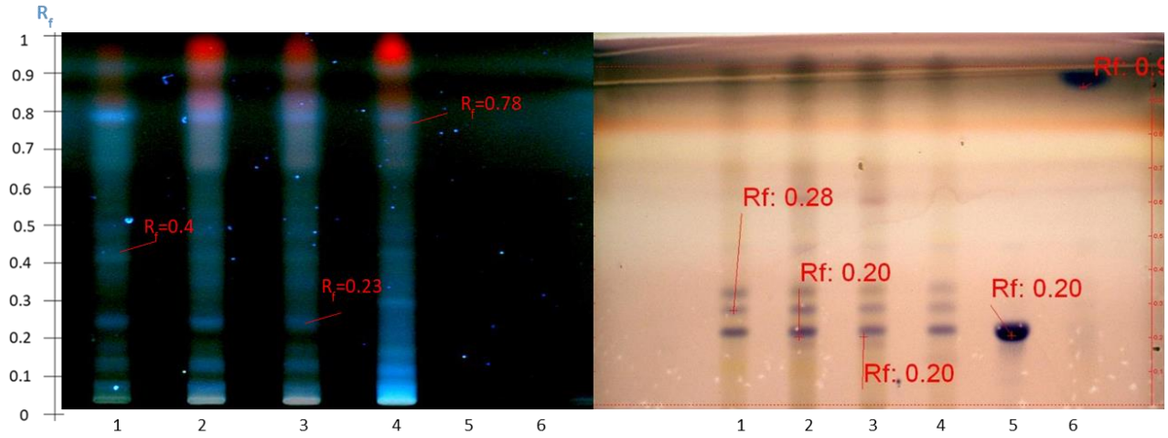


Figure 77: Profil HPTLC obtenu avant révélation à 366 nm (a) et après révélation à l'anisaldéhyde-H2SO4 (b), des 4 populations : Zaghouan (piste 1), Siliana (piste 2), Bizerte (piste 3) et Kairouan (piste 4) selon P1 ainsi que les standards, Soyasaponine (piste 5), et Soyasapgenol (piste 6) selon le système d'élution S2.

En conclusion, à cette étape, les saponines triterpénoïdes sont plus susceptibles d'être détectées au même RF que la soyasaponine après visualisation avec le réactif d'anisaldéhyde-H2SO4, avec une intensité sensiblement plus élevée dans la population de Siliana que dans les autres populations.

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

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

Le spot de la soyasaponine observé à R_F = 0,2 (Figure 78) est absent dans cette analyse, suggérant une hydrolyse totale de la soyasaponine libérant la partie aglycone de la molécule. Le profil HPTLC obtenu après hydrolyse a confirmé la présence de la saponine (Figure 79). Dans les pistes 1 et 2, un seul spot a été retardé à une valeur R_F de 0,80 comme on le voit pour le standard hydrolysé sur la piste 3. Le système SS2 a été utilisé plutôt que SS3 afin de stopper la migration de l'aglycone après hydrolyse avant le front de solvant.

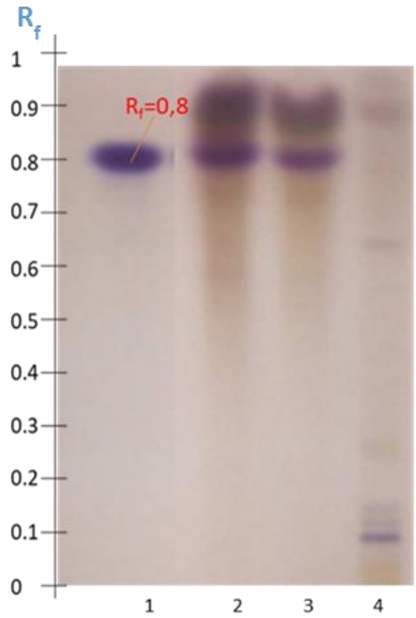


Figure 78: : Profil HPTLC obtenu après révélation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 en utilisant le système SS2. Phases chloroforme du standard de sojasaponine hydrolysé (Piste 1) et de l'extrait de Zaghouan-P3 hydrolysé (Pistes 2 et 3) et de l'extrait de Zaghouan-P3 non hydrolysé (Piste 4).

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

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

2.3.5 Quantification du Soyasapogenol

2.3.5.1 Quantification de l'extrait ZA-P3

Le dosage des saponines est évalué selon deux voies : par HPTLC, en se basant sur les densitogramme (voir § 9.2) et par un dosage spectrophotométrique (voir § 9.1) en plaques mulitpuits. Cette quantification a été réalisée essentiellement pour l'extrait ZA-P3 (Figures 78 et 79).

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

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

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

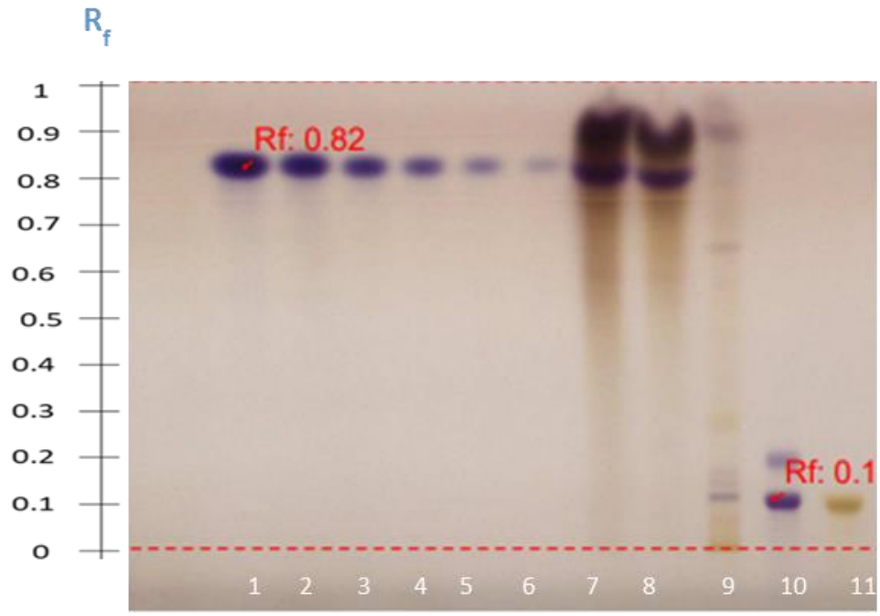


Figure 79: : Profil HPTLC obtenu après révélation à l'anisaldéhyde- H2SO4 de Soyasapogenol (piste 1-2 µg),(piste 2-1 µg),(piste 3-0.5 µg),(piste 4-0.25 µg),(piste 5-0.125 µg),(piste 6-0.625 µg),phase chloroforme ZA-P3(piste 7-8),ZA-P3 (piste 9), Soyasaponine (piste 10), Glu-fru (piste 11) selon le système d'élution S2

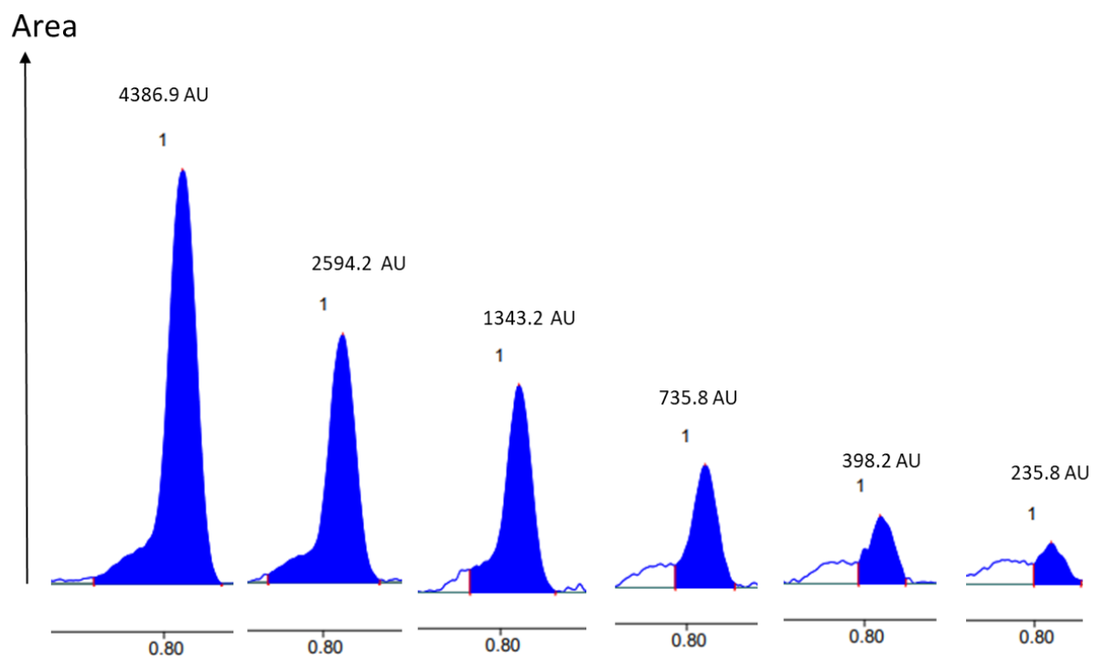


Figure 80: Densitogrammes du soyasapogénol obtenus à 6 concentrations différentes après révélation avec l'anisaldéhyde-H2SO4 et développement SS2, qui ont servi à calculer la courbe d'étalonnage

2.3.5.2 Quantification des extraits des 4 populations par spectrophotométrie

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

Les extraits SIL-P1, ZA-P1 et BI-P1 présentent sensiblement la même quantité de saponine, 30 mg/g d'extrait ou bien 3%. Cependant, les extraits Kairouan-P1 semblent sortir du lot et exhibe 8,35 % de saponine.

En comparant à d'autres Astragales, l'espèce *Astragalus hamosus* L. présente une quantité élevée de saponine.En effet, chez *Astragalus glycyphyllos*, la quantité de saponines est 103,77 ± 0,04 ng/mg c'est dire 0,000103 g/g [227].

Par ailleurs, chez *Astragalus Radix (Astragalus membranaceus et Astragalus mongholicus)*, les concentrations des principales saponines triterpéniques sont mentionnées par Lee et al. (2017): AS-IV 83,79 µg/g ; AS-III 181,23 µg/g ; AS-II, 234,02 µg/g et AS-I 647,09 µg/g [290].

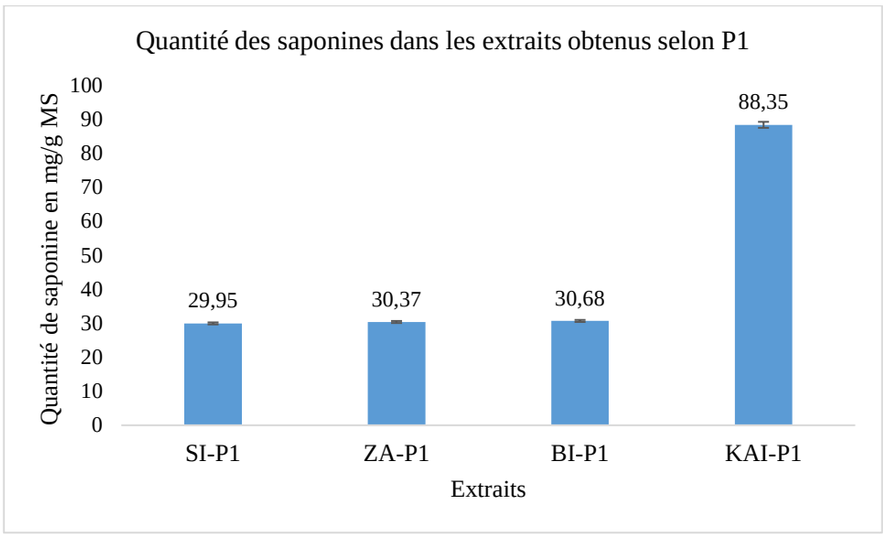


Figure 81: Histogramme de quantité de saponines dans les extraits SIL-P1, ZA-P1, BI-P1 et KAI-P1

2.4 Conclusion

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

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

Les molécules ciblées dans les extraits d'après la littérature [106], sont les isomères soyasaponine/asukisaponine ($C_{48}H_{78}0_{18}$) dont la masse attendue est de 942,51 et l'aglycone soyasapogenol ($C_{30}H_{50}O_3$) dont la masse est de 458,37.

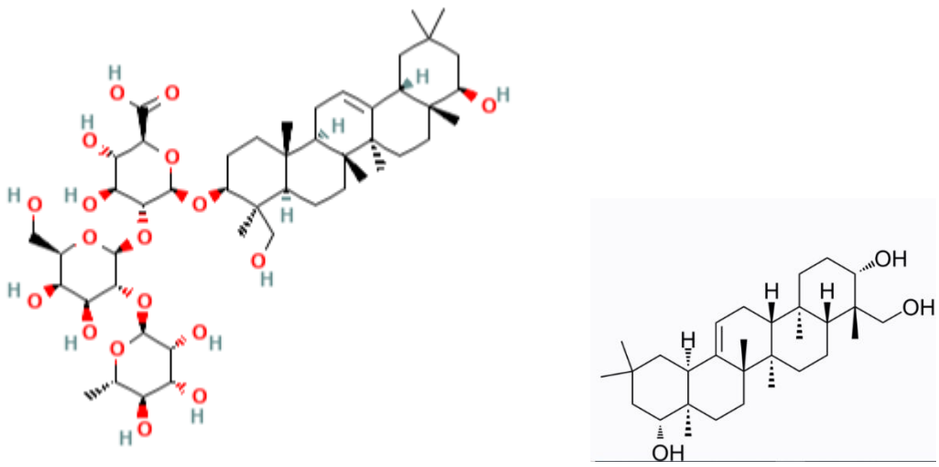


Figure 82: Formule chimique de la saponine soyasaponine I et de son aglycone et soyasapogenol.

Les fragments suivants ont été recherchés dans les extraits d'Astragalus hamosus L. avant et après purification par HPTLC ainsi que dans les extraits hydrolysés par analyse LC- MS/MS (Figure 82).

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

- En mode positif,
- m/z=943 : $[M+H]^+$
- m/z=965 : $[M+Na]^+$
- m/z=957 : $[M+CH_2+H]^+$
- m/z=979 : $[M+CH_2+Na]^+$
- En mode négatif,
- m/z=941 : $[M-H]^- = C_{48}H_{77}0_{18}$
- m/z=977 : $[M+Cl]^- = C_{48}H_{18}0_{18}Cl$
- m/z=991 : $[M+CH_2+Cl]^- = C_{49}H_{80}0_{18}Cl$

De plus, les masses identifiées suite à l'analyse du standard de soyasapogneol par LC-MS/MS et UPLC TOF-MS-ES et recherchées dans les extraits sont les suivantes:

- En mode positif,
- m/z=459 : $[M+H]^+$puis perte d'eau ; m/z=441 et m/z=423.
- En mode négatif,
- m/z =457 : $[M-H]^-$, pas d'ionisation de l'aglycone en UPLC TOF MS en mode ESI négatif pour le soyasapogénol.

3.1 Analyse de BI-25-M1 et BI-300-M1 par HPLC-SM^2

Tout d'abord, les échantillons de la population de Bizerte obtenus pas la méthode d'extraction M1 (extraction méthanolique) ont été analysés par HPLC-SM^2 en mode ESI négatif selon les conditions décrites Chapitre 2 §6. Cette analyse n'a pas permis d'identifier la présence des saponines ciblées dans l'extrait. Cependant, 19 composés ont été détectés dans l'extrait BI-25-M1, pour 23 composés dans l'extrait plus concentré BI-300-M1 (Figure 83) dont les pics majoritaires sont récapitulés dans le tableau 15(les spectres de chacun des pics sont donnés en annexe).

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

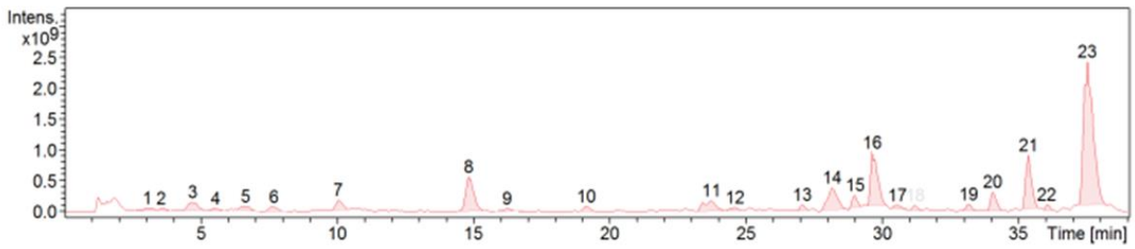


Figure 83: Chromatogramme TIC (Total Ionic Current) de l'extrait BI-300 mg-M1.

.Tableau 15: Composés détectés dans BI-300mg-M1

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

3.2 Analyse des extraits de Zaghouan par spectromètre de masse en mode ESI$^-$

Tous les extraits de Zaghouan obtenus par les différents protocoles d'extraction ainsi que les standards soyasaponine et soyasapogenol ont été analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électronébulisation ESI$^-$ (Figures 84 à 86) par injection directe. Le résultat est récapitulé dans le tableau ci-dessous (Tableau 16) :

Tableau 16: Analyse des extraits d'Astragalus hamosus L. de la population de Zaghouan par spectrométrie de masse MSn en mode ESI négatif.

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

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

La soysaponine ayant perdu un rhamnose dont le rapport m/z correspond à 795 et la soyasaponine ayant perdu sa partie sucrée, m/z 457, ont également été détectés.

Le schéma de fragmentation de la saponine dans la trappe d'ion est proposé par la perte de la partie glycolsylée et d'un rahmnose comme expliqué dans la figure 86.

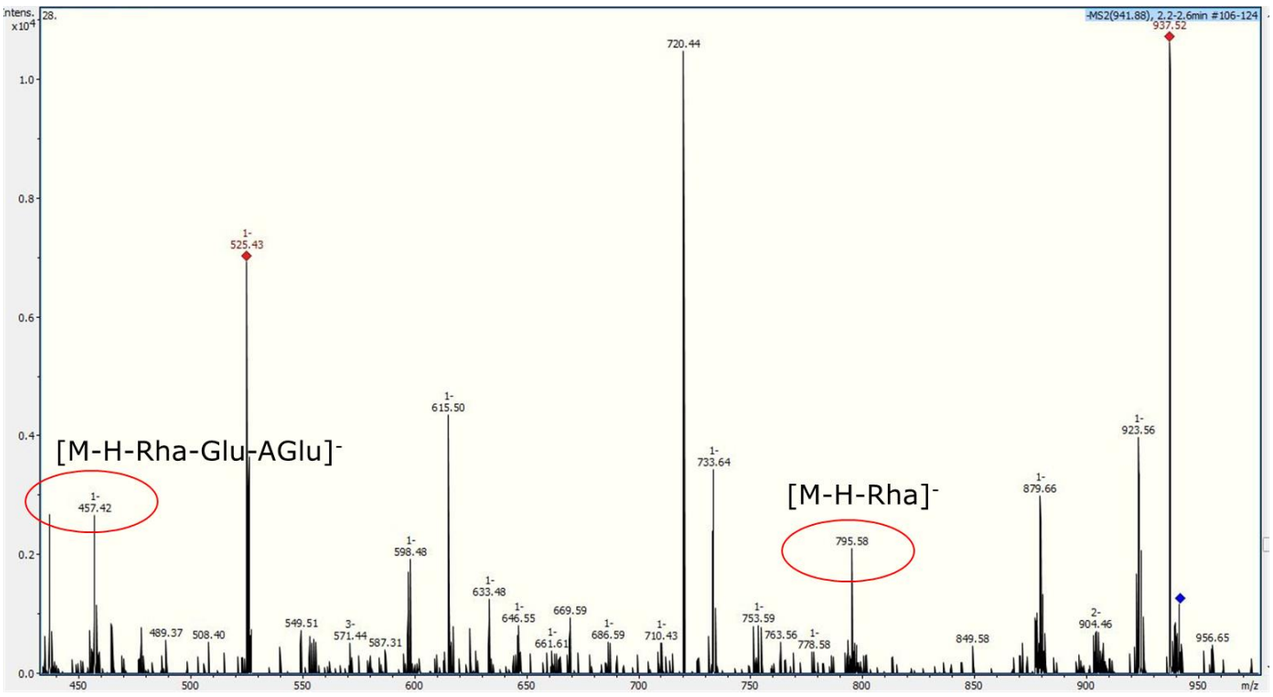


Figure 84: Spectre SM2 (ESI-) de l'ion m/z 941,88 de l'extrait de ZA-P1.

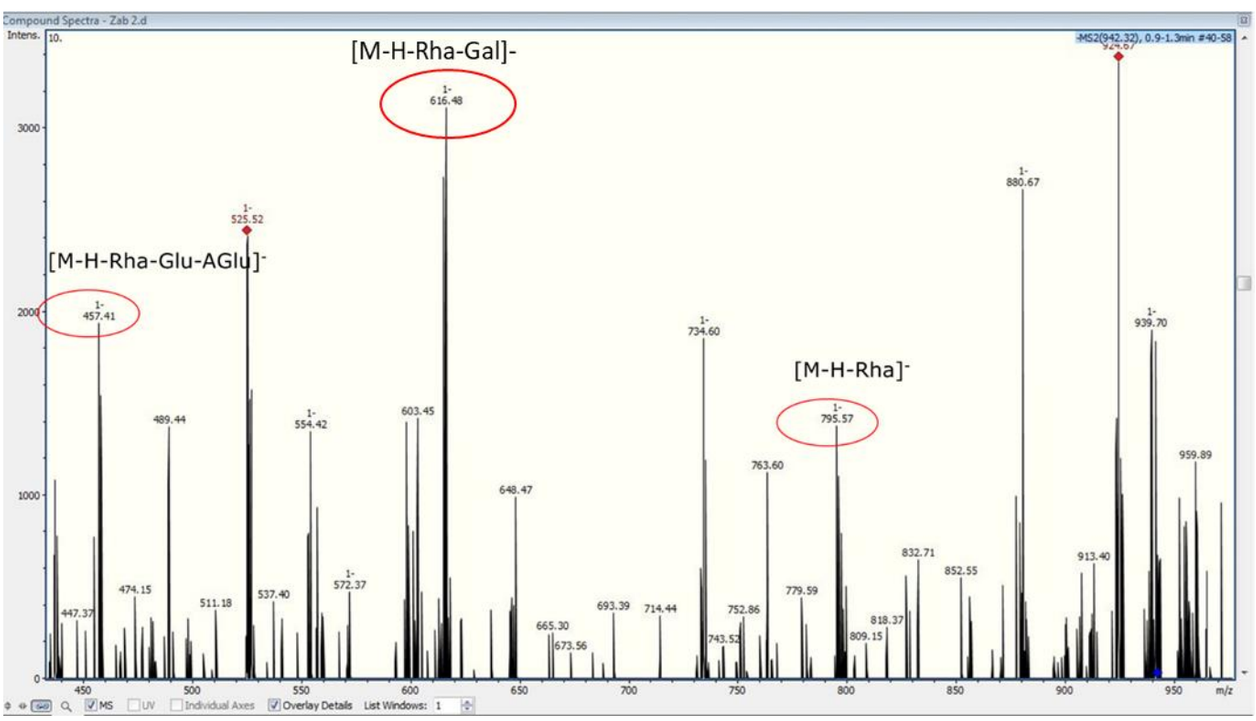


Figure 85: Spectre SM2 (ESI-) de l'ion m/z 942,32 de l'extrait de ZA-P2.

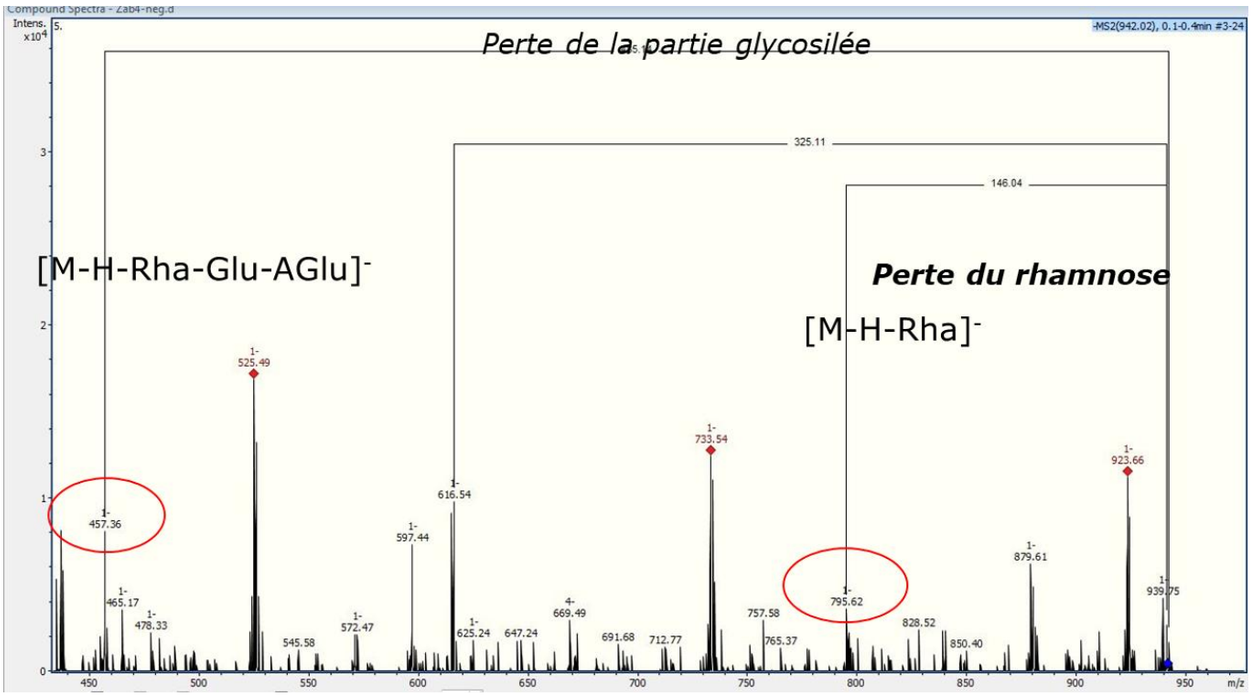


Figure 86: Hypothèse de fragmentation de la saponine azukisaponine dans les extraits de Zaghouan obtenus par le protocole P4 (Spectre SM2 (ESI$^-$) de l'ion m/z 942,02.

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

Afin de confirmer la purification par HPTLC de la fraction saponine au R_F = 0,2 (Figure 82), les spots positionnés à ce R_F ont été prélevés de deux manières. Soit au moyen de l'interface CAMAG TLC-SM qui permet de faire un transfert direct de la plaque TLC par élution vers le spectromètre de masse (voir protocole Chapitre 2 §7), soit par prélèvement de la zone de migration du chromatogramme par grattage au scalpel après migration des extraits. La silice prélevée est alors extraite au méthanol (voir protocole Chapitre 2 §8) et l'extrait méthanolique obtenu est ensuite injecté en spectrométrie de masse (Figure 88).

Les spots d'intérêt issus des extraits de la population de Zaghouan et obtenus par les protocoles P1, P2 et P4 ont été analysés par spectrométrie de masse SM^n en mode ESI positif (Amzon SL ion trap, Bruker) selon les conditions décrites Chapitre 2 §6. Les résultats sont présentés dans la Figure 88.

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

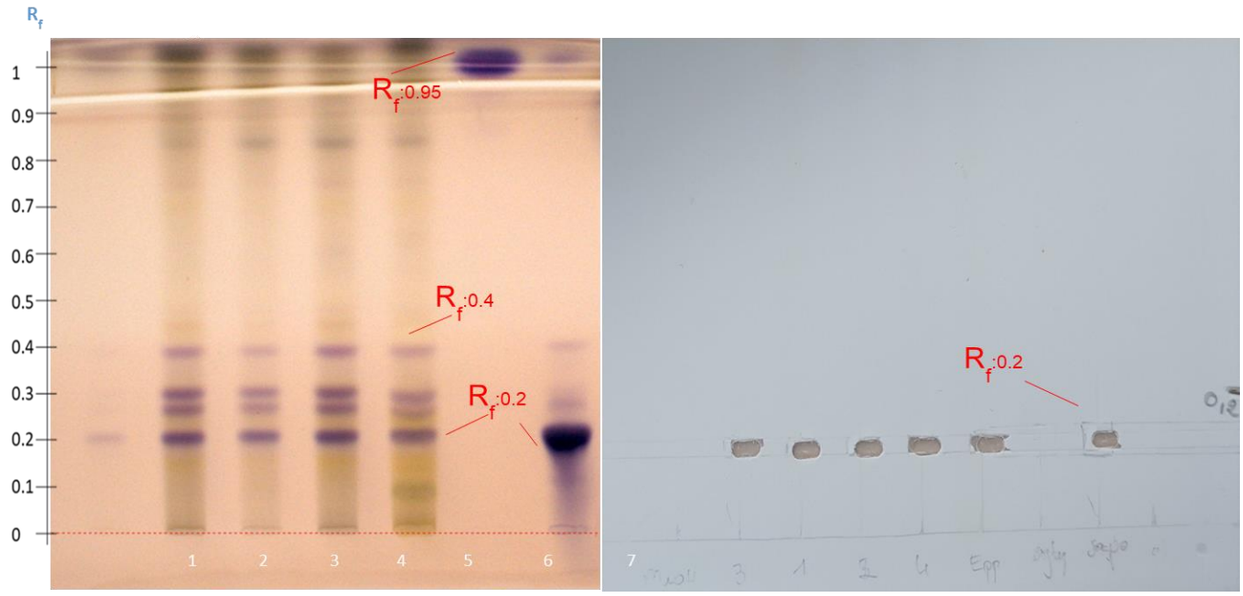


Figure 87: Principe du couplage HPTLC-SMn. Transfert direct du spot vers le spectromètre de masse ou bien récupération de la silice suivie d'une extraction méthanolique avant injection HPLC-MS.

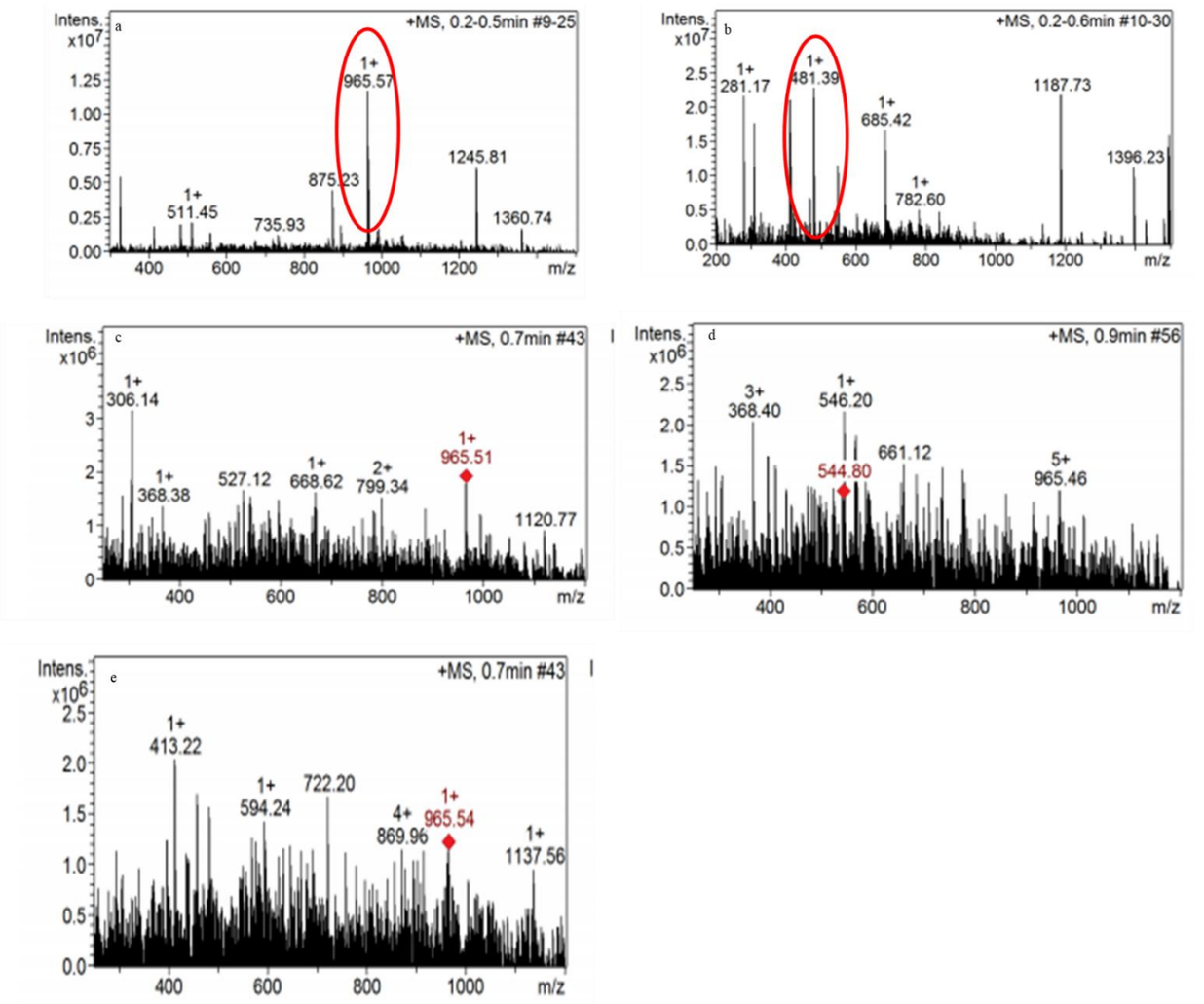
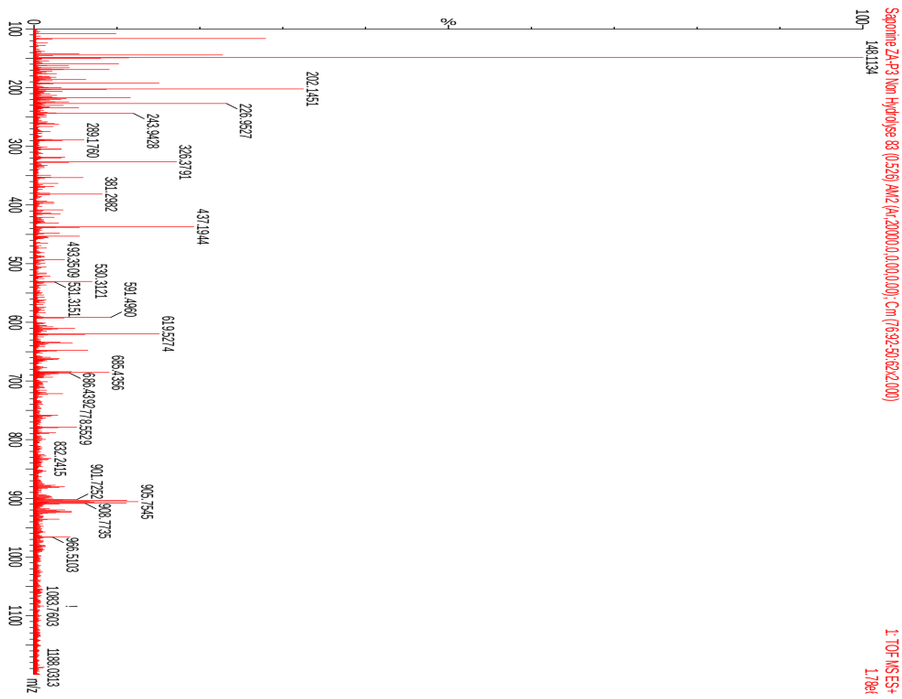


Figure 88: : Spectres de masse en mode ESI + de Soyasaponine (a), Soyasapogenol (b), ZA-P1 (c), ZA-P2 (d) et ZA-P4 (e).

Un couplage HPTLC avec un spectromètre de masse à haute résolution, UPLC Xevo G2 Q TOF (Waters) de la plateforme de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT), a été expérimenté sur des plaques de silice réalisées avec des extraits de la population de Zaghouan avant et après hydrolyse

identiques à celle de la Figure 88. Les zones de chromatographie d'intérêt situées aux Rf= 0,2 et Rf=0,8 obtenus aprés un developpement SS2, ont été prélevées et extraites au méthanol. Les extraits ont alors été analysés par spectrométrie de masse Q-TOF MS en mode ESI positif (Figures 89 et 90). Le standard soyasapogenol après migration en HPTLC ne s'ionise pas en mode ESI négatif.



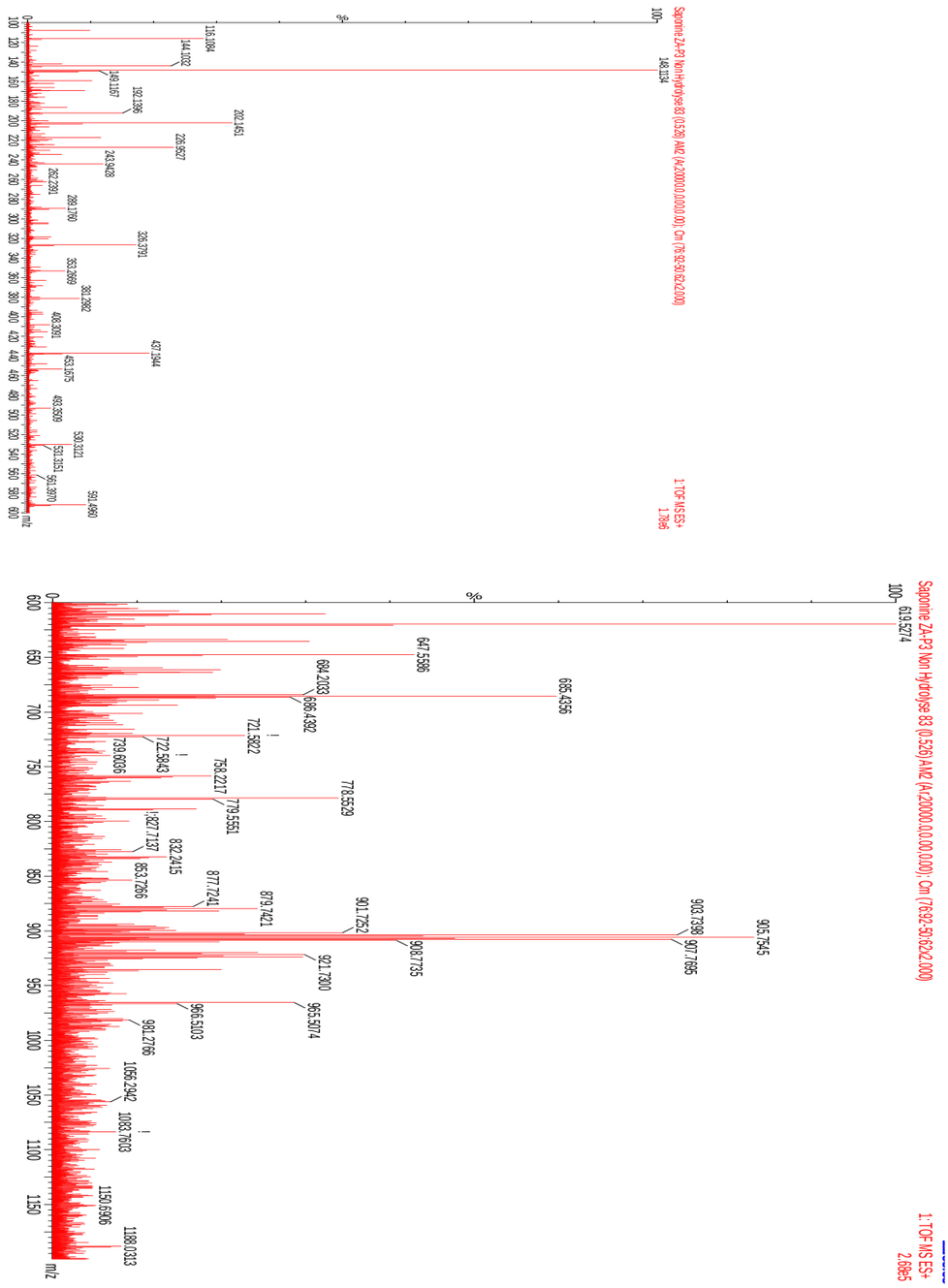


Figure 89: Zone chromatographique Rf=0,2 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF).

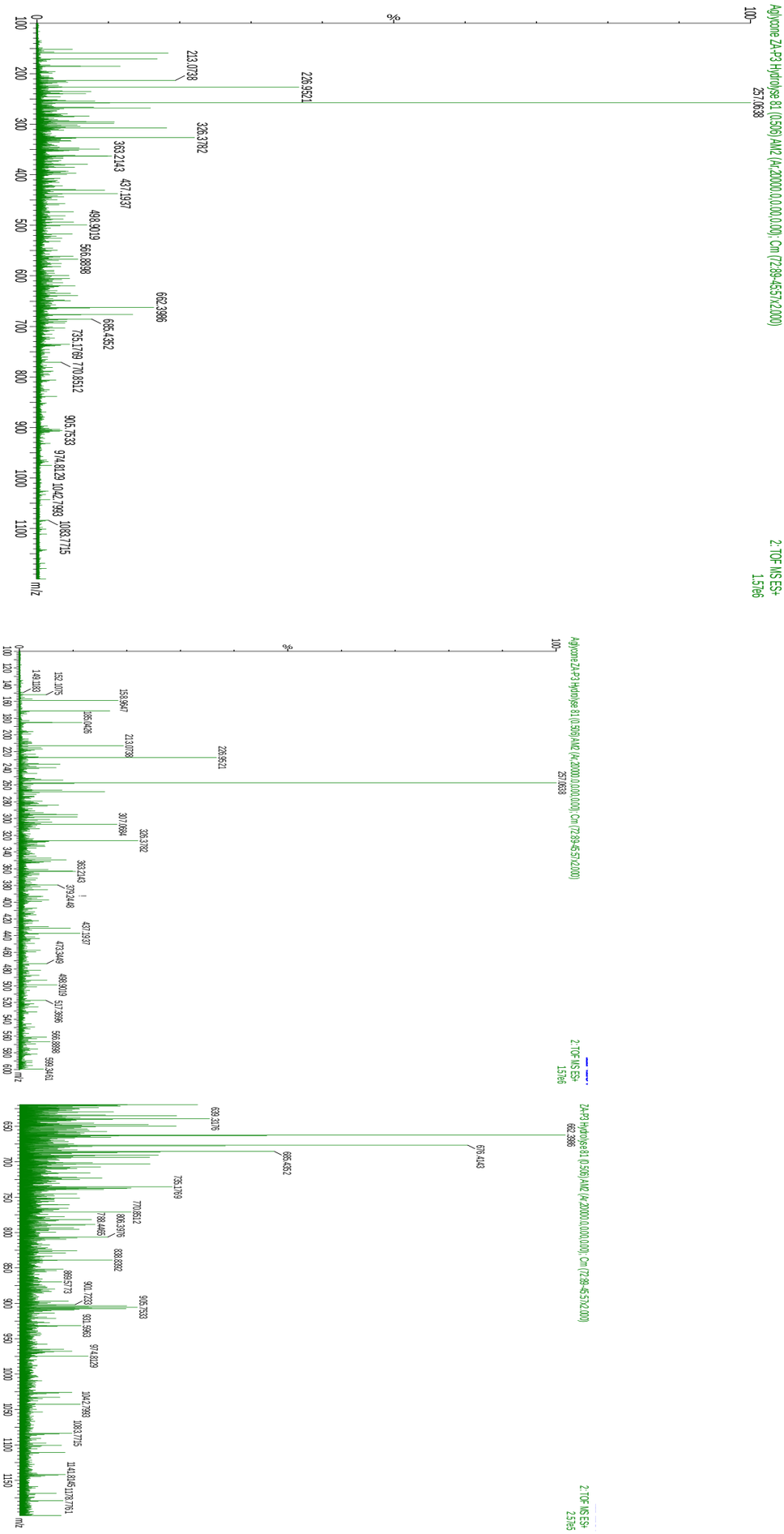


Figure 90: Zone chromatographique Rf=0,8 HPTLC ZA-P3, en mode ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) (spot d'hydrolyse).

Les composés attendus n'ont pas pu être détectés après plusieurs essais, ceci probablement lié à la présence de sels dans l'extrait ou à la concentration trop faible de l'échantillon. La limite de détection de l'aglycone soyasapogenol (prélevé sur la plaque de silice après analyse HPTLC) a été atteinte pour m/z=459 : $[M+H]^+$avec une dilution au 10 000ème dans le méthanol de la solution initiale à 0,85 g/L. Pour le standard de soyasaponine (prélevé sur la plaque de silice après analyse HPTLC), la limite de détection en mode négatif est atteinte pour une dilution 5000ème de la solution initiale à 1,95 g/L pour m/z=941. En mode positif la dilution au 5000ème pour m / =943 montre beaucoup de bruit de fond (Figures 91 à 94).

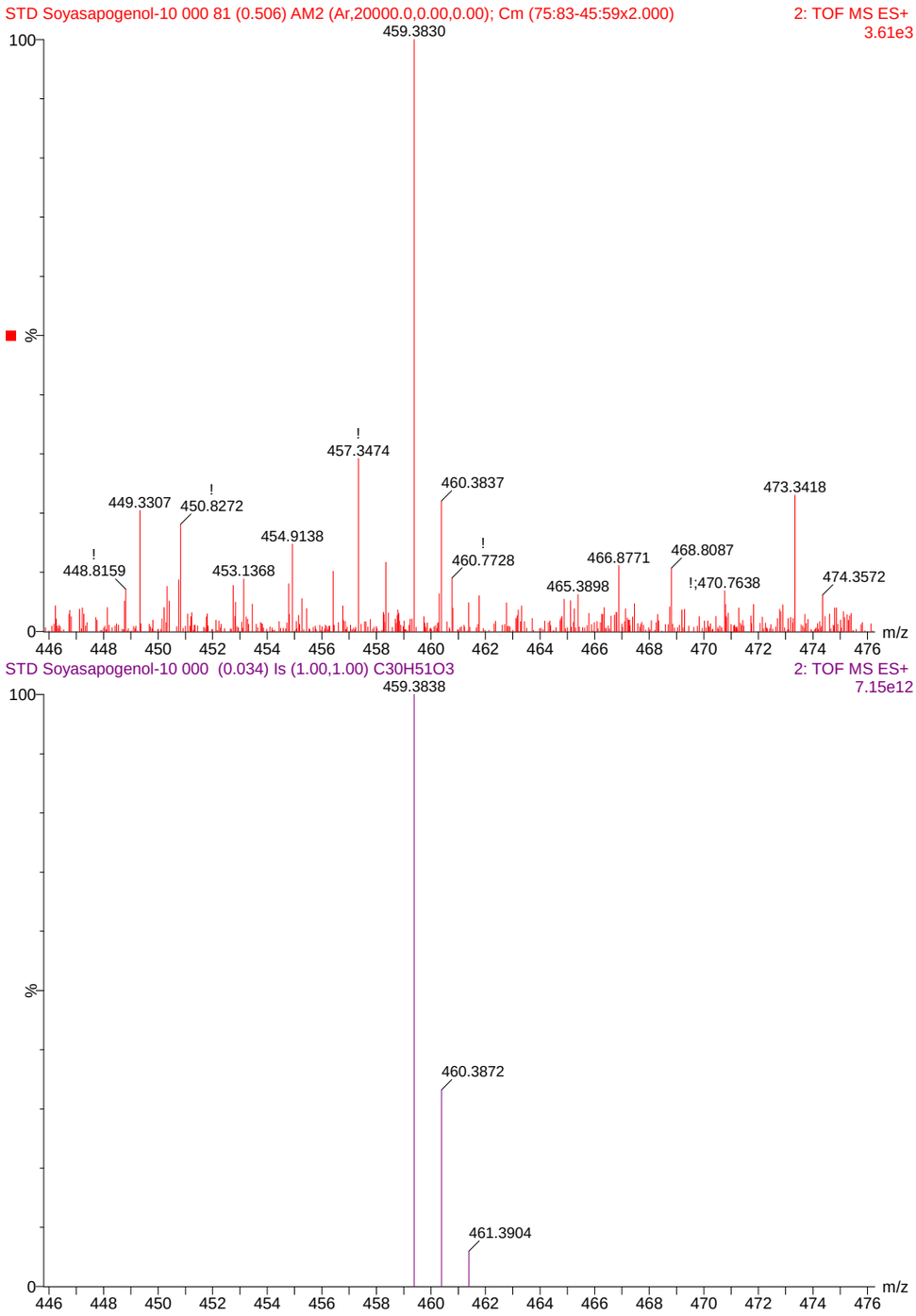


Figure 91: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (zoom à m/z=459).

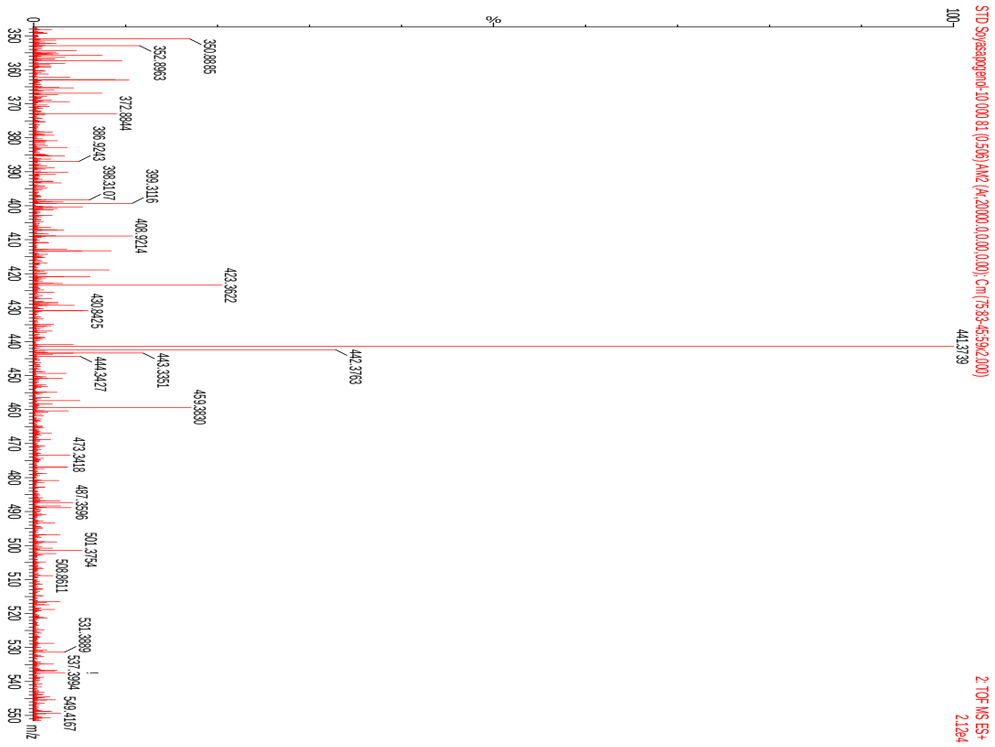


Figure 92: Standard Soyasapogenol ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 10 000 (m/z =50 à m/z=550)

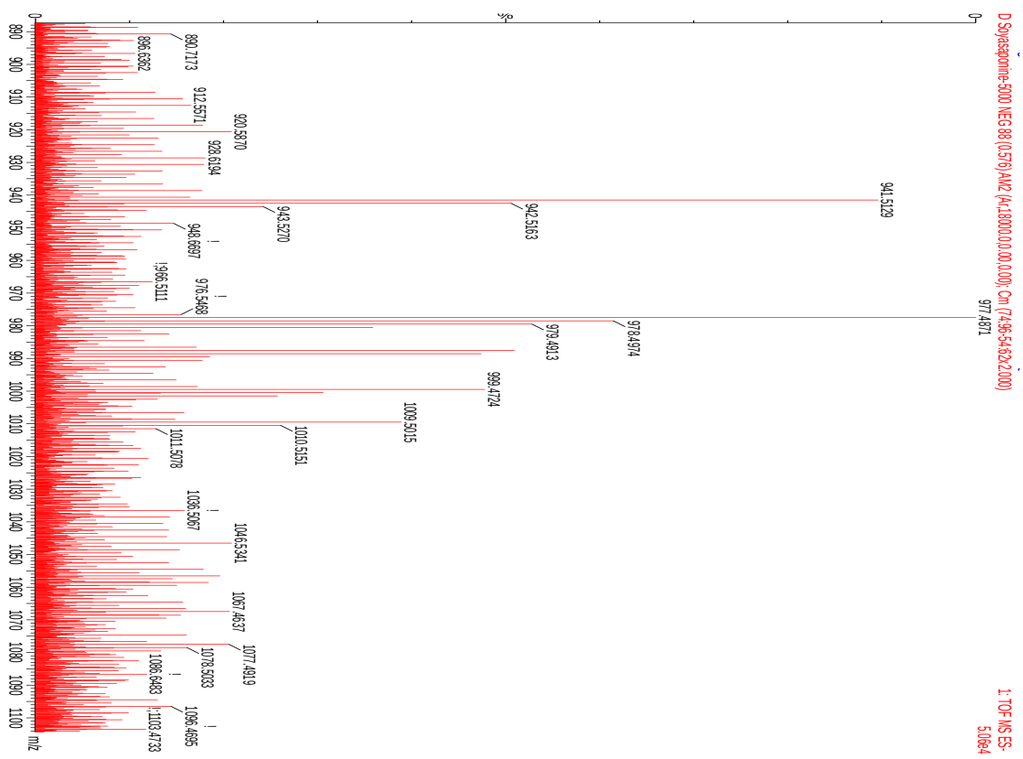


Figure 93: Standard Soyasaponine ESI MS NEG (UPLC Xevo G2 Q TOF) facteur de dilution 5 000.

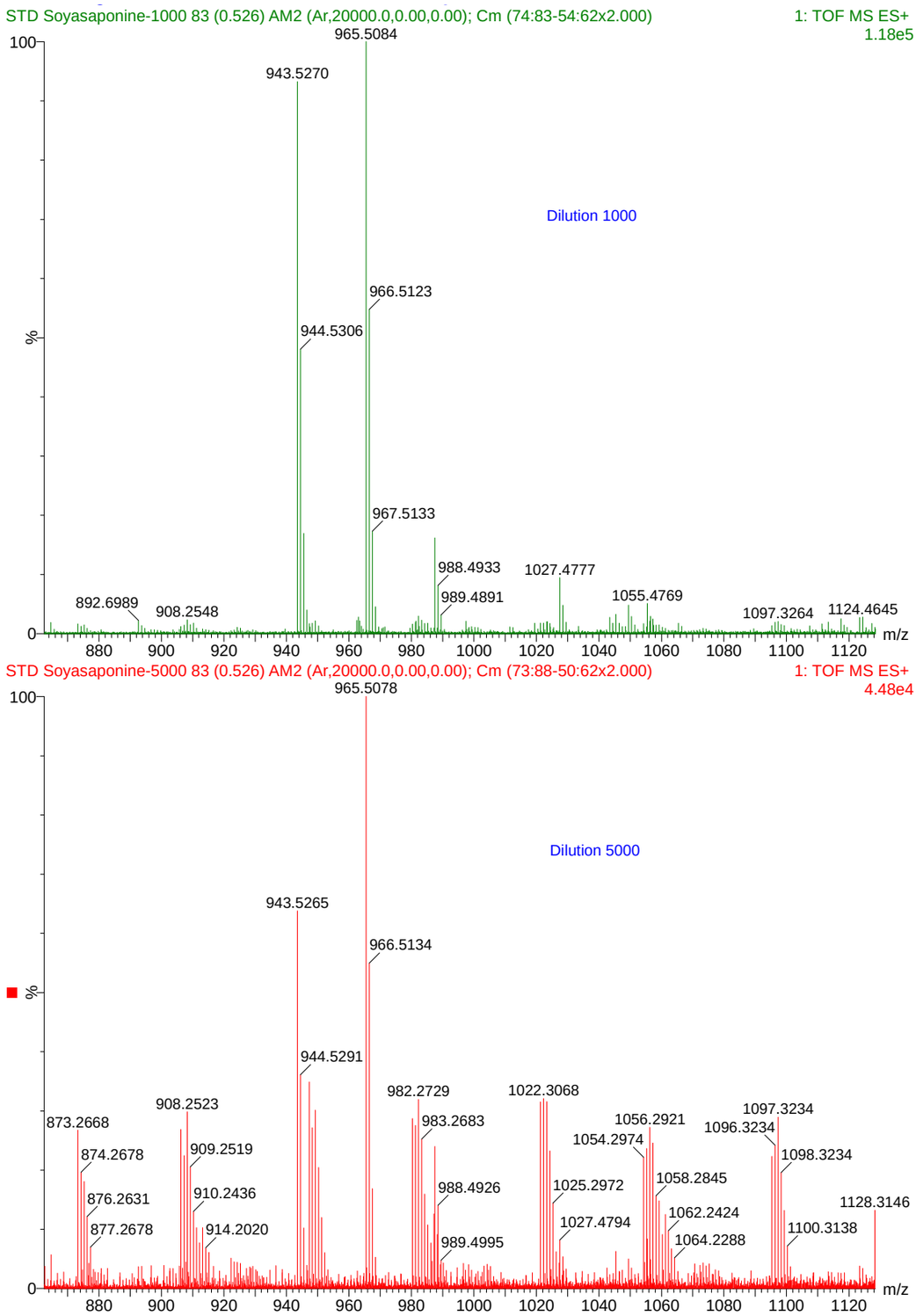


Figure 94: : Standard Soyasaponine ESI MS POS (UPLC Xevo G2 Q TOF) comparatif facteurs de dilution 5 000 et 1 000.

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

3.4 Evaluation de la teneur en polyphénols totaux

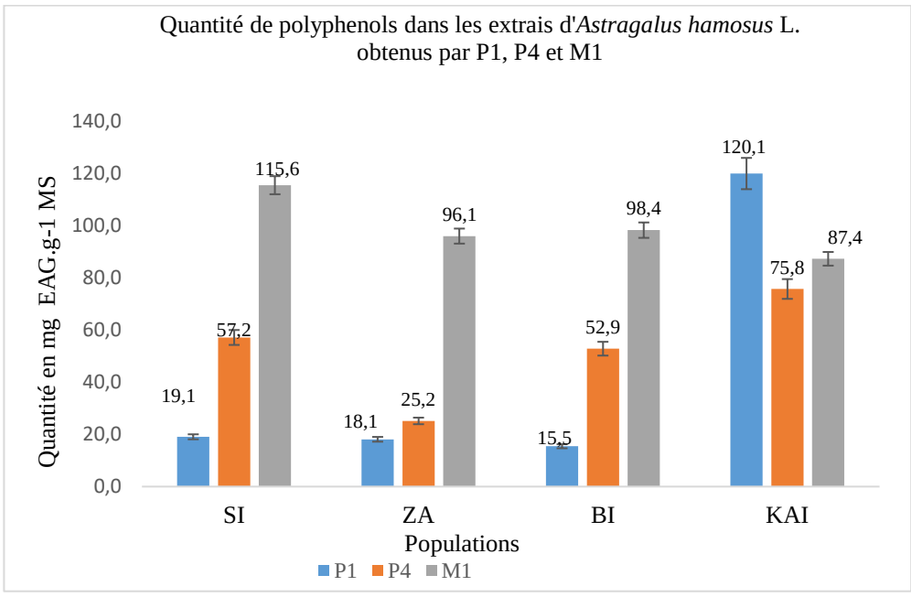


Figure 95: Quantité des polyphénols totaux dans les extraits d'Astragalus hamosus L. obtenus selon P1, P4 et M1 en mg EAG.g-1 MS

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

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

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

La quantification des polyphénols chez les astragales a été discuté dans plusieurs études. En effet, chez *Astragalus ponticus Pall*. Les fleurs contiennent 13,38 mg EAG.g-1 MS, les feuilles 26,4 mg EAG.g-1 MS, les racines 21,54 mg EAG.g-1 MS) et les tiges contiennent 13,35 mg EAG.g-1 MS [291]. Chez *Astragalus macrocéphal*, les fleurs contiennent 37,68 mg EAG.g-1 MS et les racines contiennent 5,6 mg EAG.g-1 MS [292]. La teneur totale en composés phénoliques dans les échantillons d'*Astragalus danicus L* variait de 100,75 ± 3,87 mg/g (district de Yashkinsky) à 190 ,95 ± 7,34 mg/g (district de Belovsky) [293].

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

3.5 Concluions du chapitre:

L'extraction, la purification et la quantification des saponines présentent un véritable défi. Les astragales ont été largement étudiées mais les glycosides des soyasaponines sont structurellement similaires et peuvent posséder des temps de rétention HPLC identiques, ainsi que des masses moléculaires et des schémas de fragmentation similaires lorsqu'ils sont analysés par spectrométrie de masse.

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

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

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

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

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

Chapitre 4 : Évaluation des Activités Biologiques

Introduction :

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

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

Les activités cytotoxiques contre une lignée de cancer colorectal Caco-2 ont finalement été évaluées sur les fractions d'Astragalus hamosus. En effet, la Soyasaponine I et son aglycone le Soyasapogénol B sont connus par leur effet antiprolifératif sur plusieurs lignées cellulaires du cancer colorectal. L'activité cytotoxique de ces fractions a été évaluée sur la lignée cellulaire human embryonic kidney HEK293 car lignée non cancéreuse permettant de vérifier la sélectivité.. L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre sont discutés et comparés à d'autres espèces du genre Astragalus ou bien d'autres plantes provenant d'Afrique.

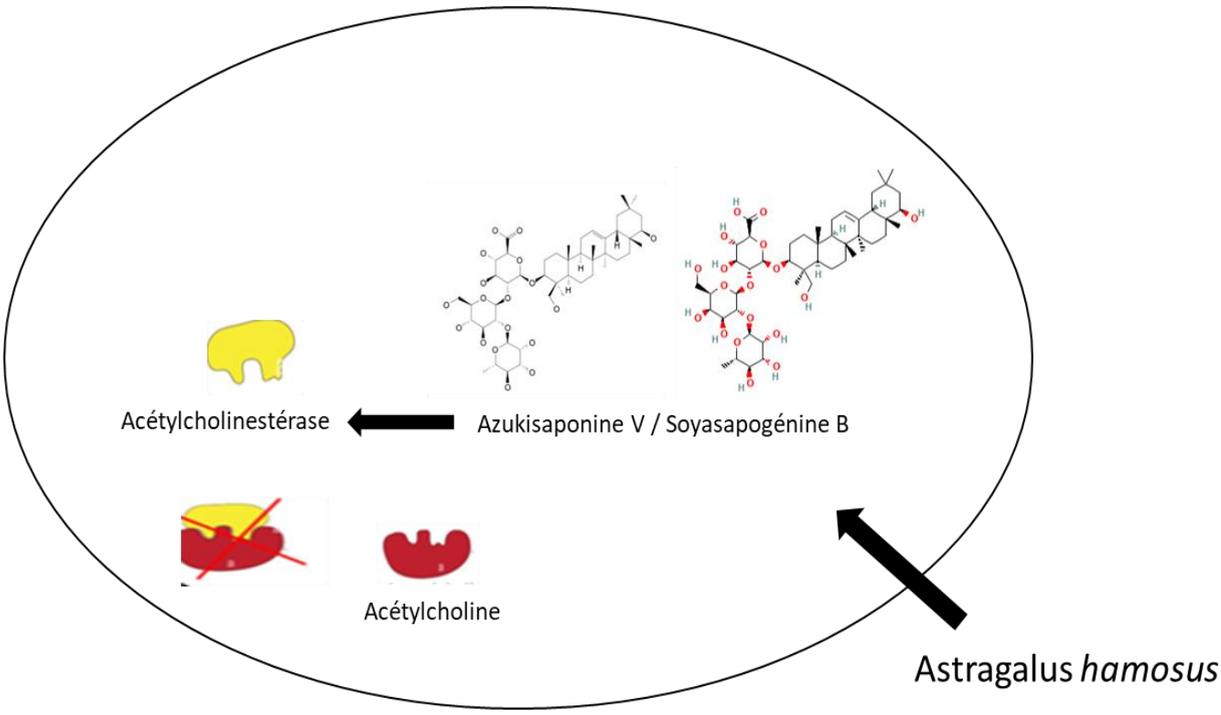


Figure 96: Première voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par inhibition de l'AchE

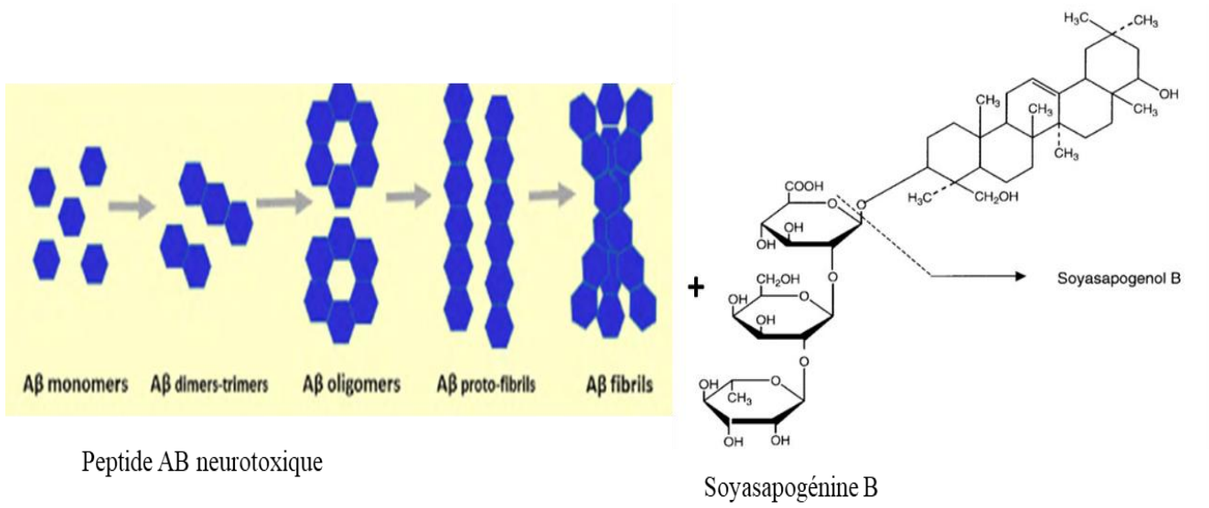


Figure 97: : Deuxième voie étudiée pour inhiber les maladies neurodégénératives par neutralisation du peptide Aβ.

1 Évaluation de l'activité antiradicalaire

L'évaluation de l'activité antiradicalaire n'a été réalisée que sur les fractions issues des protocoles d'extraction P1 et P4 pour l'ensemble des quatre populations Astragalus *hamosus* L pour des raisons essentiellement logistiques.

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

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

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

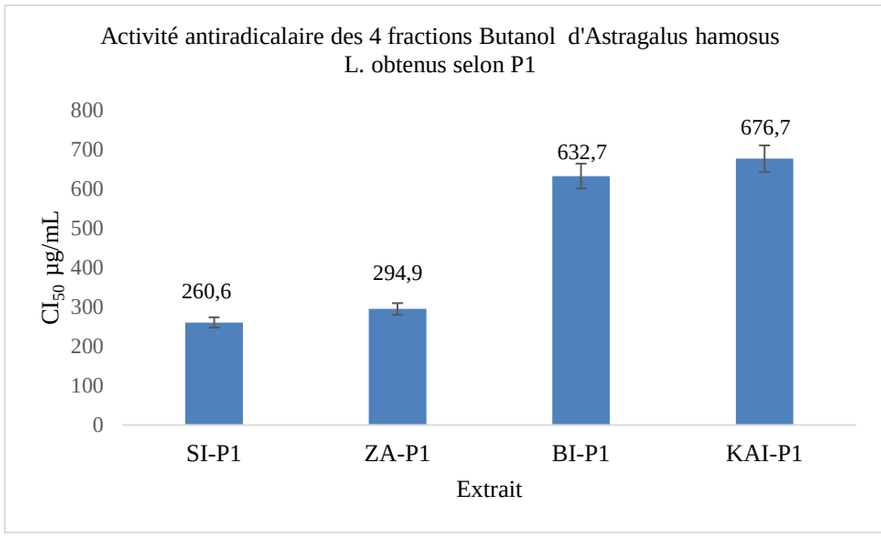


Figure 98: Activité anti radicalaire des 4 populations obtenus selon P1, exprimée en CI50 en µg/m/L

Le test de piégeage de DPPH montre une faible inhibition pour tous les extraits comparativement au Trolox (CI50= 4,5 µg/mL). Les concentrations inhibitrices CI_{50} les plus importantes sont enregistrées chez les populations Siliana et Bizerte avec des CI_{50} de 260 et 294 µg/mL successivement. Ces extraits montrent une activité plus faible que l'activité anti radicalaire la plus

faible enregistrée chez *Astragalus membranaceus* du Liban pour lequel la CI_{50} est de 102 µg/mL [294].

Des travaux ont montré une efficacité de piégeage des radicaux DPPH d'extraits au méthanol des parties racinaires et aériennes des espèces d'Astragale pour des valeurs de CI_{50} allant de 68,8 à 400,4 µg/mL [291]. En effet, chez *A. ponticus* la CI_{50} varie entre 207,9 et 141,1 µg/mL respectivement dans les parties racinaire et aérienne [295] alors qu'elle était de 626,66 et 473,33 µg/mL dans les racines et les parties aériennes d' *A. gombiformis* [296].

Récemment en 2021, les travaux de Benfarydia et al [297], ont montré que l'activité anti radicalaire d'*Astragalus gombo (racines)* variait entre 1,59 et 0,07 µg/mL Dans cette étude les chercheurs considèrent que ces résultats montrent une activité antioxydante puissante.

Par ailleurs, douze lots des racines d'Astragales ont montré une large gamme d'activités de piégeage des radicaux DPPH (CI_{50} = 1,40–9,90 µg/mL) [298].

Un extrait d'*Astragalus armatus* a exhibé une activité de piégeage de DPPH avec une CI_{50} : 67,90 µg/mL) [299].

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

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

Les résultats de l'activité antiradicalaire montrent que les polyphénols ne sont pas seuls réspensables de cette activité (voir chapitre 3) et que d'autres métabolites secondaires interviennent.

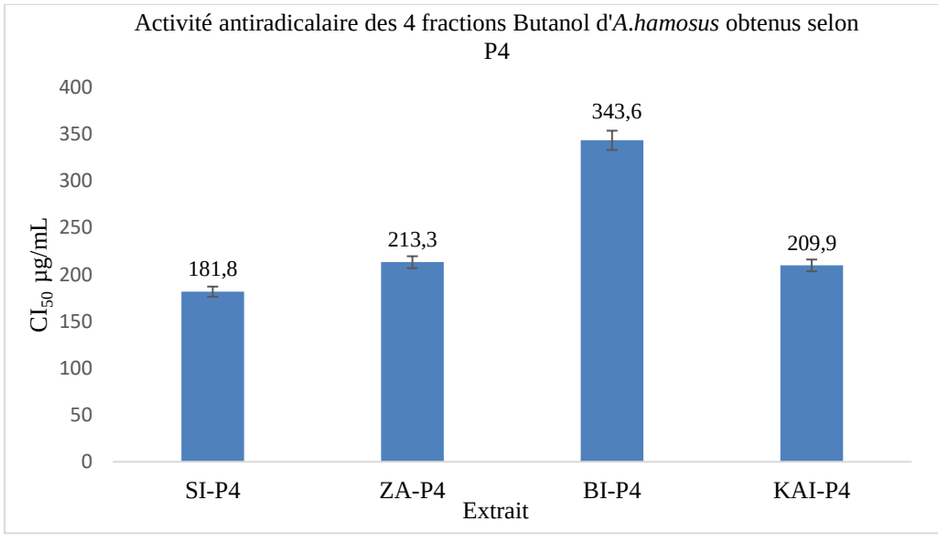


Figure 99: Activités anti radicalaires des SIL-P4, ZA-P4, BI-P4 et KAI-P4 exprimées en CI50 en µg/m/L

2 Activité anti-acétylcholinestérase

2.1 Évaluation de l'activité anti-AchE par HPTLC-Biautographie

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

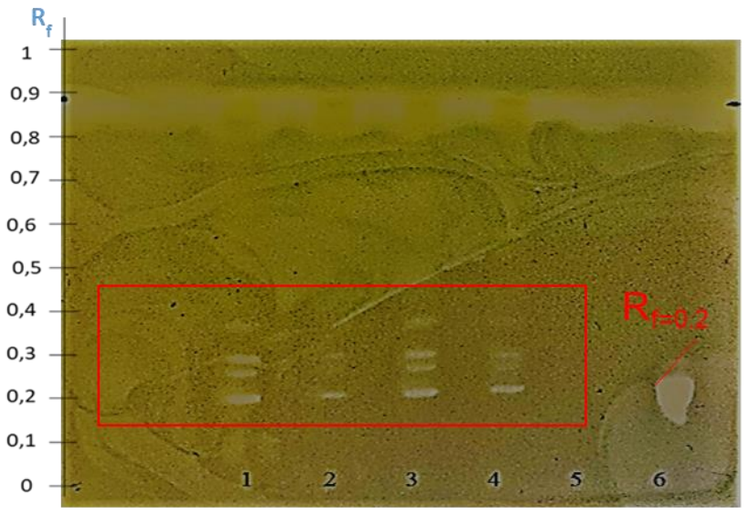


Figure 100: Dépistage de l'inhibition de l'AChE par HPTLC-Biautographie des extraits SIL-P1 (piste), BI-P1 (piste 2), ZA-P1(piste 3) et KAI-P1(piste 4), ainsi que la soyasapogenol B (piste 5) et la soya saponine B (piste 6).

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

La méthode d'Ellman, qui repose sur la détermination de la quantité de thiocholine libérée lors de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'AChE, est la méthode la plus utilisée car elle est simple et donne un accès rapide aux informations contenues dans les extraits de plantes [300].

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

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

Au démarrage à T0, la CI_{50} est de 22,12 µg/mL, puis à 42 secondes diminue à 9,3 µg/mL, à 84 secondes devient 4,25 µg/mL, 1,8 µg/mL à 126 secondes et atteint 1,45 µg/mL à 168 secondes (Figure 101). Les courbes d'inhibition de l'AchE par la galanthamine en fonction du temps et de la concentration en extrait sont présentées en annexe.

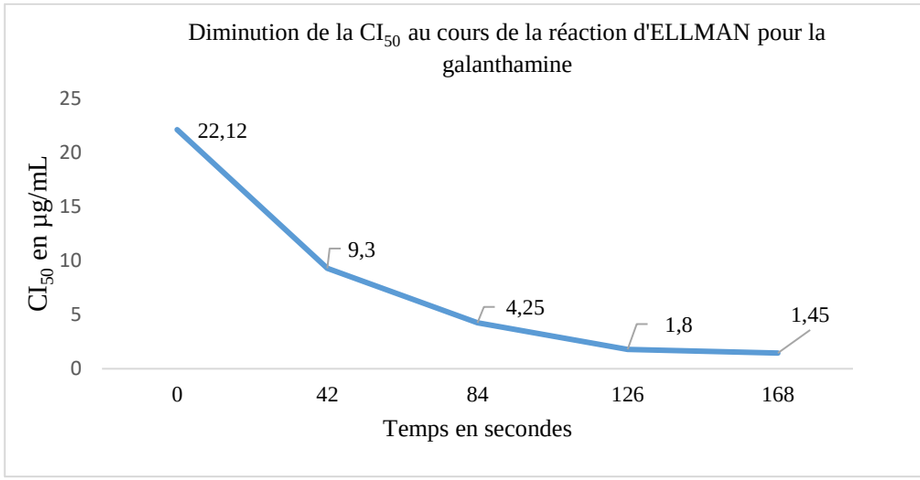


Figure 101: Diminution de la CI50 de la galanthamine en fonction du temps

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

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

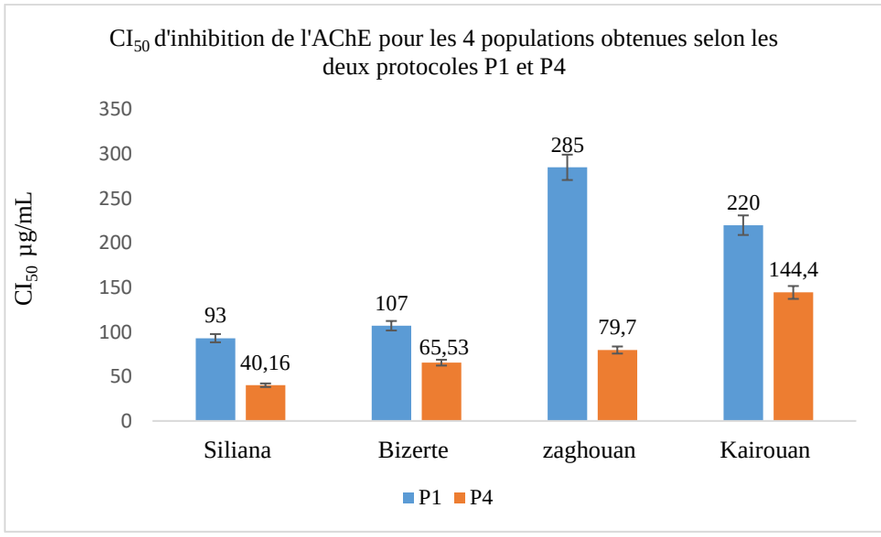


Figure 102: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par les 4 extraits, Siliana, Bizerte, Kairouan et Zaghouan selon P1 (bleue) et selon P4 (orange) à 168 secondes de la réaction d'Ellman

En se basant sur la CI_{50} de chaque extrait, on peut classer l'inhibition comme forte si CI_{50} varie, entre 0,3 et 19 µg/mL, modérée si CI_{50} varie entre 21 et 184,5 µg/mL, et faible si CI_{50} varie entre 218 et 1000 µg/mL approximativement [301]. Chez les Astragales, ces limites d'évaluation ne sont pas prises en compte, par exemple la CI_{50} des extraits d' *A. gombiformis* est de valeur 110 µg/mL, elle a été considérée comme importante et cette découverte suggère que cette espèce peut être une source possible de produits naturels anticholinestérasiques [302]. Chez *Astragalus Armatus*, la CI_{50} est de valeur l'AChE 40,25 µg/mL et elle a été considérée comme significative [303].

Les extraits obtenus par le protocole 4 ont une meilleure inhibition que les extraits obtenus par le protocole 1, ceci peut être expliqué par la présence plus marquée de molécules inhibitrices

d'acétylcholinestérase extraites grâce au protocole 4. SIL-P4 exhibe la meilleure inhibition avec une CI_{50} égale à 40,16 µg/mL, suivie de BI-P4 (CI_{50} =65,53 µg/mL) et ZA-P4 (CI_{50} =79,7 µg/mL) et finalement KAI-P4 avec CI_{50} =144,4 µg/mL.

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

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

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

Généralement, les plantes stockent les saponines sous forme de glycosides, généralement sous forme bidesmosidique, qui peuvent être hydrolysées en formes monodesmosidiques. De plus, il a été rapporté que ce changement de bidesmosidique à monodesmosidique améliore les effets biologiques des saponines [304].

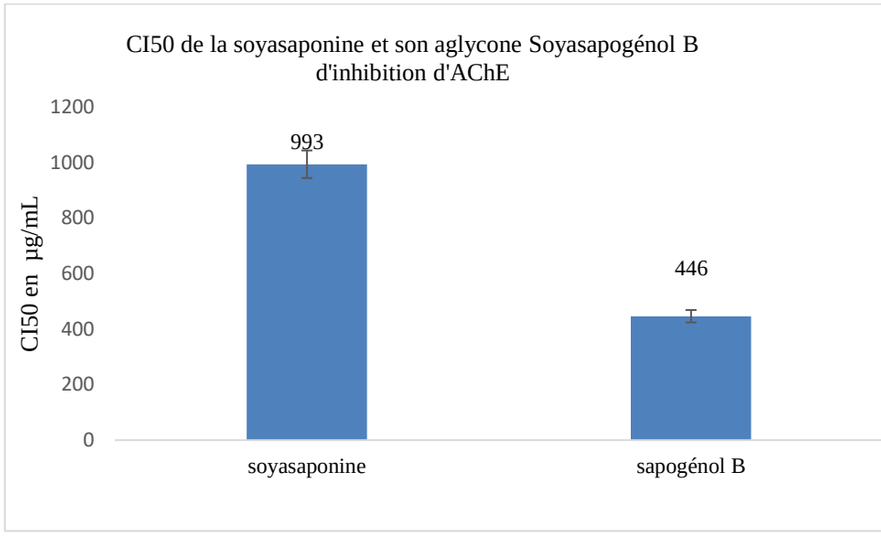


Figure 103: Histogramme de présentation de la CI50 d'inhibition de l'AChE par la Soyasaponine et le Soyasapogénol B

3 Évaluation de la Neuroprotection

Évaluation de l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire

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

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

Les extraits ZA-P1, BI-P1, SIL-P1 et KAI-P1 à 50 µg/mL augmentent la prolifération de plus ou égale à 200 %, Les pourcentages de viabilité sont 243,57 %; 221,11 %; 195,69 %; 197,27 % pour ZA-P1, BI-P1, SIL-P1 et KAI-P1 respectivement (Figure 104). En augmentant la concentration à 100 µg/mL, la prolifération reste importante mais diminue légèrement, ceci peut être expliqué par la mort cellulaire normale à cause d'une forte stimulation. En effet, en atteignant la confluence, les cellules adhérentes occupent la totalité de la surface disponible du milieu de culture où elles se

divisent jusqu'à la formation d'une monocouche, après cette étape les cellules meurent si elles ne se différencient pas [307, 308]. La multiplication des cellules PC12 est toujours observée et à 5 µg/mL avec 120,16 %; 113,60 %; 107,04 % et 141,30 % pour les mêmes extraits respectivement. Un retour à une viabilité normale est observé lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL. Nous pouvons conclure que les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 ne sont pas toxiques sur PC12 ; il s'agit plutôt des stimulateurs significatifs de leur prolifération jusqu'à une concentration de 5 µg/mL.

En se fondant sur les valeurs de p-value, il est possible de conclure que la réduction de la concentration de 5 µg/mL à 1 µg/mL n'engendre pas d'effet significatif pour les échantillons ZA-P1 (p-value = 0,254), BI-P1 (p-value = 0,465) et SIL-P1 (p-value = 0,785). En revanche, la diminution de la concentration a un effet significatif sur la viabilité des cellules PC12 pour l'échantillon KAI-P1 avec une p-value inférieure à 0,0001.

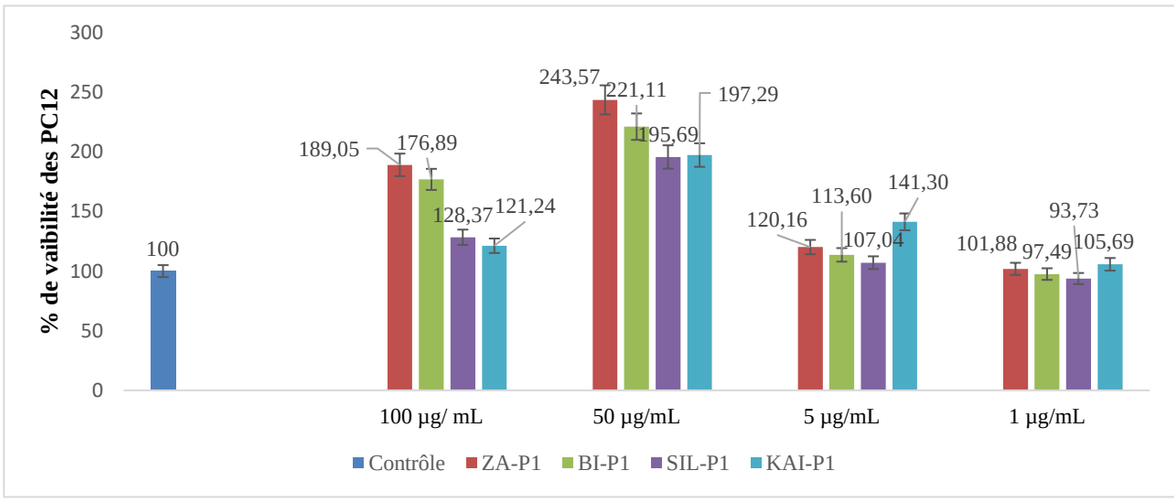


Figure 104: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des différentes fractions Butanol obtenues par le protocole d'extraction P1 pour les 4 populations à différentes concentrations (n=9)

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

De même, les extraits ZA-P2, ZA-P-HEX ont stimulé la prolifération de PC12 à 50 et 5 µg/mL et la viabilité reste normale (Figure 105). À 50 µg/mL, les pourcentages de viabilité sont de 166,22 et 182,96 pour ZA-P2 et ZA-P2/HEX respectivement et diminuent à 135 et 124,69 à 5 µg/mL.

À 100 µg/mL, les deux fractions butanol et hexane ont conservé la viabilité mais elles ne l'ont pas stimulé. Ce résultat est expliqué par la mort cellulaire normale en raison de la forte confluence. En analysant les valeurs de p-value, on peut conclure que la diminution de la concentration de 5 µg/mL à 1 µg/mL n'a pas un impact significatif sur la vibailité pour ZA-P2/HEX, où la p-value est de 0,74. En revanche, une différence significative est marquée pour ZA-P2 dont la p-value est inférieure à 0,0001.

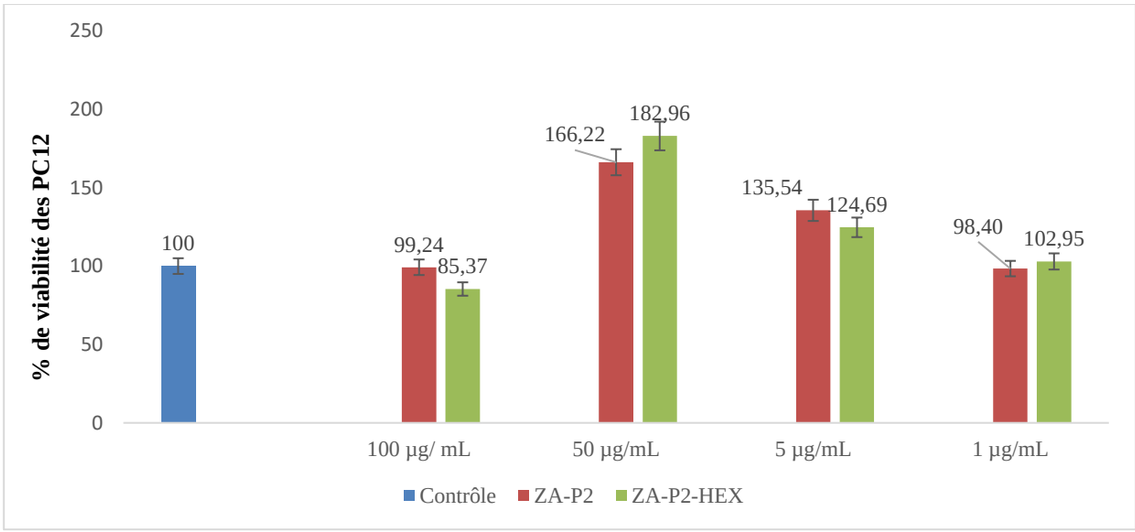


Figure 105: : Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des deux fractions ZA-P2 (butanol) et ZA-P2-HEX (hexane), obtenues au cours du procédé d'extraction P2, à différentes concentrations (n=9).

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

L'étude de la viabilité en présence des extraits à 100 µg/mL a été réalisée mais les résultats n'ont pas été validés à cette concentration. Concernant les extraits P3 (Figure 106), KAI-P3 à 50 µg/mL stimule la prolifération des cellules PC12 de 59,93% ; elles sont normalement viables à 5 µg/mL et 1 µg/mL (106 et 103,47 % respectivement). L'extrait SIL-P3 est légèrement cytotoxique à 50 µg/mL, le pourcentage de viabilité est de 81,88%, mais en abaissant la concentration à 5 µg/mL l'extrait exerce une légère prolifération à 109,96 %. Le BI-P3 est neurotoxique à 50 µg/mL avec 82,71% mais stimule la prolifération à 5 µg/mL avec 112,04 %. ZA-P3 stimule légèrement la croissance à 50 et 5 µg/mL de 111,27 et 112,82 % et revient à la normale à 1 µg/mL de 101,87 %.

En effet, la réduction de la concentration de 5 à 1 µg/mL n'a pas de conséquence significative sur la viabilité des cellules PC12 pour tous les extraits KAI-P3, SIL-P3, ZA-P3 et KAI-P3. Les valeurs de p associées sont respectivement >0,9999, 0,9794, 0,9534, et 0,6799.

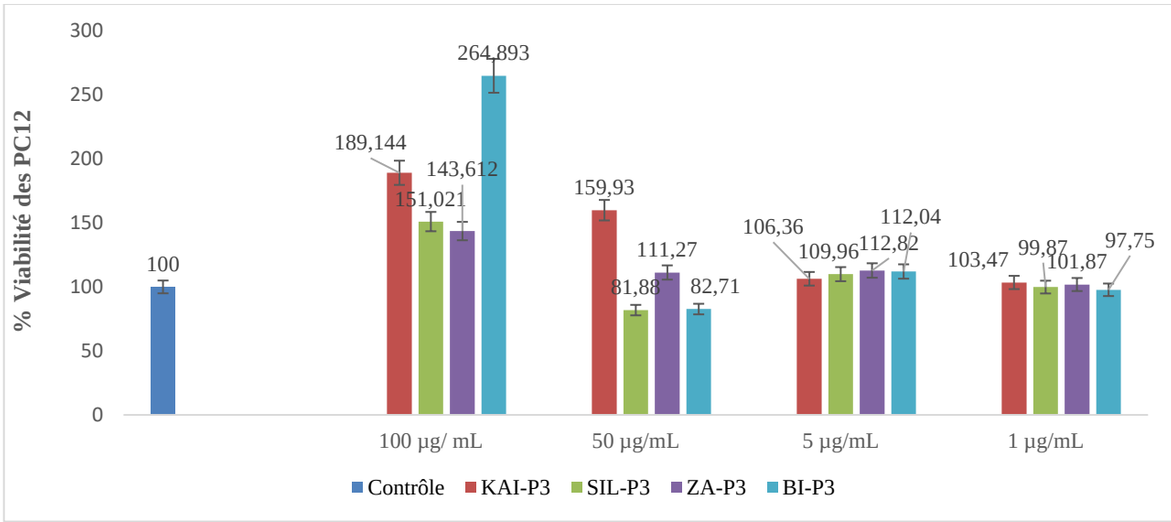


Figure 106: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions butanol de KAI-P3, SIL-P3, ZA-P3 et BI-P3 (n=9)

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

Certains extraits obtenus par P4 sont toxiques pour PC12, tandis que d'autres stimulent la prolifération (Figure 107).

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

La réduction de la concentration de 5 à 1 µg/mL présente une significativité statistique quant à la viabilité des cellules PC12 uniquement dans les cas de SIL-P4 (p-value=0,0065) et ZA-P4/AE (p-value =0,0442). En ce qui concerne KAI-P4, ZA-P4/HEX, ZA-P/chloro et BI-P4, cette réduction de concentration n'a pas d'effet significatif, car les valeurs de p-value sont supérieures à 0,05 (0,9999, 0,1571, 0,6119, >0.9999) respectivement.

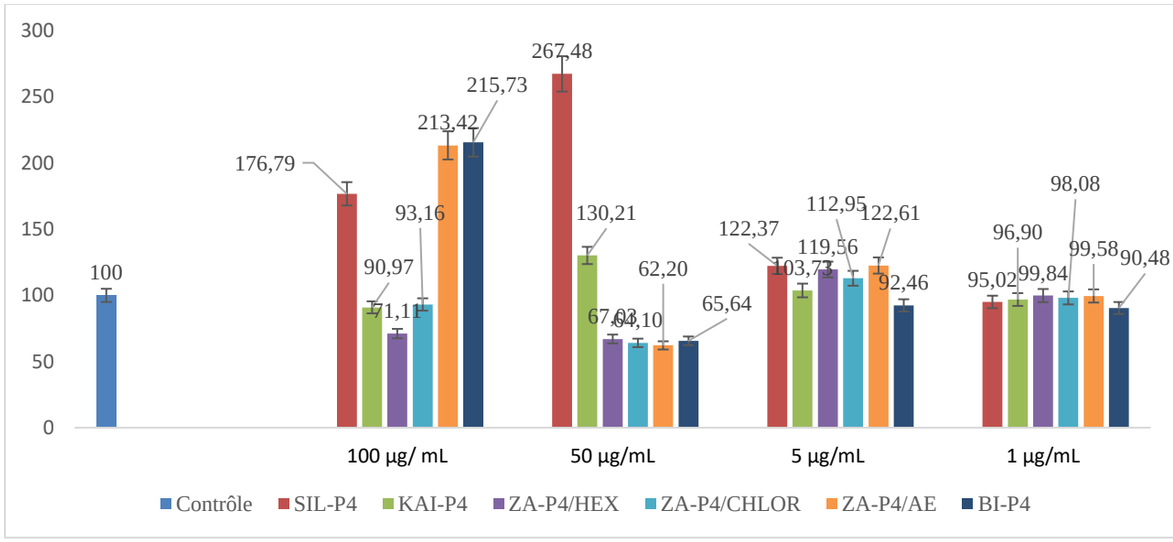


Figure 107: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence des fractions obtenues par P4 (n=9)

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

Les 3 extraits SIL-M1, KAI-M1 et BI-M1 sont neurotoxiques à 50 µg/mL mais la viabilité est normale à cette concentration pour ZA-M1 avec 86,02 %. En abaissant la concentration à 5 µg/mL tous les extraits deviennent des stimulateurs de prolifération des cellules PC12 avec 104 % ; 116 % ; 117,12 % et 138 % respectivement pour ZA-M1, SIL-M1, BI-M1 et KAI-M1. La viabilité est normale en leur présence à 1 µg/mL (Figure 108).

Cette baisse de concentration de 5 à 1 µg/mL n'engendre pas d'effet significatif sur la viabilité pour ZA-M1, SIL-M1 et BI-M1 avec une p-value supérieure à 0,9999 pour ZA-M1 et égale à 0,526 et 0,0996 pour SIL et BI réspectivement. L'effet est significatif pour KAI-P4 (p-value < 0,001).

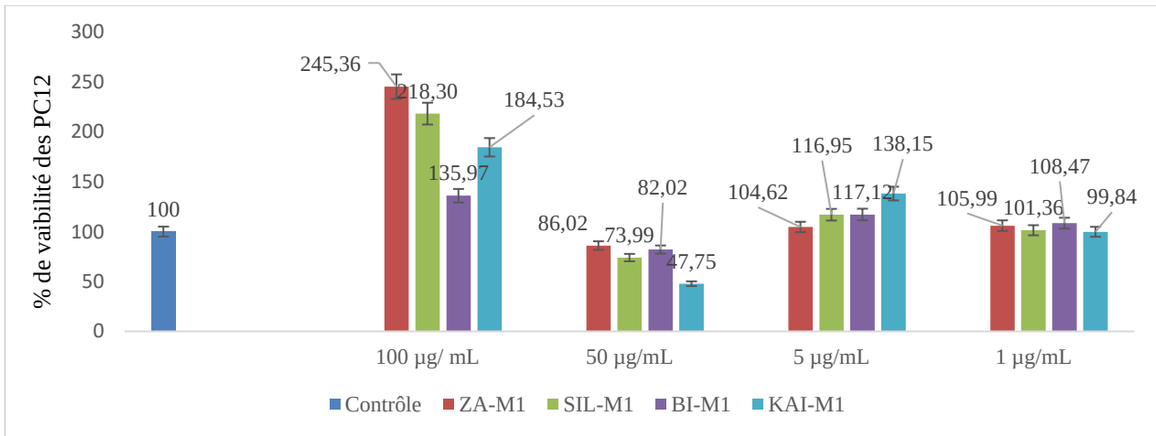


Figure 108 :Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des fractions obtenus par M1(n=9)

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

L'aglycone soyasapogenol B était neurotoxique à 50 µg/mL avec 40,20 % mais stimulateur avec 145,07 % à 5 µg/mL. Une légère prolifération est observée même à 1 µg/mL avec 105,03 % de viabilité (p-value $< 0{,}001$) (Figure 109).

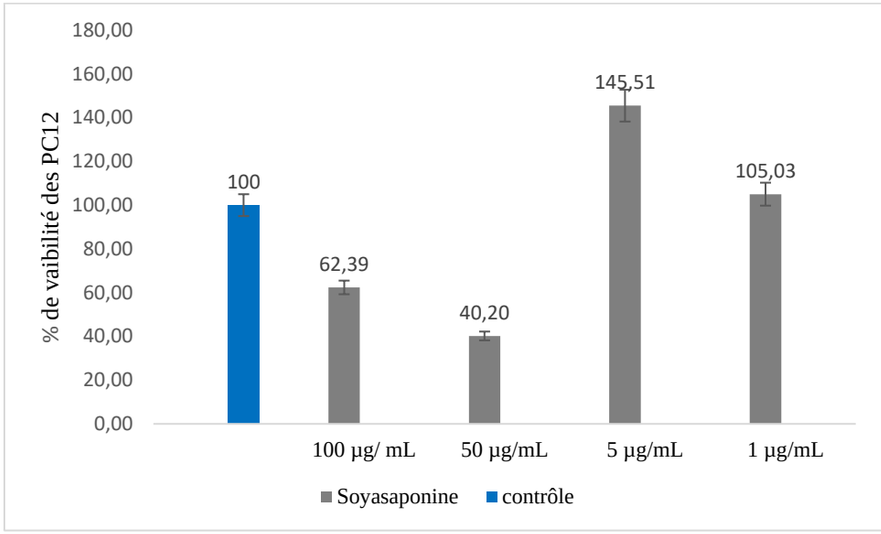


Figure 109: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence du Soyasapogénol B (n=9).

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

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

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

Dans cette section de l'étude, nous avons évalué la différence significative de l'effet de la neuroprotection entre deux concentrations, à savoir 5 µg/mL et 1 µg/mL à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA), en utilisant la P-value comme critère de significativité. Une différence entre les concentrations est significative pour une valeur de P inférieure à 0,05.

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

Pour une concentration de 1 µg/mL, les extraits ZA, BI, SI exercent une très faible neuroprotection (Figure 110). Les pourcentages de viabilité en présence du peptide Aβ à 5 µM et des extraits à 1 µg/mL sont de 51 %; 50 %; 51 % et 41 % pour ZA-P1, BI-P1, SIL-P1 et KAI-P1 respectivement. En présence du peptide Aβ et des extraits à 50 µg/mL, une neuroprotection et une stimulation de la prolifération ont été observées pour certains extraits. En effet, les pourcentages de viabilité sont de 123,37 %;108,82 %; 113,96 % et 77,72 % pour ZA-P1, BI-P1, SIL-P1 et KAI-P1 respectivement. À une concentration de 5 µg/mL, les extraits conservent toujours leur effet neuroprotecteur, avec une viabilité cellulaire de 82,78 % ; 80,87 % ; 73,07 % et 51,4 %.

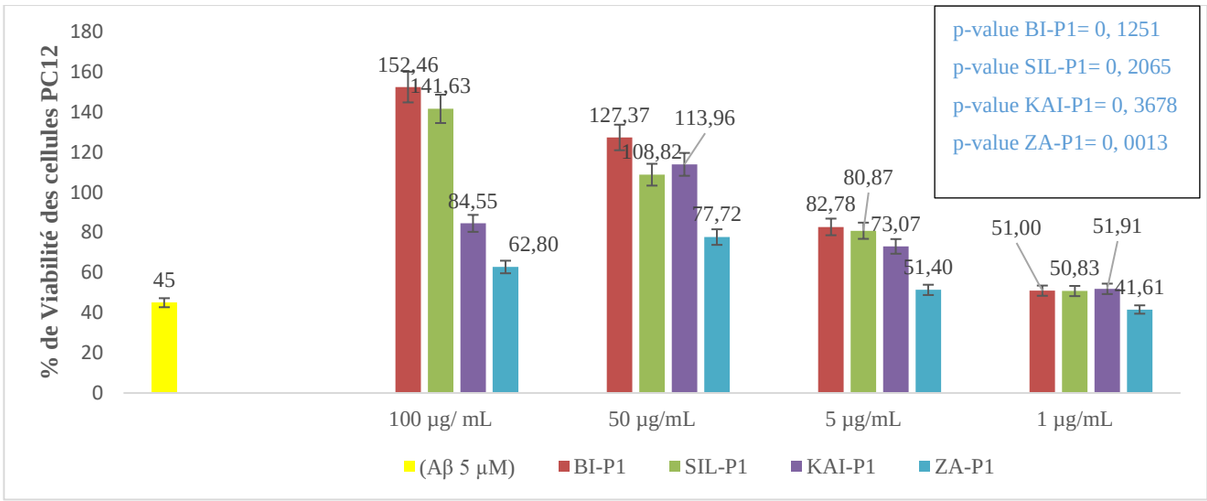


Figure 110: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des PC12 en présence des extraits P1(n=9) et du peptide Aβ. Différence significative de neuroprotection pour les concentrations 5 µg/mL et 1 µg/mL (p< 0,05) pour ZA-P1

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

Les extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 n'ont aucun effet neuroprotecteur (Figure 111). L'effet toxique du peptide Aβ est observé en présence de l'extrait.

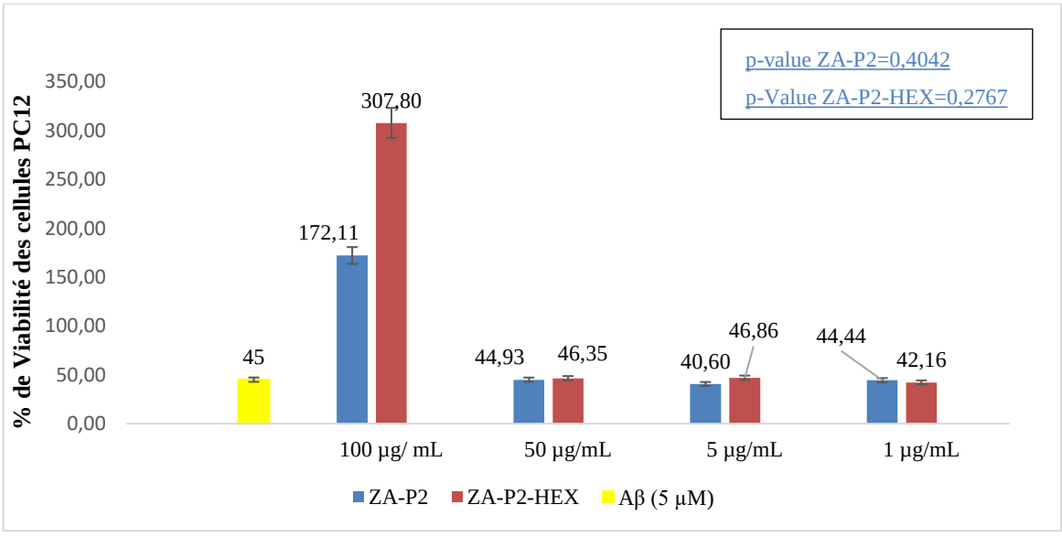


Figure 111: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus par le protocole d'extraction P2 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9)). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentration 5 et 1 µg/mL.

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

Tous les extraits obtenus par P3 sont neuroprotecteurs à 100 µg/mL (Figure 112). Les deux extraits KAI-P3 et SIL-P3 sont stimulateurs de prolifération avec 172,30 % et 137,20 % successivement. En abaissant la concentration à 50 µg/mL, SIL-P3 exerce la neuroprotection la plus importante avec 82,46 %, suivi de KAI-P3 avec 62,93 %. Pour ZA-P3 et KAI-P3 la neuroprotection est négligeable voire inexistante avec 35,37 et 53,83 successivement. À 5 µg/mL, seul l'extrait SIL-P3 a montré un effet neuroprotecteur significatif avec 71,84 %. À 1 µg/mL, aucune neuroprotection par les extraits n'est observée.

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

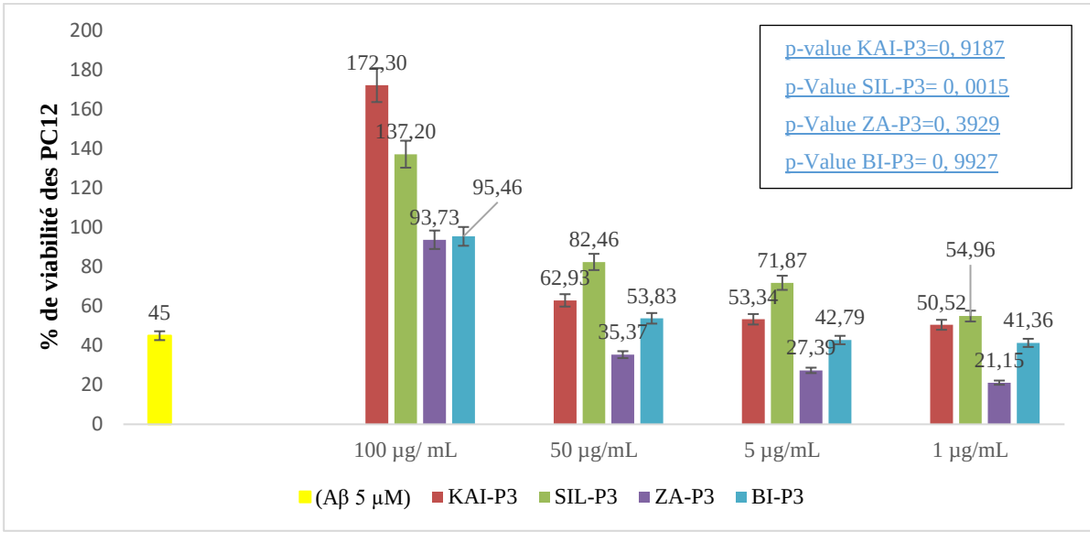


Figure 112: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité de PC12 en présence des extraits P3 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentrations 5 et 1 µg/mL.

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

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

SIL-P4, KAI-P4, ZA-P4/HEX, ZA-P4/CHLOR, ont également montré une neuroprotection avec 53,93 % ; 54,49 % ; 58,10 % et 55,83 % respectivement (Figure 113).

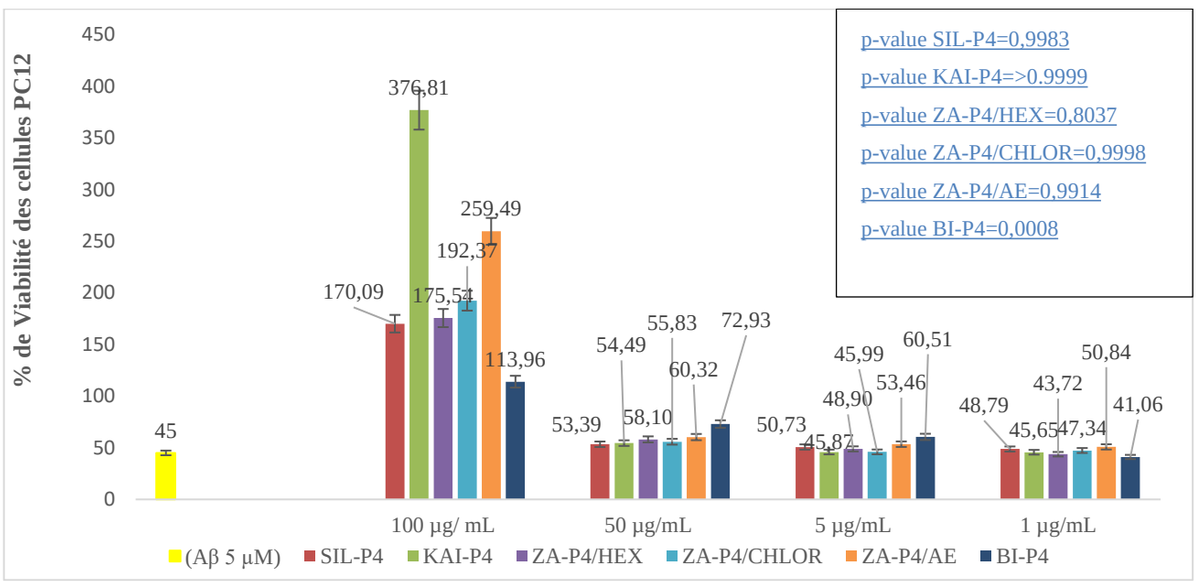


Figure 113: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits issus du protocole d'extraction P4 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentration 5 et 1 µg/mL.

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

À 50 µg/mL, les extraits ZA-M1, SIL-M1 et BI-M1 ont un effet neuroprotecteur avec 80,85%, 85,38% et 77,34% de viabilité respectivement qui diminue avec la concentration décroissante (Figure 114). L'extrait de KAI-M1 présente un effet neuroprotecteur avec 69,61 % de viabilité à une concentration de 5 µg/mL et cet effet diminue à 55,97 % de viabilité à 1 µg/mL.

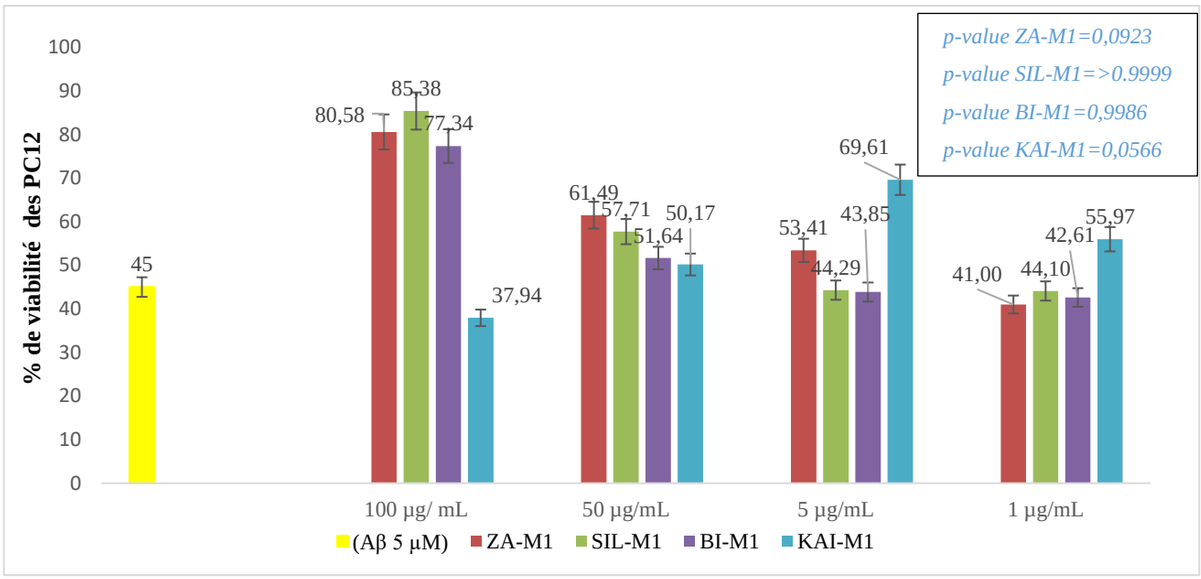


Figure 114: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité des cellules PC12 en présence des extraits obtenus avec le protocole d'extraction M1 et du peptide Aβ (5 µM) (n=9)

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

Les résultats de l'analyse ont montré que le soyasapogénol B n'a un effet neuroprotecteur qu'à une concentration de 100 µg/mL en présence du peptide Aβ (Figure 115). À cette concentration cet aglycone était cytotoxique sur les cellules PC12 en absence du peptide Aβ. Il y aurait alors une réaction entre le soyasapogénol B et le peptide Aβ. En présence, l'un neutralise l'effet de l'autre et ces molécules perdent mutuellement leur toxicité sur les cellules PC12. Ceci peut être une voie de thérapie des maladies neurodégénératives dont la cause principale est la toxicité causée par le peptide Aβ.

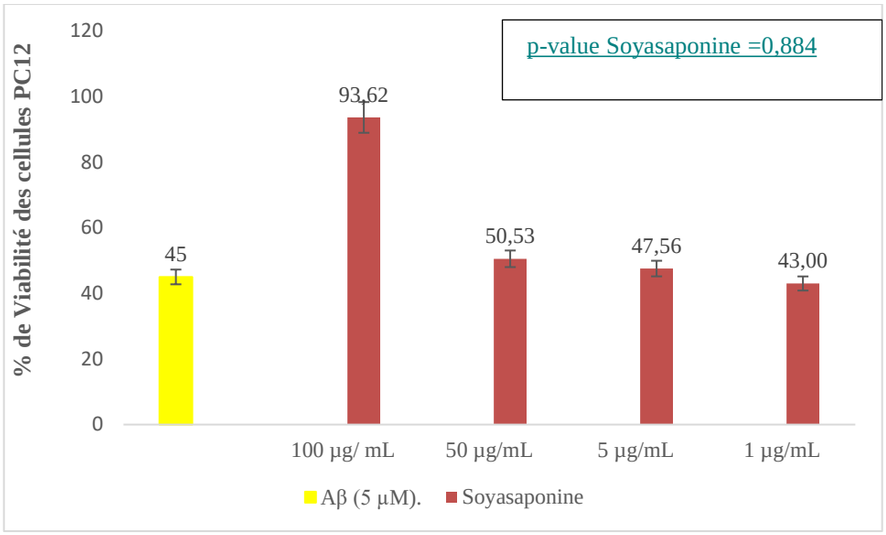


Figure 115: Histogramme représentatif des pourcentages de viabilité de PC12 en présence du Soyasapogénol B et du peptide Aβ (5 µM) (n=9). Résultats ANOVA (p-value) pour les concentrations 5 et 1 µg/mL.

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

Il convient de noter qu'au cours de la période (2010-2021), jusqu'à 360 saponines triterpéniques testées pour l'activité cytotoxique ont révélé des effets cytotoxiques aussi puissants : IC 50 < 10 µM. Le graphique ci-dessous (Figure 116) montre le nombre de ces composés hautement actifs étudiés par an et le nombre de rapports publiés qui paraissent chaque année. Comme on peut le constater, la communauté scientifique s'intéresse de façon soutenue aux recherches portant sur l'activité cytotoxique des saponines triterpéniques.

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

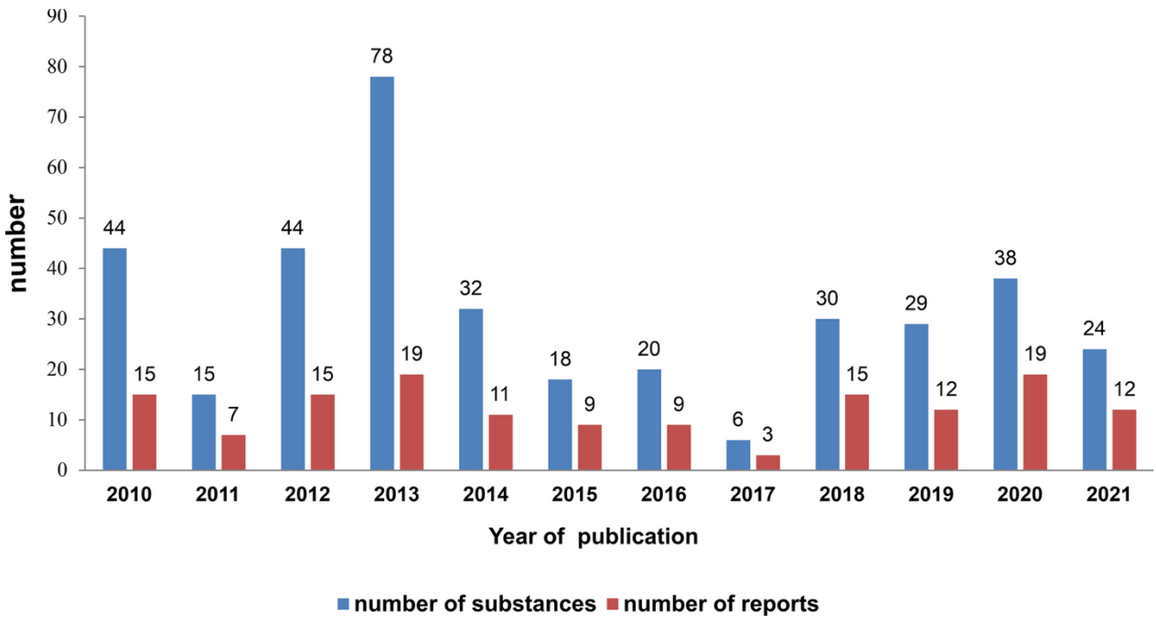


Figure 116 : Le nombre de saponines tritérpeniques testées en tant qu'agents cytotoxiques et le nombre de rapports publiés dans la période couverte 2009/2021[309].

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

Les soyasaponines semblent passer le système digestif sans être digérées dans l'intestin grêle, puis sont partiellement métabolisées en sapogénols par les glycosidases bactériennes du côlon. Le mélange de saponines et de sapogénols qui en résulte est vraisemblablement bio disponible pour l'épithélium colique, ce qui suggère que les soyasaponines pourraient potentiellement moduler la carcinogenèse du côlon [136]. Ellington et al, ont prouvé qu'un mélange des soyasaponines B supprime la prolifération dose-dépendante des cellule HT-15 et provoque la macro autophagie induite à 100 µg/mL après 24 h. Ils ont mis en évidence qu'en présence de ce mélange, les cellules se bloquent dans la phases S du cycle cellulaire [136].

Oh et Sung, ont mis en évidence qu'un mélange de soyasaponin B a permis la suppression de l'activité PKC et l'induction de la différenciation des cellules HT-29 du cancer coloréctal [137]. Dans d'autre travaux, le soyasapogénol B montre une suppression dose-dépendante de la lignée HT-29 de 6 à 50 µg/mL après 72 h. Les soyasaponines I et III ont été testées aussi mais la soyasaponine I n'était pas active sur la lignée HT-29 et la saponine III supprimait la croissance à 50 µg/mL après 72 h. Probablement, la suppression de la croissance cellulaire de la lignée HT-29 est intensifiée avec l'augmentation de la lipophilie des molécules (Sapogénol B > Saponine III > Saponine I) [139]. L'inhibition des cellules Caco-2a été étudiée dans deux travaux, Hu et al, ont montré que le soyasapogénol B a significativement réduit la viabilité cellulaire à 230 et 1375 µg/mL après 4 h [141] et MacDonald et al ont montré que le soyasapogenol B a considérablement réduit la croissance cellulaire à 25, 50 et 100 µg/mL [142]. Toutes ces données nous ont encouragé pour évaluer la cytoxicité de nos extraits contre la lignée Caco-2.

4.1 La lignée CACO-2

La lignée cellulaire Caco-2, initialement isolée d'un adénocarcinome humain, a la particularité, une fois à confluence, de se différencier spontanément en une monocouche d'entérocytes polarisés comprenant des microvillosités, des transporteurs membranaires ainsi que les enzymes de la bordure en brosse [307]. En raison des mêmes activités biologiques et de la structure des microvillosités simulant l'intestin humain, le modèle cellulaire Caco-2a été utilisé pour examiner le mécanisme de transport et d'absorption des médicaments dans une plaque transwell spéciale [308]. Les cellules Caco-2 subissent des processus de confluence, de prolifération et de différenciation au cours de leur croissance. Il a été prouvé qu'en conditions de culture, les cellules Caco-2passent par une différenciation spontanée et présentent les caractéristiques des entérocytes matures. La bordure en brosse a été formée par la surface cellulaire qui fait face au milieu supérieur et cette bordure ressemble à la membrane luminale de l'épithélium intestinal humain. La membrane basolatérale est constituée par la surface cellulaire qui fait face au milieu inférieur et est attachée à la membrane perméable. Malgré leur origine colique, les cellules Caco-2complètes polarisées ressemblent à des cellules de la muqueuse intestinale humaine présentant des jonctions serrées, des bordures en brosse, des transporteurs d'efflux et d'absorption au niveau des compartiments basolatéral et apical [309].

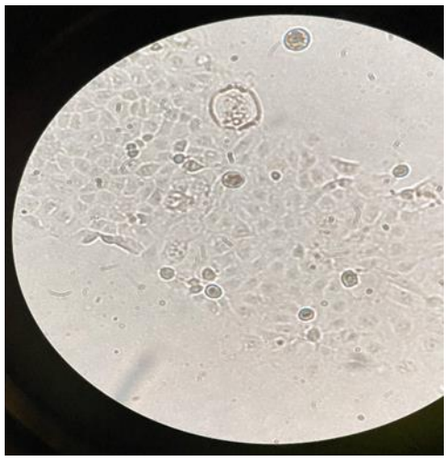


Figure 117:Début de confluence des cellules Caco-2après 15 jours de culture

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

En considérant que le critère d'activité de cytotoxicité pour les extraits bruts, tel qu'établi par l'American National Cancer Institute (NCI), est une concentration d’inhibition IC 50 < 30 µg/mL, nous concluons que toutes les fractions analysées d’*Astragalus hamosus* L. sont « super actives » sur la lignée Caco-2.

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

Pour les extraits ZA, BI, SI et KAI, les pourcentages d'inhibition ont été respectivement de 91 %, 88 %, 94 % et 87 % à une concentration de 5 µg/mL à l’aide de l’extraction via le protocole P1. Même à une concentration de 1 µg/mL, les taux d'inhibition demeurent significatifs, avec des valeurs de 73 %, 70 %, 67 % et 72 % pour les mêmes populations respectivement.

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

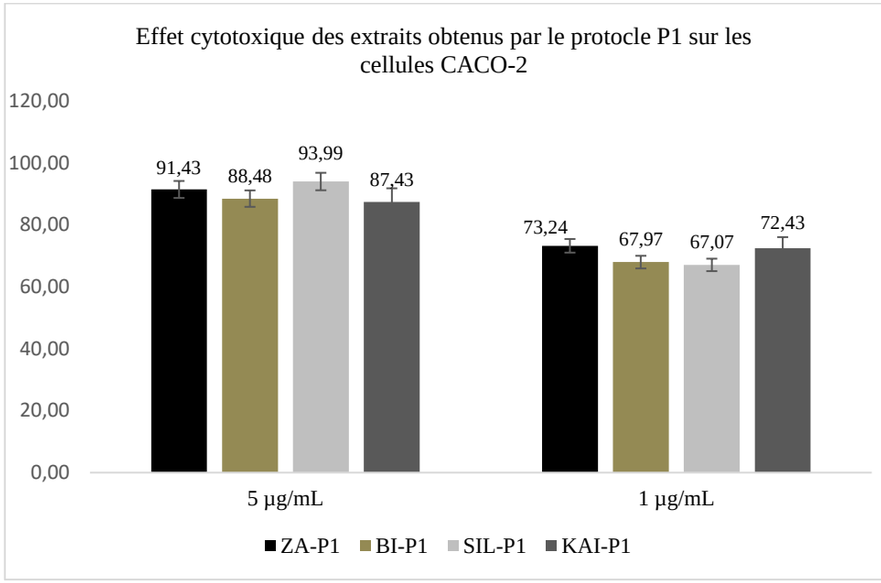


Figure 118 : Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P1 (n=9)

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

Les extraits obtenus en utilisant le protocole 2 ont démontré une activité très élevée contre les cellules Caco-2. La fraction butanol a inhibé 86 % des cellules Caco-2, tandis que la fraction hexane a montré une inhibition de 93 % à une concentration de 5 µg/mL d'extrait (Figure 119).

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

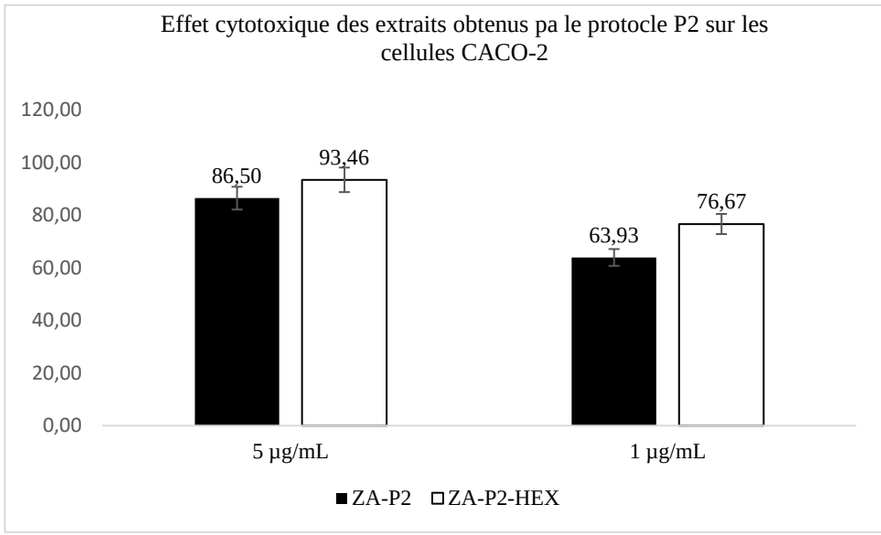


Figure 119: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P1 (n=9)

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

À une concentration de 5 µg/mL, les extraits SIL-P3, KAI-P3 et ZA-P3 ont démontré une capacité inhibitrice considérable contre la lignée Caco-2, avec des valeurs de 98 %, 98 % et 95 % respectivement. Quant à l'extrait BI-P3, il a présenté une inhibition de 74 % à cette concentration.

En réduisant la concentration à 1 µg/mL, l'inhibition reste significative mais diminue, avec des valeurs de 66 %, 66 %, 59 % et 61 % respectivement pour les mêmes fractions (Figure 120).
Ces résultats mettent en évidence la forte activité inhibitrice des extraits SIL-P3, KAI-P3 et ZA-P3 à une concentration de 5 µg/mL, tandis que l'extrait BI-P3 présente une inhibition légèrement inférieure mais toujours significative. À une concentration plus faible de 1 µg/mL, l'inhibition se maintient, bien que réduite, pour toutes les fractions testées.

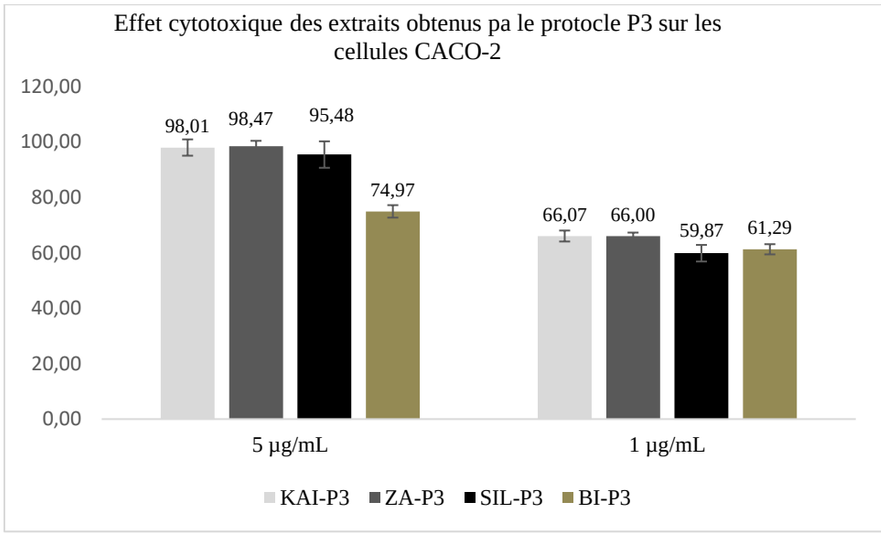


Figure 120: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P3

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

Les extraits obtenus en utilisant le protocole P4 ont révélé une cytotoxicité extrême contre les cellules cancéreuses Caco-2. Les extraits SIL-P4 et KAI-P4 ont montré une inhibition de 100 % à une concentration de 5 µg/mL. Cependant, en réduisant la concentration des extraits à 1 µg/mL, l'inhibition reste significative mais diminue à 78 % et 74 % respectivement.
Ces résultats mettent en évidence l'activité exceptionnelle de ces extraits obtenus par le protocole P4 contre les cellules cancéreuses Caco-2. De même, les autres fractions ont présenté des pourcentages d'inhibition élevés : 98 %, 93 %, 92 % et 89 % respectivement pour ZA-P4/HEX, ZA-P4/CHLOR, ZA-P4/AE et BI-P4.
Ces résultats confirment la remarquable efficacité des extraits obtenus par le protocole P4 dans l'inhibition des cellules cancéreuses Caco-2. Lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL, les pourcentages d'inhibition demeurent significatifs, comme illustré dans la Figure 121.

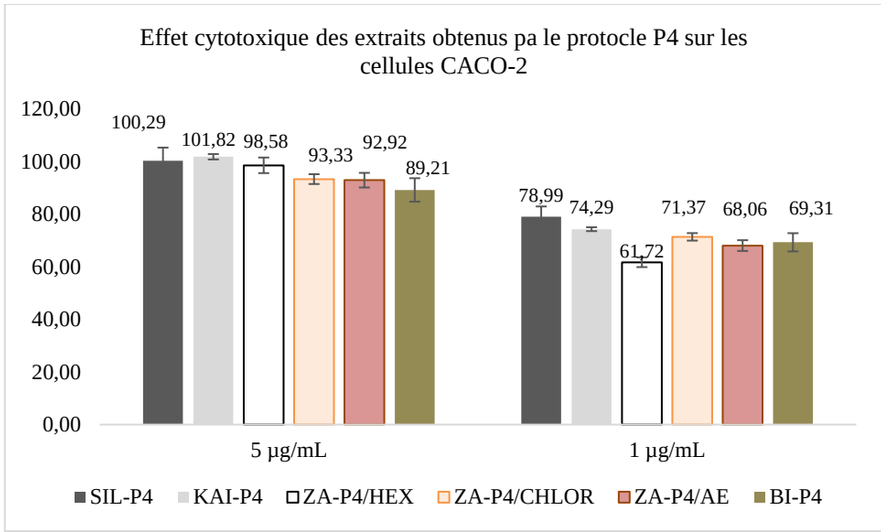


Figure 121: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules CACO-2par les extraits P4 (n=9)

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

Les valeurs de CI_{50} obtenues pour toutes les populations M1 sont extrêmement significatives, se situant respectivement à 1,45 µg/mL pour ZA, 1,29 µg/mL pour SIL, 1,22 µg/mL pour BI et également 1,22 µg/mL pour KAI.

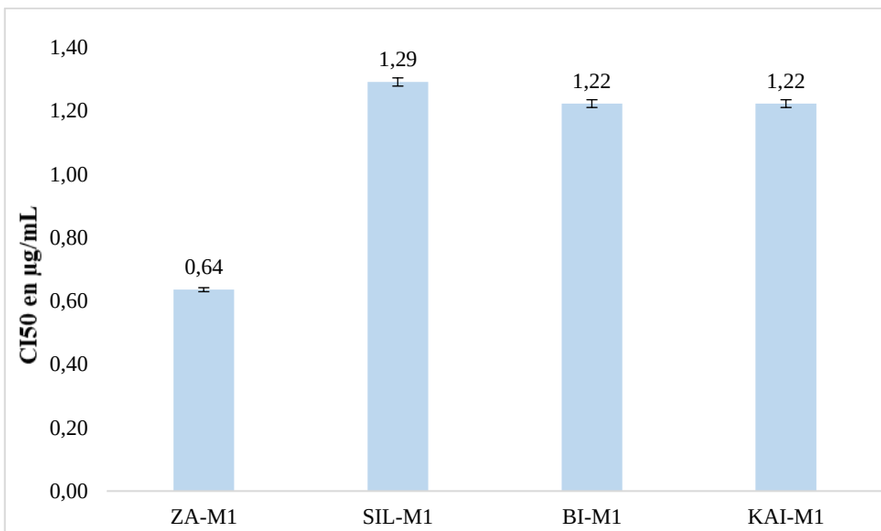


Figure 122: Histogramme de représentation des CI50 des cellules Caco-2 par les extraits M1(n=9)

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

L'aglycone Soyasapogénol B présente une CI_{50}=1,25 (Figure 123). Cette molécule pure inhibe significativement la lignée Caco-2. Les résultats présentés précédemment montrent qu'il existe des extraits d'*Astragalus hamosus* L. plus actifs que cette molécule pure connue pour ses activités cytotoxiques multiples (voir 4.1.2.1.1 dans le chapitre 1), tels que KAI-P1, ZA-P2-HEX, BI-P3 et SIL-P4. Ceci peut être expliqué en partie par l'effet synergique des saponines.

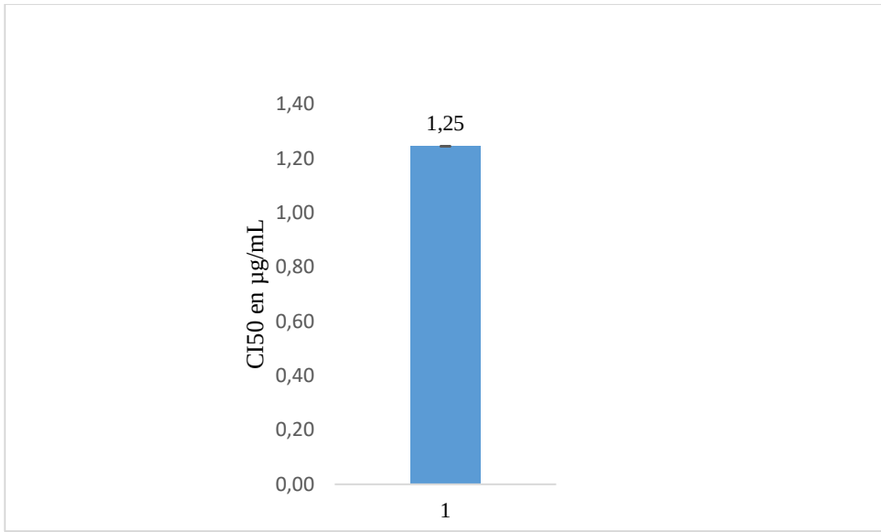


Figure 123:Histogramme représentant l'CI50 des cellules Caco-2 de l'aglycone Soyasapogénol B (n=9)

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

5.1 La lignée HEK293

La lignée cellulaire 293 a été dérivée par transformation de cultures primaires de cellules de rein embryonnaire humain (HEK) avec de l'ADN d'adénovirus cisaillé (Ad)5. Une combinaison d'immunostaining, d'immunoblot et d'analyse de microréseau a montré que 293 cellules expriment les sous-unités de neurofilament (NF) NF-L, NF-M, NF-H et α-internexine ainsi que de nombreuses autres protéines généralement présentes dans les neurones [310].

La lignée cellulaire HEK293 est d'origine épithéliale et de nature adhérente. Elle a été adaptée pour se développer en culture en suspension dans des milieux sans sérum ou chimiquement définis et est actuellement utilisée pour l'expression de protéines recombinantes dans des plateformes adhérentes et en suspension [311].

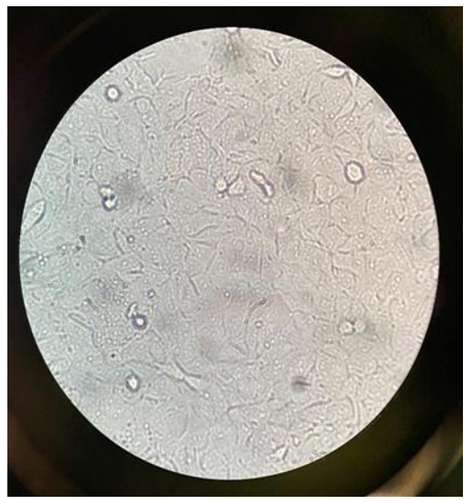


Figure 124:Confluence des cellules HEK293 après une semaine de culture (n=9)

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

Les extraits obtenus en utilisant le protocole d'extraction P1 se sont révélés être hautement cytotoxiques pour les cellules HEK293. Les pourcentages d'inhibition à une concentration de 5 µg/mL sont de 90 %, 101 %, 97,7 % et 93 % respectivement pour ZA, BI, SIL et KAI, en suivant le protocole P1. À une concentration de 1 µg/mL, les pourcentages d'inhibition restent significatifs et dépassent les 50 % pour tous les extraits obtenus par le protocole P1.

Ces résultats mettent en évidence la forte cytotoxicité de tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sur les cellules HEK293. En effet, les extraits ont montré des pourcentages d'inhibition importants à une concentration de 5 µg/mL et à une concentration plus basse de 1 µg/mL, témoignant de leur potentiel cytotoxique (Figure 125).

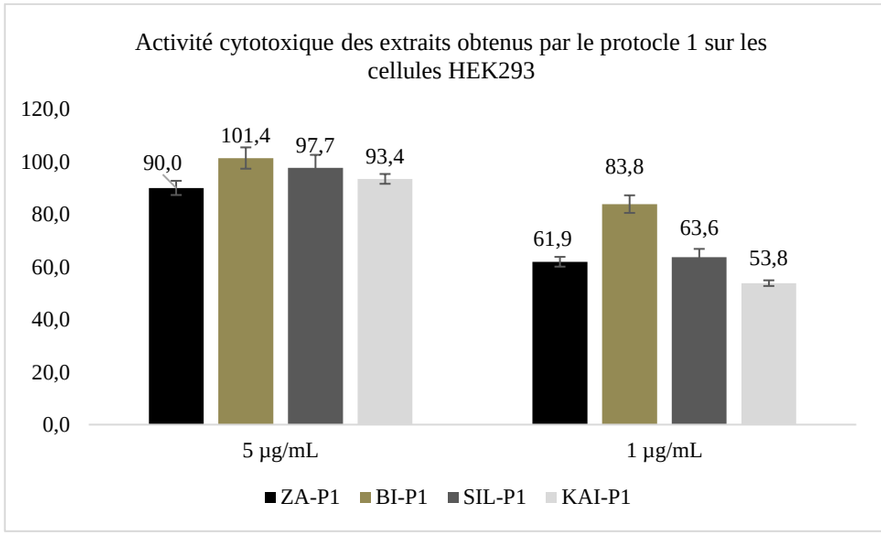


Figure 125: Histogramme de représentation des pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les extraits P1 (n=9)

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

La fraction butanol ZA-P2 démontre une CI_{50} très faible, ce qui est extrêmement significatif, équivalant à 1 µg/mL. En ce qui concerne la fraction hexane, les pourcentages d'inhibition dépassent les 50 % même à une concentration de 1 µg/mL, la CI_{50} n'a donc pas été mentionnée dans la figure 126.

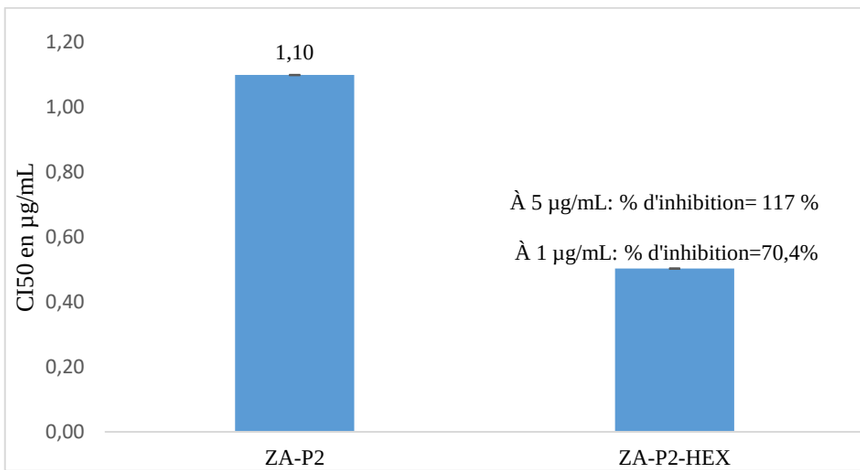


Figure 126: Histogramme représentant la CI50 des cellules HEK293 par la fraction ZA-P2 et les pourcentages d'inhibition de la fraction ZA-P2/HEX (n=9)

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

Les extraits KAI, ZA et SI obtenus en utilisant le protocole P3, à une concentration de 5 µg/mL, ont montré des résultats exceptionnellement significatifs en termes de capacité d'inhibition de la lignée HEK293, avec des pourcentages d'inhibition de 102 %, 120 % et 107 % respectivement. Pour ce qui est de BI-P3, le pourcentage d'inhibition est de 84 % à cette même concentration. De plus, les pourcentages d'inhibition restent significatifs même lorsque la concentration est réduite à 1 µg/mL (Figure 127).

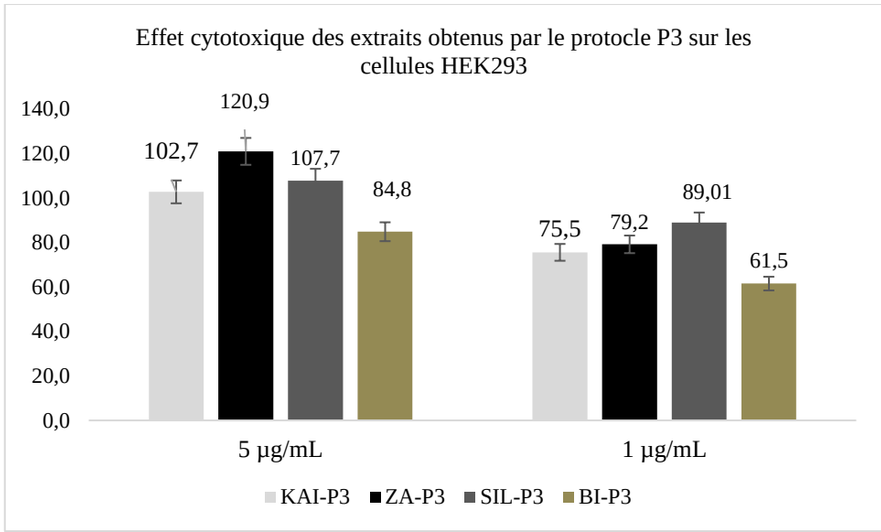


Figure 127: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P3 (n=9)

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

Les résultats obtenus sont particulièrement remarquables puisque les pourcentages d'inhibition de la lignée HEK293 dépassent les 100 % pour toutes les fractions obtenues grâce au protocole P4 (Figure 128). Un tel taux d'inhibition indique un fort potentiel cytotoxique de ces extraits. En outre, l'extrait ZA-P4 CHLOR a démontré une CI_{50} exceptionnellement basse, évaluée à seulement 1,07 µg/mL. Dans le cas de cet extrait, une telle efficacité à une concentration aussi faible est particulièrement remarquable.

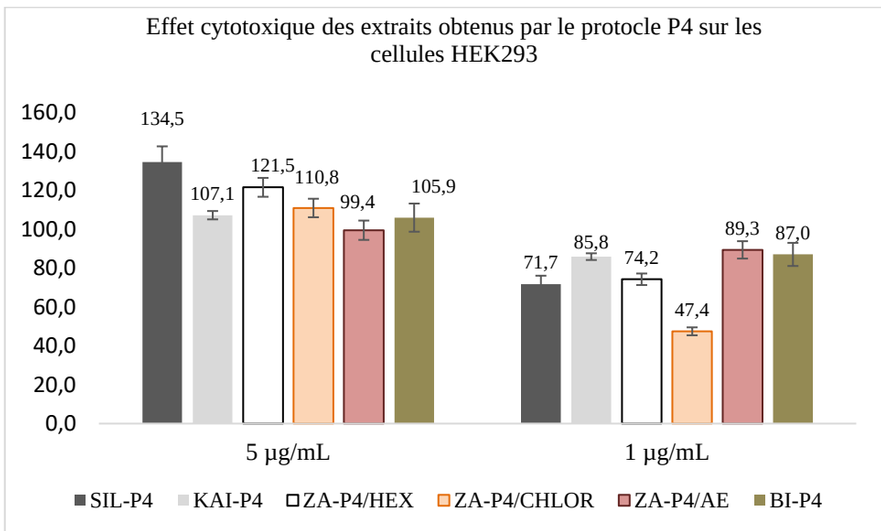


Figure 128:Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions P4 (n=9)

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

Comme anticipé, les extraits obtenus par M1 ont démontré des pourcentages d'inhibition significatifs à la fois à une concentration de 5 µg/mL et à 1 µg/mL. En effet, la CI_{50} pour l'extrait BI-M1 est de 1,01 µg/mL. Ces résultats indiquent que l'activité inhibitrice est dose dépendante à la concentration des extraits testés (Figure 129).

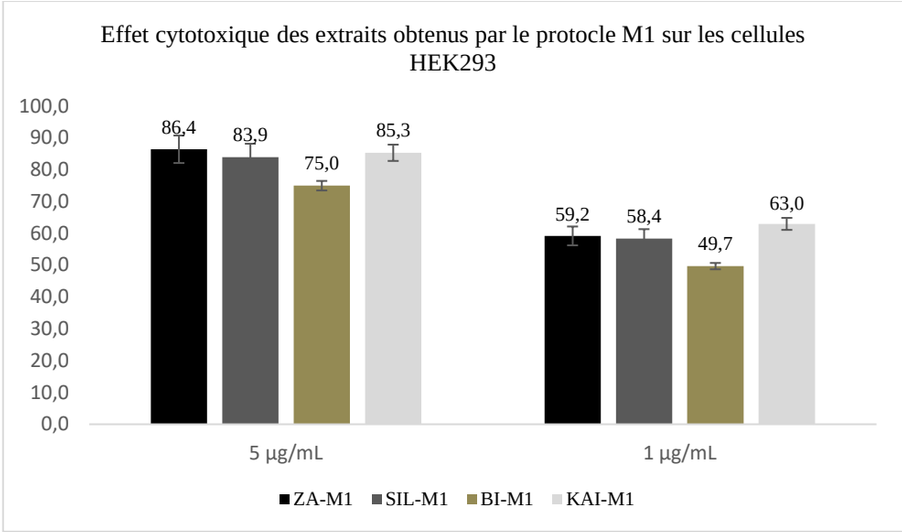


Figure 129: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par les fractions M1 (n=9)

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

Les résultats de l'analyse du standard soyasapogenol mettent en évidence son effet cytotoxique sur les cellules HEK293 (Figure 130). Les pourcentages d'inhibition observés sont de 100 % à une concentration de 5 µg/mL et de 61,6 % à une concentration de 1 µg/mL, respectivement. Ces résultats confirment l'activité cytotoxique du standard soyasapogenol sur les cellules HEK293.

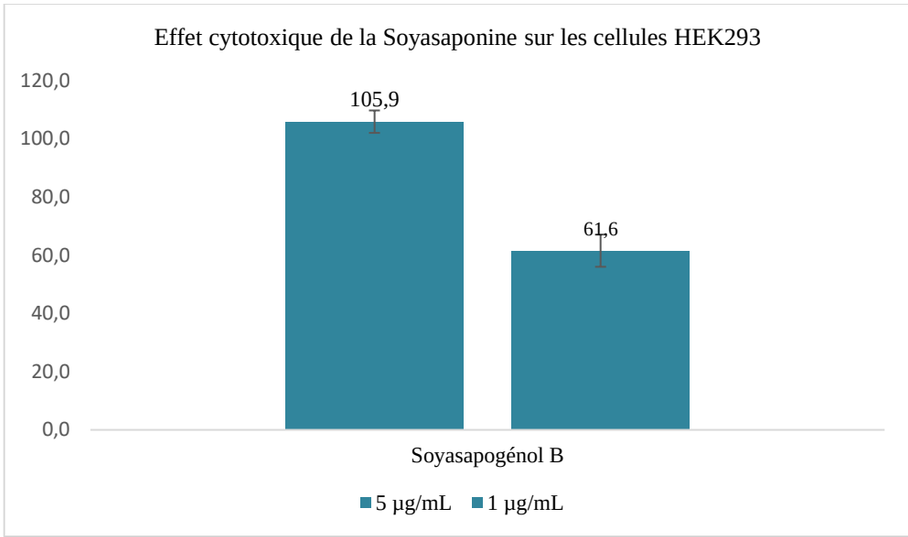


Figure 130: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition des cellules HEK293 par le Soyasapogénol B (n=9)

6 Discussion :

6.1 Évaluation de la neuroprotection

Plusieurs études ont été réalisées pour mettre en valeur les rôles des saponines dans la neuroprotection des maladies neurodégénératives. Khan et al. (2022) ont révélé que l'asaponine E1 pourrait être un produit naturel thérapeutique pour le traitement et la prévention de la MA. Il a été constaté que la théasaponine E1 réduisait le NFT en diminuant les niveaux de protéine Tau et la formation de Aβ via la suppression de l'expression et de l'activité de la protéine kinase GSK-3β , ainsi que des gènes et des cytokines favorisant la pathologie MA [312]. Zhou et al. (2009) ont prouvé que les extraits aqueux de *Dispacus Asper Wall*, la fraction de saponines et la saponine d'*Akebia saponin D* avaient la capacité de protéger les cellules PC12 contre la cytotoxicité induite

par $A\beta_{25-35}$ dans les cellules PC12 [313]. Dans une autre étude de Ding et al. (2019), une nouvelle saponine tritérpenique a présenté une excellente neuroprotection sur les lésions des cellules PC12 induites par $A\beta_{25-35}$ aux doses de 150 µmol/L et 200 µmol/L. Les poucentages de viabilité cellulaire étaient de (76,18 ± 2,09) % et (76,02 ± 3,20) %, respectivement [314]. Yue et al. (2015) ont montré que l'astragaloside IV atténue la neurotoxicité induite par le glutamate dans les cellules PC12 d'une manière dose dépendante [315]. Nos extraits d'*Astragalus hamosus* L. ont présenté des pourcentages de viabilité intéressant en présence du peptide Aβ sauf pour les extraits P2, ceci peut être dû à des alcaloïdes potentiellement présents dans ces extraits. Il est également important de signaler aussi que certains extraits toxiques sur les cellules PC12 en absence du peptide Aβ, deviennent neuroprotecteurs en présence du peptide. Nous avons supposé que ces extraits sont riches en molécules qui interagissent avec le peptide Aβ bloquant ainsi sa neurotoxicité.

6.2 Évaluation de la cytotoxicité

Astragalus hamosus L. a été récolté en Tunisie, aussi dans ce paragraphe, nos résultats seront comparés avec des études de cytotoxicité conduites sur d'autres plantes d'Afrique. En effet, l'extrait brut de *Cotyledon orbiculata* a diminué la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante des lignées cellulaires cancéreuses HCT116 et KYSE70 avec des valeurs de CI_{50} de 64,9 et 36,9 µg/mL, respectivement [316]. De plus, Mfengwana et al. (2019) ont montré que l'extrait méthanol d' Asparagus *laricinus* (CI_{50} = 97,6 µg/mL) et l'extrait dichlorométhane de *S. asperulus* (CI_{50} = 69,15 µg/mL) sont cytotoxiques sur les cellules cancéreuses MCF-7 [317]. Enfin, l'extrait acétone de *Castanea dentata* a révélé une cytotoxicité de manière significative avec des CI_{50} de 41,55, 45,13, 57,35 et 43,24 µg/mL contre les lignées cellulaires A549, HeLa, Caco-2 et MCF-7, respectivement [318]. Les extraits à l'acétone de *Warburgia salutaris* ont montré une valeur de CI_{50} de 34,15 µg/mL contre la lignée cellulaire MCF-7 [318]. D'autres études ont révélé des valeurs de CI_{50} supérieures à 100 µg/mL. Par exemple, dans l'étude de Zoyane et al. (2020) des extraits de *S. frutescens* produits à partir de plantes poussant dans différentes localités géographiques d'Afrique du Sud, les valeurs de CI_{50} ont confirmé la puissance relativement plus élevée des plantes de Colesburg, Zastron et Gansbaai (158,7, 172,7 et 176,7 µg/ mL, respectivement) [319]. De plus, dans l'étude d'Izuegbuna et al. (2019) [17], l'extrait séché à l'acétone d' *Opuntia stricta* a montré une légère cytotoxicité (CI_{50} = 110,1 µg/mL), et Unuofin et al. (2018) ont montré des valeurs de CI_{50} pour des extraits aqueux et éthanoliques de *Kigelia africana* > 200 µg/mL [320] .

Pour les plantes récoltées au Cameroun, des valeurs de CI_{50} inférieures ou voisines de 30 µg/mL ont été mises en évidence dans la quasi-totalité des études analysées. L'extrait brut de fruit obtenu à partir de *Tetrapleura tetraptera* a affiché des valeurs de CI_{50} inférieures à 20 µg/mL sur sept des neuf lignées cellulaires cancéreuses testées. Les valeurs de CI_{50} obtenues variaient de 10,27 µg/mL (dans les cellules leucémiques CCRF-CEM) à 23,61 µg/mL (contre les cellules cancéreuses du côlon HCT116 $p53^{-/-}$) [330]. Mbaveng et al. (2019) ont également déterminé la cytotoxicité de des extraits méthanoliques d'écorce de *Fagara tessmannii*, dans sept lignées cellulaires cancéreuses. Après 72 h d'incubation, les CI_{50} de valeur inférieures à 20 µg/mL ont été enregistrées avec le même extrait brut dans trois lignées cellulaires cancéreuses (MDA-MB-231-pcDNA, CI_{50} = 19,43 µg /mL ; MDA-MB-231-BCRP, CI_{50} = 18,87 µg/mL ; U87MG.ΔEGFR, CI_{50} = 17,34

µg/mL) [322]. Dans une étude précédente de Mbaveng et al. (2018), les rhizomes de *Curcuma longa* et les feuilles de *Lycopersicon esculentum* affichaient des valeurs de CI_{50} inférieures à 20 µg/mL dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses évaluées [323]. De plus, Teinkela et al. (2018) ont montré des valeurs de CI_{50} de 20 µg/mL pour l'extrait au méthanol de feuilles de Tephrosia vogelii et l'extrait au méthanol de bois de racines aériennes de *Ficus elastica* [324]. Njoya et al. (2017) ont également trouvé des valeurs de CI_{50} inférieures à 30 µg/mL sur des cellules MCF-7 et HeLa pour les extraits au méthanol de Sarcocephalus pobeguinii des feuilles et de l'écorce [325]. Enfin, Potesta et al. (2019) ont étudié l'activité antiprolifération d'extraits aqueux bouillis et congelés de *Moringa oleifera*, une espèce bien connue utilisée à des fins médicinales et nutritionnelles [326].

Dans deux études réalisées avec des plantes provenant du Maroc, un extrait au méthanol de *(Convolvulus arvensis* (fleurs) était l'agent anticancéreux anti-myéloïde le plus significatif, montrant une valeur de CI_{50} de 31 µg/mL [327]. Des valeurs similaires de CI_{50} ont été montrées dans l'étude de Belayachi et al. (2017) pour PC-3 (19,31 µg/mL) et pour les cellules LN229 (41,67 µg/mL) après traitement avec l'extrait hexanique d' *Cladanthus eriolepis* [328].

Pour les plantes récoltées dans d'autres pays africains (par exemple, l'Éthiopie, l'Égypte, le Burkina Faso et le Kenya), des valeurs de CI_{50} allant jusqu'à 30 µg/mL ont également été observées. Tesfaye et al. (2021) ont montré la puissante activité de deux plantes sur 22 collectées en Éthiopie contre les 10 lignées cellulaires évaluées, à savoir l'extrait d' *Acokanthera schimperi* (80 % de méthanol), avec des valeurs de CI_{50} de 1,87 à 10,31 µg /mL, et des extraits de *Carex petitiana* qui avaient des valeurs de CI_{50} de 2,09 à 10,41 µg/mL[329]. De plus, l'extrait de *B. nigra*, collecté en Egypte et évalué dans l'étude d'Ahmed et al. (2020) [330], a montré des valeurs de CI_{50} de 32,02 et 25,38 µg/mL contre les lignées cellulaires A549 et H1299, respectivement. Sawadogo et al. (2020) [331] ont montré pour l' extrait brut de *Lantana ukambensis* (plante collectée au Burkina Faso) une valeur de CI_{50} de 23,05 µg/mL dans la lignée cellulaire HCT-116. Enfin, dans l'étude d'Ochwang'I et al. (2018) réalisée avec 35 plantes médicinales du Kenya, la concentration la plus élevée testée (40 µg/mL) a montré une valeur de CI_{50} de 30 µg/mL [332].

7 Conclusion:

Le résultat le plus remarquable dans ce chapitre 4 est la spécificité des extraits d'*Astragalus hamosus* L. vis-à-vis des cellules neurales PC12. La cytotoxicité des extraits a été testée sur Caco-2 qui est une lignée cancéreuse, sur les cellules HEK293 qui sont à l'origine saines et sur les cellules PC12 de type neuronal. Les travaux de ce chapitre ont pu montrer que les extraits d'*Astragalus hamosus* L. sont cytotoxiques sur la lignée Caco-2 et HEK293 mais sont cytoprotetcteurs et stimulateurs de la prolifération des cellules PC12. Les extraits choisis sont probablement riches en molécules spécifiques à la protection des PC12 neuronales.

Les extraits obtenus par P1 présentent les meilleurs résultats, en effet, tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 sont stimulateurs de la prolifération des cellules PC12, neuroprotecteurs contre la toxicité induite par Aβ et cytotoxiques sur les lignées Caco-2 et HEK293. L'ensemble des résultats sur le pourcentage d'inhibition des extraits d'Astragalus hamosus L. sur les lignées Caco-2 et HEK293, ainsi que sur la viabilité et la neuroprotection des

cellules PC12 en présence des extraits et de Aβ à 5 µM sont présentés ci-.après sous forme de tableaux synthètiques (Tableau 18 et Tableau 19).

Tableau 17: Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition des extraits d'Astragalus hamosus L. sur les lignées Caco-2 et HEK293

Lignée cellulaire	Caco-2		HEK293	
Extraits	% d'inhibition (5 µg/mL)	% d'inhibition (1 µg/m)	% d'inhibition (5 µg/mL)	% d'inhibition (1 µg/mL)
ZA-P1	91,43	73,24	90,00	61,93
BI-P1	88,48	67,97	101,36	83,84
SIL-P1	93,99	67,07	97,68	63,62
KAI-P1	87,43	72,43	93,43	53,80
ZA-P2	86,50	63,93	121,91	45,44
ZA-P2/HEX	93,46	76,67	117,47	70,39
KAI-P3	98,01	66,07	102,73	75,55
ZA-P3	98,47	66,00	120,93	79,15
SIL-P3	95,48	59,87	107,71	89,01
BI-P3	74,97	61,29	84,81	61,50
SIL-P4	100,29	78,99	134,45	71,73
KAI-P4	101,82	74,29	107,13	85,82
ZA-P4/HEX	98,58	61,72	121,46	74,18
ZA-P4/CHLOR	93,33	71,37	110,84	47,43
ZA-P4/AE	92,92	68,06	99,40	89,30
BI-P4	89,21	69,31	105,88	86,97
ZA-M1	74,92	42,62	86,40	59,17
SIL-M1	80,15	44,36	83,94	58,38
BI-M1	73,46	46,75	74,95	49,69
KAI-M1	78,16	42,27	85,29	62,95
Soyasapogénol B	75,78	46,18	105,92	61,58

Tableau 18: Tableau récapitulatif des pourcentages de variabilité et de neuroprotection des PC12 en présence des extraits et de Aβ 5 µM

	% de viabilité des PC12				% de Neuroprotection des PC12			
EXTRAITS	100 µg/ mL	50 µg/mL	5 µg/mL	1 µg/mL	100 µg/ mL	50 µg/mL	5 µg/mL	1 µg/mL
ZA-P1	189,05	243,57	120,16	101,88		127,37	82,78	51,00
BI-P1	176,89	221,11	113,60	97,49		108,82	80,87	50,83
SIL-P1	128,37	195,69	107,04	93,73		113,96	73,07	51,91
KAI-P1	121,24	197,29	141,30	105,69		77,72	51,40	41,61
ZA-P2	99,24	166,22	135,54	98,40		44,93	40,60	44,44
ZA-P2-HEX	85,37	182,96	124,69	102,95		46,35	46,86	42,16
KAI-P3		159,93	106,36	103,47	172,30	62,93	53,34	50,52
SIL-P3		81,88	109,96	99,87	137,20	82,46	71,87	54,96
ZA-P3		111,27	112,82	101,87	93,73	35,37	27,39	21,15
BI-P3		82,71	112,04	97,75	95,46	53,83	42,79	41,36
SIL-P4		267,48	122,37	95,02		53,39	50,73	48,79
KAI-P4		130,21	103,73	96,90		54,49	45,87	45,65
ZA-P4/HEX		67,03	119,56	99,84		58,10	48,90	43,72
ZA-P4/CHLOR		64,10	112,95	98,08		55,83	45,99	47,34
ZA-P4/AE		62,20	122,61	99,58		60,32	53,46	50,84
BI-P4		65,64	92,46	90,48		72,93	60,51	41,06
ZA-M1		86,02	104,62	105,99		61,49	53,41	41,00
SIL-M1		73,99	116,95	101,36		57,71	44,29	44,10
BI-M1		82,02	117,12	108,47		51,64	43,85	42,61
KAI-M1		47,75	138,15	99,84		50,17	69,61	55,97
Soyasaponine	62,39	40,20	145,51	105,03	93,62	50,53	47,56	43,00

Conclusion générale & Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ce travail a été conduit dans le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) sous la direction de Mme Christine RAYNAUD et l'encadrement de Mme Géraldine GIACITNI en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) sous la direction de Mr Jalloul BOUAJILA à la Faculté de pharmacie de Toulouse et le Laboratoire LGMIB sous la direction de Mme Sonia MARGHALI où des études préliminaires sur l'espèce Astragalus hamosus L. ont été initiées depuis le master.

Notre pays, la Tunisie est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales. Ces plantes restent toujours une source fiable de principes actifs, connus pour leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des potentialités biologiques d'une espèce non valorisée en Tunisie qui est Astragalus hamosus L.

L'objectif de cette thèse a été de mettre en lumière les saponines de l'espèce Astragalus hamosus L. provenant de la Tunisie.

En raison de leurs caractéristiques chimiques et structurales particulières, l'extraction et l'isolement des saponines des plantes représentent un défi important. Les résultats de ces travaux ont permis de confirmer l'hypothèse de la présence de saponines dans les extraits d'Astragalus hamosus L. d'origine tunisienne.

Une stratégie combinant différents protocoles d'extraction et systèmes d'élution HPTLC a été proposée. Une première méthode d'extraction méthanolique basique (M1) a permis d'extraire les molécules bioactives mais les quatre protocoles mis en œuvre (P1, P2, P3 et P4) ont permis une première purification. En effet, ces protocoles sont basés sur l'augmentation des polarités des solvants organiques au cours du fractionnement de la plante dont le but est de récupérer les saponines polaires dans la dernière fraction butanolique. Les protocoles P1, P2 et P4 ont fait appel à l'utilisation du soxhlet. Cette technique s'appuie notamment sur l'énergie thermique lors des extractions, ce qui peut provoquer une déglycosylation des saponines par rapport à l'extraction à température ambiante.

Le Protocole P3, quant à lui, basé sur la macération à température ambiante a été sélectionné comme protocole le plus pertinent pour la détection des saponines d'Astragalus hamosus.

Tout d'abord, des extraits méthanoliques (M1) de la population de Bizerte ont été analysés par HPTLC-UV-VIS et par HPLC. Les extraits BI-M1-25 et BI-M1_300 ont montré une richesse notable en métabolites mais aucune saponine répertoriée dans la littérature n'a été détectée. L'analyse des extraits BI-25-M1, SIL-25-M1, KAI-25-M1 et ZA-25-M1 par HPTLC suivant le système S1, a montré que la population Siliana était plus riche en métabolites. La visualisation des HPTLC sous UV a montré que les saponines ne sont pas détectables à 366 nm et ceci est expliqué par l'absence de chromophore.

L'ensemble de ces résultats a suggéré de changer la méthode d'extraction en premier lieu et ensuite le système de développement S1 qui n'a pas permis de purifier les saponines qui sont restées au R_F=0 en HPTLC. En effet, la population Zaghouan a été choisie pour optimiser les analyses et appliquer 4 protocoles d'extraction adaptés de la littérature (P1, P2, P3 et P4). Une HPTLC a été

préparée pour purifier les extraits ZA-P1, ZA-P2, ZA-P3, ZA-P4 et ZA-25-M1 selon le système de développement S1. À ce niveau, nous avons confirmé la non validité du système S1. Les mêmes extraits ont été alors analysés selon un système de développement S2 où l'élution se fait théoriquement suivant 3 niveaux : les méthylxanthines, ensuite les polyphénols et en dernier les saponines. Le nouveau système d'élution a permis la migration des molécules polaires qui restaient auparavant avec le système S1 au niveau de la ligne de dépôt. L'augmentation de la force d'élution dans le système S2 de SS1 à SS3 a permis d'éluer les molécules les moins polaires jusqu'au front de solvant et de faire migrer les molécules les plus polaires qui étaient localisées au R_F=0.

L'analyse HPTLC suivant le système d'élution S2 des extraits Zaghouan obtenus par les 5 protocoles a montré que le protocole P3 est le plus sélectif, nous ne détections plus qu'un seul spot au R_F=0,2 au même R_F que la Soyasaponine B et c'est pour cette raison que cet extrait a été hydrolysé et analysé par HPTLC-UPLC. Les résultats HPTLC ont démontré que l'hydrolyse avait libéré la partie glycosylée de son aglycone.

Les extraits Zaghouan ont fait l'objet d'une analyse directe en HPLC-SM en mode ESI négatif. La soyasaponine, ainsi que son aglycone ont été détectés dans tous les extraits. Ces résultats ont été confirmés, après une phase d'optimisation des paramétres analytiques par un couplage HPTLC-SM en mode ESI positif où les spots d'intérêt ont été désorbés directement de la plaque de silice après une élution suivant le système S2 et injectés en spectrométrie de masse. La soyasaponine B et son aglycone ont été détectées sous forme d'adduit sodium $[M+Na]^+$, m/z=965 et, m/z=481 respectivement dans les extraits Zaghouan obtenus par les protocoles d'extraction P1, P2 et P4. Au final, les résultats de cette étude ont permis de démontrer que les saponines triterpénoïdes d'Astragalus hamosus L. sont probablement présentes dans les différents extraits d'Astragalus hamosus L. des populations Zaghouan, Bizerte, Siliana et Kairouan.

La quantification des saponines a été évaluée par spectrophotométrie et par HPTLC en se basant sur la gamme étalon du Soyasapogénol, 3 % de saponines ont été estimées en équivalent soyasapogénol dans l'extrait ZA-P3.

Les extrait ZA obtenus par les protocoles d'extraction P1, P4 et M1 ont été évalués pour leurs quantités en polyphénols en équivalent d'acide gallique. Les quantités de polyphénols obtenus par P1 étaient proches pour Siliana, Zaghouan et Bizerte (19 mg EAG.g-1 MS ; 18,1 mg EAG.g-1 MS et 15,4 mg EAG.g-1 MS successivement). Ce sont les quantités les plus faibles en comparaison avec les autres protocoles d'extraction, ceci confirme que P1 purifie plus efficacement les extraits d'Astragalus hamosus L. vis à vis des polyphénols. Le protocole d'extraction méthanolique M1 a permis d'avoir des extraits plus riches en polyphénols. La faible quantité des polyphénols explique l'activité antiradicalaire non significative des extraits obtenus par les protocles P1 et P4.

La détermination des propriétés biologiques neuroprotectrices des extraits des quatre populations d'Astragalus hamosus L. ont apporté des résultats concluants.

Dans le cadre du volet neuroprotection, l'évaluation qualitative par biautographie a montré une inhibition de l'AchE par tous les sports situés entre R_F=0,2 et R_F=0,4, qui sont probablement des saponines glycosilées, ainsi que pour la Soyasaponine B.

S'agissant du test d'Ellman, SIL-P4 et BI-P4 présentaient les CI_{50} les plus importantes de valeur 40,16 et 65,35 µg/mL respectivement. Les standards présentaient des CI_{50} non significatives et à ce stade nous avons décidé de choisir un autre modéle. Nous avons commencé par tester l'effet

des extraits sur les cellules neurales PC12 en absence du peptide Aβ. Les extraits obtenus par P1 étaient tous stimulateurs de la prolifération des cellules PC12 même à 100 µg/mL d'extrait, il en a été de même pour les extraits obtenus par P2. Quant à SIL-P3 et BI-P3, ils sont légèrement toxiques à une concentration de 50 µg/mL.

La fraction SIL-P4 est stimulatrice de la prolifération des cellules PC12 mais BI-P4 est neurotoxique même à la plus faible concentration et toutes les fractions hexane, chloroforme, acétate d'éthyle de l'extrait ZA-P4 ont montré un effet neurotoxique à 50 µg/mL. Toutes les fractions obtenues par M1 sont neurotoxiques à 50 µg/mL. Le Soyasapogénol B est neurotoxique à 100 et 50 µg/mL mais stimulateur de la prolifération à 5 µg/mL.

Le peptide Aβ à 5 µM a causé 55 % de mort cellulaire, c'est-à-dire que seulement 45 % des cellules restaient viables. Tous les extraits obtenus par le protocole d'extraction P1 étaient neuroprotecteurs, contrairement aux deux fractions obtenues par P2 qui ne présentaient aucune neuroprotection. Les extraits obtenus par P3, sont neuroprotecteurs à différentes concentrations. Concernant P4, SIL-P4 présentait les meilleurs résultats, il est neuroprotecteur et stimulateur même en présence du peptide Aβ, suivie de BI-P4 qui a exhibé 72,93 % de viabilité à 50 µg/mL.

Par rapport à la méthode M1, ZA-M1, SIL-M1 et BI-M1 exerçaient une neuroprotection dose dependante.

Ce qui est intéressant et marquant dans ces travaux dans le cadre de l'évaluation de la neuroprotection, ce sont les extraits qui exerçaient une toxicité sur les cellules PC12 en absence du peptide Aβ et une neuroprotection en présence d'Aβ. Ce résultat peut s'expliquer par une interaction qui a lieu entre le peptide Aβ et les molécules présentes dans les extraits étudiés, cette interaction neutralise probablement la toxicité.

L'effet cytotoxique des astragales cité dans la littérature nous a encouragé à évaluer nos extraits sur la lignée du cancer colorectal CACO-2. En effet, tous les extraits ont exercé une inhibition significative de la prolifération sans exception. Tous les extraits obtenus à partir des protocoles d'extraction P1, P2, P3 et P4 ont démontré leur cytotoxicité, avec une CI_{50} estimée probablement inférieure à 1 µg/mL. Les pourcentages d'inhibition observés étaient supérieurs à 50 % même à une concentration de 1 µg/mL, ce qui suggère une activité inhibitrice importante. Il convient d'explorer des concentrations encore plus faibles pour préciser la CI_{50}.

Les extraits obtenus par le protocole M1 ont également présenté une activité similaire, avec une CI_{50} exceptionnellement basse de 1 µg/mL. Cette valeur est remarquable par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature, soulignant ainsi la puissance inhibitrice des extraits obtenus par ce protocole.

Ces résultats démontrent clairement la cytotoxicité des extraits obtenus à partir des différents protocoles d'extraction, ainsi que l'efficacité des extraits obtenus par le protocole M1. Il convient de poursuivre les recherches pour mieux comprendre leur mécanisme d'action et leur potentiel en tant qu'agents anticancéreux prometteurs.

Les extraits d'Astragalus hamosus L. exercent une activité cytotoxique sur les cellules Caco-2plus importante que le soyasapogénol B qui a exhibé une CI_{50} de valeur 1,25 µg/mL, concentration hautement significative. La cytotoxicité des extraits d'Astragalus hamosus L. sur les cellules HEK293 est également significative.

En conclusion, les fractions isolées d'Astragalus hamosus L. issues de quatre populations tunisiennes ont montré des activités biologiques prometteuses permettant d'envisager la valorisation de cette plante à des fins thérapeutiques, cependant des essais complémentaires seront nécessaires pour valider ces effets bilogiques.

Dans le domaine de la recherche sur les saponines et leur potentiel thérapeutique, plusieurs perspectives émergentes permetteraient d'approfondir notre compréhension et exploiter leur efficacité dans le traitement des maladies neurodégénératives et du cancer colorectal.

Tout d'abord, il est essentiel d'étudier les interactions des saponines avec d'autres médicaments couramment utilisés dans le traitement des maladies neurodégénératives. Comprendre comment les saponines interagissent avec ces médicaments permettra d'optimiser les protocoles de traitement et de minimiser les effets indésirables potentiels.

Parallèlement, le développement de formulations pharmaceutiques adaptées est une perspective clé. Il s'agit de concevoir des formulations qui permettent une administration efficace et sûre des saponines. Une absorption optimale, une biodisponibilité adéquate et une stabilité des saponines sont des éléments essentiels à considérer pour maximiser leur potentiel thérapeutique.

Des études pré-cliniques approfondies sont également nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité des saponines en tant que traitement.

Parallèlement, il est important de comprendre les mécanismes d'action des saponines pour déterminer comment elles engendrent des effets thérapeutiques sur les maladies neurodégénératives. Une meilleure compréhension des voies biologiques et des mécanismes moléculaires impliqués permet d'optimiser l'utilisation des saponines dans le développement de nouveaux traitements.

L'évaluation de la plénitude des saponines est une autre perspective cruciale. Il s'agit de déterminer la dose maximale sans effet toxique pour les patients, en établissant une plage de doses sûres et efficaces. Cette évaluation permettra d'optimiser l'utilisation clinique des saponines, en garantissant la sécurité tout en maximisant leur efficacité thérapeutique.

Enfin, il est également important d'élargir les études de cytotoxicité des saponines à d'autres lignées cellulaires du cancer colorectal, telles que HCT116 et de surcroit à d'autres cellules de lignées non cancéreuses pour évaluer la sélectivité. Cela permettra d'obtenir des données plus complètes sur l'activité anticancéreuse des saponines et d'évaluer leur potentiel thérapeutique sur différentes lignées cellulaires.

En somme, ces différentes perspectives de recherche permettent de mieux comprendre et exploiter le potentiel thérapeutique des saponines dans le traitement des maladies neurodégénératives et du cancer colorectal. Elles contribueront à développer des stratégies plus efficaces et sûres pour améliorer la qualité de vie des patients et ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques prometteuses.

Références bibliographiques

[1] W. Reith, « Neurodegenerative Erkrankungen », *Radiologe*, vol. 58, nº 3, p. 241-258, mars 2018, doi: 10.1007/s00117-018-0363-y.

[2] U. Ziegler et G. Doblhammer, « [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002] », *Gesundheitswesen*, vol. 71, nº 5, p. 281-290, mai 2009, doi: 10.1055/s-0028-1119384.

[3] C. Qiu, D. De Ronchi, et L. Fratiglioni, « The epidemiology of the dementias: an update », *Current Opinion in Psychiatry*, vol. 20, nº 4, p. 380-385, juill. 2007, doi: 10.1097/YCO.0b013e32816ebc7b.

[4] P. Hobson et J. Meara, « Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom », *Movement Disorders*, vol. 19, nº 9, p. 1043-1049, 2004, doi: 10.1002/mds.20216.

[5] « La maladie d'Alzheimer : plus de 100 ans d'histoire et de découvertes », France Culture. Consulté le: 28 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.franceculture.fr/sciences/la-maladie-dalzheimer-plus-de-100-ans-dhistoire-et-de-decouvertes

[6] J. L. Crimins, A. Pooler, M. Polydoro, J. I. Luebke, et T. L. Spires-Jones, « The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease », *Ageing Res Rev*, vol. 12, nº 3, p. 757-763, juin 2013, doi: 10.1016/j.arr.2013.03.002.

[7] R. A. Nixon, « Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease », *J Cell Sci*, vol. 120, nº Pt 23, p. 4081-4091, déc. 2007, doi: 10.1242/jcs.019265.

[8] J. Lewis et D. W. Dickson, « Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies », *Acta Neuropathol*, vol. 131, nº 1, p. 27-48, janv. 2016, doi: 10.1007/s00401-015-1507-z.

[9] H. V. Goodson et E. M. Jonasson, « Microtubules and Microtubule-Associated Proteins », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, nº 6, p. a022608, juin 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a022608.

[10] L. C. Kapitein et C. C. Hoogenraad, « Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton », *Neuron*, vol. 87, nº 3, p. 492-506, août 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.046.

[11] N. El Kadmiri, K. Hamzi, B. El Moutawakil, I. Slassi, et S. Nadifi, « Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer (Revue) », *Pathologie Biologie*, vol. 61, nº 6, p. 228-238, déc. 2013, doi: 10.1016/j.patbio.2013.04.001.

[12] L. Buée, T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, et P. R. Hof, « Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders », *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 33, nº 1, p. 95-130, août 2000, doi: 10.1016/s0165-0173(00)00019-9.

[13] J.-P. Brion, « Neurofibrillary Tangles and Alzheimer's Disease », *ENE*, vol. 40, nº 3, p. 130-140, 1998, doi: 10.1159/000007969.

[14] H. Gao, L. Dou, L. Shan, Y. Sun, et W. Li, « Proliferation and committed differentiation into dopamine neurons of neural stem cells induced by the active ingredients of radix astragali », *Neuroreport*, vol. 29, nº 7, p. 577-582, mai 2018, doi: 10.1097/WNR.0000000000000997.

[15] R. Wang, G.-J. Wang, X.-L. Wu, F. Zhou, et Y.-N. Li, « Ginsenoside Rg1 attenuates structural disruption of the blood-brain barrier to protect the central nervous system in ischemia/reperfusion », *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 11, nº 1, p. 30-37, janv. 2013, doi: 10.1016/S1875-5364(13)60004-7.

[16] B. R. Hoover *et al.*, « Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration », *Neuron*, vol. 68, nº 6, p. 1067-1081, déc. 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030.

[17] N. Sergeant, A. Delacourte, et L. Buée, « Tau protein as a differential biomarker of tauopathies », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1739, nº 2-3, p. 179-197, janv. 2005, doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020.

[18] Y. Ju et K. Y. Tam, « Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease », *Neural Regen Res*, vol. 17, nº 3, p. 543-549, août 2021, doi: 10.4103/1673-5374.320970.

[19] D. Allsop, M. Landon, et M. Kidd, « The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein », *Brain Res*, vol. 259, nº 2, p. 348-352, janv. 1983, doi: 10.1016/0006-8993(83)91273-8.

[20] A. Mudher et S. Lovestone, « Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? », *Trends Neurosci*, vol. 25, nº 1, p. 22-26, janv. 2002, doi: 10.1016/s0166-2236(00)02031-2.

[21] M. S. Parihar et T. Hemnani, « Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions », *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 11, nº 5, p. 456-467, juin 2004, doi: 10.1016/j.jocn.2003.12.007.

[22] « Causes et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer », Fondation pour la Recherche sur Alzheimer. Consulté le: 3 novembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://alzheimer-recherche.org/la-maladie-alzheimer/quest-maladie-dalzheimer/facteurs-de-risques/

[23] J. Ankri, « Prévalence, incidence et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer », *Gerontologie et societe*, vol. 32 / n° 128-129, nº 1, p. 129-141, sept. 2009.

[24] D. Blacker et R. E. Tanzi, « The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects », *Arch Neurol*, vol. 55, nº 3, p. 294-296, mars 1998, doi: 10.1001/archneur.55.3.294.

[25] S. Craft *et al.*, « Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes with Alzheimer's disease », *Neurology*, vol. 51, nº 1, p. 149-153, juill. 1998, doi: 10.1212/wnl.51.1.149.

[26] N. Schupf, D. Kapell, B. Nightingale, A. Rodriguez, B. Tycko, et R. Mayeux, « Earlier onset of Alzheimer's disease in men with Down syndrome », *Neurology*, vol. 50, nº 4, p. 991-995, avr. 1998, doi: 10.1212/wnl.50.4.991.

[27] R. Mayeux, « Understanding Alzheimer's disease: expect more genes and other things », *Ann Neurol*, vol. 39, nº 6, p. 689-690, juin 1996, doi: 10.1002/ana.410390602.

[28] P.-A. Kenigsberg *et al.*, « Impact socio-économique de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées en Europe », *Gérontologie et société: cahiers de la Fondation nationale de gérontologie*, vol. 128-129, p. 297-318, janv. 2009, doi: 10.3917/gs.128.0297.

[29] C. L. Joachim et D. J. Selkoe, « The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease », *Alzheimer Dis Assoc Disord*, vol. 6, nº 1, p. 7-34, 1992, doi: 10.1097/00002093-199205000-00003.

[30] J. Hardy et D. J. Selkoe, « The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics », *Science*, vol. 297, nº 5580, p. 353-356, juill. 2002, doi: 10.1126/science.1072994.

[31] H. Lin, R. Bhatia, et R. Lal, « Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology », *The FASEB Journal*, vol. 15, nº 13, p. 2433-2444, 2001, doi: 10.1096/fj.01-0377com.

[32] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, et K. Beyreuther, « Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, nº 12, p. 4245-4249, juin 1985, doi: 10.1073/pnas.82.12.4245.

[33] D. M. Mann et M. M. Esiri, « The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome », *J Neurol Sci*, vol. 89, nº 2-3, p. 169-179, févr. 1989, doi: 10.1016/0022-510x(89)90019-1.

[34] F. Checler *et al.*, « Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines », *Med Sci (Paris)*, vol. 18, nº 6-7, Art. nº 6-7, juin 2002, doi: 10.1051/medsci/20021867717.

[35] « Les plaques amyloïdes — Site des ressources d'ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre ». Consulté le: 28 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/alzheimer/la-maladie-dalzheimer-a-lechelle-cellulaire-et-moleculaire/les-palques

[36] L. Govaerts, J. Schoenen, et D. Bouhy, « Pathogénie de la maladie d'Alzheimer: les mécanismes moléculaires et cellulaires », *Revue médicale de Liège*, vol. 62, avr. 2007.

[37] A. Delacourte, « De la physiopathologie au traitement de la maladie d'Alzheimer », 2006, doi: 10.1016/S0035-3787(06)75099-8.

[38] A. Hémar et C. Mulle, « Maladie d'Alzheimer, peptide β-amyloïde et synapses », *Med Sci (Paris)*, vol. 27, nº 8-9, Art. nº 8-9, août 2011, doi: 10.1051/medsci/2011278015.

[39] C. Haass *et al.*, « Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism », *Nature*, vol. 359, nº 6393, p. 322-325, sept. 1992, doi: 10.1038/359322a0.

[40] A. Jan, O. Gokce, R. Luthi-Carter, et H. A. Lashuel, « The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity », *J Biol Chem*, vol. 283, nº 42, p. 28176-28189, oct. 2008, doi: 10.1074/jbc.M803159200.

[41] T. Li *et al.*, « Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities », *J Neurosci*, vol. 27, nº 40, p. 10849-10859, oct. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2152-07.2007.

[42] J. R. Cirrito *et al.*, « Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo », *Neuron*, vol. 48, nº 6, p. 913-922, déc. 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.028.

[43] E. S. Musiek, D. D. Xiong, et D. M. Holtzman, « Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease », *Exp Mol Med*, vol. 47, p. e148, mars 2015, doi: 10.1038/emm.2014.121.

[44] M. Meyer-Luehmann *et al.*, « Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease », *Nature*, vol. 451, nº 7179, p. 720-724, févr. 2008, doi: 10.1038/nature06616.

[45] J. Götz, F. Chen, R. Barmettler, et R. M. Nitsch, « Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau », *J Biol Chem*, vol. 276, nº 1, p. 529-534, janv. 2001, doi: 10.1074/jbc.M006531200.

[46] « Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease - PubMed ». Consulté le: 8 novembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25853174/

[47] B. Zott *et al.*, « A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation », *Science*, vol. 365, nº 6453, p. 559-565, août 2019, doi: 10.1126/science.aay0198.

[48] D. Rice *et al.*, « Exercise-Induced Hypoalgesia in Pain-Free and Chronic Pain Populations: State of the Art and Future Directions », *Journal of Pain*, mars 2019, doi: 10.1016/j.jpain.2019.03.005.

[49] V. Kumar, A. J. Hart, T. T. Wimalasena, G. A. Tucker, et D. Greetham, « Expression of RCK2 MAPKAP (MAPK-activated protein kinase) rescues yeast cells sensitivity to osmotic stress », *Microb Cell Fact*, vol. 14, nº 1, p. 85, déc. 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0276-7.

[50] Y. Hou *et al.*, « Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease », *Nat Rev Neurol*, vol. 15, nº 10, p. 565-581, oct. 2019, doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.

[51] I. M. Rea, D. S. Gibson, V. McGilligan, S. E. McNerlan, H. D. Alexander, et O. A. Ross, « Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines », *Front Immunol*, vol. 9, p. 586, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00586.

[52] V. Di Donato *et al.*, « An Attractive Reelin Gradient Establishes Synaptic Lamination in the Vertebrate Visual System », *Neuron*, vol. 97, nº 5, p. 1049-1062.e6, mars 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.030.

[53] V. Calsolaro et P. Edison, « Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions », *Alzheimers Dement*, vol. 12, nº 6, p. 719-732, juin 2016, doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.

[54] E. E. Spangenberg et K. N. Green, « Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models », *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 61, p. 1-11, mars 2017, doi: 10.1016/j.bbi.2016.07.003.

[55] C. Zhang, Y. Wang, D. Wang, J. Zhang, et F. Zhang, « NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies », *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 10, 2018, Consulté le: 9 novembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2018.00083

[56] « Alzheimer : l'arrivée de la mémantine, antagoniste des récepteurs NMDA », Le Quotidien du Médecin. Consulté le: 8 novembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.lequotidiendumedecin.fr/archives/alzheimer-larrivee-de-la-memantine-antagoniste-des-recepteurs-nmda

[57] A. J. Granger, Y. Shi, W. Lu, M. Cerpas, et R. A. Nicoll, « LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type », *Nature*, vol. 493, nº 7433, p. 495-500, janv. 2013, doi: 10.1038/nature11775.

[58] A. Reiner et J. Levitz, « Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert », *Neuron*, vol. 98, nº 6, p. 1080-1098, juin 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018.

[59] C. P. Jacob *et al.*, « Alterations in Expression of Glutamatergic Transporters and Receptors in Sporadic Alzheimer's Disease », *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 11, nº 1, p. 97-116, janv. 2007, doi: 10.3233/JAD-2007-11113.

[60] C. C. Rudy, H. C. Hunsberger, D. S. Weitzner, et M. N. Reed, « The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease », *Aging and disease*, vol. 6, nº 2, p. 131, 2015, doi: 10.14336/AD.2014.0423.

[61] S. Claeysen, « Modulation du microbiote intestinal comme nouvelle voie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer », *Revue Neurologique*, vol. 178, p. S149, avr. 2022, doi: 10.1016/j.neurol.2022.02.024.

[62] C. S. Atwood, X. Huang, R. D. Moir, R. E. Tanzi, et A. I. Bush, « Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease », *Met Ions Biol Syst*, vol. 36, p. 309-364, 1999.

[63] H. Y. Zhou, J. L. Hong, P. Shu, Y. J. Ni, et M. J. Qin, « A new dicoumarin and anticoagulant activity from Viola yedoensis Makino », *Fitoterapia*, vol. 80, nº 5, p. 283-285, juill. 2009, doi: 10.1016/j.fitote.2009.03.005.

[64] M. A. Ansari, H. M. Abdul, G. Joshi, W. O. Opii, et D. A. Butterfield, « Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease », *J Nutr Biochem*, vol. 20, nº 4, p. 269-275, avr. 2009, doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.03.002.

[65] B. Moosmann et C. Behl, « Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders », *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 11, nº 10, p. 1407-1435, oct. 2002, doi: 10.1517/13543784.11.10.1407.

[66] B. Halliwell, « Biochemistry of oxidative stress », *Biochem Soc Trans*, vol. 35, nº Pt 5, p. 1147-1150, nov. 2007, doi: 10.1042/BST0351147.

[67] T. O. Elufioye, T. I. Berida, et S. Habtemariam, « Plants-Derived Neuroprotective Agents: Cutting the Cycle of Cell Death through Multiple Mechanisms », *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2017, p. 3574012, 2017, doi: 10.1155/2017/3574012.

[68] W.-Z. Li *et al.*, « Protective effect of extract of Astragalus on learning and memory impairments and neurons' apoptosis induced by glucocorticoids in 12-month-old male mice », *Anat Rec (Hoboken)*, vol. 294, nº 6, p. 1003-1014, juin 2011, doi: 10.1002/ar.21386.

[69] S. Zhu, L. Qi, Y. Rui, R. Li, X. He, et Z. Xie, « Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca2+ oscillations on hippocampal neurons », *Acta Pharmacol Sin*, vol. 29, nº 1, p. 57-64, janv. 2008, doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00712.x.

[70] Y. Luo *et al.*, « Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia », *Neurosci Lett*, vol. 363, nº 3, p. 218-223, juin 2004, doi: 10.1016/j.neulet.2004.03.036.

[71] M. Kondeva-Burdina, I. Krasteva, et M. Mitcheva, « Effects of rhamnocitrin 4-β-D-galactopyranoside, isolated from Astragalus hamosus on toxicity models in vitro », *Pharmacogn Mag*, vol. 10, nº Suppl 3, p. S487-S493, août 2014, doi: 10.4103/0973-1296.139778.

[72] B. M. Abdelaziz, M. W. Helmy, M. A. Katary, M. M. Abd-Alhaseeb, et A. I. Ghoneim, « Protective effects of Astragalus kahiricus root extract on ethanol-induced retrograde memory impairments in mice », *J Herbmed Pharmacol*, vol. 8, nº 4, p. 295-301, sept. 2019, doi: 10.15171/jhp.2019.43.

[73] Z. Bahaeddin, A. Yans, F. Khodagholi, et S. Sahranavard, « Dietary supplementation with Allium hirtifolium and/or Astragalus hamosus improved memory and reduced neuro-inflammation in the rat model of Alzheimer's disease », *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, vol. 43, déc. 2017, doi: 10.1139/apnm-2017-0585.

[74] W. Xie *et al.*, « Panax Notoginseng Saponins: A Review of Its Mechanisms of Antidepressant or Anxiolytic Effects and Network Analysis on Phytochemistry and Pharmacology », *Molecules*, vol. 23, nº 4, p. 940, avr. 2018, doi: 10.3390/molecules23040940.

[75] Z. Zhang, T. Deng, M. Wu, A. Zhu, et G. Zhu, « Botanicals as modulators of depression and mechanisms involved », *Chinese Medicine*, vol. 14, nº 1, p. 24, juill. 2019, doi: 10.1186/s13020-019-0246-9.

[76] H.-T. A. E. Abd Elkader, H. M. Abdou, O. A. Khamiss, et A. E. Essawy, « Anti-anxiety and antidepressant-like effects of astragaloside IV and saponins extracted from Astragalus spinosus against the bisphenol A-induced motor and cognitive impairments in a postnatal rat model of schizophrenia », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, nº 26, p. 35171-35187, juill. 2021, doi: 10.1007/s11356-021-12927-5.

[77] L. Li, X. Hou, R. Xu, C. Liu, et M. Tu, « Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV », *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 31, nº 1, p. 17-36, févr. 2017, doi: 10.1111/fcp.12232.

[78] A. Sun, X. Xu, J. Lin, X. Cui, et R. Xu, « Neuroprotection by Saponins », *Phytotherapy Research*, vol. 29, nº 2, p. 187-200, 2015, doi: 10.1002/ptr.5246.

[79] B. Pál, « Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability », *Cell Mol Life Sci*, vol. 75, nº 16, p. 2917-2949, août 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2837-5.

[80] W.-Z. Li *et al.*, « Protective effects of astragalosides on dexamethasone and Aβ25-35 induced learning and memory impairments due to decrease amyloid precursor protein expression in 12-month male rats », *Food Chem Toxicol*, vol. 50, nº 6, p. 1883-1890, juin 2012, doi: 10.1016/j.fct.2012.03.064.

[81] X. Wang, W. Xu, H. Chen, W. Li, W. Li, et G. Zhu, « Astragaloside IV prevents Aβ1-42 oligomers-induced memory impairment and hippocampal cell apoptosis by promoting

PPARγ/BDNF signaling pathway », *Brain Research*, vol. 1747, p. 147041, nov. 2020, doi: 10.1016/j.brainres.2020.147041.

[82] X. Wang *et al.*, « Lychee Seed Saponins Improve Cognitive Function and Prevent Neuronal Injury via Inhibiting Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Alzheimer's Disease », *Nutrients*, vol. 9, nº 2, Art. nº 2, févr. 2017, doi: 10.3390/nu9020105.

[83] H. Pei *et al.*, « Traditional Chinese Medicine for Alzheimer's Disease and Other Cognitive Impairment: A Review », *Am J Chin Med*, vol. 48, nº 3, p. 487-511, 2020, doi: 10.1142/S0192415X20500251.

[84] L. Wang et W. S. Kisaalita, « Administration of BDNF/ginsenosides combination enhanced synaptic development in human neural stem cells », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 194, nº 2, p. 274-282, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.10.025.

[85] N. Ye, J. Cruz, X. Peng, J. Ma, A. Zhang, et X. Cheng, « Remyelination is enhanced by Astragalus polysaccharides through inducing the differentiation of oligodendrocytes from neural stem cells in cuprizone model of demyelination », *Brain Res*, vol. 1763, p. 147459, juill. 2021, doi: 10.1016/j.brainres.2021.147459.

[86] Z. Zheng et B. Zhao, « RETRACTED: Astragalus polysaccharide protects hypoxia-induced injury by up-regulation of miR-138 in rat neural stem cells », *Biomed Pharmacother*, vol. 102, p. 295-301, juin 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.040.

[87] « Cancer colorectal et facteurs de risque • Cancer Environnement », Cancer Environnement. Consulté le: 7 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.cancer-environnement.fr/fiches/cancers/cancer-colorectal/

[88] E. Lecommandeur, « Le microbiote intestinal joue-t-il un rôle dans le cancer colorectal ? », Microbiote intestinal & Bien-être. Consulté le: 8 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://blog.nahibu.com/le-microbiote-intestinal-joue-t-il-un-role-dans-le-cancer-colorectal/

[89] A. Rondon, « Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale », 2018.

[90] J. C. Fabregas, B. Ramnaraign, et T. J. George, « Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022 », *Clinical Colorectal Cancer*, vol. 21, nº 3, p. 198-203, sept. 2022, doi: 10.1016/j.clcc.2022.05.006.

[91] « Cancer du colon rectum ». Consulté le: 13 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum

[92] I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, et M. J. Rodriguez Yoldi, « Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer », *Int J Mol Sci*, vol. 18, nº 1, p. 197, janv. 2017, doi: 10.3390/ijms18010197.

[93] R. Lotte, « Caractérisation des interactions moléculaires entre la GTPase Rac1 et son régulateur HACE1 : perspectives en infectiologie et en cancérologie », 2017.

[94] M. M. Y. Tin, C.-H. Cho, K. Chan, A. E. James, et J. K. S. Ko, « Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft », *Carcinogenesis*, vol. 28, nº 6, p. 1347-1355, juin 2007, doi: 10.1093/carcin/bgl238.

[95] A. Al-Snafi, « CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ASTRAGALUS HAMOSUS AND ASTRAGALUS TRIBULOIDES GROWN IN IRAQ », *Asian J of Pharm Sci & Tech*, vol. 5, p. 321-328, janv. 2015.

[96] I. Ionkova, A. Shkondrov, I. Krasteva, et T. Ionkov, « Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Astragalus saponins », *Phytochemistry Reviews*, vol. 13, p. 343-374, juin 2014, doi: 10.1007/s11101-014-9347-3.

[97] « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales - Detail - Ermes ». Consulté le: 29 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/doc/exploitation/HORIZON/493163/nouvelle-flore-de-l-algerie-et-des-regions-desertiques-meridionales

[98] « Flore et écologie taxonomique de Tunisie : dicotyledones - Sécheresse ». Consulté le: 29 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://www.secheresse.info/spip.php?article23696

[99] G. A. Pottier-Alapetite, *Flore de la Tunisie : Angiospermes-dicotylédones*. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture. [Tunis], 1979.

[100] D. Podlech, « The genus Astragalus L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union », *Feddes Repertorium*, vol. 119, nº 5-6, p. 310-387, 2008, doi: 10.1002/fedr.200811171.

[101] M. national d'Histoire naturelle, « Astragalus hamosus L., 1753 - Astragale à gousses en hameçon », Inventaire National du Patrimoine Naturel. Consulté le: 29 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/84846

[102] F. Dane, Ö. D. Aksoy, et G. Yılmaz, « Karyological and palynological studies on Astragalus hamosus and A. glycyphyllos in Turkey », p. 6, 2007.
[103] C. P. Khare, Éd., *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. New York, NY: Springer New York, 2007. doi: 10.1007/978-0-387-70638-2.
[104] I. Krasteva, S. Platikanov, S. Nikolov, et M. Kaloga, « Flavonoids from Astragalus hamosus », *Natural Product Research*, vol. 21, nº 5, p. 392-395, mai 2007, doi: 10.1080/14786410701236871.
[105] S. Saleem *et al.*, « Anticancer potential of rhamnocitrin 4'-β-D-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats », *Mol Cell Biochem*, vol. 384, nº 1-2, p. 147-153, déc. 2013, doi: 10.1007/s11010-013-1792-6.
[106] I. Krasteva, G. Momekov, P. Zdraveva, S. Konstantinov, et S. Nikolov, « Antiproliferative effects of a flavonoid and saponins from Astragalus hamosus against human tumor cell lines », *Pharmacognosy Magazine*, vol. 4, p. 269-272, oct. 2008.
[107] M. Mahmoodi *et al.*, « Fabrication and Characterization of a Three-Dimensional Fibrin Gel Model to Evaluate Anti-Proliferative Effects of Astragalus hamosus Plant Extract on Breast Cancer Cells », *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 23, nº 2, p. 731-741, févr. 2022, doi: 10.31557/APJCP.2022.23.2.731.
[108] J. Ai *et al.*, « The anti-angiogenic effect of Astragalus hamosus extract on human umbilical vein endothelial cells cultured on three-dimensional fibrin gel model », In Review, preprint, août 2022. doi: 10.21203/rs.3.rs-1960472/v1.
[109] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, et H. Gruppen, « Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom », *Phytochemistry*, vol. 68, nº 3, p. 275-297, févr. 2007, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008.
[110] W. A. Oleszek, « Chromatographic determination of plant saponins », *Journal of Chromatography A*, vol. 967, nº 1, p. 147-162, août 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01556-4.
[111] « PHARMACOGNOSIE, PHYTOCHIMIE, PLANTES MEDICINALES », Sauramps Medical. Consulté le: 7 novembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.livres-medicaux.com/botanique/12396-pharmacognosie-phytochimie-plantes-medicinales.html
[112] N.-H. Nguyen, T. K. Q. Ha, J.-L. Yang, H. T. T. Pham, et W. K. Oh, « Triterpenoids from the genus Gynostemma: Chemistry and pharmacological activities », *J Ethnopharmacol*, vol. 268, p. 113574, mars 2021, doi: 10.1016/j.jep.2020.113574.
[113] K. Hostettmann, H. Kizu, et T. Tomimori, « Molluscicidal Properties of Various Saponins », *Planta Med*, vol. 44, nº 1, p. 34-35, janv. 1982, doi: 10.1055/s-2007-971396.
[114] « Chemical diversity and biological activities of the saponins isolated from Astragalus genus: focus on Astragaloside IV | SpringerLink ». Consulté le: 9 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-019-09626-y
[115] J. Zhang, C. Wu, L. Gao, G. Du, et X. Qin, « Astragaloside IV derived from Astragalus membranaceus: A research review on the pharmacological effects », *Adv Pharmacol*, vol. 87, p. 89-112, 2020, doi: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.
[116] L. Verotta et N. A. El-Sebakhy, « Cycloartane and oleanane saponins from Astragalus sp. », in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 25, Atta-ur-Rahman, Éd., in Bioactive Natural Products (Part F), vol. 25. , Elsevier, 2001, p. 179-234. doi: 10.1016/S1572-5995(01)80008-9.
[117] W. Tang et G. Eisenbrand, « Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees », in *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*, W. Tang et G. Eisenbrand, Éd., Berlin, Heidelberg: Springer, 1992, p. 97-103. doi: 10.1007/978-3-642-73739-8_14.
[118] « Effects of Plant-Derived Polysaccharides on Murine Cytomegalovirus and Encephalomyocarditis Virus Infections in Mice - D. F. Smee, A. J. Verbiscar, 1995 ». Consulté le: 10 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/095632029500600606
[119] E. Polat, E. Bedir, A. Perrone, S. Piacente, et O. Alankus-Caliskan, « Triterpenoid saponins from Astragalus wiedemannianus Fischer », *Phytochemistry*, vol. 71, nº 5, p. 658-662, avr. 2010, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.11.013.
[120] A. S. Ashour, M. M. A. El Aziz, et A. S. Gomha Melad, « A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination », *JNMR*, vol. 7, nº 4, p. 282-288, févr. 2019, doi: 10.15406/jnmr.2019.07.00199.
[121] PubChem, « Astragaloside I ». Consulté le: 7 novembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13996685

[122] Y.-Y. Bian, J. Guan, Z.-M. Bi, Y. Song, et P. Li, « Studies on chemical constituents of Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao », *Chinese Pharmaceutical Journal*, vol. 41, p. 1217-1221, août 2006.
[123] R. P. Mamedova et M. I. Isaev, « Triterpenoids from Astragalus Plants », *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 40, nº 4, p. 303-357, juill. 2004, doi: 10.1023/B:CONC.0000048246.16075.62.
[124] X. Li *et al.*, « A Review of Recent Research Progress on the Astragalus Genus », *Molecules*, vol. 19, nº 11, Art. nº 11, nov. 2014, doi: 10.3390/molecules191118850.
[125] Y. Lee, J.-C. Jung, Z. Ali, I. A. Khan, et S. Oh, « Anti-Inflammatory Effect of Triterpene Saponins Isolated from Blue Cohosh (Caulophyllum thalictroides) », *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2012, p. 798192, 2012, doi: 10.1155/2012/798192.
[126] P. Liu, H. Zhao, et Y. Luo, « Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic », *Aging Dis*, vol. 8, nº 6, p. 868-886, déc. 2017, doi: 10.14336/AD.2017.0816.
[127] « Cycloartane - un aperçu | Sujets ScienceDirect ». Consulté le: 24 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/cycloartane
[128] Y. Zhang *et al.*, « Oleanane type saponins from the stems of Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao », *Fitoterapia*, vol. 109, p. 99-105, mars 2016, doi: 10.1016/j.fitote.2015.12.006.
[129] Y. Zhang *et al.*, « Rearranged oleanane type saponins, astraisoolesaponins A1–A3 and B, from the stems of Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao », *Tetrahedron*, vol. 72, nº 44, p. 7008-7013, nov. 2016, doi: 10.1016/j.tet.2016.09.034.
[130] W. Zhang et D. G. Popovich, « Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy », *Molecules*, vol. 14, nº 8, Art. nº 8, août 2009, doi: 10.3390/molecules14082959.
[131] C. Guang, J. Chen, S. Sang, et S. Cheng, « Biological Functionality of Soyasaponins and Soyasapogenols », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, nº 33, p. 8247-8255, août 2014, doi: 10.1021/jf503047a.
[132] M. Wink, « Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine », *Current Drug Metabolism*, vol. 9, nº 10, p. 996-1009, déc. 2008, doi: 10.2174/138920008786927794.
[133] J. T. Salyer, « Effect of Soyasaponin Fractions on Human Colon Cancer Cells ».
[134] A. V. Rao et M. K. Sung, « Saponins as anticarcinogens », *J Nutr*, vol. 125, nº 3 Suppl, p. 717S-724S, mars 1995, doi: 10.1093/jn/125.3_Suppl.717S.
[135] S. Mk, K. Cw, K. Mm, et R. Av, « Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture », *Nutrition and cancer*, vol. 23, nº 3, 1995, doi: 10.1080/01635589509514380.
[136] A. A. Ellington, M. A. Berhow, et K. W. Singletary, « Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells », *Carcinogenesis*, vol. 27, nº 2, p. 298-306, févr. 2006, doi: 10.1093/carcin/bgi214.
[137] Y. J. Oh et M. K. Sung, « Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells », *Nutr Cancer*, vol. 39, nº 1, p. 132-138, 2001, doi: 10.1207/S15327914nc391_18.
[138] « L'extrait de saponine de soja brut antiprolifératif module l'expression d'IkappaBalpha, de la protéine kinase C et de la cyclooxygénase-2 dans les cellules cancéreuses du côlon humain - PubMed ». Consulté le: 8 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15172114/
[139] D. M. Gurfinkel et A. V. Rao, « Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity », *Nutr Cancer*, vol. 47, nº 1, p. 24-33, 2003, doi: 10.1207/s15327914nc4701_3.
[140] C.-Y. Tsai, Y.-H. Chen, Y.-W. Chien, W.-H. Huang, et S.-H. Lin, « Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells », *World J Gastroenterol*, vol. 16, nº 27, p. 3371-3376, juill. 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i27.3371.
[141] J. Hu, M. B. Reddy, S. Hendrich, et P. A. Murphy, « Soyasaponin I and Sapongenol B Have Limited Absorption by Caco-2 Intestinal Cells and Limited Bioavailability in Women », *The Journal of Nutrition*, vol. 134, nº 8, p. 1867-1873, août 2004, doi: 10.1093/jn/134.8.1867.
[142] R. S. MacDonald *et al.*, « Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer », *J Nutr*, vol. 135, nº 5, p. 1239-1242, mai 2005, doi: 10.1093/jn/135.5.1239.

[143] X. Xia *et al.*, « Anti-Colon Cancer Activity of Dietary Phytochemical Soyasaponin I and the Induction of Metabolic Shifts in HCT116 », *Molecules*, vol. 27, nº 14, p. 4382, juill. 2022, doi: 10.3390/molecules27144382.

[144] J.-X. Xiao, G.-Q. Huang, et S.-H. Zhang, « Soyasaponins inhibit the proliferation of Hela cells by inducing apoptosis », *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 59, nº 1, p. 35-42, sept. 2007, doi: 10.1016/j.etp.2007.02.004.

[145] W. Zhang et D. G. Popovich, « Effect of Soyasapogenol A and Soyasapogenol B Concentrated Extracts on Hep-G2 Cell Proliferation and Apoptosis », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, nº 8, p. 2603-2608, avr. 2008, doi: 10.1021/jf0731550.

[146] X. Li *et al.*, « A Review of Recent Research Progress on the Astragalus Genus », *Molecules*, vol. 19, nº 11, Art. nº 11, nov. 2014, doi: 10.3390/molecules191118850.

[147] J. M. Augustin, V. Kuzina, S. B. Andersen, et S. Bak, « Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins », *Phytochemistry*, vol. 72, nº 6, p. 435-457, avr. 2011, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015.

[148] Ö. Güçlü-Üstündağ et G. Mazza, « Saponins: Properties, Applications and Processing », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, nº 3, p. 231-258, mars 2007, doi: 10.1080/10408390600698197.

[149] S. M. Hassan, A. U. Haq, J. A. Byrd, M. A. Berhow, A. L. Cartwright, et C. A. Bailey, « Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal », *Food Chemistry*, vol. 119, nº 2, p. 600-605, mars 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.06.066.

[150] H. Sun, L. Chen, J. Wang, K. Wang, et J. Zhou, « Structure–function relationship of the saponins from the roots of Platycodon grandiflorum for hemolytic and adjuvant activity », *International Immunopharmacology*, vol. 11, nº 12, p. 2047-2056, déc. 2011, doi: 10.1016/j.intimp.2011.08.018.

[151] S. G. Sparg, M. E. Light, et J. van Staden, « Biological activities and distribution of plant saponins », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 94, nº 2, p. 219-243, oct. 2004, doi: 10.1016/j.jep.2004.05.016.

[152] T.-C. Cheng, J.-F. Lu, J.-S. Wang, L.-J. Lin, H.-I. Kuo, et B.-H. Chen, « Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, nº 20, p. 11319-11329, oct. 2011, doi: 10.1021/jf2018758.

[153] S. Man, W. Gao, Y. Zhang, L. Huang, et C. Liu, « Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents », *Fitoterapia*, vol. 81, nº 7, p. 703-714, oct. 2010, doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.004.

[154] A. Waheed, J. Barker, S. J. Barton, C. P. Owen, S. Ahmed, et M. A. Carew, « A novel steroidal saponin glycoside from Fagonia indica induces cell-selective apoptosis or necrosis in cancer cells », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 47, nº 2, p. 464-473, sept. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2012.07.004.

[155] K. W. Chan, N. M. H. Khong, S. Iqbal, et M. Ismail, « Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran », *Journal of Cereal Science*, vol. 57, nº 3, p. 480-485, mai 2013, doi: 10.1016/j.jcs.2013.02.002.

[156] I. Dini, G. C. Tenore, et A. Dini, « Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties », *Food Chemistry*, vol. 113, nº 2, p. 411-419, mars 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.053.

[157] J. Li *et al.*, « Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoceras sorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity », *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, nº 4, p. 637-643, oct. 2010, doi: 10.1016/j.ifset.2010.06.004.

[158] A. Estrada, G. S. Katselis, B. Laarveld, et B. Barl, « Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from Polygala senega L. », *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 23, nº 1, p. 27-43, janv. 2000, doi: 10.1016/S0147-9571(99)00020-X.

[159] Q. Wang *et al.*, « Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice », *Phytother Res*, vol. 24, nº 12, p. 1748-1754, déc. 2010, doi: 10.1002/ptr.3130.

[160] E.-H. Joh, I.-A. Lee, et D.-H. Kim, « Kalopanaxsaponins A and B isolated from Kalopanax pictus ameliorate memory deficits in mice », *Phytother Res*, vol. 26, nº 4, p. 546-551, avr. 2012, doi: 10.1002/ptr.3596.

[161] S.-W. Hong, H. Heo, J. Yang, M. Han, D.-H. Kim, et Y. K. Kwon, « Soyasaponin I improved neuroprotection and regeneration in memory deficient model rats », *PLoS One*, vol. 8, nº 12, p. e81556, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0081556.

[162] A. Shkondrov, I. Krasteva, F. Bucar, O. Kunert, M. Kondeva-Burdina, et I. Ionkova, « A new tetracyclic saponin from Astragalus glycyphyllos L. and its neuroprotective and hMAO-B inhibiting activity », *Natural Product Research*, vol. 34, nº 4, p. 511-517, févr. 2020, doi: 10.1080/14786419.2018.1491040.

[163] M. Kondeva-Burdina, I. Krasteva, G. Popov, et V. Manov, « Neuroprotective and antioxidant activities of saponins' mixture from Astragalus glycyphylloides in a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on isolated rat brain synaptosomes », *Pharmacia*, vol. 66(4), p. 233-236, déc. 2019, doi: 10.3897/pharmacia.66.e37997.

[164] S. Samaddar, « OLEANANE-TYPE TRITERPENOID SAPONIN OF MOMORDICA CYMBALARIA EXHIBITS NEUROPROTECTIVE ACTIVITY IN DIABETIC PERIPHERAL NEUROPATHY BY AFFECTING THE POLYOL PATHWAY », *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 7, p. 618-625, févr. 2016, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(2).618-25.

[165] Y.-H. Qian, Y. Liu, H.-T. Hu, H.-M. Ren, X.-L. Chen, et J.-H. Xu, « The effects of the total saponin of Dipsacus asperoides on the damage of cultured neurons induced by beta-amyloid protein 25-35 », *Anat Sci Int*, vol. 77, nº 3, p. 196-200, sept. 2002, doi: 10.1046/j.0022-7722.2002.00029.x.

[166] M. I. Khan *et al.*, « Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Isolated Saponin Due to the Amelioration of Tauopathy and Alleviation of Neuroinflammation: A Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease », *Molecules*, vol. 27, nº 7, Art. nº 7, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27072079.

[167] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, et H. Gruppen, « Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom », *Phytochemistry*, vol. 68, nº 3, p. 275-297, févr. 2007, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008.

[168] I. Dineva, I. Krasteva, M. Berger, et S. Konstantinov, « In vitro antineoplastic activity of some cytoreductive drugs versus new compounds of plant origin », *International Journal of Current Chemistry*, vol. 1, nº 4, p. 281-290, 2010.

[169] L. Verotta *et al.*, « Cycloartane and Oleanane Saponins from Egyptian Astragalus spp. as Modulators of Lymphocyte Proliferation », *Planta medica*, vol. 68, p. 986-94, déc. 2002, doi: 10.1055/s-2002-35654.

[170] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, et R. Sulaiman, « Extraction and quantification of saponins: A review », *Food Research International*, vol. 59, p. 16-40, mai 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.

[171] J. Azmir *et al.*, « Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review », *Journal of Food Engineering*, vol. 117, nº 4, p. 426-436, août 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.

[172] L. Wang et C. L. Weller, « Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 17, nº 6, p. 300-312, juin 2006, doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.

[173] M. Y. Heng, S. N. Tan, J. W. H. Yong, et E. S. Ong, « Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 50, p. 1-10, oct. 2013, doi: 10.1016/j.trac.2013.03.012.

[174] C. P. Trentini, D. M. Oliveira, C. M. Zanette, et C. da Silva, « Low-pressure solvent extraction of oil from macauba (Acrocomia aculeata) pulp: characterization of oil and defatted meal », *Cienc. Rural*, vol. 46, nº 4, p. 725-731, janv. 2016, doi: 10.1590/0103-8478cr20150740.

[175] C. Reichardt et T. Welton, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, 2010.

[176] T.-C. Cheng, J.-F. Lu, J.-S. Wang, L.-J. Lin, H.-I. Kuo, et B.-H. Chen, « Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from Gynostemma pentaphyllum », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, nº 20, p. 11319-11329, oct. 2011, doi: 10.1021/jf2018758.

[177] S. T. Lee, R. B. Mitchell, Z. Wang, C. Heiss, D. R. Gardner, et P. Azadi, « Isolation, Characterization, and Quantification of Steroidal Saponins in Switchgrass (Panicum virgatum L.) », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, nº 6, p. 2599-2604, mars 2009, doi: 10.1021/jf803907y.

[178] S. G. Verza *et al.*, « Immunoadjuvant Activity, Toxicity Assays, and Determination by UPLC/Q-TOF-MS of Triterpenic Saponins from Chenopodium quinoa Seeds », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, nº 12, p. 3113-3118, mars 2012, doi: 10.1021/jf205010c.

[179] H.-J. Bart, « Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction », in *Industrial Scale Natural Products Extraction*, John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-25. doi: 10.1002/9783527635122.ch1.

[180] « Appareil de soxhlet animation », Appareil de soxhlet animation. Consulté le: 17 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://chariotelevateur.blogspot.com/2017/09/appareil-de-soxhlet-animation.html

[181] Z. Bialy, M. Jurzysta, M. Mella, et A. Tava, « Triterpene Saponins from Aerial Parts of Medicago arabica L. », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, nº 5, p. 1095-1099, mars 2004, doi: 10.1021/jf030446+.

[182] Z. Bialy, M. Jurzysta, M. Mella, et A. Tava, « Triterpene Saponins from the Roots of Medicago hybrida », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, nº 7, p. 2520-2526, avr. 2006, doi: 10.1021/jf0581628.

[183] B. Ncube, V. N. P. Ngunge, J. F. Finnie, et J. Van Staden, « A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated Tulbaghia violacea Harv. plants », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 134, nº 3, p. 775-780, avr. 2011, doi: 10.1016/j.jep.2011.01.039.

[184] A. C. Soria et M. Villamiel, « Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, nº 7, p. 323-331, juill. 2010, doi: 10.1016/j.tifs.2010.04.003.

[185] « PII: S1350-4177(01)00071-2 | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1350417701000712?token=CAC7D3779267118ABC1E068BC67DDE8864DCE344811889D917C3D330E91586FB31F48B814465AF85D91C466FACE698BC&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010130535

[186] « doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014 | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1466856407001245?token=7811F43BFF4DD89CE216078ED918BB7DEEA60B55C5735B1B67E2B336F743AB7C37A5570752BF2F411BB1323FCE1BF845&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010130850

[187] « Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (Garcinia mangostana Linn.) hull using ultrasonic treatments | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0926669013003610?token=C05A6F9C8369B4E9B762D3FB748E1F6996D8DAF6AFE44CAEE637EC9742AB749A3C00E236A325AA4DAF543815B7D498F9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010131359

[188] « Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0260877409000703?token=8F745838CA72B691BF5F40BD24157D8030569559553679808C6C4CB262A3AD7A025E797AAAA6AACAB1F9D3BAA1B6DFA2&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010131425

[189] H.-F. Zhang, X.-H. Yang, et Y. Wang, « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, nº 12, p. 672-688, déc. 2011, doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.003.

[190] T. Takeuchi, C. G. Pereira, M. E. Braga, M. R. Maróstica, P. F. Leal, et M. A. Meireles, « Low-Pressure Solvent Extraction (Solid,ÄìLiquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants », *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*, p. 137-218, déc. 2008, doi: 10.1201/9781420062397.ch4.

[191] W. Routray et V. Orsat, « Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review », *Food Bioprocess Technol*, vol. 5, nº 2, p. 409-424, févr. 2012, doi: 10.1007/s11947-011-0573-z.

[192] Ö. Güçlü-Üstündağ et G. Mazza, « Saponins: Properties, Applications and Processing », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, nº 3, p. 231-258, mars 2007, doi: 10.1080/10408390600698197.

[193] « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S092422441100149X?token=855C6CBBDA8B765C1DBA5C8609A6D880DBC8DAF49F449F1694DCD10DFFD11CD07A7FE7CAC5B687AB1B9F6DEF69B19F71&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010132634

[194] « Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0003267011009597?token=9F5355FAE497AF0

25242D20A79A3BF0974D31BBDF0AB3BB50258F986108EB680988D25791952DD11B5835591A87FF127&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010133840

[195] « Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation | SpringerLink ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-624-1_4

[196] « Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed | Elsevier Enhanced Reader ». Consulté le: 10 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021967312003871?token=885F72398B151D0B29261F7BB1187D1992674B22C1E05B28AEAF21A6C9AF520541B7193C1499B12B15DA07B84E591A64&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211010134345

[197] Z. M. Qian, J. Lu, Q. P. Gao, et S. P. Li, « Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium Ginseng and Radix Ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, nº 18, p. 3825-3830, mai 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.02.065.

[198] J. Wan, Q. Zhang, W. Ye, et Y. Wang, « Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from Panax notoginseng with macroporous resins », *Separation and Purification Technology*, vol. 60, nº 2, p. 198-205, avr. 2008, doi: 10.1016/j.seppur.2007.08.007.

[199] J. B. Wan, C. M. Lai, S. P. Li, M. Y. Lee, L. Y. Kong, et Y. T. Wang, « Simultaneous determination of nine saponins from Panax notoginseng using HPLC and pressurized liquid extraction », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, nº 1, p. 274-279, avr. 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2005.10.023.

[200] B. Avula, Y.-H. Wang, C. S. Rumalla, Z. Ali, T. J. Smillie, et I. A. Khan, « Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of Caulophyllum thalictroides (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, nº 5, p. 895-903, déc. 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.07.028.

[201] R. M. Borges, S. S. Valença, A. A. Lopes, N. dos S. Barbi, et A. J. R. da Silva, « Saponins from the roots of Chiococca alba and their in vitro anti-inflammatory activity », *Phytochemistry Letters*, vol. 6, nº 1, p. 96-100, févr. 2013, doi: 10.1016/j.phytol.2012.11.006.

[202] M. Ganzera, J. Gampenrieder, R. S. Pawar, I. A. Khan, et H. Stuppner, « Separation of the major triterpenoid saponins in Bacopa monnieri by high-performance liquid chromatography », *Analytica Chimica Acta*, vol. 516, nº 1-2, p. 149-154, juill. 2004, doi: 10.1016/j.aca.2004.04.002.

[203] Y. W. Ha, Y.-C. Na, J.-J. Seo, S.-N. Kim, R. J. Linhardt, et Y. S. Kim, « Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in Platycodi Radix by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1135, nº 1, p. 27-35, nov. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.015.

[204] X.-Y. Lian et Z. Zhang, « Quantitive analysis of gleditsia saponins in the fruits of Gleditsia sinensis Lam. by high performance liquid chromatography », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 75, p. 41-46, mars 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.007.

[205] T. Zhang, H. Liu, X.-T. Liu, D. Xu, X. Chen, et Q. Wang, « Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from Paris polyphylla var. yunnanensis and P. polyphylla var. chinensis by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, nº 1, p. 114-124, janv. 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2009.08.020.

[206] A.-J. Lau, S.-O. Woo, et H.-L. Koh, « Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection », *Journal of Chromatography A*, vol. 1011, nº 1-2, p. 77-87, sept. 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)01135-X.

[207] N. Boutaghane, L. Voutquenne-Nazabadioko, D. Harakat, A. Simon, et Z. Kabouche, « Triterpene saponins of Genista ulicina Spach », *Phytochemistry*, vol. 93, p. 176-181, sept. 2013, doi: 10.1016/j.phytochem.2013.03.020.

[208] T. Zheng, G. Shu, Z. Yang, S. Mo, Y. Zhao, et Z. Mei, « Antidiabetic effect of total saponins from Entada phaseoloides (L.) Merr. in type 2 diabetic rats », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, nº 3, p. 814-821, févr. 2012, doi: 10.1016/j.jep.2011.12.025.

[209] T. J. Ha *et al.*, « Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean Leguminous species using ultra performance liquid chromatography with

photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC–PDA–ESI/MS) analysis », *Food Chemistry*, vol. 146, p. 270-277, mars 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.051.

[210] H. He *et al.*, « Cardioprotective effects of saponins from Panax japonicus on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 140, nº 1, p. 73-82, mars 2012, doi: 10.1016/j.jep.2011.12.024.

[211] J.-C. Chen *et al.*, « Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from Momordica charantia », *Phytochemistry*, vol. 70, nº 1, p. 133-140, janv. 2009, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.10.011.

[212] L. Bi, X. Tian, F. Dou, L. Hong, H. Tang, et S. Wang, « New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of Aralia taibaiensis », *Fitoterapia*, vol. 83, nº 1, p. 234-240, janv. 2012, doi: 10.1016/j.fitote.2011.11.002.

[213] W. A. Oleszek, « Composition and Quantitation of Saponins in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Seedlings », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, nº 3, p. 960-962, mars 1998, doi: 10.1021/jf970766r.

[214] I. Horo, E. Bedir, M. Masullo, S. Piacente, F. Özgökçe, et Ö. Alankuş-Çalışkan, « Saponins from Astragalus hareftae (NAB.) SIRJ. », *Phytochemistry*, vol. 84, p. 147-153, déc. 2012, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.015.

[215] J. Linnek, A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, O. Duchamp, J.-F. Mirjolet, et M.-A. Lacaille-Dubois, « Cycloartane-type Glycosides from Two Species of *Astragalus* (Fabaceae) », *Natural Product Communications*, vol. 4, nº 4, p. 1934578X0900400, avr. 2009, doi: 10.1177/1934578X0900400406.

[216] L. Maamria, C. Long, H. Haba, C. Lavaud, A. Cannac, et M. Benkhaled, « Cycloartane glycosides from Astragalus gombo », *Phytochemistry Letters*, vol. 11, p. 286-291, mars 2015, doi: 10.1016/j.phytol.2015.01.014.

[217] V. U. Ahmad, F. V. Mohammad, et R. B. Tareen, « Laceioside, a new cycloartane saponin from *Astragalus tephrosioides* Boiss. var. *lacei* (Ali) Kirchoff. », *Natural Product Research*, vol. 33, nº 3, p. 393-399, févr. 2019, doi: 10.1080/14786419.2018.1455042.

[218] M. Hirotani, Y. Zhou, H. Lui, et T. Furuya, « Astragalosides from hairy root cultures of Astragalus membranaceus », *Phytochemistry*, vol. 36, nº 3, p. 665-670, juin 1994, doi: 10.1016/S0031-9422(00)89793-9.

[219] F. Fathiazad, M. K. Khosropanah, et A. Movafeghi, « Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb. », *Natural Product Research*, vol. 24, nº 11, p. 1069-1078, juill. 2010, doi: 10.1080/14786410902975582.

[220] L. Pistelli, I. Giachi, E. Lepori, et A. Bertoli, « Further Saponins and Flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris », *Pharmaceutical Biology*, vol. 41, nº 8, p. 568-572, janv. 2003, doi: 10.1080/13880200390501370.

[221] H. Li, Y. Zhao, W. Yang, et Z. Zhang, « Characterization of astragaloside I-IV based on the separation of HPTLC from Pleurotus ostreatus cultivated with Astragalus », *J Food Sci*, vol. 85, nº 10, p. 3183-3190, oct. 2020, doi: 10.1111/1750-3841.15398.

[222] C. Chu *et al.*, « Characterization of novel astragaloside malonates from Radix Astragali by HPLC with ESI quadrupole TOF MS », *Journal of Separation Science*, vol. 33, nº 4-5, p. 570-581, 2010, doi: 10.1002/jssc.200900687.

[223] X. Q. Ma, Q. Shi, J. A. Duan, T. T. X. Dong, et K. W. K. Tsim, « Chemical Analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: A Comparison with Its Adulterants and Seasonal Variations », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, nº 17, p. 4861-4866, août 2002, doi: 10.1021/jf0202279.

[224] « Full article: Effect of astragaloside on cardiomyocyte apoptosis in murine coxsackievirus B3 myocarditis ». Consulté le: 23 août 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020412331286506

[225] « Astragalus membranaceus : examen de sa protection contre l'inflammation et les cancers gastro-intestinaux | Le Journal américain de médecine chinoise ». Consulté le: 23 août 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X16500014

[226] I. Horo, E. Bedir, M. Masullo, S. Piacente, F. Özgökçe, et Ö. Alankuş-Çalışkan, « Saponins from Astragalus hareftae (NAB.) SIRJ. », *Phytochemistry*, vol. 84, p. 147-153, déc. 2012, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.015.

[227] A. Shkondrov *et al.*, « Production of saponins from in vitro cultures of Astragalus glycyphyllos and their antineoplastic activity », *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 33, nº 1, p. 1413-1418, janv. 2019, doi: 10.1080/13102818.2019.1671222.

[228] Q. T. Yu, P. Li, Z. M. Bi, J. Luo, et X. D. Gao, « Two new saponins from the aerial part of Astragalus membranaceus var. mongholicus », *Chinese Chemical Letters*, vol. 18, nº 5, p. 554-556, mai 2007, doi: 10.1016/j.cclet.2007.03.025.

[229] E. Graf, « Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Von W. Tang und G. Eisenbrand. Springer-Verlag Berlin etc. 1992, X, 1056, S., 41 Abb. gebd. DM 248,00 », *Pharmazie in unserer Zeit*, vol. 21, nº 6, p. 281-281, 1992, doi: 10.1002/pauz.19920210612.

[230] K. Guo *et al.*, « Cycloartane-type triterpenoids from Astragalus hoantchy French. », *Natural Product Research*, vol. 31, nº 3, p. 314-319, févr. 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1236100.

[231] M. Mitcheva, M. Kondeva-Burdina, V. Vitcheva, I. Krasteva, et S. Nikolov, « Effect of Purified Saponin Mixture from Astragalus corniculatus on Toxicity Models in Isolated Rat Hepatocytes », *Pharmaceutical Biology*, vol. 46, nº 12, p. 866-870, janv. 2008, doi: 10.1080/13880200802367247.

[232] K. Nafti, G. Giacinti, S. Marghali, et C. D. Raynaud, « Screening for Astragalus hamosus Triterpenoid Saponins Using HPTLC Methods: Prior Identification of Azukisaponin Isomers », *Molecules*, vol. 27, nº 17, Art. nº 17, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27175376.

[233] M. F. Striegel et J. Hill, *Thin-layer chromatography for binding media analysis*. in Scientific tools for conservation. Los Angeles: Getty Conservation Institute, 1996.

[234] « Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry S. Mitra, ed., John Wiley & Sons, 2003, 488 pp., hard cover | Sigma-Aldrich ». Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://www.sigmaaldrich.com/

[235] « The Book Corner », *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, vol. 28, nº 2, p. 169-172, avr. 2007, doi: 10.1080/15321810701212104.

[236] E. Hahn-Deinstrop, *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*, 1re éd. Wiley, 2006. doi: 10.1002/9783527610259.

[237] T. Do, « Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels », 2016.

[238] « Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach », Routledge & CRC Press. Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.routledge.com/Practical-Thin-Layer-Chromatography-A-Multidisciplinary-Approach/Fried-Sherma/p/book/9780849326608

[239] C. F. Poole, H. T. Butler, M. E. Coddens, et S. A. Schuette, « Instrumental Evaluation of Thin-Layer Chromatograms », in *Analytical and Chromatographic Techniques in Radiopharmaceutical Chemistry*, D. M. Wieland, M. C. Tobes, et T. J. Manger, Éd., New York, NY: Springer, 1986, p. 3-37. doi: 10.1007/978-1-4612-4854-5_1.

[240] « Système HPTLC Vario System », VWR. Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://ch.vwr.com/store/product/fr/2103197/systeme-hptlc-vario-system

[241] « 9788123918372: High Performance Thin Layer Chromatography In Food Analysis (Hb) - AbeBooks - Jaiswal: 8123918372 ». Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.abebooks.com/9788123918372/High-Performance-Thin-Layer-Chromatography-8123918372/plp

[242] P. E. Wall, *Thin-Layer Chromatography*. 2005. doi: 10.1039/9781847552464.

[243] M. F. Chaplin et J. F. Kennedy, *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Oxford; Washington, DC: IRL Press, 1986.

[244] « CAMAG® AMD 2 System Automated Multiple Development ». Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.camag.com/product/camag-amd-2-system-automated-multiple-development

[245] « Application Notes ». Consulté le: 14 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.camag.com/applications/application-Notes

[246] « Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach By Peter E. Wall. Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2005. x + 184 pp. £69.95. ISBN: 0-85404-535-x. », *Org. Process Res. Dev.*, vol. 10, nº 4, p. 849-849, juill. 2006, doi: 10.1021/op0600658.

[247] « Sherma 2003- Handbook of Thin Layer Chromatography - DocShare.tips ». Consulté le: 15 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://docshare.tips/sherma-2003-handbook-of-thin-layer-chromatography_58b46fffb6d87fc13f8b4b31.html

[248] « HPTLC Method Development and Validation | PDF », Scribd. Consulté le: 15 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.scribd.com/doc/213938657/hptlc-method-development-and-validation

[249] « Chromatographic Methods 5th Edition (A. Braithwaite & F. J. Smith) - LIVRO EM INGLÊS - Docsity ». Consulté le: 15 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.docsity.com/pt/chromatographic-methods-5th-edition-a-braithwaite-f-j-smith/4749720/

[250] H. Wagner et S. Bladt, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media, 1996.

[251] D. H. C. Andola, « High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical tool for Biological Analysis », p. 4.

[252] M. Srivastava, Éd., *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-14025-9.

[253] « Handbook of Analytical Derivatization Reactions | Wiley », Wiley.com. Consulté le: 15 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Analytical+Derivatization+Reactions-p-9780471034698

[254] « 1: généralités; 2: l évaluation par l opérateur; 3: l analyse d image; 4: la densitométrie en absorbance et en fluorescence; 5: la conclusion. - PDF Free Download ». Consulté le: 15 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://docplayer.fr/1726040-1-generalites-2-l-evaluation-par-l-operateur-3-l-analyse-d-image-4-la-densitometrie-en-absorbance-et-en-fluorescence-5-la-conclusion.html

[255] B. Khakimov, L. Tseng, M. Godejohann, S. Bak, et S. Engelsen, « Screening for Triterpenoid Saponins in Plants Using Hyphenated Analytical Platforms », *Molecules*, vol. 21, nº 12, p. 1614, nov. 2016, doi: 10.3390/molecules21121614.

[256] N. Kambouche, B. Merah, A. Derdour, S. Bellahouel, C. Younos, et R. Soulimani, « Activité antihyperglycémiante d'un stérol β-sitoglucoside isolé de la plante Anabasis articulata (Forssk) Moq », *Phytothérapie*, vol. 9, nº 1, p. 2-6, févr. 2011, doi: 10.1007/s10298-010-0603-4.

[257] S. Hiai, H. Oura, et T. Nakajima, « COLOR REACTION OF SOME SAPOGENINS AND SAPONINS WITH VANILLIN AND SULFUR1C ACID », *Planta Med*, vol. 29, nº 02, p. 116-122, mars 1976, doi: 10.1055/s-0028-1097639.

[258] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, et C. Berset, « Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity », *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, nº 1, p. 25-30, janv. 1995, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

[259] I. K. Rhee, M. van de Meent, K. Ingkaninan, et R. Verpoorte, « Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining », *Journal of Chromatography A*, vol. 915, nº 1, p. 217-223, avr. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00624-0.

[260] J. W. Tan et M. K. Kim, « Neuroprotective Effects of Biochanin A against β-Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via a Mitochondrial-Dependent Apoptosis Pathway », *Molecules*, vol. 21, nº 5, Art. nº 5, mai 2016, doi: 10.3390/molecules21050548.

[261] B. A. Yankner, L. R. Dawes, S. Fisher, L. Villa-Komaroff, M. L. Oster-Granite, et R. L. Neve, « Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease », *Science*, vol. 245, nº 4916, p. 417-420, juill. 1989, doi: 10.1126/science.2474201.

[262] T. Mosmann, « Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays », *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, nº 1, p. 55-63, déc. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[263] A. Zoghlami et M. Zouaghi, « Morphological variation in *Astragalus hamosus* L. and *Coronilla scorpioides* L. populations of Tunisia », *Euphytica*, vol. 134, nº 2, p. 137-147, 2003, doi: 10.1023/B:EUPH.0000003881.85977.10.

[264] A. Hakim, Tajuddin, A. Ghufran, et J. Nasreen, « Evaluation of anti-inflammatory activity of the pods of Iklil-ul-Malik (Astragalus hamosus Linn.) », *undefined*, 2010, Consulté le: 25 octobre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-anti-inflammatory-activity-of-the-of-Hakim-Tajuddin/5d16b0f0b17b4e9389b7a7ea59e529ee2efffcbd

[265] A. Shojaii, M. Motaghinejad, S. Norouzi, et M. Motevalian, « Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of the Extract and Fractions of Astragalus hamosus in Animal Models », *Iran J Pharm Res*, vol. 14, nº 1, p. 263-269, 2015.

[266] A. Shkondrov et I. Krasteva, « Liquid chromatography – high resolution mass spectrometry screening of Astragalus hamosus and Astragalus corniculatus », *PHAR*, vol. 68, nº 1, p. 135-139, janv. 2021, doi: 10.3897/pharmacia.68.e60621.

[267] A. Hamedi, M. M. Zarshenas, et M. Sohrabpour, « Phytochemical assessments of Astragalus hamosus pods (Iklil-ul-Malik) », *Trends in Pharmaceutical Sciences*, vol. 2, p. 77-84, mars 2016.

[268] « Activités biologiques et distribution des saponines végétales - ScienceDirect ». Consulté le: 27 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002557

[269] A. Osbourn, R. J. M. Goss, et R. A. Field, « The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities », *Nat Prod Rep*, vol. 28, nº 7, p. 1261-1268, juill. 2011, doi: 10.1039/c1np00015b.

[270] M. Ligor, A. Kiełbasa, I.-A. Ratiu, et B. Buszewski, « Separation and Quantification of Selected Sapogenins Extracted from Nettle, White Dead-Nettle, Common Soapwort and Washnut », *Molecules*, vol. 26, nº 24, Art. nº 24, janv. 2021, doi: 10.3390/molecules26247705.

[271] A. Estrada, G. S. Katselis, B. Laarveld, et B. Barl, « Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from Polygala senega L. », *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 23, nº 1, p. 27-43, janv. 2000, doi: 10.1016/S0147-9571(99)00020-X.

[272] R. R. T. Majinda, « Extraction and Isolation of Saponins », in *Natural Products Isolation*, S. D. Sarker et L. Nahar, Éd., in Methods in Molecular Biology. , Totowa, NJ: Humana Press, 2012, p. 415-426. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1_16.

[273] W. Oleszek et Z. Bialy, « Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005) », *Journal of Chromatography A*, vol. 1112, nº 1, p. 78-91, avr. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.037.

[274] D. V. Huhman, M. A. Berhow, et L. W. Sumner, « Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of Medicago truncatula », *J Agric Food Chem*, vol. 53, nº 6, p. 1914-1920, mars 2005, doi: 10.1021/jf0482663.

[275] « Separations | Free Full-Text | Recent Advances in Separation and Analysis of Saponins in Natural Products ». Consulté le: 27 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.mdpi.com/2297-8739/9/7/163

[276] E. Shawky et S. M. Sallam, « Simultaneous Determination of Soyasaponins and Isoflavones in Soy (Glycine max L.) Products by HPTLC-densitometry-Multiple Detection », *Journal of Chromatographic Science*, vol. 55, nº 10, p. 1059-1065, nov. 2017, doi: 10.1093/chromsci/bmx062.

[277] R. Gaceb-Terrak et F. Rahmania, « Détection et identification de saponines stéroïdes de type spirostane chez le palmier dattier *Phœnix dactylifera* L. (Arecaceae) », *Acta Botanica Gallica*, vol. 159, nº 4, p. 477-483, déc. 2012, doi: 10.1080/12538078.2012.758496.

[278] X. Q. Ma, Q. Shi, J. A. Duan, T. T. X. Dong, et K. W. K. Tsim, « Chemical Analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: A Comparison with Its Adulterants and Seasonal Variations », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, nº 17, p. 4861-4866, août 2002, doi: 10.1021/jf0202279.

[279] G. Giacinti, C. Raynaud, S. Capblancq, et V. Simon, « Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1483, p. 8-19, févr. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2016.12.056.

[280] P. Kaltbach, « New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (Ilex paraguariensis) tea », *Journal of Food Composition and Analysis*, p. 11, 2020.

[281] T. Mad, H. Sterk, M. Mittelbach, et G. N. Rechberger, « Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of Chenopodium quinoa », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, nº 6, p. 795-806, juin 2006, doi: 10.1016/j.jasms.2006.02.013.

[282] M. A. da Silva, V. Calabrese, J. Schmitt, D. Celebi, J. L. Scott, et K. J. Edler, « Alcohol induced gelation of TEMPO-oxidized cellulose nanofibril dispersions », *Soft Matter*, vol. 14, nº 45, p. 9243-9249, nov. 2018, doi: 10.1039/C8SM01815D.

[283] L. Filipe-Ribeiro, J. Milheiro, C. C. Matos, F. Cosme, et F. M. Nunes, « Data on changes in red wine phenolic compounds, headspace aroma compounds and sensory profile after treatment of red wines with activated carbons with different physicochemical characteristics », *Data in Brief*, vol. 12, p. 188-202, juin 2017, doi: 10.1016/j.dib.2017.03.055.

[284] M. Masomian, R. Rahman, et A. Salleh, « A Novel Method of Affinity Tag Cleavage in the Purification of a Recombinant Thermostable Lipase from Aneurinibacillus thermoaerophilus Strain HZ », *Catalysts*, vol. 8, p. 479, oct. 2018, doi: 10.3390/catal8100479.

[285] R. L. Munier et A. M. Drapier, « Nouvelles méthodes de séparation et comportement des alcaloides en chromatographie en milieux tres polaires, neutres ou acides, sur gel de silice non modifié (1ère partie) », *Chromatographia*, vol. 10, nº 5, p. 226-232, mai 1977, doi: 10.1007/BF02274471.

[286] R. MUNIER et D. AM, « NOUVELLES METHODES DE SEPARATION ET COMPORTEMENT DES ALCALOIDES EN CHROMATOGRAPHIE EN MILIEUX TRES POLAIRES, NEUTRES OU ACIDES, SUR GEL DE SILICE NON MODIFIE. II. », *NOUVELLES METHODES DE SEPARATION ET COMPORTEMENT DES ALCALOIDES EN CHROMATOGRAPHIE EN MILIEUX TRES POLAIRES, NEUTRES OU ACIDES, SUR GEL DE SILICE NON MODIFIE. II.*, 1977.

[287] H. T. Nguyen *et al.*, « Evaluation of the Saponin Content in Panax vietnamensis Acclimatized to Lam Dong Province by HPLC–UV/CAD », *Molecules*, vol. 26, nº 17, p. 5373, sept. 2021, doi: 10.3390/molecules26175373.

[288] G. G. Jiménez, A. G. Durán, F. A. Macías, et A. M. Simonet, « Structure, Bioactivity and Analytical Methods for the Determination of Yucca Saponins », *Molecules*, vol. 26, nº 17, p. 5251, août 2021, doi: 10.3390/molecules26175251.

[289] N. A. Andriamasinoro, « Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques », p. 176.

[290] S.-M. Lee, J.-S. Jeong, H.-J. Kwon, et S.-P. Hong, « Quantification of isoflavonoids and triterpene saponins in Astragali Radix, the root of Astragalus membranaceus, via reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled with integrated pulsed amperometric detection », *Journal of Chromatography B*, vol. 1070, p. 76-81, déc. 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.046.

[291] R. Arumugam, B. Kirkan, et C. Sarikurkcu, « Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of Astragalus ponticus Pall. », *South African Journal of Botany*, vol. 120, p. 268-273, janv. 2019, doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.002.

[292] C. Sarikurkcu et G. Zengin, « Polyphenol Profile and Biological Activity Comparisons of Different Parts of Astragalus macrocephalus subsp. finitimus from Turkey », *Biology (Basel)*, vol. 9, nº 8, p. 231, août 2020, doi: 10.3390/biology9080231.

[293] O. Babich, A. Prosekov, A. Zaushintsena, A. Sukhikh, L. Dyshlyuk, et S. Ivanova, « Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia Astragalus danicus in different regions », *Heliyon*, vol. 5, nº 8, p. e02245, août 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02245.

[294] Z. Sheng, Y. Jiang, J. Liu, et B. Yang, « UHPLC–MS/MS Analysis on Flavonoids Composition in Astragalus membranaceus and Their Antioxidant Activity », *Antioxidants*, vol. 10, nº 11, Art. nº 11, nov. 2021, doi: 10.3390/antiox10111852.

[295] A. ADIGÜZEL, M. SÖKMEN, H. ÖZKAN, G. AĞAR, M. GÜLLÜCE, et F. ŞAHİN, « In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Methanol and Hexane Extract of Astragalus Species Growing in the Eastern Anatolia Region of Turkey », *Turkish Journal of Biology*, vol. 33, nº 1, p. 65-71, janv. 2009, doi: 10.3906/biy-0805-1.

[296] H. Teyeb *et al.*, « Biological and Chemical Study of Astragalus gombiformis », *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 67, nº 7-8, p. 367-374, août 2012, doi: 10.1515/znc-2012-7-803.

[297] S. Benferdia *et al.*, « Phytochemical composition and antioxidant activity of Algerian Astragalus gombo stems », p. 6.

[298] H. Wu *et al.*, « Quality Evaluation of Astragali Radix based on DPPH Radical Scavenging Activity and Chemical Analysis », *Chinese Herbal Medicines*, vol. 6, nº 4, p. 282-289, nov. 2014, doi: 10.1016/S1674-6384(14)60043-5.

[299] A. Labed *et al.*, « Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities », *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, nº 12, p. 3026-3032, déc. 2016, doi: 10.1080/13880209.2016.1200632.

[300] M. P. de Torre, R. Y. Cavero, et M. I. Calvo, « Anticholinesterase Activity of Selected Medicinal Plants from Navarra Region of Spain and a Detailed Phytochemical Investigation of Origanum vulgare L. ssp. vulgare », *Molecules*, vol. 27, nº 20, Art. nº 20, janv. 2022, doi: 10.3390/molecules27207100.

[301] « fphar-09-01192-t001.jpg (1156×6421) ». Consulté le: 1 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/files/Articles/387238/fphar-09-01192-HTML/image_m/fphar-09-01192-t001.jpg

[302] H. Teyeb, H. Mabrouk, M. Neffati, W. Douki, et M. F. Najjar, « Anticholinesterase Activity of *Astragalus gombiformis* Extracts », *Journal of Biologically Active Products from Nature*, vol. 1, nº 5-6, p. 344-348, janv. 2011, doi: 10.1080/22311866.2011.10719103.

[303] S. Lekmine *et al.*, « Ultrasound-Assisted Extraction, LC–MS/MS Analysis, Anticholinesterase, and Antioxidant Activities of Valuable Natural Metabolites from Astragalus armatus Willd.: In Silico Molecular Docking and In Vitro Enzymatic Studies », *Antioxidants*, vol. 11, nº 10, p. 2000.

[304] M. Wink, « Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine ». Consulté le: 13 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2008/00000009/00000010/art00002

[305] T. L. Riss *et al.*, « Cell Viability Assays », in *Assay Guidance Manual [Internet]*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Consulté le: 17 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/

[306] « Culture_cellules_animales.pdf ». Consulté le: 17 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: http://eric.vinas.free.fr/IMG/pdf/Culture_cellules_animales.pdf

[307] E. Fournier, L. Etienne-Mesmin, S. Blanquet-Diot, et M. Mercier-Bonin, « Microplastiques dans notre alimentation: un focus sur la santé intestinale », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 57, nº 4, p. 270-283, août 2022, doi: 10.1016/j.cnd.2022.03.001.

[308] J. Keemink et C. A. S. Bergström, « Caco-2 Cell Conditions Enabling Studies of Drug Absorption from Digestible Lipid-Based Formulations », *Pharm Res*, vol. 35, nº 4, p. 74, févr. 2018, doi: 10.1007/s11095-017-2327-8.

[309] S. Sadeghi Ekbatan *et al.*, « Absorption and Metabolism of Phenolics from Digests of Polyphenol-Rich Potato Extracts Using the Caco-2/HepG2 Co-Culture System », *Foods*, vol. 7, nº 1, Art. nº 1, janv. 2018, doi: 10.3390/foods7010008.

[310] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, et F. L. Graham, « Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells », *The FASEB Journal*, vol. 16, nº 8, p. 869-871, 2002, doi: 10.1096/fj.01-0995fje.

[311] L. Abaandou, D. Quan, et J. Shiloach, « Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes », *Cells*, vol. 10, nº 7, Art. nº 7, juill. 2021, doi: 10.3390/cells10071667.

[312] M. I. Khan *et al.*, « Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Isolated Saponin Due to the Amelioration of Tauopathy and Alleviation of Neuroinflammation: A Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease », *Molecules*, vol. 27, nº 7, p. 2079, mars 2022, doi: 10.3390/molecules27072079.

[313] Y.-Q. Zhou, Z.-L. Yang, L. Xu, P. Li, et Y.-Z. Hu, « Akebia saponin D, a saponin component from Dipsacus asper Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity », *Cell Biol Int*, vol. 33, nº 10, p. 1102-1110, oct. 2009, doi: 10.1016/j.cellbi.2009.06.028.

[314] K. K. L. Kwan, H. Yun, T. T. X. Dong, et K. W. K. Tsim, « Ginsenosides attenuate bioenergetics and morphology of mitochondria in cultured PC12 cells under the insult of amyloid beta-peptide », *J Ginseng Res*, vol. 45, nº 4, p. 473-481, juill. 2021, doi: 10.1016/j.jgr.2020.09.005.

[315] R. Yue *et al.*, « Astragaloside IV Attenuates Glutamate-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells through Raf-MEK-ERK Pathway », *PLOS ONE*, vol. 10, p. e0126603, mai 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126603.

[316] T. J. Makhafola *et al.*, « Apoptosis in Cancer Cells Is Induced by Alternative Splicing of hnRNPA2/B1 Through Splicing of Bcl-x, a Mechanism that Can Be Stimulated by an Extract of the South African Medicinal Plant, Cotyledon orbiculata », *Frontiers in Oncology*, vol. 10, 2020, Consulté le: 11 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.547392

[317] P. H. Mfengwana, S. S. Mashele, et I. T. Manduna, « Cytotoxicity and cell cycle analysis of Asparagus laricinus Burch. and Senecio asperulus DC. on breast and prostate cancer cell lines », *Heliyon*, vol. 5, nº 5, p. e01666, mai 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01666.

[318] O. S. Soyingbe, N. I. Mongalo, et T. J. Makhafola, « In vitro antibacterial and cytotoxic activity of leaf extracts of Centella asiatica (L.) Urb, Warburgia salutaris (Bertol. F.) Chiov and Curtisia dentata (Burm. F.) C.A.Sm - medicinal plants used in South Africa », *BMC Complement Altern Med*, vol. 18, nº 1, p. 315, nov. 2018, doi: 10.1186/s12906-018-2378-3.

[319] S. Zonyane, O. A. Fawole, C. la Grange, M. A. Stander, U. L. Opara, et N. P. Makunga, « The Implication of Chemotypic Variation on the Anti-Oxidant and Anti-Cancer Activities of Sutherlandia frutescens (L.) R.Br. (Fabaceae) from Different Geographic Locations », *Antioxidants*, vol. 9, nº 2, Art. nº 2, févr. 2020, doi: 10.3390/antiox9020152.

[320] J. O. Unuofin, G. A. Otunola, et A. J. Afolayan, « In vitro α-amylase, α-glucosidase, lipase inhibitory and cytotoxic activities of tuber extracts of Kedrostis africana (L.) Cogn », *Heliyon*, vol. 4, nº 9, p. e00810, sept. 2018, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00810.

[321] A. T. Mbaveng *et al.*, « Cytotoxic phytochemicals from the crude extract of Tetrapleura tetraptera fruits towards multi-factorial drug resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 267, p. 113632, mars 2021, doi: 10.1016/j.jep.2020.113632.

[322] A. T. Mbaveng, F. Damen, İ. Çelik, P. Tane, V. Kuete, et T. Efferth, « Cytotoxicity of the crude extract and constituents of the bark of Fagara tessmannii towards multi-factorial drug

resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 235, p. 28-37, mai 2019, doi: 10.1016/j.jep.2019.01.031.

[323] A. T. Mbaveng, H. T. Manekeng, G. S. Nguenang, J. K. Dzotam, V. Kuete, et T. Efferth, « Cytotoxicity of 18 Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multi-factorial drug resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 222, p. 21-33, août 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.04.036.

[324] F. Meyer *et al.*, « Biological activities of plant extracts from Ficus elastica and Selaginella vogelli: an antimalarial, antitrypanosomal and cytotoxity evaluation », 2018, doi: 10.1016/j.sjbs.2017.07.002.

[325] E. Mfotie Njoya, A. M. Munvera, P. Mkounga, A. E. Nkengfack, et L. J. McGaw, « Phytochemical analysis with free radical scavenging, nitric oxide inhibition and antiproliferative activity of Sarcocephalus pobeguinii extracts », *BMC Complement Altern Med*, vol. 17, n° 1, p. 199, avr. 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1712-5.

[326] M. Potestà *et al.*, « Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of Moringa oleifera Lam on lymphoid and monocytoid cells », *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 18, n° 1, p. 5-17, juill. 2019, doi: 10.3892/etm.2019.7544.

[327] A.-M. Abudunia *et al.*, « Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of Calendula arvensis flowers », *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 27, n° 1, p. 90-97, mars 2017, doi: 10.1016/j.mycmed.2016.11.002.

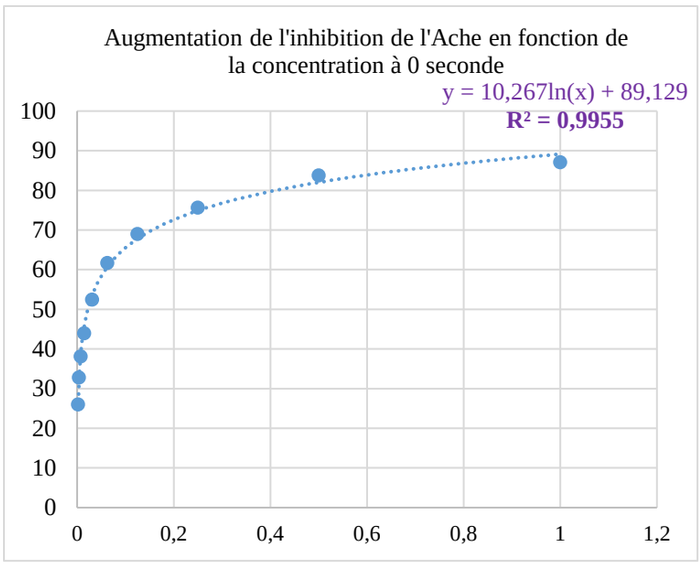
[328] L. Belayachi *et al.*, « Induction of cell cycle arrest and apoptosis by Ormenis eriolepis a Morrocan endemic plant in various human cancer cell lines », *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 14, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.4314/ajtcam.v14i2.

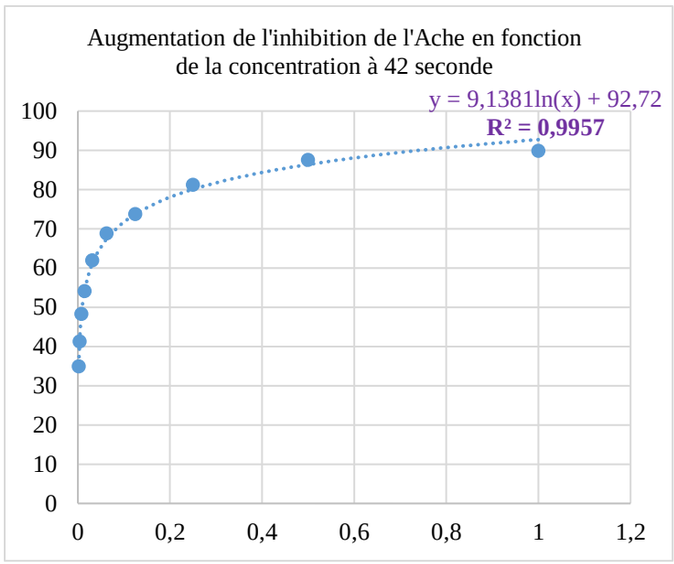
[329] S. Tesfaye *et al.*, « Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer; Part 3: Selective Cytotoxic Activity of 22 Plants against Human Cancer Cell Lines », *Molecules*, vol. 26, n° 12, Art. n° 12, janv. 2021, doi: 10.3390/molecules26123658.

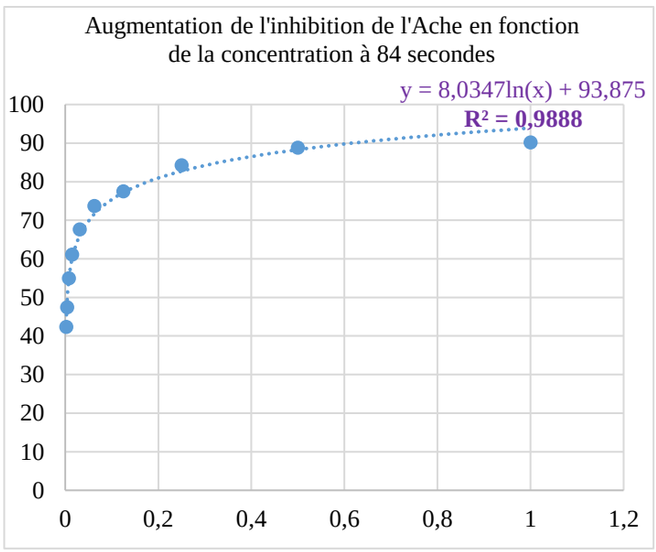
[330] A. G. Ahmed *et al.*, « Mustard Seed (Brassica nigra) Extract Exhibits Antiproliferative Effect against Human Lung Cancer Cells through Differential Regulation of Apoptosis, Cell Cycle, Migration, and Invasion », *Molecules*, vol. 25, n° 9, Art. n° 9, janv. 2020, doi: 10.3390/molecules25092069.

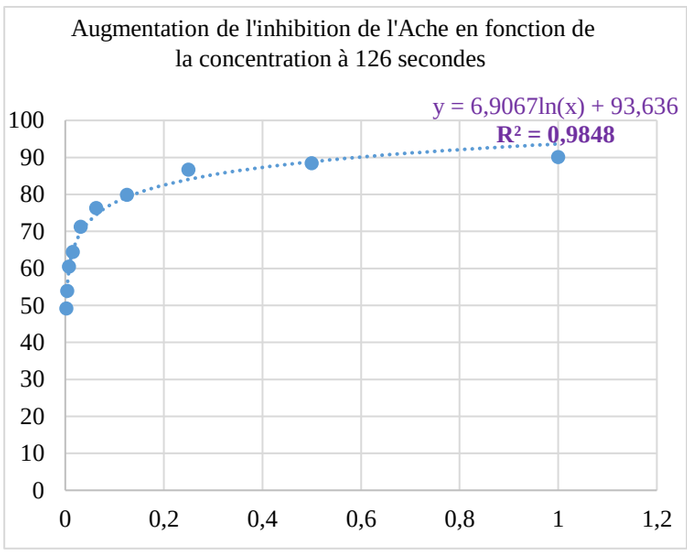
[331] W. R. Sawadogo, Y. Luo, B. Elkington, T.-C. He, C.-Z. Wang, et C.-S. Yuan, « Cytotoxicity and Preliminary Analysis of the Pro-apoptotic and Cell Cycle Arrest Effects of Lantana ukambensis Against Colorectal Cancer Cells », *Int J Appl Biol Pharm*, vol. 11, n° 3, p. 170-187, 2020.

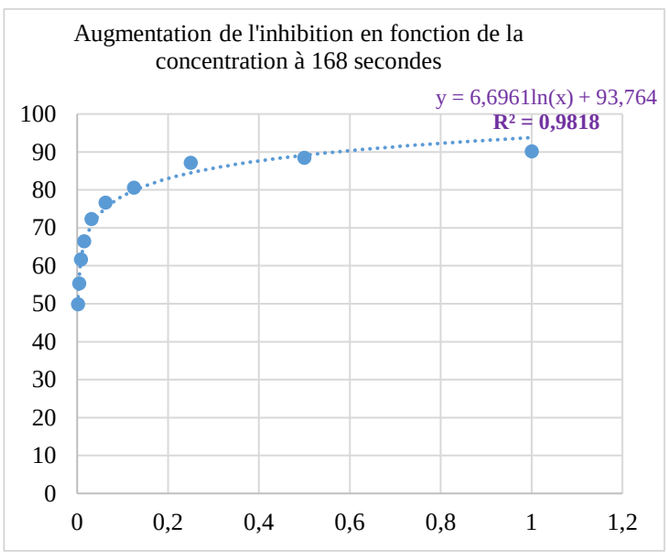
[332] D. O. Ochwang'i, C. N. Kimwele, J. A. Oduma, P. K. Gathumbi, S. G. Kiama, et T. Efferth, « Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 215, p. 233-240, avr. 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.01.004.


Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 0 seconde
y = 10,267ln(x) + 89,129
R² = 0,9955


Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 42 seconde
y = 9,1381ln(x) + 92,72
R² = 0,9957


Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 84 secondes
y = 8,0347ln(x) + 93,875
R² = 0,9888


Augmentation de l'inhibition de l'Ache en fonction de la concentration à 126 secondes
y = 6,9067ln(x) + 93,636
R² = 0,9848


Augmentation de l'inhibition en fonction de la concentration à 168 secondes
y = 6,6961ln(x) + 93,764
R² = 0,9818

Nafti K.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

Université de Toulouse

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

Mots clés : saponines, CCMHP/UV-Vis, PC12, CCHMP-SM, Alzheimer, Test d'Ellman

Résumé : L'industrie pharmaceutique moderne s'inspire largement des métabolites secondaires issus de plantes, pour la recherche de nouveaux principes actifs pourvus de propriétés pharmacologiques afin de protéger le corps humain contre les maladies. Parmi ces molécules bioactives, les saponines présentent de nombreuses activités. Dans ce cadre, nous nous sommes interessés à une plante Astragalus hamosus appartenant à la famille des Astragales en Tunsie. dont les effets biologiques sont encore peu connus par rapport à d'autres espèces du même genre. Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une mise en évidence de la présence de saponines dans quatre populations d'Astragalus hamosus de Tunisie. Une stratégie combinant divers schémas d'extraction par solvants organiques adaptés de la littérature et des méthodes analytiques spécifiques a été mise en place non seulement pour une étude phytochimique de la plante et tenter d'identifier les saponines présentes dans le végétal endémique mais également afin de pouvoir évaluer les propriétés biologiques de la plante, notamment l'effet neuroprotecteur et l'activité anticancéreuse de certaines fractions dévelopées. En raison de leurs propriétés chimiques et structurales particulières, l'extraction et l'isolement des saponines des plantes représentent un défi majeur. Dans cette thèse, des protocoles d'extraction spécifiques ont été développés et utilisés pour extraire les saponines d'Astragalus hamosus à partir de quatre populations tunisiennes issues de quatre régions géographiques différentes. La purification des extraits et la caractérisation des fractions ont été réalisées à l'aide dans un premier temps de la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC), puis par couplage à la spectrométrie de masse (HPTLC-SM2). La soyasaponine et/ou son isomère l'azukisaponine semblent avoir été identifiés et quantifiés dans certaines fractions. Un second volet de ces travaux de thèse a porté sur la détermination de l'inhibition de l'acethylcholinesterase par les fractions d'Astragalus hamosus en se basant sur le test d'Ellman et sur la neuroprotection des cellules neurales PC12 contre la toxicité induite par le peptide AB. Certaines fraction se sont avérées neuroprotectrices en présence du pepttide AB. Les fractions ont finalement été testées vis à vis du cancer colorectal CACO-2. Toutes ont montré une inhibition significative de la prolifération des cellules. La cytotoxicité des extraits sur les cellules HEK293 s'est également montrée significative. Les fractions isolées d'Astragalus hamosus issues de quatre populations tunisiennes ont montré des activités biologiques prometteuses permettant d'envisager la valorisation de cette plante à des fins thérapeutiques.

Title: Phytochemical study of Astragalus hamosus extracts: Evaluation of the therapeutic effects of saponins on neurodegenerative diseases

Key words: HPTLC-MS, Saponins, HPTLC/UV-Vis, ellman's test, Alzheimer, PC12

Abstract: The modern pharmaceutical industry is largely inspired by secondary metabolites from plants in the search for new active ingredients with pharmacological properties to protect the human body against diseases. Among these bioactive molecules, saponins have many activities. In this context, we are interested in a plant, Astragalus hamosus, belonging to the Astragales family in Tunsia, whose biological effects are still little known compared to other species of the same genus. This thesis is part of a study of the presence of saponins in four populations of Astragalus hamosus from Tunisia. A strategy combining various extraction schemes by organic solvents adapted from the literature and specific analytical methods was set up not only for a phytochemical study of the plant and to try to identify the saponins present in the endemic plant but also in order to be able to evaluate the biological properties of the plant, in particular the neuroprotective effect and the anticancer activity of certain developed fractions. Due to their particular chemical and structural properties, the extraction and isolation of saponins from plants represents a major challenge. In this thesis, specific extraction protocols were developed and used to extract saponins from Astragalus hamosus from four Tunisian populations from four different geographical regions. The purification of the extracts and the characterization of the fractions were carried out first by high performance thin layer chromatography (HPTLC), then by coupling to mass spectrometry (HPTLC-MS2). Soyasaponin and/or its isomer azukisaponin seem to have been identified and quantified in some fractions. A second part of this thesis work focused on the determination of acethylcholinesterase inhibition by Astragalus hamosus fractions based on the Ellman test and on the neuroprotection of PC12 neural cells against AB peptide-induced toxicity. Some fractions were found to be neuroprotective in the presence of AB peptide. The fractions were finally tested against CACO-2 colorectal cancer. All showed significant inhibition of cell proliferation. The cytotoxicity of the extracts on HEK293 cells was also significant. The fractions isolated from Astragalus hamosus from four Tunisian populations showed promising biological activities allowing to consider the valorisation of this plant for therapeutic purposes.