



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT

3<sup>ème</sup> Cycle (LMD)

Spécialité : Electrochimie des substances bioactives d'intérêts  
pharmaceutiques

Intitulé :

**Investigation phytochimique des extraits de  
*Astragalus gombo* aux propriétés antioxydants et  
biologique**

Présentée par :

**BENFERDIA Saida**

Soutenue publiquement le 11 Octobre 2023

Devant le jury composé de :

Mr. Zaoui Manel	Professeur ,	Univ. Ouargla	Présidente
M <sup>me</sup> . Rahmani Zehour	Professeur ,	Univ. Ouargla	Rapporteur
M <sup>me</sup> . Charbi Rekia	MCA,	Univ. Ouargla	Co- Rapporteur
Mr. Telli Alia	Professeur,	Univ. Ouargla	Examinatrice
Mr. Rebiai Abdelkrim	Professeur,	Univ. El-Oued	Examineur
Mr. Chouikh Atef	Professeur,	Univ. El-Oued	Examineur

Année universitaire : 2022/2023

### **Remerciements**

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien d'ALLAH, qui m'a donné la volonté de relever ce défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Mon travail de recherche a été réalisé au laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (VPRS) de l'université Kasdi Merbah Ouargla, au laboratoire de CRAPC Ouargla, et au laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) de l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, Sous la direction du Professeur RAHMANI Zehour.

Je tiens à remercier plus particulièrement à ma directrice de thèse, le professeur Rahmani Zehour, pour sa supervision excellente, son soutien, son caractère fraternel, et son grand intérêt, ainsi que pour les encouragements et les orientations continus que j'ai reçus tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie également Mademoiselle Charbi Rekia maître de conférences "A" à l'université Kasdi merbah Ouargla, Co-directrice de cette thèse.

J'adresse également tous mes remerciements aux honorables membres de jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie Pr. Zaoui Manel, professeur à l'Université de Ouargla pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Je tiens à remercier plus particulièrement Mme Telli Alia maître de conférences "A" à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour sa gentillesse et ses conseils et pour avoir offert ses compétences professionnelles en cas de besoin, et aussi pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail de thèse.

Je remercie également les examinateurs Monsieur Rebiai Abdelkrim et Chouikh Atef de l'Université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued.

Un grand merci aussi aux Dr. Kadri Mohamed, Dr. MESSAOUDI Abd Djabar, pour leur soutien et d'être toujours disponible pour m'aider.

Je remercie Gadja Omar l'ingénieur de Laboratoire Géologie du Sahara Université Ouargla, pour les analyses par des Rayon X, ainsi, le doctorant Berkouk Saadia merci pour votre aide. Je remercie ainsi, le directeur de CRAPC Ouargla BELKHALFA Hakim et l'ingénieur Boussaba Oualid, ainsi, l'ingénieur Rahmani Youcef pour leur aide et leur soutien.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Dr. Rahmani Zaineb, qui m'a apporté un soutien moral et intellectuel ainsi que pour sa patience avec moi tout au long de l'élaboration de cette thèse, et pour sa gentillesse et son caractère fraternel. Les mots ne peuvent pas vous remercier assez ma soeur.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à tous mes professeurs : SAIDI Mokhtar, HADJADJ Mohamed, BELFAR Mohammed Lakhdar, DENDOUGUI Hocine, DOUADI Ali, HADEF Derradji, DEKMOUCHE Messaouda, ZENKHRI Louiza, SAMARA Ouanissa, BECHKI Lazher, RAHIM Oum Elkhei, ZEGHDI Saad... qui nous ont enseigné et qui nous ont encouragés et qui nous ont soutenu par leurs compétences à poursuivre nos études.

J'adresse également tous mes remerciements à Dr. Bensaci Chaima , à tous les ingénieurs de laboratoire pédagogique de chimie, mes collègues et amies dans le laboratoire de VPRS ABID Asma, TOUAHRIA Tatou, BIRECH Kamilya, BELFAR Assia, Belguidoum, Mahdi, Mokrani Omar Elkhatab, MENAA Sabah, BENCHEIKH Fatima Zohra.

Enfin, j'adresse remerciements vont à toutes les personnes qui ont toujours soutenu et encouragé dans la réalisation de ce travail.

## Dédicace

Je dédie cette thèse

**À mes chers parents** Ali et Zohra, source de mon honneur, pour tout leur amour, leur affection, leur confiance, leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études Grâce à vos prières et vos bons conseils, j'ai pu réaliser cette grande réalisation. Je vous suis reconnaissant à tous les deux pour vos efforts et vos sacrifices. Sans vous, je n'aurais pas pu arriver au bout. Je demande à Dieu Tout-Puissant de vous accorder santé et longue vie.

**À mes Chers frères**, Bousairi, Abdelkrim, Mohamed Iamin

**À mes chères sœurs**, Hind, Imen

**À ma grande mère** Messaouda, mes tantes et mes oncles et toute la famille Benferdia.

À tous mes oncles et tantes maternelles et toute la famille Dekmouche.

À tous mes cousins et cousines

À ma belle-sœur et à mes chères Tesnim, Djanna et Farah.

À toute personne qui me connait

### Résumé

L'objectif de cette recherche est l'investigation phytochimique des extraits des feuilles et tiges d'*Astragalus gombo* et leurs effets biologiques savoir : l'activité antioxydante, l'activité antiurolithiasique et leurs effets inhibiteurs à l'enzyme l' $\alpha$ -amylase.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques à savoir : Flavonoïdes, tanins, dérivés anthracéniques libres, triterpènes, coumarines, saponosides, Polyphénols, les compose réducteur, protéines, pour avoir une idée sur le profil phytochimique de nos extraits et fractions.

Les résultats du dosage montrent la richesse tous les extraits en phénols totaux, flavonoïdes, à l'exception des tanins, qui sont présents en faible quantité, la teneur des extraits dépendait de la nature du solvant d'extraction. Les teneurs les plus importantes ont été observées dans la fraction aqueuse pour les tiges, avec  $4,17 \pm 0,034$  mg EAG/g MS de polyphénols totaux et la fraction butanolique avec  $0,706 \pm 0,002$  mg QE / g MS de flavonoïdes et la fraction aqueuse avec  $0,098 \pm 0,0054$  mg CE/g MS de tanins.

Les méthodes d'activité antioxydante *in vitro* étudiées avec cinq méthodes différentes montrent que tous les extraits étudiés présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux, Les résultats du test du DPPH ont révélé que la fraction dichlorométhane ( $IC_{50} = 0,07 \pm 0,005$  mg/mL des tiges et  $0,14 \pm 0,00$  mg/mL des feuilles) le plus fortes antioxydante.

La valeur de  $IC_{50}$  la plus grand du test ABTS<sup>•+</sup> a été enregistrée dans la fraction acétate d'éthyle pour les feuilles ( $IC_{50} = 0,33 \pm 0,05$  mg/mL), Pour le test de réduction de Mo(VI) à Mo(V), les résultats ont soulignent que tous les extraits avaient des capacités antioxydantes plus élevées que le BHA avec des valeurs AEAC comprises entre  $605,57 \pm 32,50$  et  $33,43 \pm 0,67$  mM.

Le pourcentage d'inhibition d' $O_2^{\cdot-}$  le plus importante ont été enregistré avec la fraction dichlorométhane des feuilles ( $56,31 \pm 0,88$  %) par la méthode l'auto-oxydation de pyrogallol, les résultats soulignent que tous les extraits présentent une activité antioxydante vis-à-vis le radical anion superoxyde comparativement à l'acide ascorbique avec des valeurs de  $IC_{50}$  variaient de 0,00174 à 0,025 mg/mL par la voltamétrie cyclique.

La fraction acétate d'éthyle des tiges et des feuilles montre la meilleure inhibition de l' $\alpha$  amylase avec des pourcentages d'inhibition ( $51,76 \pm 3,17$  % et  $26,23 \pm 1,50$  % respectivement), le même extrait a enregistré les valeurs les plus élevées d'AEIC ( $0,73 \pm 0,04$  et  $0,37 \pm 0,02$  pour les tiges et les feuilles respectivement).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antiurolithiasique *in vitro* de nos extraits ont montré que tous les extraits avaient des taux d'inhibition plus élevés dans l'urine d'un sujet sain dans les feuilles et les tiges par rapport aux autres types d'urine avec des valeurs allant ( $98,83 \pm 0,24$  % et  $37,20 \pm 0,8$  % respectivement). En particulier les extraits de tisane et l'extrait brut comparativement aux inhibiteurs de référence. De plus, l'extrait brut et la fraction aqueuse de feuilles sont les seuls à avoir un effet de solubilisation remarquable sur calcul C2 comparativement aux inhibiteurs de référence dans le modèle gravimétrique.

**Mots clés :** *Astragalus gombo*, polyphénols totaux, l'activité antioxydante, l'activité antiurolithiasique, l' $\alpha$ -amylas

## Abstract

The main objective of this research is the phytochemical investigation of the extracts of the leaves and stems of *Astragalus gombo* and their biological effects namely: the antioxidant activity, the antiurolithiasic activity and their inhibitory effects on the enzyme  $\alpha$ -amylase.

The phytochemical investigation has highlighted the presence of some chemical groups namely: Flavonoids, tannins, free anthracene derivatives, triterpenes, coumarins, saponosides, polyphenols, reducing compounds, proteins, to get an idea of the phytochemical profile of our extracts and fractions.

The results of the assay show the richness of all the extracts in total phenols, flavonoids, with the exception of tannins, which are present in small quantities, the content of the extracts depended on the nature of the extraction solvent. The highest levels were observed in the aqueous fraction for the stems, with  $4.17 \pm 0.034$  mg GAE / g DM of total polyphenols and the butanol fraction with  $0.706 \pm 0.002$  mg EQ / g DM of flavonoids and the aqueous fraction with  $0.098 \pm 0.0054$  mg EC / g DM of tannin.

The methods of the antioxidant activity *in vitro* studied with five different methods show that all the extracts studied have antioxidant properties at different levels, The results of the DPPH test revealed that the dichloromethane fraction ( $IC_{50} = 0.07 \pm 0.005$  mg/mL stems and  $0.14 \pm 0.00$  mg/mL leaves) the strongest antioxidant.

The highest  $IC_{50}$  value of the ABTS<sup>•+</sup> test was recorded in the ethyl acetate fraction for the leaves ( $IC_{50} = 0.33 \pm 0.05$  mg/mL), For Mo(VI) to Mo(V) reduction test, the results highlighted that all the extracts have a high antioxidant capacities than BHA with AEAC values ranging between  $605.57 \pm 32.50$  and  $33.43 \pm 0.67$  mM.

The greatest percentage of  $O_2^{\cdot-}$  inhibition was recorded with the dichloromethane fraction of the leaves ( $56.31 \pm 0.88\%$ ) with the auto-oxidation method of pyrogallol, the results show that all extracts show antioxidant activity against the superoxide anion radical compared to ascorbic acid with  $IC_{50}$  values ranging from 0.00174 to 0.025 mg/mL by cyclic voltammetry.

The ethyl acetate fraction of stems and leaves show the best inhibition of  $\alpha$  amylase with percentages of inhibition ( $51.76 \pm 3.17\%$  and  $26.23 \pm 1.50\%$  respectively), the same extract recorded the highest values of AEIC ( $0.73 \pm 0.04$  and  $0.37 \pm 0.02$  for stems and leaves respectively).

The results of the evaluation of the *in vitro* antiurolithiasic activity of our extracts showed that all extracts had higher rates of inhibition in the urine of a healthy person in the leaves and stems compared to the other types urine with values ranging ( $98.83 \pm 0.24\%$  and  $37.20 \pm 0.8\%$  respectively). In particular tisan extracts and crude extract for the leaves compared to reference inhibitors. In addition, the crude extract and the aqueous fraction of the leaves are the only ones to have a remarkable solubilization effect on C2 calculus compared to the reference inhibitors in the gravimetric model.

**Keywords:** *Astragalus gombo*, total polyphenols, antioxidant activity, antiurolithiasis activity,  $\alpha$ -amylase.

## المخلص

الهدف من هذا البحث هو التحقيق الكيميائي النباتي لمستخلصات أوراق وسيقان *أستراغالوس البامية* وتأثيراتها البيولوجية وهي: النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد لتشكيل حصيات الكلى وتأثيرها التثبيطي على إنزيم الفاميلاز.

مكّن الفحص الكيميائي النباتي من إبراز وجود بعض المجموعات الكيميائية، وهي: الفلافونويد، العفص، مشتقات الأنثراسين الحرة، الترائيتربين، الكومارين، السابونوزيدات، البوليفينول، المركبات المختزلة، البروتينات، للحصول على فكرة حول تعريف كيميائي نباتي لمستخلصاتنا و أجزائها.

أظهرت نتائج الفحص مدى ثراء جميع المستخلصات في إجمالي الفينولات والفلافونيدات باستثناء مادة التانينات الموجودة بكميات قليلة، حيث يعتمد محتوى المستخلصات على طبيعة مذيب الاستخلاص. لوحظت أعلى المستويات في الكسر المائي للسيقان، مع  $0.034 \pm 4.17$  مغ مكافئ حمض الغاليك/ غ كتلة النبات الجاف من إجمالي البوليفينول وجزء البيوتانول مع  $0.706 \pm 0.002$  مغ مكافئ الكرسيتين/ غ كتلة النبات الجاف من الفلافونويد والكسر المائي مع  $0.098 \pm 0.0054$  مغ مكافئ الكاتشين/ غ كتلة النبات الجاف.

أظهرت طرق نشاط مضادات الأكسدة في المختبر التي تمت دراستها بخمس طرق مختلفة أن جميع المستخلصات المدروسة تظهر خصائص مضادة للأكسدة بمستويات مختلفة، وأظهرت نتائج اختبار DPPH أن كسر ثنائي كلورو ميثان ( $IC_{50} = 0.07 \pm 0.005$  مجم / مل ينبع و  $0.14 \pm 0.00$  مجم. / مل أوراق) أقوى مضادات الأكسدة.

تم تسجيل أعلى قيمة  $IC_{50}$  لاختبار  $ABTS^{+}$  في كسر أسيتات الإيثيل للأوراق ( $IC_{50} = 0.33 \pm 0.05$  مجم / مل)، بالنسبة لاختبار تخفيض Mo (VI) في Mo (V)، وأوضحت النتائج أن جميع المستخلصات لها قدرة مضادات أكسدة أعلى من BHA مع قيم AEAC تتراوح بين  $32.50 \pm 605.57$  و  $0.67 \pm 33.43$  ملي مولار.

تم تسجيل أكبر نسبة تثبيط جذر  $O_2^{\cdot-}$  في كسر ثنائي كلورو ميثان للأوراق ( $56.31 \pm 0.88\%$ ) وذلك بطريقة الأكسدة الذاتية للبيروغالول، وأظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة ضد جذري الأنيون الفائق مقارنة بحمض الأسكوربيك. مع قيم  $IC_{50}$  التي تتراوح من 0.00174 إلى 0.025 مجم / مل بطريقة الفولطا متري الحلقي.

أظهر كسر خلات الإيثيل من السيقان والأوراق أفضل نسبة تثبيط لإنزيم الفاميلاز بنسب تثبيط ( $51.76 \pm 3.17\%$  و  $26.23 \pm 1.50\%$  على التوالي)، نفس المستخلص سجل أعلى قيم AEIC ( $0.73 \pm 0.04$  و  $0.37 \pm 0.02$  للسيقان والأوراق على التوالي).

أظهرت نتائج تقدير الفعالية المضادة لتشكيل حصيات الكلى في المختبر لمستخلصاتنا أن جميع المستخلصات لديها معدلات تثبيط أعلى في بول الشخص السليم في الأوراق والسيقان مقارنة بالأنواع البول الأخرى بقيم تتراوح ( $98.83 \pm 0.24\%$  و  $37.20 \pm 0.8\%$  على التوالي) على وجه الخصوص مستخلصات الشاي العشبي والمستخلص الخام مقارنة بالمثبطات المرجعية. بالإضافة إلى ذلك، فإن المستخلص الخام والكسر المائي للأوراق هما الوحيدان اللذان لهما تأثير ذوبان ملحوظ في حجر C2 مقارنة بالمثبطات المرجعية في النموذج الكتلي.

**الكلمات الدالة:** *أستراغالوس البامية*، البوليفينولات، الفعالية المضادة للأكسدة، النشاط المضاد لتشكيل حصيات الكلى، الفاميلاز.

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
Figure I. 1 : Description des composantes d'une feuille de légumineuse	4
Figure I. 2 : Description des composantes d'une fleur de Papilionacées	5
Figure I. 3 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre <i>Astragalus</i>	6
Figure I. 4 : Swainsonine	9
Figure I. 5 : Astragaloside II	10
Figure I. 6 : Atramembrainnine	10
Figure I. 7 : Situation géographique de la zone d'Ouargla	19
Figure I. 8 : <i>Astragalus gombo</i>	21
Figure II. 1 : Localisation des calculs dans le système urinaire	27
Figure II. 2 : Promoteurs, Promoteurs et espèces cristallines et substances cristallisables	28
Figure II. 3 : Calculs d'oxalate de calcium : (A) monohydraté , (B) dihydraté	30
Figure II. 4 : Principaux calculs de phosphates calciques (a : calcul de brushite et b : calcul de carapatite)	31
Figure II. 5 : Principaux calculs de acide urique et de urate . a : calculs de acide urique anhydre, b : calcul de acide urique dihydraté et c : calcul de urate d'ammonium	31
Figure II. 6 : Calcul de struvite	32
Figure II. 7 : Calcul de cystine	33
Figure II. 8 : Quelques calculs induits par les médicaments . a : calculs d'indinavir, b : calculs de triamterène . c : calcul de N-acétylsulfadiazine	33
Figure III. 1 : Protocole d'extraction de différentes fractions	41
Figure III. 2 : Réduction du radical libre DPPH.	44
Figure III. 3 : Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS •+	45
Figure III. 4 : Auto-oxydation du pyrogallol	46
Figure III. 5 : Voltamogramme d'O <sub>2</sub>	47
Figure III. 6 : Produit de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ – amylase	50
Figure III. 7 : Les photos des deux calculs rénaux (C1 : Calcul d'acide urique et C2 : Calcul d'urate de calcium).	53
Figure IV. 1 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	58
Figure IV. 2 : Teneur phénolique des feuilles et des tiges	59
Figure IV. 3 : Courbe d'étalonnage de quercétine	61
Figure IV. 4 : Teneur flavonoïdes des feuilles et des tiges	62
Figure IV. 5 : Courbe d'étalonnage de catéchine	64
Figure IV. 6 : Teneur des tanins pour les feuilles et les tiges	65
Figure IV. 7 : Courbes représentants les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différents extraits	67
Figure IV. 8 : Activité anti radicalaire DPPH des extraits de <i>A. gombo</i> , BHA et BHT	69
Figure IV. 9 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C) pour la réduction de Mo (VI)	72
Figure IV. 10 : Capacité réductrice de Mo(VI) en Mo(V)) des extraits d' <i>Astragalus gombo</i>	74

Figure IV. 11	: Courbe représentant l'activité anti-radicalaire ABTS <sup>•+</sup> des extraits d' <i>Astragalus gombo</i>	76
Figure IV. 12	: Activité anti-radicalaire d'ABTS des extraits d' <i>A. gombo</i> et d'acide ascorbique	78
Figure IV. 13	: Courbes de vitesse d'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant	81
Figure IV. 14	: Pourcentage d'inhibition de radical anion superoxyde par différents échantillons	82
Figure IV. 15	: Voltamogrammes d'oxygène en présence d'acide ascorbique	83
Figure IV. 16	: Voltamogramme d'oxygène à la présence des différentes fractions étudiées	85
Figure IV. 17	: Effets d'inhibition de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> par des différentes fractions de plante	86
Figure IV. 18	: Valeurs de la CI <sub>50</sub> pour l'inhibition des radicaux superoxydes par les extraits d' <i>A. gombo</i> et l'acide ascorbique	87
Figure IV. 19	: Réaction des flavonoïdes avec les ROS	88
Figure IV. 20	: Courbe d'étalonnage de l'acarbose	90
Figure IV. 21	: Les taux d'inhibition des extraits d' <i>Astragalus gombo</i> vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase	92
Figure IV. 22	: Allure générale de la courbe turbidimétrique	94
Figure IV. 23	: Courbe de cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel sans inhibiteur	95
Figure IV. 24	: Courbe de cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine de sujet malade sans inhibiteur	95
Figure IV. 25	: Courbe de cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine de sujet normale sans inhibiteur	96
Figure IV. 26	: Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des extraits de feuilles d' <i>Astragalus gombo</i>	97
Figure IV. 27	: : Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des extraits de tiges d' <i>Astragalus gombo</i>	97
Figure IV. 28	: Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des références	98
Figure IV. 29	: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet malade en présence des extraits de feuilles d' <i>Astragalus gombo</i>	98
Figure IV. 30	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet malade en présence des extraits de tiges d' <i>Astragalus gombo</i>	99
Figure IV. 31	: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet malade en présence des références	99
Figure IV. 32	: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet normale en présence des extraits de feuilles d' <i>Astragalus gombo</i>	100
Figure IV. 33	: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet normale en présence des extraits de tiges d' <i>Astragalus gombo</i>	100
Figure IV. 34	: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet normale en présence des références	101

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>			<b>Page</b>
Tableau I.	1	: Dénombrements de genres et espèces des <i>Fabacées</i> recensés au niveau mondial et en Algérie	3
Tableau I.	2	: Flavones isolés de <i>Astragalus</i>	11
Tableau I.	3	: Flavanones isolés de <i>Astragalus</i>	12
Tableau I.	4	: Isoflavones isolés de <i>Astragalus</i>	12
Tableau I.	5	: Chalcones isolés de <i>Astragalus</i>	13
Tableau I.	6	: Flavanes isolés de <i>Astragalus</i>	13
Tableau I.	7	: Ptérocarpanes isolés de <i>Astragalus</i>	14
Tableau I.	8	: Saponines à squelette cycloartane isolés de <i>Astragalus</i>	14
Tableau I.	9	: Saponines à squelette oléanane isolés de <i>Astragalus</i>	16
Tableau I.	10	: Stérols isolés de <i>Astragalus</i>	17
Tableau I.	11	: Carbohydrates isolés de <i>Astragalus</i>	17
Tableau I.	12	: Flavones isolés de l'espèce <i>Astragalus gombo</i>	22
Tableau I.	13	: Saponines à squelette cycloartane isolés de l'espèce <i>Astragalus gombo</i>	23
Tableau II.	1	: Inhibiteurs de la cristallisation	29
Tableau II.	2	: Études antérieures sur l'activité antiuroolithiasique de quelques plantes médicinales	35
Tableau IV.	1	: Résultats des screening phytochimique dans la plante <i>d'Astragalus gombo</i>	58
Tableau IV.	2	: Rendement des différentes fractions des feuilles et tiges	57
Tableau IV.	3	: Quantité des phénols totaux dans les extraits en mg EAG/ g MS	59
Tableau IV.	4	: Quantité des flavonoïdes totaux dans les extraits en mg EQ / g MS	61
Tableau IV.	5	: Quantité des tanins totaux dans les extraits en mg EC/g MS	64
Tableau IV.	6	: Valeurs des $CI_{50}$ des extraits étudiées en mg/mL par piégeage du radical DPPH'	68
Tableau IV.	7	: Valeurs AEAC pour toutes les fractions étudiées en mM équivalent d'acide ascorbique	73
Tableau IV.	8	: Valeurs $CI_{50}$ de test d'ABTS des différents extraits	77
Tableau IV.	9	: Pourcentages d'inhibition d'anions superoxydes	80
Tableau IV.	10	: Résultats de $CI_{50}$ obtenues pour les fractions étudiées	86
Tableau IV.	11	: Pourcentage inhibition de l'alpha-amylase par les fractions étudiées	90
Tableau IV.	12	: les taux d'inhibition de cristallisation oxalocalcique pour toutes les fractions étudiées et références pour des concentrations égales à 1 g/L.	102
Tableau IV.	13,a	: Les coefficients de corrélation entre les teneurs des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités biologiques	105
Tableau IV.	13,b	: Les coefficients de corrélation entre les teneurs des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités biologiques	106
Tableau IV.	14	: Effet des extraits de plantes sur la dissolution <i>in vitro</i> des calculs urinaires	108

*Liste des abréviations*

**Abs** : Absorbance

**ABTS** : Acide 2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonique)

**AEAC** : Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity

**BHA** : Butylhydroxyanisole

**BHT** : Butylhydroxytoluène

**C1** : Calcul 1 d'urate de calcium

**C2** : Calcul 2 de phosphate de calcium

**CFT** : Concentration des flavonoides totaux

**CPT** : Concentration des phénols totaux

**CTT** : Concentration des tanins totaux

**D%** : Pourcentage de dissolution

**DNS** : Acide 3,5-dinitrosalicylique

**DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle

**DRX** : Diffraction des rayons X

**ECS** : Electrode au calomel saturé

**Electrode CV** : électrode charbon vitreux

**EQ** : Equivalent de quercitine

**ET**: Equivalents trolox.

**I%** : Pourcentage d'inhibition

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice provoquant de 50% d'inhibition

**MS** : Matière sèche

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**OxCa** : Oxalate de calcium

**PI** : Pourcentage d'inhibition

**RNS** : Reactive nitrogen species

**ROS** : Reactive oxygen species

**SOD** : Super-Oxyde Dismutase

**ti** : Temps d'induction

**UI** : Unité internationale

v / v : Rapport volume par volume

VC : Voltamétrie cyclique

<b>Remerciements</b> .....	I
<b>Dédicace</b> .....	III
Résumé .....	IV
Abstract .....	V
ملخص .....	VI
Liste des figures .....	VII
Liste des tableaux .....	IX
Liste des abréviations .....	X
Introduction .....	1

## Partie Bibliographie

### *Chapitre I : Rappel bibliographique*

I.	La famille Fabaceae .....	3
I.1.	Généralités .....	3
I.2.	Description botanique des Fabaceae .....	4
I.3.	Le genre <i>Astragalus</i> .....	5
I.3.1.	Répartition géographique de genre <i>Astragalus</i> .....	5
I.3.2.	Propriétés pharmacologiques du genre <i>Astragalus</i> .....	6
I.3.3.	Utilisation en médecine traditionnelle .....	7
I.3.4.	Quelques activités biologiques reconnues .....	8
I.3.5.	Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Astragalus</i> .....	9
I.4.	Présentation de la région d'étude Vallée du N'essa .....	19
I.4.1.	<i>Astragalus gombo</i> .....	20
I.4.2.	Systématique d' <i>Astragalus gombo</i> .....	20
I.4.3.	Description botanique d' <i>Astragalus gombo</i> .....	20
I.4.4.	Métabolites primaires d' <i>Astragalus gombo</i> .....	21
I.4.5.	Métabolites secondaires d' <i>Astragalus gombo</i> .....	21
I.4.6.	Etudes phytochimiques précédentes et principaux métabolites secondaires isolés...	22
I.4.7.	Composition minérale d' <i>Astragalus gombo</i> .....	23
I.4.8.	Activités Pharmacologiques d' <i>Astragalus gombo</i> .....	24

I.4.9.	Toxicité .....	24
I.4.10.	Activité Antioxydante d' <i>Astragalus gombo</i> .....	25

## *chapitre II : Activité antiurolithiasique et antidiabétiques*

II.1.	Généralités sur la maladie lithiasique .....	26
II.1.1.	Historique .....	26
II.1.2.	Lithiase et calcul .....	26
II.1.3.	Inhibiteurs et promoteurs de la lithogénèse.....	28
II.1.4.	Différents types de lithiase .....	30
II.1.4.1.	Lithiase oxalocalcique .....	30
II.1.4.2.	Lithiase phosphocalcique .....	30
II.1.4.3.	Lithiase urique et uratique .....	31
II.1.4.4.	Lithiase phospho-ammoniaco-magnésienne.....	32
II.1.4.5.	Lithiase cystinique .....	32
II.1.4.6.	Lithiase médicamenteuse.....	33
II.1.5.	Méthodes d'évaluation de l'activité antiurolithiasique.....	33
II.1.6.	Activité antiurolithiasique des plantes médicinales.....	34
II.2.	Diabète.....	35
II.2.1.	Définitions et généralités.....	35
II.2.2.	Pancréas et l'insulinosécrétion.....	36
II.2.3.	Diabète et le stress oxydatif.....	36
II.2.4.	Plantes antidiabétiques.....	37

## *Travaux persennels*

### *Chapitre III : Les Activités biologiques*

III.1.	Matériel végétal .....	38
III.2.	Screening phytochimique des extraits .....	38
III.2.1.	Tanins .....	38
III.2.2.	Alcaloïdes .....	38
III.2.3.	Protéines .....	39

III.2.4.	Les flavonoïdes .....	39
III.2.5.	Les saponines .....	39
III.2.6.	Teste des composés réducteurs .....	39
III.2.7.	Cardénolides .....	39
III.2.8.	Coumarines .....	39
III.2.9.	Stérols et triterpènes.....	39
III.3.	Préparation des extraits .....	40
III.4.	Détection chimique à propos de certains métabolites secondaires .....	42
III.4.1	Dosage des polyphénols totaux .....	42
III.4.2	Dosage des flavonoïdes totaux.....	42
III.4.3	Dosage des tannins totaux.....	43
III.5.	Evaluation des activités biologiques .....	43
III.5.1.	Activité antioxydante .....	43
III.5.1.1	Piégeage du radical DPPH•.....	43
III.5.1.2.	Capacité réductrice (Réduction de Mo(VI) en Mo(V)) .....	44
III.5.1.3.	Test d'ABTS.....	45
III.5.1.4.	Évaluation de la capacité inhibitrice de l'anion superoxyde radicalaire $O_2^{\bullet-}$ .....	46
a.	Voie chimique .....	46
b.	Voie électrochimique .....	47
III.6.	Estimation d'inhibition d' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> par les extraits de <i>A. gombo</i> .....	49
III.6.1.	Test de l'inhibition de l'activité d' $\alpha$ -amylase.....	49
III.6.2.	L'étude cinétique de réaction d'inhibition d' $\alpha$ -amylase .....	52
III.7.	Evaluation de l'activité antiurolithiasique .....	52
III.7.1.	Les urines .....	52
III.7.2.	Calculs rénaux .....	52
III.7.3.	Modèle turbidimétrique .....	53
III.7.4.	Modèle gravimétrique .....	54

## *Chapitre IV : Résultats et discussion*

IV.1.	Screening phytochimique des extraits .....	55
-------	--	----

IV.2	Rendement de l'extraction des différentes fractions .....	56
IV.3	Résultat de dosage .....	58
IV.3.1	Dosage des phénols totaux (CPT) .....	58
IV.3.2	Dosage des flavonoïdes totaux (CFT) .....	60
IV.3.3	Dosage des tanins totaux (CTT) .....	63
IV.4	Evaluation de l'activité antioxydante.....	66
IV.4.1	Résultats du piégeage du radical DPPH. ....	66
IV.4.2	Réduction de Mo(VI) en Mo(V) .....	72
IV.4.3	Piégeage du radical cation ABTS <sup>•+</sup> .....	75
IV.5.	Évaluation de la capacité inhibitrice de radical anion superoxyde .....	80
IV.5.1	Évaluation par la méthode chimique.....	80
IV.5.2	Évaluation par la méthode électrochimique.....	83
IV.6	Estimation d'inhibition d' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> par les extraits d' <i>A. gombo</i> .....	89
IV.6.1.	Test de l'inhibition de l'activité d' $\alpha$ -amylase.....	89
IV.7.	Évaluation de l'activité antiurolithiasique.....	92
	Conclusion générale .....	110
	Références .....	113
	Annexe .....	133

***INTRODUCTION***

***GENERALE***

### INTRODUCTION GENERALE

Entre 70 et 80 % de la population mondiale dépend encore des plantes médicinales pour leurs besoins de soins de santé primaires. Aussi, il y a un regain d'intérêt des entreprises pharmaceutiques pour les plantes médicinales comme source de pistes chimiques [1, 2] .

Les plantes médicinales et aromatiques sont d'une grande importance économique; Et une réputation médicale sur les marchés mondiaux, car c'est une source majeure de médicaments et de produits chimiques efficaces qui sont utilisés dans la fabrication de médicaments et de médecine traditionnelle, et est utilisé à de nombreuses fins telles que le médicament, les cosmétiques, les huiles aromatiques et autres, et en raison de l'émergence d'effets secondaires graves qui sont nocifs pour les médicaments fabriqués chimiquement [3] .

La recherche scientifique est concentrée sur les antioxydants naturels comme traitement pour de nombreuses maladies plutôt que sur les médicaments synthétiques qui ont des effets secondaires [4] .

Il n'est plus nécessaire de prouver les bienfaits thérapeutiques des plantes. Actuellement, la majeure partie de la population mondiale, en particulier dans les pays moins développés et même en développement, dépend fortement aux remèdes traditionnels à base de plantes pour ses soins personnels.

L'un des continents avec la plus grande biodiversité dans le monde est le continent africain. La position biogéographique de l'Algérie offre un très haut niveau de diversité écologique et floristique. Près de 3 000 espèces, dont près de 653 espèces endémiques, se retrouvent dans près de 150 familles de cette flore [1] . D'un point de vue chimique et pharmacologique, le potentiel thérapeutique des plantes médicinales, qui regroupent des milliers d'espèces aux intérêts divers, est rarement investigué [5] .

Nous nous sommes intéressés à une espèce de la famille Fabaceae en ce qui concerne la valorisation des plantes algériennes. La famille des Fabacées est connue par sa richesse en nombreux métabolites secondaires, comme les saponines et les flavonoïdes [6] . La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce *Astragalus gombo*.

Ce genre contient 3000 espèces réparties dans des régions arides et continentales en Afrique, Asie et Amérique [7] . Il n'y en a que 40 espèces dans le Sahara. *Astragalus gombo* (Fabaceae), l'une de ces 40 espèces, est une plante vivace, c'est-à-dire commune et endémique, souvent utilisée comme fourrage pour les animaux [8] , est une plante bien représentée dans le désert de l'est du nord de l'Algérie (région d'Oued N'essa- Ouargla, Algérie). Malgré de

nombreuses publications sur la richesse en métabolites secondaires d'autres espèces appartenant au genre *Astragalus* et la description de leurs propriétés biologiques, aucune étude ne s'est intéressée sur l'espèce *A.gombo*

Dans ce contexte, ce travail de thèse qui s'inscrit dans le programme de recherche de notre laboratoire visant à valoriser le végétale locale, l'endémisme et l'utilisation potentielle en médecine traditionnelle restent nos principaux critères de sélection des plantes pour l'investigation phytochimique et biologique. Notre laboratoire a démarré un programme de recherche pour l'étude chimique et biologique de la plante *Astragalus gombo* bunge.

C'est dans cette perspective que se situe notre étude dont les objectifs spécifiques peuvent être résumés dans les sections suivantes :

- \_ Le screening phytochimique a été utilisé pour caractériser qualitativement les métabolites secondaires de la plante sélectionnée.
- \_ Préparation des extraits.
- \_ Quantification des phénols totaux, flavonoïdes et tanins par la méthode colorimétrique.
- \_ L'évaluation de l'activité antioxydante par différents tests.
- \_ Estimation d'inhibition d'  $\alpha$  -amylase des extraits
- \_ Evaluation de l'activité antiurolithiasique

Nous présentons ce manuscrit comme suit :

Le premier chapitre de ce manuscrit contient une synthèse bibliographique et botanique d'espèce *Astragalus gombo* et les travaux antérieurs.

Le deuxième chapitre est destiné aux généralités sur l'activité antiurolithiasique et le diabète.

Le troisième chapitre comporte les travaux personnels sur screening phytochimique des extraits, le dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins ainsi que l'étude de l'activité antioxydante d'extraits par la méthode spectrophotométrique (DPPH, réduction de Mo(VI) à Mo(V), ABTS et radical anion superoxyde et la méthode électrochimique (voltamétrie cyclique) pour l'inhibition de l'anion superoxyde et en fin l' Estimation l'activité d'inhibition d' $\alpha$ -amylase et l'étude cinétique de cette enzyme et Evaluation de l'activité antiurolithiasique par deux modèle : turbidimétrique et gravimétrique).

***RAPPEL***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

**I. la famille Fabaceae**

**I.1. Généralités**

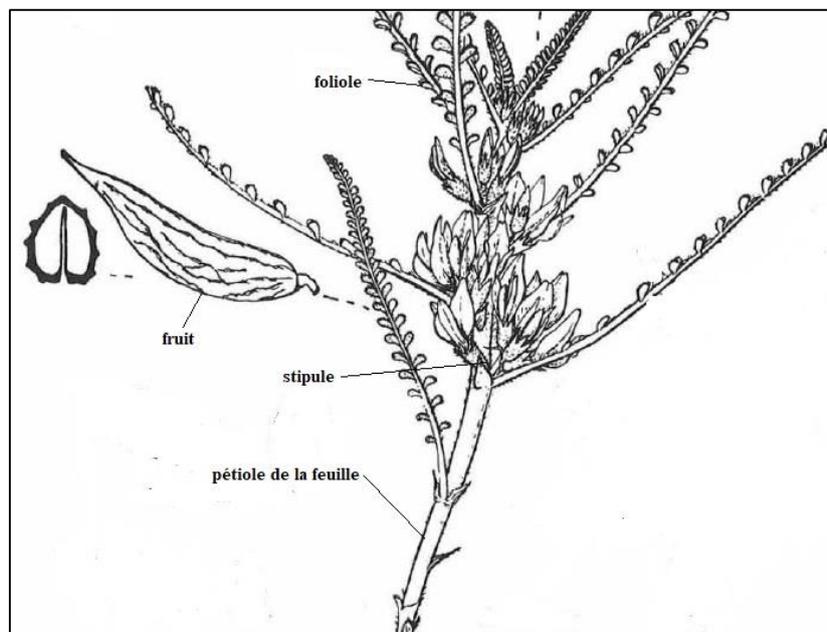
La famille des Fabaceae (De faba signifie haricot) , également connue sous le nom de Leguminosae (Légumineuses) est l'une des plus importantes du règne végétal [9], et communément appelée les "fabales" il contient 778 genres et environ 22 000 espèces distribué partout dans le monde [10] . un nombre de 53 genres et 339 espèces ont été recensés en Algérie [11] . Les Fabacées sont avec les Astéracées et les Orchidacées sont les plus importants groupes de Spermaphytes. Les experts s'accordent à dire que la superfamille en question peut être classée en trois groupes distincts. Alors que certains les classent tous dans la famille "Leguminosae" ou "Fabale", d'autres les divisent en trois sous-familles, à savoir "Cesalpinioideae", "Mimosoideae" et "Papilionoideae" (également connu sous le nom de "Faboideae") [12, 13]. D'autres font de ces trois groupes des familles « Césalpiniacées de 2 genres, Mimosacées de 2 genres et Papilionacées de 49 genres » dans l'Algérie. Les deux premières, les Césalpiniacées et Mimosacées regroupent surtout des buissons et des arbres tropicaux et subtropicaux comme : Mimosa, Acacia. La troisième, les Papilionacés comptent globalement des plantes herbacées, cosmopolites, elle est particulièrement bien représentée dans les zones tempérées comme : trèfles, pois, haricots [9-12] (voir le tableau I.1). La caractéristique unique des Fabaceae est qu'elles vivent en symbiose avec des bactéries installées dans les nodules racinaires (ou,moins fréquemment, caulinaires) et assimilant l'azote atmosphérique [13] .

**Tableau I.1 :** Dénombrements de genres et espèces des Fabacées recensés au niveau mondial et en Algérie

Sous familles	Dans le monde				En Algérie	
	Judd <i>et al.</i> (2002)		Spichiger <i>et al.</i> (2004)		Quézel et Santa (1962)	
	Genres	Espèces	Genres	Espèces	Genres	Espèces
<i>Cesalpinioideae</i>	150	2700	150 / 180	2200 / 3000	2	3
<i>Mimosoideae</i>	40	2500	50 / 56	3000	2	6
<i>Papilionaceae</i> = <i>Faboideae</i>	429	12615	440 / 500	12000	49	330
<b>Total</b>	<b>619</b>	<b>17815</b>	<b>640 / 736</b>	<b>17600</b>	<b>53</b>	<b>339</b>

## I.2. Description botanique des Fabaceae

Les plantes dicotylédones, dialypétales, superovariennes, herbacées ou arborescentes, annuelles, bisannuelles ou vivaces qui portent des fruits en forme de gousse ou de légume forment la famille ou la superfamille [13]. Selon (Judd, *et al.*) [10] les espèces de Fabaceae ont tendance à être des plantes herbacées, arbustives, arborescentes ou grimpantes avec des lianes ou des vrilles volubiles. Les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliées ; entières à parfois dentées – serrées à nervation pennée (Figure I.1). Typiquement hermaphrodites, les fleurs peuvent être régulières ou irrégulières. Le périanthe en a généralement deux ; Calice tubulaire ou en forme de cloche, persistant ou caduc, à cinq sépales formant parfois deux lèvres. La corolle est souvent composée de 5 pétales et zygomorphe, généralement papilionacée [11]. Le pétale supérieur (standard) chevauche le reste sur le bourgeon plus grand, souvent dressé. Deux pétales latéraux égaux (ailes) recouvrant deux pétales inférieurs (carène) souvent réunis par leur bord extérieur. 5-10 les étamines sont très nombreuses, très souvent à filaments soudés en un tube staminal, fendu ou non, contenant l'ovaire et lui-même contenu dans la carène (voir la Figure I.2). Le fruit le plus souvent une gousse, parfois une samare, un fruit momentané, une gousse indéhiscente, un akène, une drupe ou une baie [10], et la graine est presque toujours exalbuminée [14]. Les inflorescences sont presque toujours indéterminée.



**Figure I.1:** Description des composantes d'une feuille de légumineuse [9]

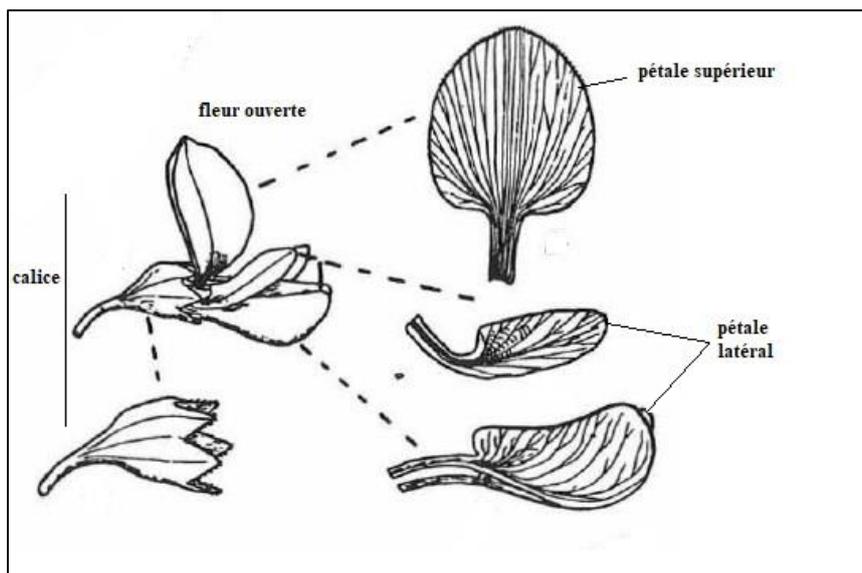


Figure I.2: Description des composantes d'une fleur de Papilionacées [9]

### I.3. Le genre *Astragalus*

#### I.3. 1. Répartition géographique de genre *Astragalus*

*Astragalus* est le plus grand genre de la famille Fabaceae et l'un des plus grands genres de plantes vasculaires sur terre [15]. La répartition géographique de ce genre a été signalée, estimée à 3064 espèces, réparties principalement dans les régions froides à chaudes arides et semi-arides de l'hémisphère nord [16]. La prédominance de l'espèce se trouve en Asie du Sud 1500 espèces, suivie de l'Europe avec 500 espèces, de l'Amérique du Nord avec 500 espèces et de l'Amérique latine avec 500 espèces. Ainsi, 150 espèces peuvent être trouvées le long de la cordillère des Andes. Dans les pays du bassin Méditerranéen, 500 espèces ont été décrites dont une centaine sont localisées en Afrique du Nord et une quinzaine plus spécifiquement au Sahara environ 40 espèces de ce genre, dont *Astragalus gombo* Coss. & Dur, se trouvent en Algérie. Dans les pâturages sablonneux arides et désertiques d'Algérie, cette plante vivace endémique s'épanouit [11].



**Figure I.3 :** Répartition géographique des espèces appartenant au genre *Astragalus* [17]

### I.3.2. Propriétés pharmacologiques du genre *Astragalus*

Le genre d'*Astragalus L.* est connu pour contenir différents métabolites biologiquement actifs en tant que principes pharmacologiquement actifs tels que les saponines, les flavonoïdes et les polysaccharides [15, 18], ils sont connus comme immunostimulants [19], antiviraux [20], antiprotozoaires [21], cicatrisants [22], anti-inflammatoires [23] et possèdent des activités cytotoxiques [24]. De plus, les composés toxiques comprennent les alcaloïdes imidazoliniques, les composés nitro aliphatiques et le sélénium [6].

Diverses substances pharmacologiques ont été isolées des des feuilles, racines, des graines et des gousses d'astragale. Les polysaccharides (dont les galactomannanes), les saponines, les acides aminés, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les alcaloïdes, les oligo-éléments, les astragalosides et les terpènes ont tous été déclarés constituants actifs, démontrant le haut potentiel pharmacologique de ce genre [17]. Certaines de ces espèces d'*Astragale* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies - par exemple, le diabète sucré, la néphrite et la leucémie [6, 25, 26]. En raison de leurs activités antioxydantes qui protègent les cellules contre les dommages des radicaux libres [27-29]. Et des activités biologiques telles que les activités antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires et diurétiques [30].

### I.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Astragalus* ont longtemps été utilisées comme plantes médicinales dans la médecine populaire de nombreux pays comme remèdes cardiovasculaires, antihypertenseurs, diurétiques, cholérétiques, ainsi que comme remèdes antimicrobiens et antiviraux [31].

Le genre *Astragalus* est l'une des herbes les plus cruciales pour le traitement des néphrites, du cancer, de l'utérus, du diabète et de la leucémie. Les plantes d'astragale sont fréquemment mentionnées dans la médecine traditionnelle chinoise. De plus, il est fréquemment utilisé en cuisine (soupes, thés) [17].

En médecine traditionnelle, les racines séchées de certaines espèces d'*Astragale* (*Radix Astragali*) sont bien connues pour le traitement contre les morsures d'animaux et les poisons, les maladies, les maladies oculaires, les plaies et les brûlures, la cirrhose, la néphrite, le diabète sucré, l'hypertension, de la gorge, le cancer de l'utérus et la leucémie [32].

La racine d'astragale est un médicament très ancien et bien connu de la médecine traditionnelle chinoise. Elle a été utilisée pour améliorer la résistance aux infections et pour aider à lutter contre les troubles immunologiques et les infections virales, et comme hépatoprotecteur. Il stimule également le système circulatoire et agit comme un tonique cardiaque. Il est spécifiquement utilisé pour les symptômes de transpiration excessive, de prolapsus des organes internes et du rectum, et pour accélérer la guérison des brûlures et des abcès, ainsi que miction déficiente [15].

Une place particulière est accordée aux racines séchées de certaines espèces du genre *Astragalus* sont appelées *Astragali Radix* incluant *A. membranaceus* (Fisch.) est une autre espèce d'*Astragalus* répertoriée dans la pharmacopée chinoise. Il est utilisé comme tonique contre la polyurie et les vertiges. Les espèces d'astragale sont également utilisées en médecine traditionnelle en Bulgarie, en Russie et dans d'autres pays européens et asiatiques. Dans la médecine chinoise moderne, il est utilisé dans la thérapie *Fu Zheng* pour améliorer les paramètres du système immunitaire et c'est le promoteur le plus fréquemment utilisé pour d'autres thérapies à base de plantes. Parce que ses propriétés sont quelque peu similaires à celles des herbes plus chères ginseng (*Panax ginseng*), il a été utilisé comme substitut de cette espèce. L'astragale est tenu en haute estime par les Chinois, qui l'ont incorporé dans de nombreuses

autres formules médicinales. Les herboristes peuvent suggérer d'utiliser cette plante pendant le traitement par chimiothérapie car elle stimule le système immunitaire [25, 33, 34].

Dans la médecine populaire turque, les racines des espèces d'*Astragale* sont utilisées pour le traitement de la leucémie et pour la cicatrisation des plaies [35]. *A. corniculatus* est utilisé par la médecine traditionnelle bulgare comme diurétique pour le traitement de l'hypertension [36]. Des troubles rénaux, des maladies nerveuses et des rhumatismes, ainsi que comme diaphorétique. La préparation de comprimés d'hydrogel à base d'oxyde de polyéthylène avec extrait sec standardisé d'*A. corniculatus* a été développée [37], *A. exscapus* est utilisé en médecine traditionnelle en France et dans la région d'Odessa en Ukraine pour le traitement de la syphilis, des rhumatismes, des troubles cutanés, des douleurs articulaires et comme diurétique et sudorifique [31].

#### I.3.4. Quelques activités biologiques reconnues

Les plantes du genre *Astragalus* sont réputées pour leur richesse en flavonoïdes, saponines et polysaccharides, métabolites secondaires aux activités biologiques diverses et intéressantes [31]. En renforçant l'immunité à la fois *in vitro* et *in vivo*, les polysaccharides sont dotés de propriétés antitumorales [38].

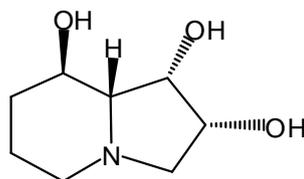
En Egypte, il existe 32 espèces du genre *Astragalus* [39, 40], ont démontré des activités immunostimulatrices, antivirales et cardiovasculaires. Ainsi, l'extrait brut d'*A. Kahiricus* démontre une cytotoxicité reproductible contre le cancer de l'ovaire de la lignée cellulaire A 2780 [24].

Une étude biologique sur des extraits et des flavonoïdes d'*A. adsurgens* a révélé une cytotoxicité contre la leucémie de la ligne cellulaire HL-60 et l'hépatome de la ligne cellulaire SMMC-7721. Quelques flavonoïdes ont également démontré des propriétés antibactériennes [41].

Selon des études biologiques, certaines espèces de ce genre (*A. trojanus*) contiennent des triterpènes glycosylés avec des oléanane et des squelettes cycloartane isolés qui se sont avérés avoir d'activités immunostimulantes [19, 35, 42], anti-protozoaires [20, 43], antivirales [21], cytotoxique [24], cardiotonique [44] et adjuvante comme *A. oleifolius* DC et *A. trojanus* Stev [45].

### I.3.5. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Astragalus*

D'un point de vue chimique le genre *Astragalus* apparaît très uniforme, avec deux types de principes pharmacologiquement actifs et trois types différents de composés toxiques. Dans le premier groupe se distinguent les polysaccharides et les saponines, et dans le second, les alcaloïdes indolizidine (swainsonine et son dérivé N-oxyde, et lentiginosine) (voir la Figure I.4) les composés nitro endécaphyllines (dérivés acide nitropropionique-glucose) et 3- nitropropyl-glucosides, et les dérivés sélénifères (sélénio-cystéine, -cystathionine, -cystine, et- méthionine). Il existe d'autres composés très importants, tels que les flavonoïdes (flavones, flavonols, flavylions et isoflavones) sous formes libres et glycosidiques ; sans ptérocarpanes et sous forme de glucosides ; et les dérivés d'acides organiques (acide homopilosinique et acidephaséique) [24].



**Figure I.4 :** Swainsonine

Les polysaccharides d'*A. membranaceus* sont les plus connus et plusieurs groupes de recherche les ont isolés et purifiés. Fang et al. A isolé l'astragale I, II et III à partir de l'extrait d'*A. mongholicus*. *membranaceus* var. *L'astragalan* I est un polysaccharide composé de D-glucose, de D-galactose et de D-arabinose dans un rapport molaire de 1.75:1.63:1, avec un poids moléculaire de 36 300, tandis que l'astragale II et III sont composés de D-glucose uniquement, avec poids moléculaires de 122 300 et 34 000 respectivement [25]. Tomoda et al. ont purifié un glycone de l'extrait d'eau chaude des racines de *A. membranaceus*, constitué principalement de L-arabinoside, D-galactose, L-rhamnose et acide D-galacturonique dans un rapport molaire de 6:9:8:30 [46], Shimizu et al. ont isolé un polysaccharide acide d'*A. mongholicus*, composé de L-arabinoside, D-galactose, acide D-galacturonique, acide D-glucuronique dans un rapport molaire de 18:18:1:1, plus de petites quantités de groupes acétyle et fraction peptidique [47]. Les Triterpènes et les Saponines sont les métabolites secondaires les plus étudiés. Une 40 de saponines principalement dérivées de la forme 20R,24S du cycloastragénol, nommées astragalosides, et plus rarement de la forme 20S,24R, nommée astramembrainnines (Figure I.5 et I.6). Six composés avec le squelette oléanane ont été rapportés [24].

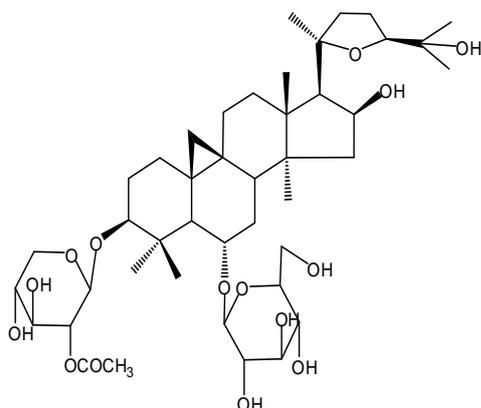


Figure I.5: Astragaloside II

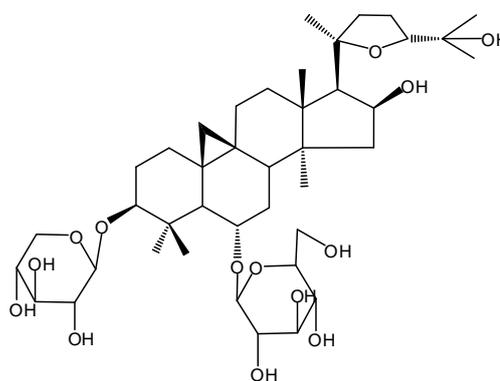
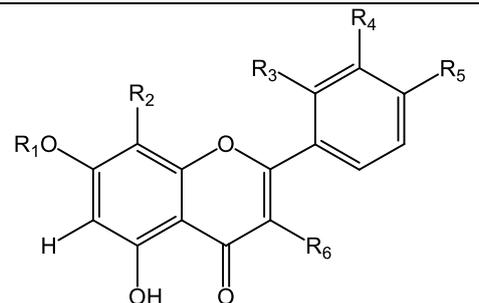


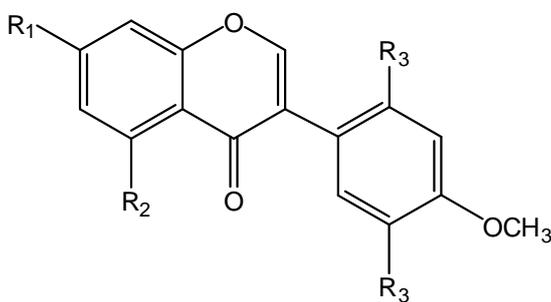
Figure I.6 : Astramembrainnine I

Divers métabolites secondaires ont été identifiés dans ce genre (*Astragalus*), Il a été rapporté qu'une série de saponines triterpéniques de types oléane et cycloartane ainsi que des flavonoïdes ont été isolées dans des études antérieures réalisées sur des espèces d'*Astragalus* [49 ,48]. Le tableau I.2 présente les différents métabolites secondaires isolés de plantes du genre *Astragalus*.

Tableau I.2: Flavones isolés de *Astragalus*

								
Composés	R1	R2	R3	R4	R5	R6	l'espèce	Réf
Kaempférol	H	H	H	H	OH	rha <sup>1-6</sup> glc	<i>A. cruciatus</i>	[50]
						rha <sup>1-4</sup> rha <sup>1-6</sup> glc		
						H	<i>A. corniculatus</i>	[51]
						Glc		
						rha <sup>1-6</sup> gal		
	rha	H	H	H	OH	rha <sup>1-6</sup> [rha <sup>1-2</sup> ]gal	<i>A. shikokianus</i>	[54]
						rha <sup>1-2</sup> gal		
						rha <sup>1-6</sup> gal		
	CH3	H	H	H	OH	rha <sup>1-2</sup> gal	<i>A. gombiformis</i>	[55]
						rha <sup>1</sup> O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- <sup>6</sup> gal		
rha <sup>1</sup> O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- <sup>6</sup> gal								
xylo <sup>1-3</sup> rha <sup>1-6</sup> apiofur <sup>1-2</sup> gal								
Isorhamnétine	H	H	H	OCH3	OH	rha <sup>1-6</sup> glc	<i>A. annularis</i>	[57]
						Glc		
						H	<i>A. corniculatus</i>	
Quercétine	H	H	H	OH	OH	OH	<i>A. corniculatus</i>	[51]
						rha <sup>1-6</sup> glc		
						Glc		
						Gal		
	CH3	H	H	OH	OH	rha <sup>1-6</sup> gal	<i>A. verrucosus</i>	[53]
						rha <sup>1-2</sup> gal	<i>A. gombiformis</i>	[55]
Gal								
rha <sup>1</sup> O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- <sup>6</sup> gal								
Apigénine	H	glc	H	H	OH	H	<i>A. corniculatus</i>	[51]
		H					<i>A. verrucosus</i>	[53]
Lutéoline (Orientine)	H	glc	H	OH	OH	H	<i>A. corniculatus</i>	[51]
Eriodyctiol	glc	H	H	OH	OH	H		

**Tableau I.3:** Flavanones isolés du genre *Astragalus*

			
Composés	Parties étudiées	l'espèce	Réf
diméthoxyflavanone	Plante entière	<i>A. adsurgens</i>	[58]

**Tableau I.4:** Isoflavones isolés de *Astragalus*

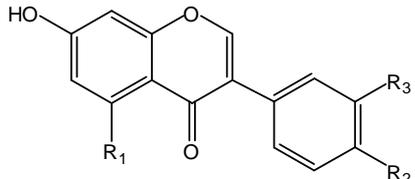
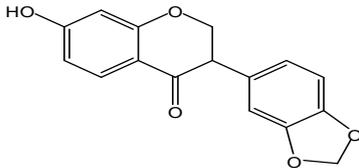
						
Composés	R1	R2	R3	R4	l'espèce	Réf
Isoflavone	OH	OH	H	H	<i>A. adsurgens</i>	[41]
	OCH	H	OH			
Calycosine	H	H	H	OH	<i>A. verrucosus</i>	[53]
Ononine			glc	H		
Daidzéine	H	OH	H			
Génistéine	OH					
Pratenseine		OCH <sub>3</sub>	OH			
Pseudobaptigénine						

Tableau I.5: Chalcones isolés de *Astragalus*

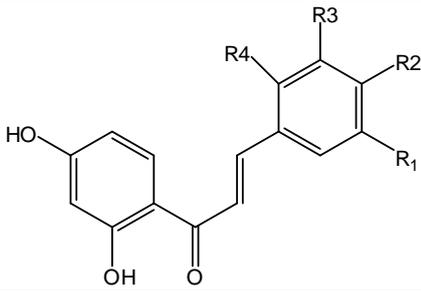
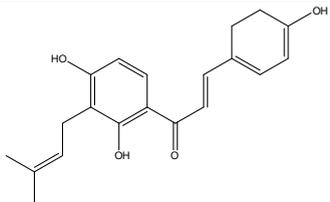
						
Composés	R1	R2	R3	R4	l'espèce	Réf
Chalcone	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	<i>A.adsurgens</i>	[41]
	H	OH				
		H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		
Astradurnine						

Tableau I.6: Flavanes isolés de *Astragalus*

l'espèce	Parties étudiées	Composés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	Planteentière	isoflavane (1)	[41]
<i>A. trimestris</i>	Partiesaériennes	8-méthoxyvestitol (2)	[57]
<i>A.depressus</i>	Racines	Pendulone (3)	[59]

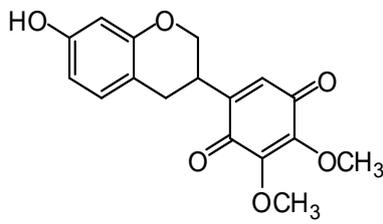
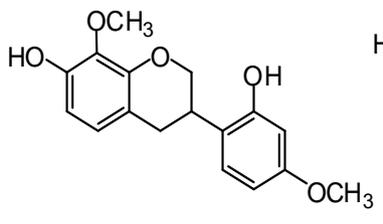
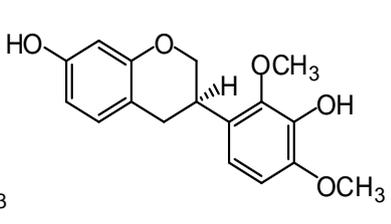
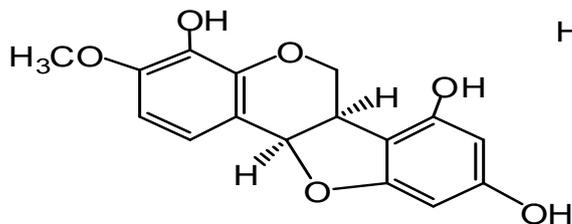
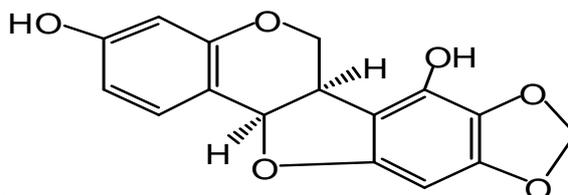
		
(3)	(2)	(1)

Tableau I.7: Ptérocarpanes isolés de *Astragalus*

l'espèce	Parties étudiées	Composés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	Planteentière	MelilotocarpaneB (51)	[41]
<i>A. verrucosus</i>	Parties aériennes	Maackiaïne (52)	[53]



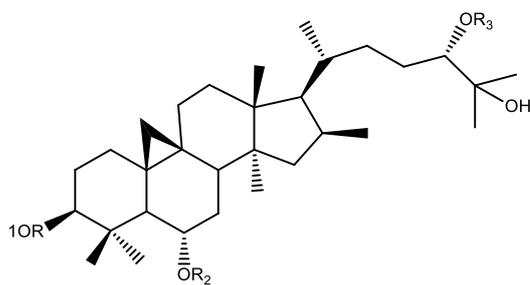
(51)



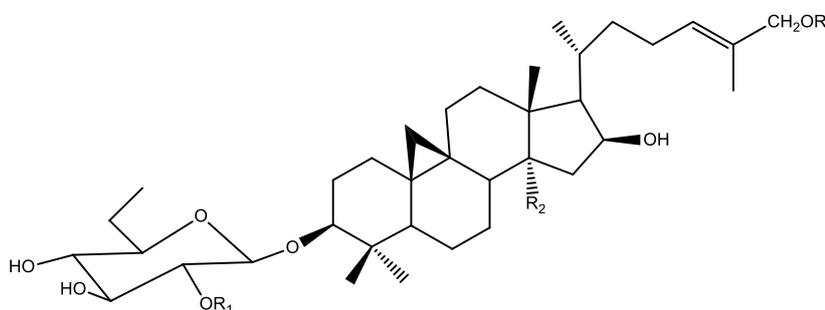
(52)

Tableau I.8: Saponines à squelette cycloartane isolés de *Astragalus*

Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	l'espèce	Réf
cycloartane	arab <sup>1-2</sup> -xyl	H	OH	H	<i>A. campylosema</i>	[56, 60]
			OCOCH <sub>3</sub>			
		COCH <sub>2</sub> OH	HGle			



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	l'espèce	Réf
cycloartane	xyl	xyl	H	<i>A.hareftae</i>	[48]
		glc	H		
		xyl	H		
Oleifolioside	arab <sup>1-2</sup> xyl	xyl	H	<i>A.oleifolius</i>	[20]



Composés	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	l'espèce	Réf
Kahiricoside	H	H	H	<i>A. kahiricus</i>	[24]
		Ac	Ac		



Tableau I.10: Stérols isolés de *Astragalus*

l'espèce	Parties étudiées	Composés	Réf
<i>A. trimestris</i>	Parties aériennes	Stigmastérol (1)	[57]
<i>A. sieversianus</i>	Racines	$\beta$ -sitostérol (2), Daucostérol (3)	[65]

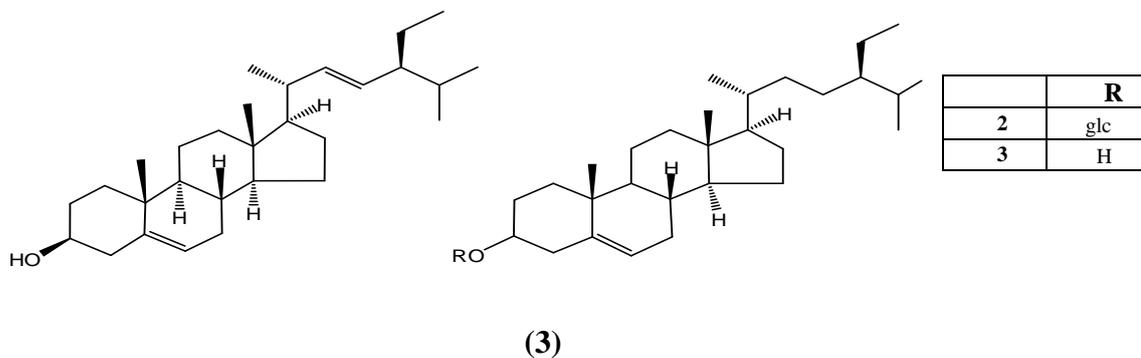
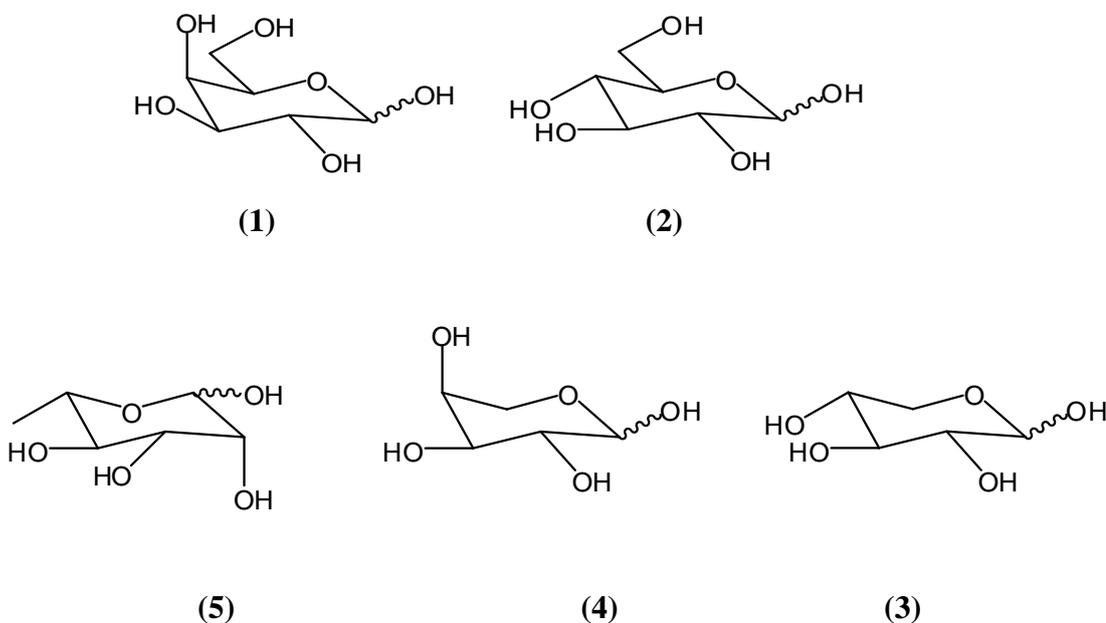


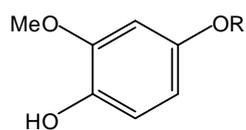
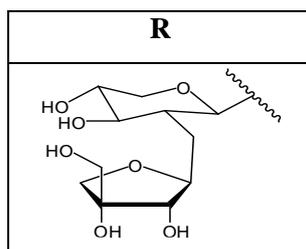
Tableau I.11: Carbohydates isolés du genre *Astragalus*

l'espèce	Parties étudiées	Composés	Réf
<i>A. sciureus</i> <i>A. submitis</i>	folioles, Racines	Galactose(1), Glucose(2)	[66]
<i>A. pauxillis</i>		Xylose(3), Rhamnose(4), Arabinose(5)	

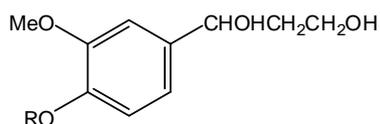


➤ Autres composés

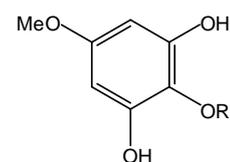
l'espèce	Parties étudiées	Composés	Réf
<i>A. zahlbruckneri</i>	Racines	Glucopyranoside: (1) , (2), (3), (4), (5),(6), (7), (8)	[67]
<i>A.membranace</i>	Racines	gentisine(5) Emodine(6)	[7]
<i>A.asper</i>	Parties aériennes	acide cafféique (7) , Acidechlorogénique(8)	[52]



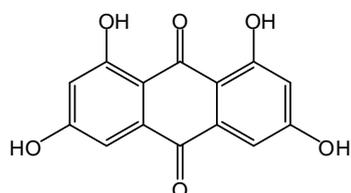
(3)



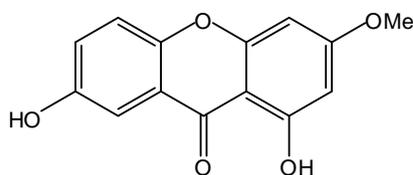
(2)



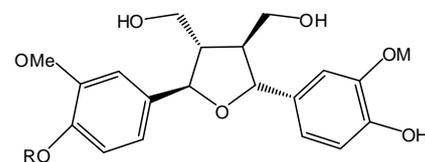
(1)



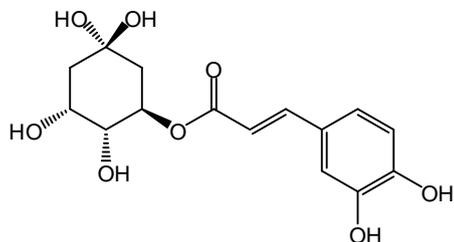
(6)



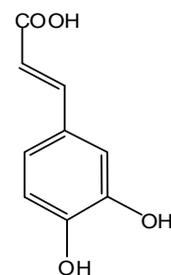
(5)



(4)



(8)



(7)

**I. 4. Présentation de la région d'étude Vallée du N'essa**

La province d'Ouargla est l'une des principales oasis du désert algérien, où se situe notre zone d'étude. Elle est à 800 kilomètres de la capitale et située au sud-est de l'Algérie. Ses limites sont les wilayas d'El Oued au nord-est, Djelfa au nord-ouest, Illizi au sud-est et Ghardaa à l'ouest. Il a une superficie totale de 163 238 km<sup>2</sup>. Sa situation géographique sont : 31°54' à 32' Nord et latitudes de 5°15' à 5°27' Est [68] (voir la Figure I.7).

Vallée du N'essa au nord de Ouargla et dont couvre son bassin versant Vallée du N'essa une superficie de 7800 Km<sup>2</sup>, Cette Vallée est située sur une longueur d'environ 100 Km.à la longitude 32° 32' Nord et latitudes de 5° 21' Est [69]. Il coule dans trois directions différentes : ouest-est dans le cours supérieur, nord-ouest-sud-est dans le cours moyen, et encore une fois vers l'Est dans le cours inférieur avant d'entrer dans le Sabkhet Safioune [70].



**Figure I.7** : Situation géographique de la zone d'Ouargla [70]

### I. 4.1. *Astragalus gombo*

#### I.4.2. Systématique d'*Astragalus gombo* [71] :

- Règne : Plantae (végétal)
- Embranchement : Spermatophytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dialypétales
- Ordre : Fabales
- Famille : Fabaceae
- Sous famille Papilionaceae
- Genre : *Astragalus*
- Espèce : *A.gombo*
- Nom scientifique : *Astragalus gombo*
- Nom vernaculaire : Faila (الفيلة)

#### I. 4. 3. Description botanique d'*Astragalus gombo*

L'espèce *Astragalus gombo* Cosse et Dur (Bunge) est une plante vigoureuse au port dressé de 10 à 50cm de haut (Figure I.8) à port chamaephytique dont les bourgeons se situent près du sol, elles sont de couleur claire, pourvues de très longues feuilles de couleur vert clair, avec de très nombreuses petites folioles. Les pétioles robustes perdant leurs folioles deviennent coriaces et piquant à l'extrémité [9], aux tiges dressées, tomenteuses (cotonneuses) recouvertes de poils épais blancs. Des grappes axillaires jaunes et denses de fleurs papilionacées sont présentes. La caractérisation du fruit est cruciale, comme c'est le cas pour toutes les espèces d'astragale. Les grappes de fleurs papilionacées jaunes en grappes axillaires denses sont La gousse a des parois épaisses, est ligneuse, gonflée, extrêmement dure et est complètement divisée en deux moitiés par une coupe longitudinale. Il est également recouvert d'un duvet soyeux de plus d'un centimètre de diamètre. Il a une forme extérieure avec des veines apparentes qui se terminent par un bec fort [9, 11] *Astragalus gombo* est une espèce endémique saharienne [9] elle pousse sur le plateau, dans les lits sablonneux des oueds, ou les éboulis de falaises [72].

Elle forme parfois d'importants pâturages après la pluie et résiste longtemps dans certains oueds, Elle est bien appréciée par les animaux, notamment, le dromadaire [73].

L'espèce saharienne endémique *Astragalus gombo* [9] pousse sur les plateaux, dans les oueds ensablés et sur les les éboulis des falaises [72]. Dans certains oueds, il peut persister très longtemps et créer des pâturages importants après la pluie. Les animaux, surtout le dromadaire, en sont friands [73].



**Figure I.8 :** *Astragalus gombo*

#### **I.4.4. Les métabolites primaires d'*Astragalus gombo***

Les racines de la plante d'astragale sont utilisées comme remède médicinal et, en raison de son importance, des recherches pharmacologiques et botaniques approfondies ont été menées à son sujet.

Il contient également plusieurs éléments actifs, dont des acides aminés, des sucres et des traces de minéraux.

Les substances efficaces et peu toxiques sont appelées polysaccharides. Selon de nombreuses études, les polysaccharides présentent des propriétés bioactives telles que antioxydants, antitumoraux, effets antibactériens, anti-hyperglycémiques, et anti-inflammatoires [74], laissent apparaître des traces de lipide, Une teneur en protéine pour la racine et pour la tige, et des teneurs considérables en éléments minéraux (Na, K, Ca), Une teneur en sucre totaux, et la teneur de fibre.

Le *gombo Astragalus* est connu pour sa bonne importance nutritionnelle pour les animaux des zones désertiques arides qui le consomment sous forme de pâturage libre, car il contient une quantité de fibres et de protéines brutes [8].

#### **I.4.5. Les métabolites secondaires d'*Astragalus gombo***

Les métabolites secondaires les plus fréquemment trouvés dans l'espèce *Astragalus* sont les saponines triterpènes et sapogénines. Les parties aériennes ont été utilisées dans une étude phytochimique. Neuf composés naturels, dont sept saponines triées dans le squelette

cycloartane, à partir d'extrait de n-butanol d'*Astragale gombo* cos. & Dor (région de Biskra) a été isolé. Six s'est avéré être le premier. Les deux substances restantes sont des flavonoïdes, ou plus spécifiquement, des flavonols o-glycosylés [75]. Etudes phytochimiques précédentes et principaux métabolites secondaires isolés.

#### I.4.6. Etudes phytochimiques précédentes et principaux métabolites secondaires isolés

D'après une étude approfondie de la littérature que nous avons menée sur l'espèce *Astragalus gombo*, qui a montré sa richesse en flavonoïdes et terpènes [76] Tableau I.12.

Tableau I.12: Flavones isolés du l'espèce *Astragalus gombo*

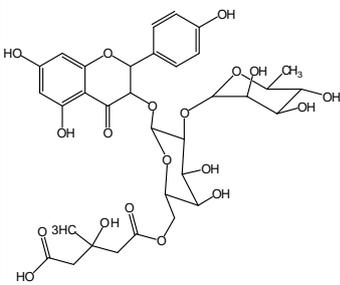
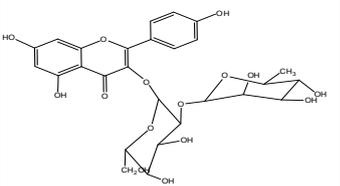
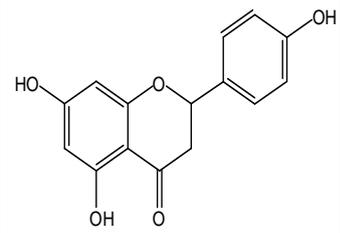
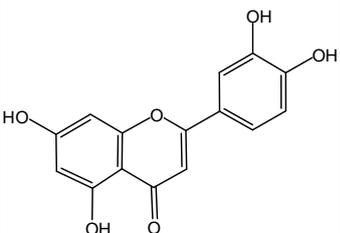
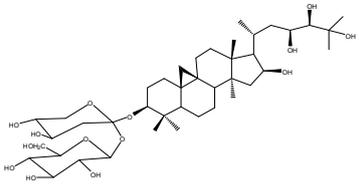
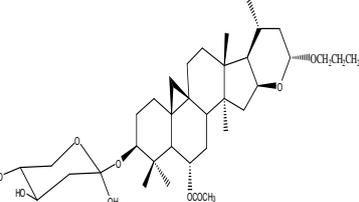
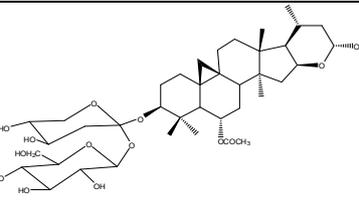
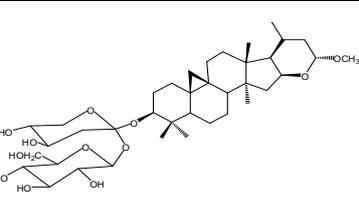
Structure de Composé	Composés identifiés	Parties étudiées	La région	Réf
	<b>Kaempférol</b>	Parties aériennes	Biskra	[75]
				
	<b>Apiegenin</b>	Parties aériennes	Ghardaïa	[76]
				

Tableau I.13: Saponines à squelette cycloartane isolés de l'espèce *Astragalus gombo*

Structure de Composé	Composés identifiés	Parties étudiées	La région	Réf
	<b>cycloartane</b>	parties aériennes	Biskra	<b>[63]</b>
				
				
				

#### I. 4. 7. La composition minérale d'*Astragalus gombo*

En ce qui concerne le profil minéral, les espèces d'*Astragalus*, en particulier les jeunes plants d'astragale récoltés au stade végétatif et les feuilles des plantes à pleine floraison, sont une bonne source d'éléments alimentaires importants tels que (Ca, Mg et Fe). Il est à noter que les valeurs en fer pour les jeunes plants d'*Astragale* étaient plus élevées que celles d'autres plantes largement utilisées dans les aliments, y compris les épinards qui sont considérés comme une riche source de Fe, ou dans de nombreuses plantes médicinales [75 ,73] .Cette découverte est importante car la carence en Fe est considérée comme l'un des dix principaux problèmes de santé dans la société moderne, étant particulièrement repas pour les femmes en âge de procréer [72,75].

#### I. 4. 8. Activités Pharmacologiques d'*Astragalus gombo*

Plusieurs constituants des astragales pharmacologiquement actifs, telles que les polysaccharides et les saponines, ont des effets antiviraux, immunostimulants et hépatoprotecteurs [6].

Les huiles essentielles de la partie aérienne d'*Astragalus gombo* renferment quelques composés actifs comme l' $\alpha$  pinène, le camphène et le terpinène-4-ol possédant des activités antibactérienne et anti-inflammatoire et le  $\gamma$ -terpinène possédant une activité antioxydante [75,77, 78].

Pour expliquer certaines des utilisations thérapeutiques traditionnelles d'*Astragalus gombo*, les caractéristiques biologiques de certains polysaccharides extraites ont été étudiées, comme le galactomannane des graines de cette plante, qui a montré une bonne activité antioxydante dans le test DPPH par rapport aux vitamines C.

L'effet inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase a été mesuré à l'aide des fractions pectiques et hémicellulosiques isolées des tiges d'*Astragalus gombo*, qui ont eu un bon effet inhibiteur sur cette enzyme [17].

#### I. 4.9. Toxicité

La majorité des astragaux sont non toxiques. Certaines espèces, comme *Astragalus nuttalianus* et l'*Astragalucitre* trouvées dans le sud-ouest et l'ouest des États-Unis, sont respectivement utilisées comme espèces de pâturage et sont très considérées par les bovins [79]. Il en va de même pour les espèces d'*Astragalus Gyzensis* Bunge. De plus, *Astraglus Gombo* Bunge, qui peut être Situé dans le nord du Sahara Algérien [80].

Les espèces toxiques de ce genre ont été divisés en groupes, selon la nature du principe toxique et de leurs effets sur les animaux [16] :

- espèces causant un empoisonnement par l'acacia (des alcaloïdes indolizidiques, la swainsonine)
- espèces qui synthétisent des composés nitro aliphatiques, et leurs glycosides, sous forme de misérottoxine.
- espèces qui accumulent du Sélénium.

**I.4. 10. Activité Antioxydante d'*Astragalus gombo***

Il existe une étude menée par (Tayeb., *et al* ) sur huiles essentielles la partie aérienne d'*Astragalus gombo* pour deux régions de Sidi Bouzid et Sbitla (Tunisie), portant sur le test de l'activité antioxydant par le test DPPH, car elle a montré de bons résultats contre ce test. Cela pourrait être dû au composé principal majeur, le phytol [81].

***ACTIVITÉ  
ANTIUROLITHIASIQUE ET  
ANTIDIABÉTIQUES***

## II.1. Généralités sur la maladie lithiasique

### II.1.1. Historique

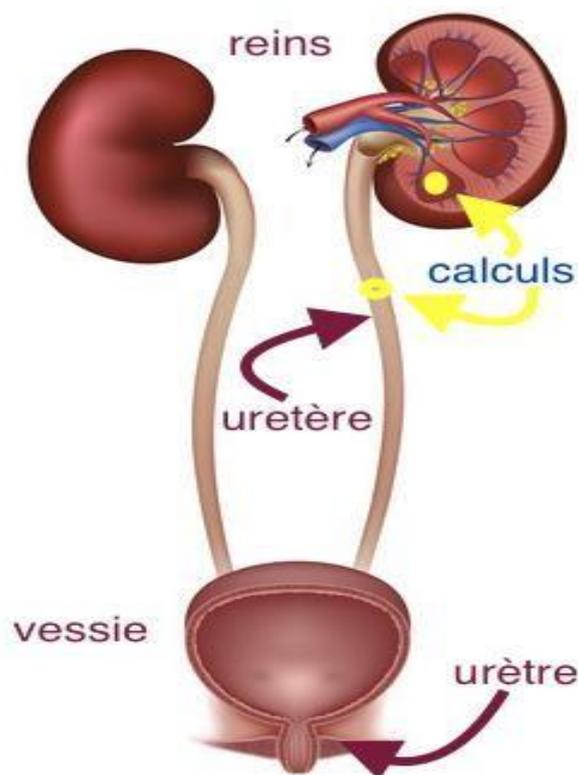
Depuis les temps les plus reculés, La maladie lithiasique est bien connue et est indissociable liée à l'histoire humaine [82]. La découverte d'une pierre vésicale dans la tombe d'un jeune garçon en Égypte il y a environ 4 000 ans a marqué le début de l'histoire de la lithiase. Deux cas supplémentaires trouvés en Inde à partir de 1500 av. J.-C mélangés avec les restes d'une femme décédée en couches [83].

L'antiquité : La lithiase a été mentionnée dans des textes remontant à l'Ancien Testament en Inde et en Grèce, car Hippocrate recommandait des diurétiques abondants.

### II.1.2. Lithiase et calcul

L'origine du mot " Lithos "est grecque et signifie pierre. La formation de calculs au niveau des voies urinaires est appelée le terme lithiase, ou elle survient lors de la sédimentation anormale de l'urine, ainsi que le résultat de microbes qui provoquent une infection des voies urinaire [84].

De petites pierres appelées pierres sont créées dans les reins par des cristaux trouvés dans l'urine. La probabilité que les cristaux entrent en collision et forment des calculs, ce qui peut provoquer des douleurs, des saignements, une infection des voies urinaires ou une obstruction du flux urinaire, augmente avec la concentration d'urine [85]. Ces cristaux, qui peuvent également être découverts dans le reste des voies urinaires : dans la vessie , l'urètre ou les uretères, sont appelés par les médecins lithiase urinaire [86] (Figure II.1).



**Figure II.1:** Localisation des calculs dans le système urinaire [86]

La formation de calculs rénaux est un complexe qui résulte d'une succession de plusieurs événements physico-chimiques dont la sursaturation, l'agrégation et la rétention dans les reins. Plus de 10% des habitants des villes industrielles souffrent de calculs urinaires [87].

Le calcul se forme au cours de plusieurs mois ou années. Cela commence par la formation d'un noyau autour des déchets cellulaires dans le rein. Suite à l'agrégation des cristaux, ces cristaux se fixent ensuite aux parois des cellules tubulaires de la papille rénale. Différents constituants de l'urine sont susceptibles de cristalliser : calcium(Ca), oxalates(Ox), ammonium, sodium, phosphate, cystine, urate [86, 88].

Par conséquent, l'analyse des calculs est nécessaire pour mieux évaluer la progression de la maladie lithiasique et ses relations avec les pathologies ou les facteurs de risque qui contribuent à son émergence [82]. Compte tenu du caractère récidivant de l'affection et de l'évolution péjorative silencieuse de la fonction rénale, une enquête étiologique reste nécessaire et systématique pour chaque patient lithiasique. Cela passe par l'analyse du calcul et la recherche des facteurs de risque lithogéniques à partir des données cliniques, radiologiques et biologiques [89].

Cependant, sa localisation anatomique, sa fréquence ainsi que sa composition chimique varieront largement en fonction des conditions climatiques, des conditions socioéconomiques,

des moyens de médicalisation disponibles ainsi que des habitudes alimentaires et des facteurs génétiques [90-93].

Pour identifier les conditions pathologiques responsables de la formation des calculs, il est nécessaire d'examiner attentivement la structure et déterminer la composition quantitative et qualitative du principal témoin de la maladie qui est le calcul [91, 94-96].

Etapes de la lithogénèse :

Il y a sept étapes dans le processus de lithogénèse qui se produisent séquentiellement ou simultanément lors de la formation d'une pierre. Voici ces étapes [97] :

La sursaturation des urines, la germination cristalline, la croissance des cristaux, l'agrégation des cristaux, l'agglomération cristalline, la rétention des particules cristallisées, la croissance du calcul.

### II.1. 3. Inhibiteurs et promoteurs de la lithogénèse

La présence de cristaux dans l'urine indique une rupture de l'équilibre entre les inhibiteurs et les catalyseurs

- Promoteurs : Ce sont des ions qui contribuent à la formation de substances insolubles qui sont des promoteurs de cristallisation. Ils se combinent fréquemment en groupes de deux ou trois pour créer une substance qui peut cristalliser et qui, à son tour, peut avoir en plusieurs espèces cristallines [98]. (Figure II. 2)

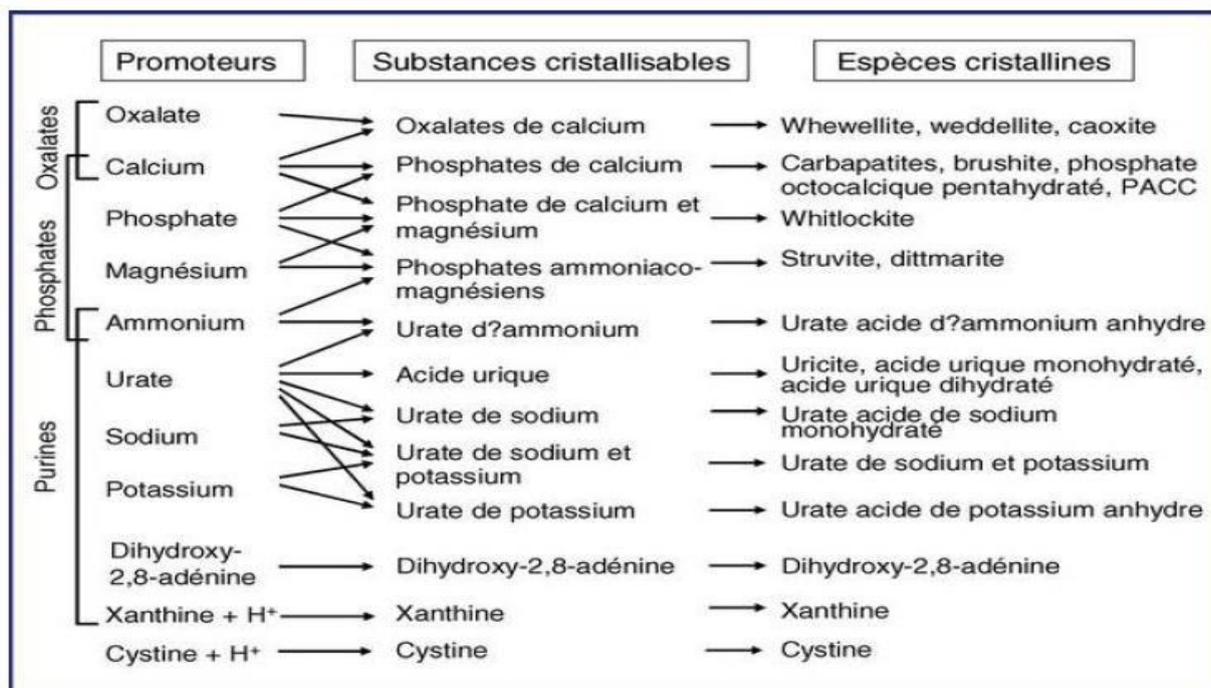


Figure II. 2 : Promoteurs et espèces cristallines et substances cristallisables [98]

➤ Inhibiteurs :

Ce sont des molécules qui ralentissent la croissance des cristaux et augmentent le seuil de sursaturation qui initie la nucléation [99]. Bien qu'il existe des inhibiteurs chez les personnes normales et les patients atteints de lithiase, mais ils sont moins efficaces pour prévenir la formation de cristaux, leur présence peut être moindre comparativement aux promoteurs, ou leur composition structurelle peut changer [100]. Il se divise en deux classes : les composés ioniques forment un complexe qui réduit la sursaturation et est facilement soluble dans les matériaux cristallisés. Ainsi, le composé de citrate de calcium empêche l'apparition de cristallisation et réduit ainsi la formation de calculs [101]. Les deux familles chimiques des glycoaminoglycanes et des glycoprotéines appartiennent aux inhibiteurs de haut poids moléculaire, qui bloquent à leur tour les sites de croissance situés à leur surface (tableau II.1) [102].

**Tableau II.1:** Inhibiteurs de la cristallisation

Inhibiteurs de faible poids moléculaire	cible	Inhibiteurs macromoléculaires	cible
Mg <sup>2+</sup>	OxCa	Uropontine	OxCa, PCa
Fe <sup>3+</sup>	OxCa	Néphrocalcine	OxCa
Zn <sup>2+</sup>	OxCa	Protéine de Tamm-Horsfall	OxCa
Citrate	OxCa, PCa	Bikunine	OxCa
Phosphocitrate Pyrophosphate	OxCa, PCa	Fibronectine Calprotectine	OxCa
Isocitrate	OxCa,PCa	Fragment 1 de la prothrombine	OxCa
Aspartate	OxCa	Lithostathine	OxCa, Acide urique,urates
Hippurate	OxCa	Glycosaminoglycanes Sulfate de chondroïtine Sulfate d'héparane Sulfate de kératane Sulfate de dermatane Acide hyaluronique	
Glutamate	OxCa	Lithostathine	CaCO <sub>3</sub>

## II.1.4. Les différents types de lithiase

### II.1.4.1. La lithiase oxalocalcique

Oxalate de calcium : Ce sont de loin les plus courants et se divisent en deux classes de cristallines :

- I. la whewellite
- II. la weddellite [103, 104].
- Oxalates de calcium monohydratés "Whewellite" : Ce sont les plus courantes causées par l'hyperoxalurie, qui sont de couleur brune et de petite taille, et sont éliminées spontanément par l'uretère.
- Oxalates de calcium dihydratés "Weddellite" : Il est excrété dans l'urine, de grande taille et de couleur jaune, environ deux fois moins fréquent. Elle est associée à un excès de calcium dans les urines.



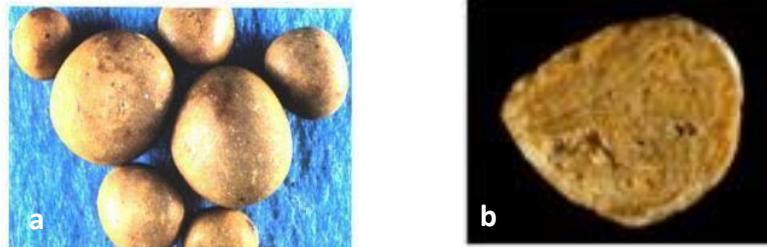
**Figure II.3:** Calculs d'oxalate de calcium : (A) monohydraté , (B) dihydraté [103, 104]

### II.1.4.2. La lithiase phosphocalcique

Calculs impliquant l'acide phosphorique (figure II.4). En raison de l'alcalinité continue de l'urine. L'abus de laxatifs, la diarrhée chronique, l'iléostomie et la thérapie à l'acétazolamide sont plus fréquents dans certaines régions. Une option est de penser au phosphonore qui acidifie durablement les urines. Pour l'obtenir, vous ajoutez de l'acide phosphorique [86].

Le phosphate de calcium le plus répandu est la carbapatite ou phosphate de calcium carbonaté. Elle peut être liée à une hypercalciurie, à une augmentation du pH urinaire, voire à une infection urinaire de longue durée. Différentes circonstances biochimiques affectent la formation des cristaux de brushite (phosphate dicalcique dihydraté) et d'orthophosphates de

calcium (principalement du phosphate de calcium carbonaté amorphe et des carbapatites). Lorsque le pH de l'urine  $> 6,5$ , les espèces d'orthophosphate de calcium se forment facilement et dépendent largement du pH de l'urine. La formation de brushite nécessite généralement des concentrations élevées de calcium et de phosphate, bien qu'elle puisse également être aidée par une faible concentration de citrate [105].



**Figure II.4:** principaux calculs de phosphates calciques . **a** : calcul de brushite et **b** : calcul de carbapatite [105]

### II.1.4.3. La lithiase urique et uratique

La classe III comprend les urates et les calculs d'acide urique [106, 107]. 10% des cas de lithiase urinaire sont dus à des calculs d'acide urique, qui sont produits lorsque le corps décompose les protéines.

Des cristaux d'acide urique se forment dans l'urine acide. L'acide urique monohydraté et dihydraté, l'acide urique amorphe, deux formes hydratées et l'acide urique anhydre (uricite). L'acide urique dihydraté et l'acide urique amorphe sont les espèces les plus courantes trouvées dans l'urine. Dépendent de différentes conditions métaboliques : l'acide urique amorphe est principalement lié à une concentration élevée d'urate dans l'urine, tandis que l'acide urique dihydraté dépend principalement d'un faible pH de l'urine. En revanche, les sels d'urate, tels que l'urate hydrogéné d'ammonium, se forment dans l'urine alcaline (**Figure II.5**) [108].



**Figure II.5:** principaux calculs de acide urique et de urate . **a** : calculs de acide urique anhydre, **b** : calcul de acide urique dihydraté et **c** : calcul de urate d'ammonium [108]

#### II.1.4.4. La lithiase phospho-ammoniac-magnésienne

"Nombre de physiophores, d'ammoniac et de magnésium." Aussi connue sous le nom de struvite minérale (Figure II.6), elle est plus fréquente chez les femmes. Elle diffère de la lithiase métabolique en ayant une physiopathologie différente selon laquelle les micro-organismes uréases peuvent provoquer des infections des voies urinaires qui peuvent hydrolyser l'urée urinaire et modifier le pH de l'urine pour qu'elle soit plus ou moins alcaline [109]. De ce fait, le développement d'une lithiase infectieuse nécessite la présence simultanée d'urée et d'une uréase. Les micro-organismes producteurs d'uréase comprennent *Protéus* (*P.Mirabilis*, *P.Morganii*, *P. Vulgaris*), *Morganella*, *Providencia*, *Pseudomonas* et plus rarement *enterobacter*, *Klebsiella* et *Serratia* [86]. Il y a 10% des cas qui consistent en des calculs de phosphate d'ammonium et de magnésium, qui peuvent être clairement vus sur les rayons X.

Elle se répète dans la composition des calculs complexes ou en forme de corail.

- Elle se forme en milieu alcalin.
- Les phosphates de calcium et de magnésium, tels que la boreshite, la carpatite, la struvite et la litelockite, sont regroupés dans la classe IV [110, 111].



**Figure II.6:** calculs de struvite [110]

#### II.1.4.5. La lithiase cystinique

La lithiase à cystine résulte de la cystinurie, un défaut autosomique récessif dans le transport de la cystine et des acides aminés dibasiques à travers les membranes épithéliales du rein et de l'intestin. Parce qu'il s'agit de l'acide aminé le moins soluble, la cystine cristallise et forme des calculs lorsqu'elle est excrétée en plus grande quantité dans l'urine [112]. Les quatre acides aminés dibasiques (ornithine, lysine, cystéine et arnitrine) sont affectés par un trouble héréditaire connu sous le nom d'insuffisance tubaire chronique congénitale et familiale, qui en est la cause connue. (**Figure II.7**) [113].



**Figure II.7:** calcul de cystine [113]

#### II.1.4.6. La lithiase médicamenteuse

La lithiase médicamenteuse représente 1 à 2 % de tous les calculs rénaux. Il existe deux catégories de médicaments censés contribuer à la formation de calculs : Le premier groupe est constitué de substances qui favorisent la cristallisation de l'urine et ont une excrétion urinaire élevée mais une faible solubilité. Parmi les molécules peu solubles, Le deuxième groupe comprend les médicaments qui peuvent entraîner des calculs urinaires car leurs effets métaboliques, en particulier ceux provoqués par la supplémentation en vitamine D/calcium, qui sont probablement sous-estimés. Les principaux médicaments actuellement criminalisés sont les sulfamides et l'indinavir, en particulier le triamtérène et la sulfadiazine. (**Figure II.8**) [114].



**Figure II.8:** quelques calculs induits par les médicaments . **a** : calculs d'indinavir, **b** : calculs de triamtérène . **c** : calcul de N-acétylsulfadiazine [114].

#### II.1.5. Les méthodes d'évaluation de l'activité antiurolithiasique

Pour étudier la pathogenèse de la néphrolithiase à CaOx, développer des protocoles et des agents thérapeutiques et tester leur efficacité, De nombreux modèles de lithiase urinaire *in vitro* et *in vivo* ont été développés [115] . La nucléation, la croissance et l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium sont examinées dans des expériences de cristallisation *in vitro* en l'absence et en présence de modulateurs de cristallisation. Ces méthodes *in vitro* donnent une estimation simple et rapide de l'activité de modification de la cristallisation, un dépistage préliminaire de l'activité anti-urolithique et mode(s) d'action possible(s). Cependant, le système biologique et

la pathogenèse de la lithiase urinaire sont trop complexes et ces résultats *in vitro* ne peuvent pas être extrapolés en toute sécurité pour l'effet thérapeutique [116]. Par conséquent, des modèles animaux *in vivo* de la néphrolithiase au CaOx pour mieux comprendre la pathogenèse de la néphrolithiase et étudier les actions anti-urolithiques et le potentiel de divers médicaments ont été développés [115].

Les études *in vitro* fournissent également des configurations plus petites utilisant une petite substance de test, permettant de faibles coûts et un nombre élevé de répétitions. Ainsi, fournir une motivation pour minimiser les coûts des médicaments grâce à des procédures de test économiques et donne une évaluation plus directe des performances de l'extrait ou du composé que les études *in vivo* conventionnelles [117].

### II.1.6. Activité antiurolithiasique des plantes médicinales

Des dizaines d'accumulations de connaissances ethnobotaniques sont apparues au cours des siècles, et l'utilisation des plantes médicinales est devenue d'une grande importance dans le traitement de nombreuses maladies. Le terme plantes anti-urolithiase est appelé plantes médicinales pour la lithiase urinaire [118]. Les médicaments à base de plantes et les extraits de plantes ont un rôle important et documenté dans le traitement de la lithiase urinaire, qui est la troisième maladie des voies urinaires la plus courante [119]. En outre, Ils sont relativement plus sûrs, moins chers et plus accessibles aux grandes populations des pays en développement [120]. Des études scientifiques exposent le mécanisme d'action de ces plantes médicinales anti-urolithiatiques et responsables à différents stades de la lithiase urinaire, telles que, l'action diurétique augmente la quantité de liquide passant par les reins en conséquence débusquer les dépôts [121].

Afin d'évaluer l'activité antiurolithiasique *in vitro* et *in vivo*, des recherches scientifiques ont été menées sur plusieurs plantes médicinales. Nous nous soucions des études antérieures publiées sur la famille fabaceae (Tableau II.2) :

**Tableau II.2:** Études antérieures sur l'activité antiuroliithiasique de quelques plantes médicinales

famille	Plantes médicinales	Partie utilisée	Étude	Réf
<b>Fabaceae</b> (Leguminosae)	<i>Retama retam</i>	feuilles	<i>in vivo</i>	[122]
	<i>Macrotyloma uniflorum</i>	Feuilles et Apex des tiges	<i>in vitro</i>	[123]
	<i>Dolichous biflorus</i> L.	grains	<i>in vivo</i>	[124]
	<i>Sesbania grandiflora</i> L	Jus de feuilles	<i>in vivo</i>	[125]
	<i>Tamarindus indica</i> Linn	Pulpe de fruits	<i>in vivo</i>	[126]
	<i>Alhagi mannifera</i> Desv (L.)	Racines	<i>in vivo</i>	[120]
	<i>Clitoria ternatea</i> L	leaves	<i>in vitro</i>	[127]
	<i>Macrotyloma uniflorum</i>	grains	<i>in vivo</i>	[128]
	<i>Astragalus membranaceus</i>	membrane	<i>in vivo</i>	[129]
	<i>Trigonella foenum-graceum</i>	grains	<i>in vivo</i>	[130]

## II.2. Le diabète

### II.2.1. Définitions et généralités

Une augmentation chronique de la glycémie causée par une production et/ou une action altérée de l'insuline détermine le diabète sucré comme une maladie métabolique [131, 132]. En 2017, le nombre mondial de patients diabétiques était estimé à environ 415 millions, ce qui devrait augmenter et atteindre 642 millions d'ici 2040 [133].

L'hyperglycémie chronique chez les patients diabétiques réduisant la qualité de vie et accélère leur décès en provoquant des lésions cardiovasculaires et d'autres complications à long terme. La cardiomyopathie et l'insuffisance cardiaque sont considérées comme l'une des principales complications du Diabète sucré [134, 135]. En plus de détruire les cellules des îlots et les voies de signalisation de l'insuline, le stress oxydatif participe dans la progression pathologique du diabète et peut entraîner de graves complications telles que les maladies cardiovasculaires diabétiques et la néphropathie diabétique [136].

A cause de leur innocuité relative, de leur rentabilité et de leur toxicité réduite lorsqu'ils

sont pris aux doses recommandées, les médicaments antidiabétiques à base de plantes ont attiré beaucoup d'attention [137, 138]. Actuellement, les plantes médicinales et les herbes sont utilisées sous forme d'extraits pour leur activité antidiabétique. L'activité antidiabétique des extraits de plantes et leur capacité à restaurer la fonction des cellules pancréatiques ont été démontrées dans de nombreuses études scientifiques cliniques [139].

### II.2.2. Le pancréas et l'insulinosécrétion

En sécrétant diverses enzymes digestives et d'hormones pancréatiques, La digestion des macronutriments est régulée par le pancréas et, par extension, du métabolisme énergétique/homéostasie. C'est un organe rectangulaire d'une longueur d'environ 15, et il est situé derrière l'estomac dans la cavité abdominale. La majorité des cellules de cet organe sécrétoire sont des cellules acineuses ou exocrines, qui sécrètent du suc pancréatique dans les canaux pancréatiques principaux et accessoires. Ce suc pancréatique contient des enzymes digestives telles que l'amylase, qui est responsable de la digestion des glucides, la lipase pancréatique, qui est l'enzyme responsable de la décomposition des graisses en acides aminés, et le trypsinogène, qui à son tour est responsable de la digestion des protéines [140].

L'insuline, la seule hormone du corps capable d'abaisser la glycémie, ou la principale hormone de régulation du métabolisme du glucose, est sécrétée par les cellules pancréatiques. La sécrétion d'insuline est un processus hautement dynamique régulé par des mécanismes complexes, Il est régulé par l'état des nutriments, des facteurs hormonaux et des facteurs neuraux [141]. Le diabète sucré est causé par une sécrétion d'insuline altérée ou insuffisante.

Comprendre le diabète sucré, une condition marquée par des niveaux élevés de sucre dans le sang provoqués par une production d'insuline inadéquate pour répondre aux besoins de l'organisme, nécessite une connaissance approfondie du processus de sécrétion d'insuline [142].

### II.2.3. Le diabète et le stress oxydatif

Le corps humain est continuellement exposé à différents types d'agents qui entraînent la production d'espèces réactives appelées radicaux libres (ROS/RNS) qui, par le transfert de leur électron libre non apparié, provoquent l'oxydation de la machinerie cellulaire. Traiter avec les effets indésirables de ces espèces, le corps a des systèmes antioxydants endogènes ou il obtient des antioxydants exogènes à partir d'un régime alimentaire qui neutralise ces espèces et maintient l'homéostasie du corps. Tout déséquilibre entre le RS et les antioxydants conduit à produire une condition connue sous le nom de « stress oxydatif » [143]. De nombreuses études

ont confirmé que le stress oxydatif est un facteur crucial dans l'apparition, la progression et les complications du diabète, qui ont été largement liés au stress oxydatif et à l'incidence du diabète sucré [144, 145]. Cela se produit également lorsqu'il y a une distorsion de l'équilibre redox de la cellule, causant des dommages aux membranes et aux biomolécules vitales telles que les lipides, l'ADN et les protéines [141, 142, 146-149]. Il a été noté que l'hyperglycémie favorise le stress oxydatif par la génération de radicaux libres et la suppression des systèmes de défense antioxydants. Dans les conditions d'hyperglycémie chronique, la production de ROS est perpétuée et, par conséquent, les enzymes antioxydantes et les antioxydants non enzymatiques sont sévèrement supprimés dans divers tissus, ce qui exacerbe encore le stress oxydatif [146]. Les complications du diabète induites par le stress oxydatif peuvent inclure les accidents vasculaires cérébraux, la neuropathie, la rétinopathie et la néphropathie [150].

Cela explique pourquoi les personnes diabétiques ont tendance à avoir des environnements cellulaires et organiques plus oxydatifs que les individus en bonne santé [151-153].

#### II.2.4. Plantes antidiabétiques

Les plantes médicinales sont connues depuis des millénaires et sont utilisées comme une riche source d'agents thérapeutiques dans le monde entier. L'OMS a signalé que 75% de la population mondiale, environ 800 plantes sont utilisées dans les systèmes de médecine indigène, La majorité des personnes dans tous les pays en dépendent pour leurs besoins de santé de base [154]. En raison de la toxicité des médicaments et des effets secondaires, l'utilisation de la phytothérapie devient de plus en plus courante. Ainsi, la phytothérapie devient de plus en plus importante dans le traitement et la gestion des maladies chroniques telles que le diabète [155]. Depuis l'époque des papyrus Ebers, soit environ 1550 avant Jésus Christ les gens ont utilisé des plantes médicinales pour traiter le diabète sucré. De nombreuses herbes, épices et D'autres parties de végétaux ont été utilisées pour traiter cette maladie dans le monde entier. La médecine populaire traite le diabète avec près de 1200 espèces végétales [156].

Plusieurs d'études *in vivo* ont été réalisées sur des animaux pour tester l'activité revendiquée ont démontré la propriété hypoglycémiant de nombreuses plantes [157], y compris la famille des légumineuses, en particulier *Radix Astragali* seu Hedysari (Leguminosae). Les racines d'*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. sont utilisées dans de nombreux troubles chroniques comme le diabète [155].

TRAVAUX  
PERSONNELS

### III.1. Matériel végétal

Les études phytochimiques et les activités biologiques ont été réalisées au Laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (LVPRS), Université Kasdi Merbah Ouargla ainsi qu'au Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (LVTRS), Université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued.

L'espèce d'*Astragalus gombo* Bunge a été récoltée en mars 2018 dans la région d'Oued N'essa Ouargla. L'identification botanique a été réalisée par Professeur Abdelmadjid Chahma botaniste à l'Université Kasdi Merbah Ouargla (Algérie).

### III. 2. Screening phytochimique des extraits

Afin d'identifier les différents composés responsables des activités, nous avons réalisé des tests chimiques sur les extraits hydro-méthanoliques (l'extrait hydrométhanolique est dilué avec de 10 mL de l'eau distillée pour 1 g de matière sèche, on laisse la solution en repos pendant une nuit puis on filtre). L'un des principaux objectifs des tests phytochimiques est de découvrir les différentes familles de métabolites secondaires présents dans les parties étudiées (feuilles, tiges) de la plante *Astragalus gombo*. Selon la méthodologie suivante : (Soulama, S) [158] (Mace, M. E.) [159] (Biren N. Shah) [160] (S. Zeidan) [161] (Trease et Evans) [162].

#### III. 2.1. Les tanins

L'ajout de 3ml d'chlorure ferrique à 2% p/v à 3 ml l'extrait, lorsque la couleur vire au bleu-noir, c'est une indication de la présence de tanins.

#### III.2.2. Les alcaloïdes

On ajoute 3 mL d'HCl dilué à 3 mL d'extraits, bien agités. Les tests suivants ont été réalisés avec le mélange.

*Test de Mayer* : à 3 mL de mélange, 1 mL de réactif de *Mayer* (iodure mercurique de potassium) a été ajouté. L'apparition d'un précipité blanc avec le réactif *Mayer* indique la présence d'alcaloïdes.

*Test de Dragendorff* : à 3 mL de mélange, 1 mL de réactif de *Dragendorff* (iodobismuthide de potassium) a été ajouté. L'apparition d'un précipité rouge brique avec le réactif *Dragendorff* indique la présence d'alcaloïdes.

#### III.2.3. Les protéines

- a. **Test de Biuret** : 1 ml de NaOH (4%), 1 ml de CuSO<sub>4</sub> (1%) et 2 ml de l'extrait ont été combinés. La présence de la protéine a été indiquée par un changement de couleur violet ou rose dans la solution.
- b. **Teste de ninhydrine** : 3 gouttes de solution d'acétate de Pb (5%), ajoutées à 2 ml de l'extrait, ont été chauffées au bain-marie pendant 10 minutes. Lorsque des acides aminés sont présents, la couleur de la solution vire au violet ou au bleu.

#### III.2.4. Les flavonoïdes

*Test Shinoda* : Ajouter 2 ml de l'extrait à 0,5 g de magnésium et 5 gouttes d'HCl concentré avec prudence. Lorsque la couleur rouge foncé apparaît, cela indique la présence de flavonoïdes.

#### III.2.5. Les saponines

*Test de mousse* : 2 mL d'extrait ont été vigoureusement agités avec 5 mL d'eau et observés pour une mousse persistante, ce qui indique la présence de saponines.

#### III.2.6. Teste des composés réducteurs

On ajoute 1 ml de l'extrait à 2 ml de réactif de Fehling A et B à parts égales, puis on le met au bain-marie pendant quelques minutes. L'apparition d'une brique rouge est une indication des composés réducteurs.

#### III.2.7. Les Cardénolides

Afin d'identifier les glycosides cardénolides, 5 ml de chaque extrait sont combinés avec 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré et 2 ml d'acide acétique glacial, ainsi qu'une goutte de solution de FeCl<sub>3</sub>. Les sucres désoxy des glycosides cardiaques se distinguent par l'anneau brun sur l'interface.

#### III.2.8. Les coumarines

L'extrait hydrométhanolique a été réparti dans deux éprouvettes après avoir été dilué de moitié avec de l'eau distillée. 0,5 mL d'une solution de NH<sub>4</sub>OH titrée à 10% a été ajouté dans le deuxième tube tandis que le premier servait de témoin. Sous une lampe UV 365 nm, l'apparition d'une fluorescence bleue ou verte dénote la présence de coumarines.

#### III.2.9. Les stérols et triterpènes

*Test Salkowaski* : on a ajouté 5 gouttes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2 mL d'extrait, Lorsque la couleur bleu-vert apparaît, c'est une indication de la présence de triterpénoïdes

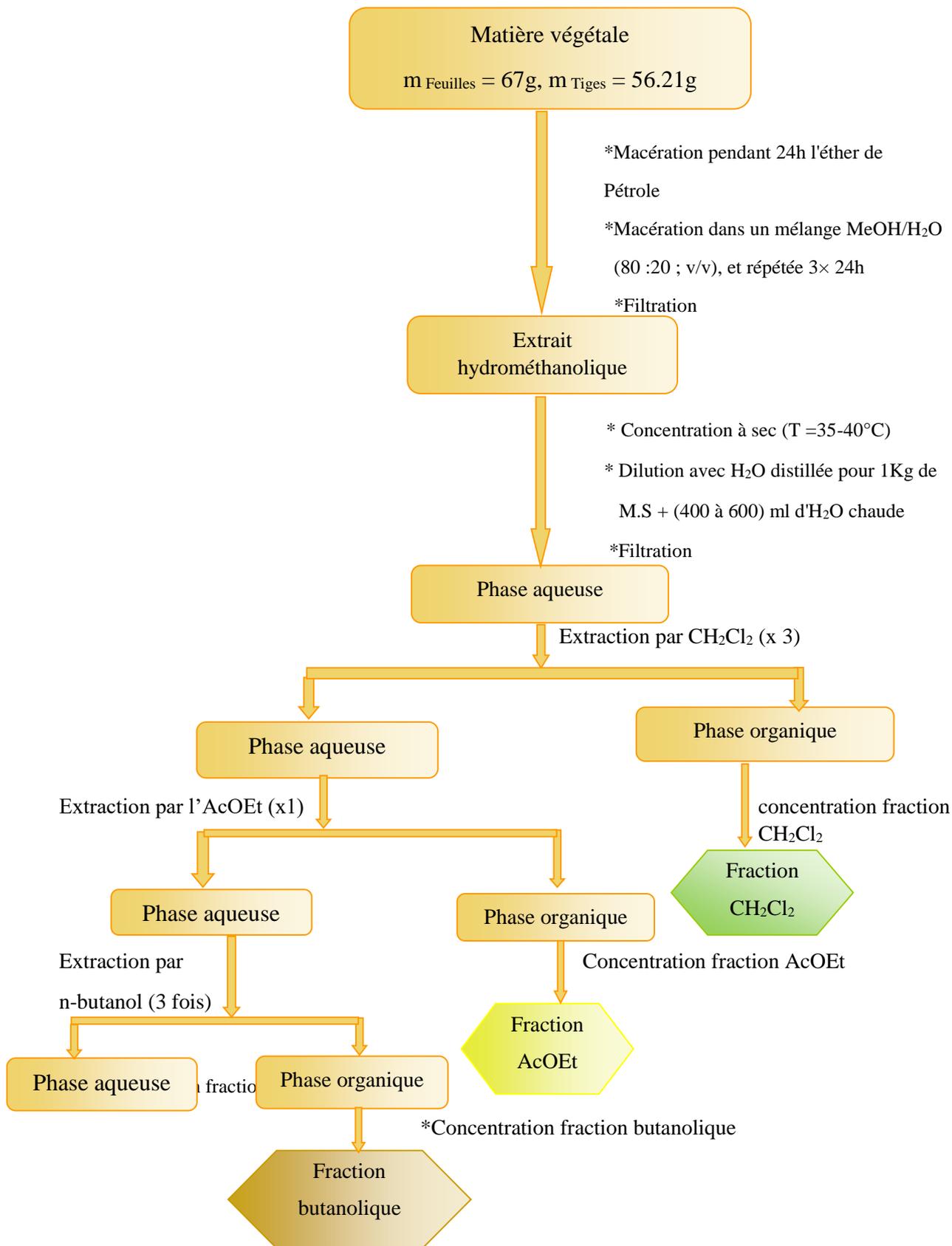
*Test Libermann burchard* : 10 gouttes d'anhydride acétique concentré ont été ajoutées à 2 ml de la solution à tester et bien mélangées. Aux côtés du tube à essai, 5 ml d'acide sulfurique

concentré ont été ajoutés. Lorsque la couleur bleue verdâtre apparaît, c'est une indication de la présence de terpénoïdes et stéroïdes.

### III.3. Préparation des extraits

Une méthode d'extraction de type solide-liquide a été utilisée, c'est-à-dire le mélange de la matière végétale (solide) avec le solvant d'extraction (liquide). La matière végétale collectée a été séchée à une température ambiante et protégée de la lumière et de l'humidité. Après séchage, les feuilles et les tiges sont cassées à la main jusqu'à obtenir de petits morceaux. L'extraction des substances actives de 56.21g, 67g de la plante sèche (tiges et feuilles) a été effectuée d'abord par macération à température ambiante pendant 24 h dans l'éther de pétrole après filtration et séchage de matière végétale ; on continue l'extraction par macération dans un mélange méthanol/eau (MeOH/H<sub>2</sub>O) (80/20 : v/v) pendant 5 x 24 h à une température ambiante. La solution obtenue a été filtrée. Ce filtrat est concentré sous vide, l'extrait hydrométhanolique est dilué avec de 30 à 40 mL de l'eau distillée pour 67 g de matière sèche, on laisse la solution en repos pendant une nuit puis on filtre. Après avoir obtenu phase aqueuse on fractionne successivement en utilisant du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du n-butanol selon le protocole d'extraction illustré à la figure III.1.

Figure III.1 : Protocole d'extraction de différentes fractions



### III.4. Détection chimique à propos de certains métabolites secondaires

#### III.4.1. Dosage des polyphénols totaux

A l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu et de la méthode colorimétrique, la spectrophotométrie a été utilisée pour calculer le dosage des polyphénols totaux. Cette méthode a été utilisée pour décrire des extraits végétaux d'origines les plus diverses [163].

##### a. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange oxydant d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique jaune qui, lorsqu'il est réduit, donne une couleur bleue constituée d'un complexe phosphotungstique. Il absorbe à une longueur d'onde de 760 nm. Plus la couleur était intense, plus il y avait de composés phénoliques dans les extraits de plantes [164].

##### b. Procédure

Le protocole utilisé est décrit par Singleton et Rossi [165]. Un volume 0,1 mL de l'échantillon a été mélangé avec 0,5 mL de réactif Folin– Ciocalteu 10 fois dilué fraîchement préparé. Après 5 minutes, 2 mL de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 20% ont été ajoutés, le mélange a été agité et a réagi pendant 30 mn à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance a été lue à 760 nm. En utilisant des solutions d'acide gallique à diverses concentrations de 0,03 à 0,3 g/L ont été utilisées pour préparer un standard de calibration. Les teneurs en polyphénols totaux est exprimées en milligramme (mg) équivalent acide gallique par gramme (g) de la masse sèche de plante (mg EAG/g).

#### III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

##### a. Principe

Un spectrophotomètre UV-Visible avec du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) a été utilisé pour la quantification les flavonoïdes dans les extraits de feuilles et de tiges d'*Astragalus gombo*.  $\text{AlCl}_3$  est utilisé comme réactif. Cette méthode est basé sur la capacité des flavonoïdes à se lier aux ions  $\text{Al}_3^+$  dans une solution et à former un complexe stable. Le rapport des molécules de flavonoïdes aux ions  $\text{Al}^{3+}$  ainsi que la disposition de leurs groupes hydroxyle (OH) déterminent la couleur du complexe. En conséquence, selon la configuration expérimentale, les lectures spectrophotométriques utilisées dans cette méthode peuvent aller de 367 à 510 nm [166].

##### b. Procédure

Le dosages des flavonoïdes a été effectué par la méthode du ( $\text{AlCl}_3$ ) décrite par [167, 168] avec une légère modification. 0,5 mL d'extrait est mélangé avec d'une solution d'éthanol

$\text{AlCl}_3$  à 2%. Le mélange réactionnel incube pendant 30 min à température ambiante, L'absorbance est immédiatement lue à 430 nm. La quantification des flavonoïdes totaux est exprimée en équivalents milligramme quercitine par gramme de la masse sèche de plante (mg EQ / g).

### III.4.3. Dosage des tannins totaux

#### a. Principe

La méthode à la vanilline avec HCl a été utilisée La méthode d'interaction de la vanilline avec le groupe des flavonoïdes terminaux présents sur les tanins a été utilisée en milieu acide pour former un produit de couleur rouge, ce qui s'explique par la capacité des tanins à interagir avec la vanilline pour produire des anthocyanidines rouges, son absorption maximale à environ 500 nm [169].

#### b. Procédure

La teneur en tanins a été estimée par la méthode de vanilline acidifiée [170]. Un volume de 0,4 mL d'échantillon est mélangé avec 3 mL de solution de vanilline (4% dans l'éthanol) et à 1,5 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl). Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 500 nm. La quantité des tanins totaux est exprimée en équivalents milligramme (mg) de catéchine par gramme (g) de la masse végétale sèche (mg EC/ g).

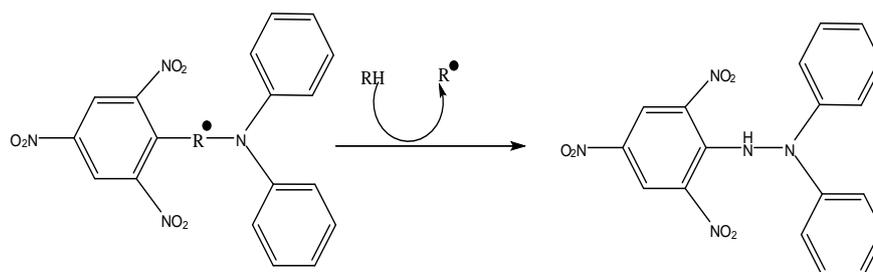
### III.5. Evaluation de l'activité antioxydante et biologique

Plusieurs méthodes *in vitro* ont été utilisées pour tester la capacité d'activité antioxydante des extraits phénoliques à travers les tests suivants : ABTS, DPPH, réduction de Mo(VI) à Mo(V) et radical anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  par deux voies (chimique et électrochimique). Pour l'activité biologique nous avons choisi deux activités : l'activité d'inhibition d' $\alpha$ -amylase et l'activité antiurolithiasique.

#### III.5.1. Test de piégeage du radical DPPH $\cdot$

##### • Principe

La base de cette technique est de mesurer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres stable de forme synthétique : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH $\cdot$ ) (Figure III.2), qui absorbe à  $\lambda = 515$  et 520 nm dans le spectre visible. L'acceptation d'un atome d'hydrogène entraîne la réduction de ce dernier, ce qui donne de la diphénylpicrylhydrazine et un radical phénoxy. Piégeage du radical DPPH fait virer la solution violette au jaune, permettant de suivre la couleur et de réduire l'absorption à  $\lambda = 517$  nm [171] avec quelques modifications [172].



**Figure III.2 :** Réduction du radical libre DPPH·

• **Protocole**

La capacité de piégeage de radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH·) Créé par de Kim *et al* [173], avec de légères modifications. 1 mL de différentes concentrations de l'extrait a été ajouté à 1 mL d'une solution DPPH· 0,25 mM préparée dans le méthanol, à température ambiante et dans l'obscurité, le mélange est incubé pendant 30 min, Les absorbances des extraits et des références ont été lues à 517 nm. Le contrôle négatif contient le méthanol avec solution DPPH·, l'inhibition des radicaux libres DPPH· exprimé en pourcentages d'inhibition (I%) a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (I\%)} = \frac{\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1}{\text{Abs}_0} \times 100 \text{ (équation 1)}$$

où Abs<sub>0</sub> ; Abs<sub>1</sub> sont l'absorbance à 30 min pour contrôle négatif et de l'échantillon, respectivement. Nous générons la courbe I% = f(C), Ensuite, nous calculons les valeurs CI<sub>50</sub>

### III.5.2. Test de capacité réductrice (Réduction de Mo(VI) en Mo(V))

La capacité réductrice des extraits végétaux étudiés par la méthode de formation du complexe phosphomolybdate [174].

• **Principe**

La réduction du molybdène d'un nombre d'oxydation de (VI) à (V) par des composés antioxydants sert de base pour le test. A pH acide et avec un maximum d'absorbance à 695 nm, cette diminution se manifeste par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate / Mo (V)) [174].

• **Protocole**

Le test de Phosphomolybdate (PPM) est évalué selon la procédure décrite par Prieto *et al.* [175] dans un tube un volume de 0,1 mL de différentes concentrations de l'extrait végétal est mélangé avec 1 mL de solution de réactif : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes des échantillons sont incubés à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des solutions est lue à 695 nm contre le

blanc qui contient (1 ml de la solution du réactif et 0.3 ml 0.1 mL d'eau, incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

L'acide ascorbique est pris comme antioxydant standard à différentes concentrations, sa capacité antioxydante est exprimée selon un nouveau terme appelé AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity)

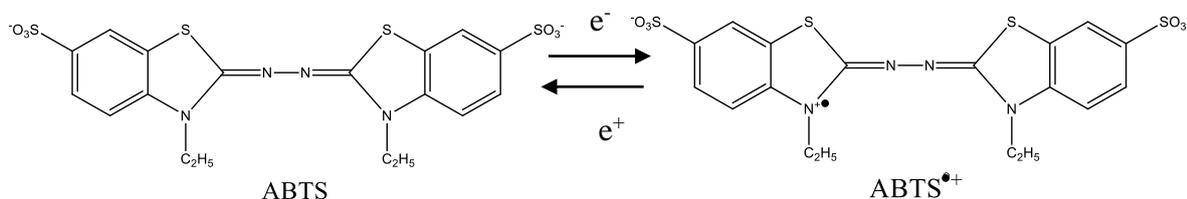
### III.5.3. Test d'ABTS

Evaluation de l'activité de piégeage d'ABTS<sup>•+</sup> par un spectrophotomètre UV-Vis Shimadzu Agilent Cary 100 selon la méthode de Re *et al* [176] ses co-auteurs [177], avec quelques modifications.

#### • Principe

L'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonique) (ABTS) possède des radicaux cationiques stables sous forme libre. Par oxydation en présence de persulfate de potassium, ce radical se forme facilement à partir de l'acide correspondant.

En utilisant cette méthode, la capacité des antioxydants à interagir avec les radicaux cationiques ABTS<sup>•+</sup> produits chimiquement a été évaluée (Figure III.3). La couleur caractéristique de Le radical cation ABTS<sup>•+</sup> est bleu-vert. Après avoir été réduit par des substances donneuses de protons, il devient incolore. Cette méthode utilise un spectrophotomètre à 734 nm pour quantifie la capacité d'une molécule ou d'un extrait à piéger des radicaux.



**Figure III.3 :** Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS<sup>•+</sup>

#### • Protocole

La solution d'ABTS<sup>•+</sup> a été préparée en dissolvant l'ABTS dans l'eau à une concentration de 7 mM avec 2,45 mM de persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> et en laissant le mélange dans l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 heures avant utilisation ; Le mélange dilué par de l'eau distillée pour obtenir une absorbance égale à 0,700±0,020 à 734 nm.50 µL de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 950 µL de solution ABTS préparée et

incubés à température ambiante à l'obscurité pendant 6 min. Puis, on mesure l'absorbance de chaque solution à 734nm.

Puis le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant « l'équation 1 » De la même manière que pour le test DPPH. L'activité antiradicalaire a été exprimée en IC<sub>50</sub> (mg/mL), le contrôle positif utilisé est l'acide ascorbique [176].

### III.5.4. Test de radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

#### a. Voie chimique

##### • Principe

Cette méthode repose sur l'inhibition de l'auto-oxydation des composés catéchols tels que l'adrénaline, la 6-hydroxydopamine ou le pyrogallol. Le pyrogallol (ou benzène-1,2,3-triol) sera utilisé comme source d'anions. En milieu alcalin, leur forme anionique, proche du phénolate, est oxydée et donne de la quinone avec consommation d'oxygène. Deux électrons des oxy-anions sont transférés en deux étapes à l'oxygène moléculaire lors de la réaction d'auto-oxydation (Figure III.4) [178].

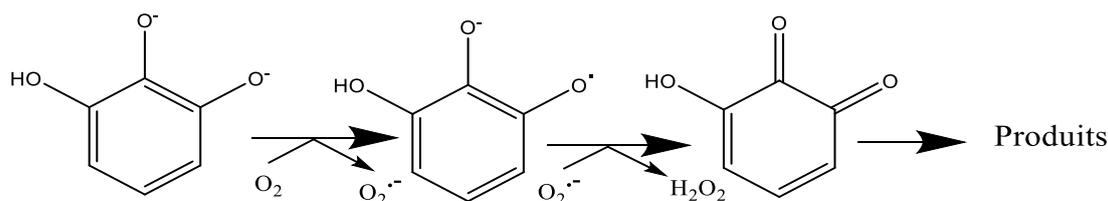


Figure III.4 : Auto-oxydation du pyrogallol

##### • Protocole

La méthode d'auto-oxydation au pyrogallol a été utilisée pour tester l'efficacité de piégeage des radicaux anion superoxyde des extraits d'*Astragalus gombo* [179].

Un volume de 4,5 mL de la solution saline tamponnée au phosphate PBS (pH 8,2) mélangé avec 0,5 mL d'échantillon à concentration (1µg /mL) l'extrait ou l'eau à 25 ° C et 10 µl de pyrogallol 45 mM , L'absorbance des échantillons est lue à une longueur d'onde de 320 nm chaque 30 seconde. toutes les 30 secondes pendant 5 minute ,le pourcentage de réduction (I%) de l'auto- oxydation du pyrogallol est calculé par l'équation suivante :

$$I = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100$$

Où

$\Delta A_0$ : La vitesse de l'auto-oxydation de pyrogallol en absence d'antioxydant

$\Delta A$ : La vitesse de l'auto-oxydation de pyrogallol en présence d'antioxydant

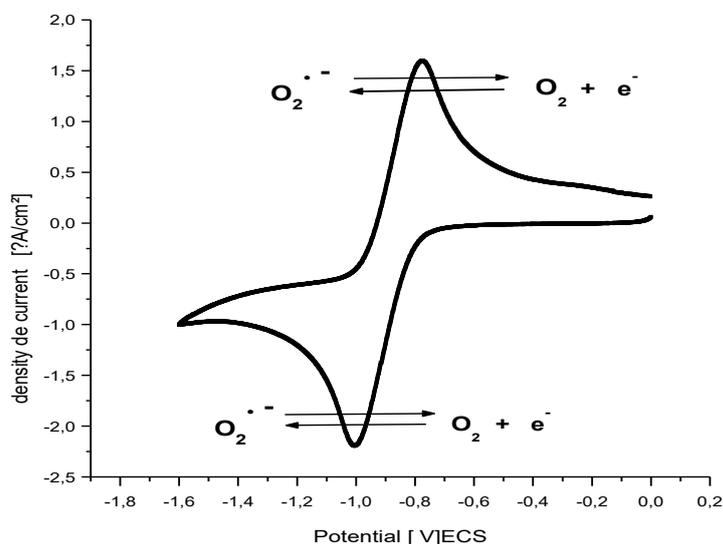
### b. Voie électrochimique

Parmi les techniques d'électrolyse, la voltamétrie cyclique est l'une des plus importantes et des plus largement utilisées [180]. L'un de ses avantages est qu'il est simple à mettre en œuvre et nous fournit une mine d'informations collectées pour étudier les processus redox [181]. La réversibilité du système électrochimique de l'étude ou la cinétique des réactions de transfert de charge. Cette approche est également utilisée pour évaluer la capacité antioxydant et la teneur des produits à base de plantes [182].

Avec cette méthode, une tension à variation linéaire est appliquée à l'électrode de travail tandis qu'un courant correspondant est mesuré simultanément. La manière la plus courante d'utiliser la voltampérométrie consiste à effectuer un cycle en effectuant deux balayages linéaires, le premier appelé "aller" et le second appelé "retour", tous deux dans le sens opposé, pour revenir au potentiel de départ (Figure III.5). La méthode est appelée dans ce cas sous le nom standard de "voltamétrie cyclique" [183].

Les grandeurs caractéristiques d'un voltampérogramme sont :

Le pic anodique (ipa), cathodique, le potentiel de réduction cathodique ( $E_c$ ) et le potentiel d'oxydation anodique ( $E_a$ ). La méthode de voltamétrie cyclique est réalisée selon Le Bourvellec et al [184]. En réduisant l'oxygène à un électron dans le DMF, le radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$  est produit par la technique de voltamétrie cyclique dans la couche de diffusion de l'électrode.



**Figure III.5 :** voltamogramme d' $O_2$

Pour étudier le comportement électrochimique de l'anion radical superoxyde par la réduction de dioxygène commercial dans de l'oxygène moléculaire commercial DMF contenant

0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> à température ambiante 25 °C puis nous étudions le comportement électrochimique de ce dernier en présence des extraits de plante . Les voltamogrammes sont obtenus à l'aide d'un appareil Potentionstat-Galvanostat PGZ301 voltalab 40 piloté par un logiciel de travail voltmaster 4, connecté à une cellule électrochimique de 15 ml qui contient les électrodes :

- Électrode de travail : une électrode en carbone vitreux d'une surface géométrique de 0,013 cm<sup>2</sup>. Le polissage est vérifié avant chaque expérience et désinfecté à l'acétone avant chaque enregistrement.
- Électrode auxiliaire : une électrode de Platine.
- Électrode de référence : (ECS) électrode au calomel saturé. Il a été conservé dans une solution de KCl saturée

#### a. Le milieu utilisé

Le DMF (99,9 %) est utilisé comme un milieu aprotique pour les raisons suivantes :

- Pour éviter la protonation des intermédiaires [185].
- En évitant la formation d'un précipité qui précipiterait sur les électrodes, une force de dissolution élevée est formée par rapport à l'halogénure métallique.
- Plusieurs sels de support peuvent être dissous grâce à sa constante diélectrique élevée.
- La stabilité du radical O-•

Électrolyte de soutien Tetra n-butylammonium-hexafluorophosphate (nTBuNPF<sub>6</sub>) à une concentration de C = 0,1 M

L'élimination de l'oxygène des solutions est assurée par barbotage d'azote

#### b. Comportement électrochimique du système ( $O_2/O \cdot^-$ )

##### Conditions expérimentales :

Une électrode en carbone vitreux , 15 mL de DMF / nTBuNPF<sub>6</sub> 0,1M , 25 °C , vitesse de balayage 100 mV/s , domaine d'électro-activité (0, -1,6 V).

La solution est saturée par le barbotage d'oxygène pendant 15 minutes.

#### c. Comportement électrochimique du système ( $O_2/O \cdot^-$ ) en présence des antioxydants

On ajoute des volumes d'extraits de plante à 15 mL de solution (DMF (99,9 %) + électrolyte support), Les voltamogrammes sont enregistrés un par un après chaque ajout. Les extraits utilisés dans cette partie électrochimique sont : les fractions dichlorométhane, butanol,

acétate d'éthyle, fraction aqueuse et le Brute pour les feuilles en plus l'acide ascorbique il a été utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition (I%) de radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  est calculé selon le l'équation suivante :

$$I(\%) = \frac{i_{pa0} - i_{pas}}{i_{pa0}} \times 100$$

Où :

$I(\%)$  : Pourcentage d'inhibition

$i_{pa0}$  : Densité de courant anodique en l'absence d'échantillon

$i_{pas}$  : Densité de courant anodique en présence d'échantillon

On établit la courbe  $I\% = f(C)$ , puis on calcule les valeurs de  $CI_{50}$ .

L'indice  $CI_{50}$  est défini par la concentration d'antioxydant capable d'inhiber 50% du  $O_2^{\bullet-}$

### III.6. Estimation d'inhibition d' $\alpha$ -amylase *in vitro* par les extraits de *A. gombo*

#### III.6.1. Test de l'inhibition de l'activité d' $\alpha$ -amylase

Nous avons soumis nos extraits phénoliques à des tests d'inhibition afin d'évaluer leur potentiel en tant qu'inhibiteurs de l'alpha amylase avant de poursuivre l'étude de leur activité inhibitrice, c'est-à-dire l'étude de leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution) et quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre.

Sur son substrat d'amidon, qui est une combinaison des homopolymères amylose et amylopectine, qui sont chacun constitués d'unités de molécules de D-glucose, l'activité enzymatique de l'-amylase est quantifiée. Ce substrat subit une hydrolyse catalytique, libérant du maltose et d'autres composés (Figure III.6). L'analyse spectrophotométrique est utilisée pour mesurer le maltose libéré.



"l' $\alpha$ -amylase". Le groupe fonctionnel du maltose subit une oxydation dans un milieu alcalin chauffé, convertissant l'acide 3,5-dinitrosalicylique jaune orangé (DNSA) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique rouge orangé, qui absorbe à 530 nm.

La quantité de sucres réducteurs dans le milieu réactionnel est directement liée à l'intensité de la couleur.

#### **b. Préparation de réactif DNSA (acide 3,5-dinitrosalicylique)**

40 ml d'eau distillée ont été utilisés pour dissoudre 1 g de DNSA. Sous agitation, 30 g de double tartrate de potassium et de sodium tétrahydraté ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sont ajoutés à ce mélange. La solution résultante a une teinte jaune opaque. Le réactif devient limpide et orangé après addition de 20 ml de solution de NaOH 2N. Avec de l'eau distillée, le volume final est ajusté à 100 ml. Le réactif obtenu est conservé dans un endroit sombre à +4°C [186].

#### **c. Protocole**

L'activité d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase est réalisé par la méthode de Bernfeld (1955) (Miller et *al.*, 1959) avec de légères modifications [187]. 200  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium salin (pH = 6,9) ont été mélangés avec 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'amidon (1 %) a été utilisé comme substrat et 100  $\mu\text{L}$  de chaque extrait a été utilisé comme substrat et 100  $\mu\text{L}$  de chaque extrait dilué à la même concentration (1 mg/mL) pour comparaison, tandis que 100  $\mu\text{L}$  de tampon a été utilisé à la place de l'extrait pour l'échantillon à blanc. Après avoir soigneusement mélangé, les tubes à essai échantillon et blanc ont été ensuite incubée à 37 ° C pendant 5 min. Ensuite, la réaction a été lancée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  d' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* (13 unités/ml une unité d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de maltose de l'amidon par minute dans des conditions de teste). Après incubation à 37 ° C pendant 5 min, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1 ml de solution de DNS. Le mélange réactionnel a été incubé à 100°C pendant 5 min ; après cela, les tubes ont été refroidis avec de l'eau du robinet et après refroidissement, 4 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange. A 530 nm, la densité optique a été mesurée par rapport à la quantité d'équivalents de maltose libérée de l'amidon pour estimer l'activité enzymatique. La courbe standard est tracée en utilisant diverses concentrations d'acarbose ; les données ont été rapportées par rapport à la valeur obtenue avec l'acarbose à partir de la courbe d'étalonnage.

Le pourcentage d'inhibition (I%) de l' $\alpha$ -amylase a été calculé par la formule suivante :

$$(I\%) = \frac{Abs_c - Abs_{\acute{e}}}{Abs_c} \times 100$$

Où :

I% est le pourcentage d'inhibition d' $\alpha$ -amylase

Abs<sub>C</sub>, Abs<sub>E</sub> sont l'absorbance à 530 nm du contrôle ou témoin et l'échantillon avec inhibiteur, respectivement.

### III.6.2. L'étude cinétique de réaction d'inhibition d' $\alpha$ -amylase

Dans des conditions opératoires bien définies, le dosage du substrat transformé ou du produit qui se manifeste par unité de temps est équivalent à la mesure de l'activité enzymatique. Dans ce cas, le maltose généré lors de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase fongique d'*Aspergillus oryzae* est ce que nous nous intéressons à mesurer via un dosage spectrophotométrique indirect [188].

### III.7. Evaluation de l'activité antiurolithiasique

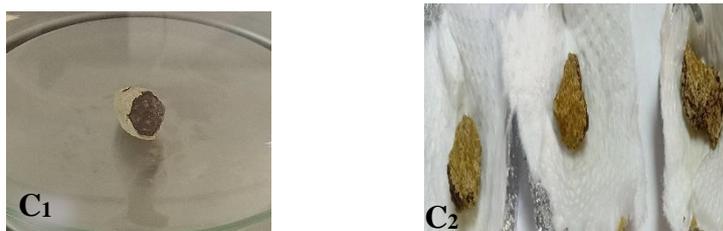
Dans ce travail, nous avons évalué l'activité antiurolithiasique d'extraits des feuilles et des tiges d'*Astragalus gombo* nous avons utilisé deux tests (modèles) : un modèle turbidimétrique et un modèle gravimétrique.

#### III.7.1. Les urines

L'évaluation de l'activité antiurolithiasique a été étudiée sur deux types d'urine (urine humaine et urine artificielle). Les échantillons des urines humaines de 24 h, ont été collectés de deux hommes adultes. L'un sans antécédents lithiasiques et l'autre atteint d'une maladie des calculs rénaux. Les échantillons prélevés ont été conservés dans une bouteille de propylène contenant de l'azote de sodium (NaN<sub>3</sub>) comme agent antibactérien. L'urine artificielle (UA) a été préparée selon la méthode Burns et Finlayson [189] avec une légère modification [190] et la composition suivante : chlorure de sodium 105,5 mM, phosphate de sodium 32,3 mM, citrate de sodium 3,21 mM, sulfate de magnésium 3,85 mM, sulfate de sodium 16,95 mM, chlorure de potassium 63,7 mM, chlorure de calcium 4,5 mM, oxalate de sodium 0,32 mM, hydroxyde d'ammonium 17,9 mM et chlorure d'ammonium 0,0028 mM. L'UA a été préparée fraîche à chaque fois et le pH a été ajusté à 6,0.

#### III.7.2. Calculs rénaux

Les deux types des calculs rénaux ont été obtenus à partir du Docteur Abdelkader Bounaceur Chirurgien Urologue (Ouargla). L'identification de ces deux calculs a été faite à l'aide d'un diffractomètre rayons X (Philips X'Pert 1 X-ray) au niveau de laboratoire de physique à l'université de kadi merbah ouargla. Les deux calculs collectés ont été lavés et conservés dans de l'eau physiologique. Avant de procéder au test gravimétrique, on récupère les deux calculs, lavés avec l'eau distillée, puis sécher à l'air libre sur papier filtre pendant 2 h.



**Figure III.7 :** Les photos des trois calculs rénaux (C<sub>1</sub> : Calcul d'urate de calcium et C<sub>2</sub> : Calcul de phosphate de calcium)

### II.7.3. Modèle turbidimétrique

Pour ce modèle, nous avons mené une étude *in vitro* sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique entre l'urine et l'oxalate de calcium, avec et sans inhibiteur (standards et extraits), Évaluer le pouvoir inhibiteur des extraits végétaux étudiés [191].

Nous avons d'abord déterminé que le temps de réaction correspondant à la croissance de l'oxalate de calcium pouvait être mesuré expérimentalement après incubation de trois types d'urine : d'un homme sans antécédents lithiasiques (urine de sujet sain), d'un homme d'une maladie des calculs rénaux (urine de sujet malade) et urine artificiel dans un bain-marie à 37°C à un pH de 6,8.

Après 30 minutes, 1 ml d'urine est prélevé, 1 ml d'oxalate de sodium (25 mM) a été ajouté, préalablement maintenu à 37 °C et la mesure a été immédiatement effectuée. Un spectrophotomètre UV-Visible (Agilent Technology Cary 100) connecté à un logiciel d'acquisition de données (Cary UV) a été utilisé pour mesurer l'absorbance de la turbidité à 620 nm afin d'évaluer l'activité antiurolithiasique des extraits en termes de production d'oxalate de calcium. On obtient ainsi, la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps et on détermine alors le temps d'induction  $t_i$  qui correspond à une durée moyenne de 300 s.

La capacité des extraits à l'effet antiurolithiasique a été mesurée comme suivantes : 100µL d'extrait dilué (1 g/L) ont été ajoutés à 1 mL d'urine incubée dans un bain-marie à 37°C et 1 mL d'oxalate de sodium. Après 300 s d'incubation à 37 °C et dans l'obscurité, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible contre un blanc.

Nous avons pu exprimer l'activité anti-urolithiasique par le pourcentage d'inhibition du PI (%) dérivé des pentes turbidimétriques en présence et en l'absence de l'inhibiteur à l'aide de mesures de densité optique en présence de chaque solution d'extrait et de références à des concentrations égales à 1g/L, sont calculés par la formule suivante :

$$PI \% = \left[ 1 - \left( \frac{PSI}{PAI} \right) \right] \times 100$$

$P_{SI}$  : pente turbidimétrique en absence d'inhibiteur.

$P_{AI}$  : pente turbidimétrique en présence d'inhibiteur.

#### II.7.4. Modèle gravimétrique

Nous avons adopté la méthode de mesure de la perte de masse (dissoute) des calculs afin d'utiliser la méthode gravimétrique pour évaluer l'activité antiurolithiasique des extraits produits ainsi que les standards [192]. Dans cette expérience, nous avons utilisé deux types de calculs rénaux : (phosphate de calcium et l'urate de calcium).

Les fragments de calculs doivent d'abord être lavés à l'eau distillée avant d'être mis à sécher dans l'étuve à température à 40°C. Après séchage, les fragments des calculs ont été exposés à 5 mL de chaque extrait à une concentration de 5 g/L pendant quinze jours dans l'étuve à température à 37°C. Les calculs ont été retirés du milieu expérimental après cette période de contact, lavés à l'eau distillée, séchées à 40°C pendant 16 h, puis pesées avec une balance de précision pour déterminer la perte de masse.

L'activité antiurolithiasique a été exprimée par le pourcentage de dissolution (D%) du calcul rénal.

$$D(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

$m_i$  : masse initiale du calcul ;  $m_f$  : masse du calcul non dissoute.

# ***RÉSULTATS ET DISCUSSION***

### IV.1 Screening phytochimique des extraits

Le screening phytochimique réalisés sur la plante *Astragalus gombo* a permis de mettre en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires existant dans les deux parties étudiées (feuilles, tiges) et d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. La détection de ces composés chimiques est basée sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux pour les métabolites secondaires dans les deux parties étudiées de la plante sont illustrés dans le tableau IV.1.

**Tableau IV.1:** Résultats des screening phytochimique dans la plante *d'Astragalus gombo*.

Métabolites secondaire	Feuilles	Tiges	Fleurs	Fruits
Flavonoïdes	-	+	+	+
Dérivés anthracéniques libres	+	+	+	+
Tannins, Polyphénols	+	+	+	+
Saponines	+	+	-	-
Terpénoides, Coumarines	+	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-	-
Les composés réducteurs, Protéines	-	+	+	+
Cardénolides, Stéroïdes	-	-	-	-

(+) : Présence (-) : Absence

Selon les résultats obtenus par les tests phytochimiques, nous remarquons la présence de la majorité des métabolites secondaires dans les organes étudiés (feuilles, tiges). Les tiges renferme neuf composés du métabolisme secondaires : flavonoïdes, tanins, dérivés anthracéniques libres, triterpènes, coumarines, saponosides, polyphénols, les composés réducteur et les protéines. Le screening chimique a montré également l'absence de trois

principes actifs dans les tiges dont l'importance utilisations thérapeutiques est non négligeable tels que, les cardénolides, les stéroïdes, les alcaloïdes.

Les feuilles contiennent aussi tous les phyto constituants de tiges à l'exception de la présence des flavonoïdes, des composés réducteurs, et les protéines.

L'existence de ces composés a été prouvée et six nouveaux glycosides triterpènes de type cycloartane ont été isolés dans *Astragalus gombo* [63]. Une autre étude a révélé la présence de protéines dans les parties aériennes d'*Astragalus gombo* provenant d'une région semi-aride d'Algérie [8], tandis que (Kim *et al.*) [193] ont isolé des protéines d'*Astragalus membranaceus* qui agissent comme un allergène. (Jaradat *et al.*) [194] rapportent que les extraits d'*Astragalus aleppicus*, d'*Astragalus angustifolius*, d'*Astragalus annularis* et d'*Astragalus boeticus*. Il est démontré que les glycosides de saponine, les phénols, les flavonoïdes, les tanins et les stéroïdes ont été trouvés en grande quantité dans les extraits aqueux, acétoniques, méthanoliques et dichloromethane. L'étude de (Shojaii *et al.*) [195] rapportent dans leurs travaux que l'extrait hydro alcoolique des gousses d'*Astragalus hamosus*, a révélé la présence de quantités considérables de flavonoïdes, saponines, terpènes, alcaloïdes, tanins et phénols, ces résultats sont en agreement avec la nôtre à l'exception de l'absence des alcaloïdes dans notre plante. De plus, cette plante contient des coumarines qui sont utilisées comme anticoagulants [196] antioxydants, antimicrobiens (antiviraux, antifongiques et antiparasitaires), anticancéreux, antidiabétiques, analgésiques, anti-neurodégénératifs et anti- inflammatoires.

Le genre *Astragalus* est bien connu pour être une riche source de métabolites secondaires bioactifs. Des recherches phytochimiques antérieures sur diverses espèces d'*Astragalus* ont permis principalement d'isoler et de caractériser des saponines [26, 197] et des flavonoïdes [52, 198] et des polysaccharides. Ce qui explique pour l'utilisation de cette plante pour ses propriétés hépatoprotectrices, immunostimulantes, antioxydantes et antivirales [6].

## IV.2 Rendement de l'extraction des différentes fractions

Le rendement de chaque extraction est calculé par le poids du résidu qui varie selon Type de plante, la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa plarité, les conditions de séchage, organe utilisé pour l'extraction, la richesse de chaque espèce en métabolites. Les rendements des différentes fractions des feuilles et tiges variait de 0,07 à 11,17 (tableau IV.2).

**Tableau IV.2:** Rendement des différentes fractions des feuilles et tiges

Extrait	Feuilles %	Tiges %
Brut	2,9850	4,8852
fraction Dichlorométhane	0,07	0,1387
fraction Acétate d'éthyle	0,1044	0,1508
fraction butanol	2,1701	1,2947

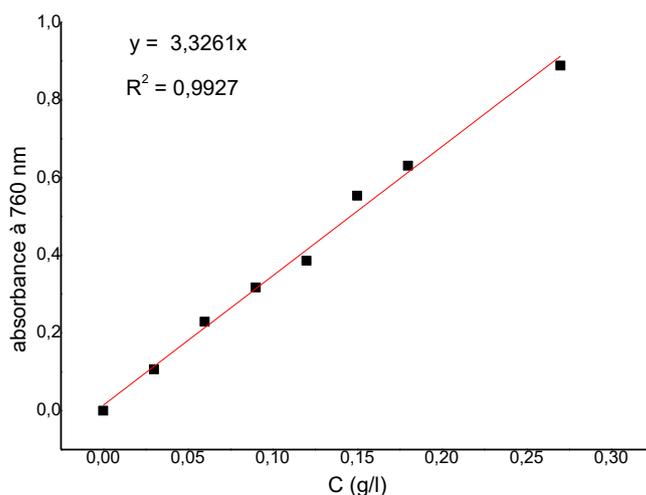
Le rendement d'extraction d'*Astragalus gombo* est fortement affecté par la méthode et le solvant d'extraction. Le pourcentage de récupération des composés extractibles des feuilles et tiges variait de 11,17 à 0,07 %. Les rendements d'extraction du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle étaient faibles dans les feuilles et tiges, cependant, le rendement d'extraction du butanol était significatif. L'extrait brut (hydro-méthanolique) quant à lui présente un pourcentage intéressant de 4,88% suivie de l'extrait brut des feuilles (2,98%). Cela peut être lié à la richesse de la plante en composés polaires. Les résultats d'étude de (**Maamria, et al.,**) [63] Sur la partie aérienne de *Astragalus gombo*, montrent un rendement d'extraction élevé d'extrait butanolique par rapport aux deux autres extraits éther de pétrole et acétat d'éthyle, sont en accord avec nos résultat.

(**Arumugam, et al.,**) [199] ont montré que l'extrait méthanolique de *Astragalus ponticus* possède le plus haut rendement par rapport à d'autres extraits de la même plante, ce qui est en accord avec notre étude. Nos résultats ne sont pas en accord avec l'étude de (**Shojaii, et al.,**) [195], qui ont décrit que le rendement maximum en extrait était obtenu à partir d'extrait d'hexane. La différence de polarités des solvants utilisés, qui joue aussi un rôle majeur d'augmentation de la solubilité des composés phytochimiques, pourrait être à l'origine de la variation des rendements en extraits. Selon les résultats des auteurs (**Truong et al.,**) [200], dans les mêmes conditions d'extraction, Le solvant a été reconnu comme l'un des facteurs les plus importants pour déterminer le rendement d'extraction. D'après les présents résultats, nous pouvons conclure que l'utilisation combinée d'eau et de solvants organiques, en particulier l'éthanol et le méthanol pur, sont les meilleurs solvants à utiliser pour l'extraction des métabolites secondaires afin d'obtenir un meilleur rendement ; Facilitant ainsi l'extraction de produits chimiques solubles dans l'eau et/ou un solvant organique.

### IV.3. Résultat de dosage

#### IV.3.1. Dosage des phénols totaux (CPT)

La teneur en phénols totaux des différents extraits végétaux a ensuite été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure IV.1) et exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). L'équation obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées :  $Y = 3,32X$  ( $R^2 = 0,992$ ).



**Figure IV.1:** Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont présentés dans le Tableau IV.3.

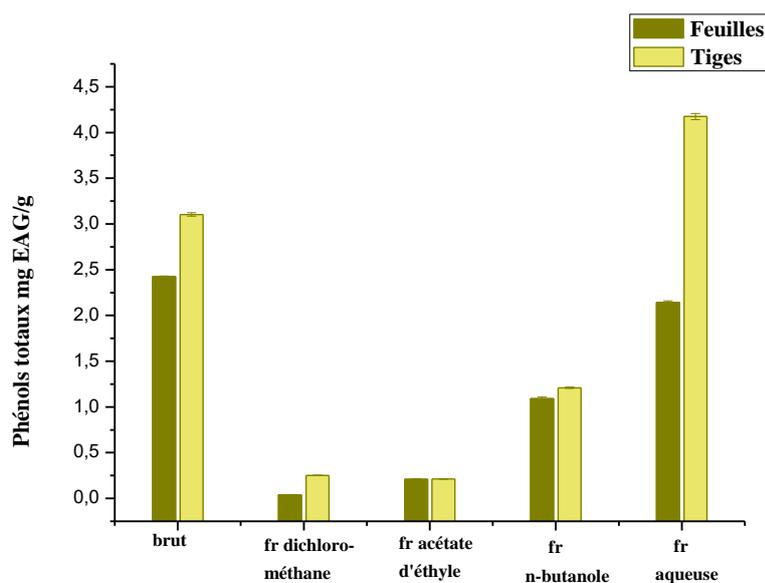
Les résultats obtenus ont montré que la fraction aqueuse et l'extrait brut pour les tiges ont enregistré les valeurs les plus élevées des phénols totaux ( $4.17 \pm 0.034$  et  $3.10 \pm 0.0109$  mg EAG / g MS respectivement). La même chose pour les feuilles les valeurs plus élevées de CPT ont été enregistrées à la fraction aqueuse et l'extrait brut (Tableau IV.3). Tandis que, les teneurs les plus faibles sont remarquées dans la fraction dichlorométhane pour les feuilles et la fraction acétate d'éthyle pour les tiges.

**Tableau IV.3:** Quantité des phénols totaux dans les extraits en mg EAG/ g MS

Extrait	Feuilles	Tiges
<b>Brut</b>	2,425 ± 0,063	3,104 ± 0,019
<b>fraction dichlorométhane</b>	0,040 ± 0,003	0,254 ± 0,001
<b>fraction acétate d'éthyle</b>	0,211 ± 0,001	0,213 ± 0,001
<b>fraction n-butanol</b>	1,090 ± 0,019	1,209 ± 0,007
<b>fraction aqueuse</b>	2,142 ± 0,018	4,174 ± 0,034

Nous avons comparé la teneur en composés phénoliques dans les fractions des organes étudiés et avons constaté que la teneur en composés phénoliques augmentait avec l'augmentation de la polarité du solvant ; le contenu en phénols totaux pour les feuilles est classé selon l'ordre décroissant suivant :

Fraction aqueuse > fraction butanolique > fraction acétate d'éthyle > fraction dichlorométhane, mais chez les tiges l'ordre comme le suivant : fraction aqueuse > fraction butanolique > fraction dichlorométhane > fraction acétate d'éthyle. Autre part, on a comparé la teneur des composés phénoliques chez les extraits bruts pour les deux organes et nous avons trouvé que les tiges enregistrent la quantité la plus élevée (Figure IV.2).

**Figure IV.2 :** Teneur phénolique des feuilles et des tiges

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Niknam *et al.***) [201], dans lesquels la teneur en composés phénoliques totaux dans les racines de 20 espèces d'astragale que l'extrait méthanol/eau (80/20, v/v) et l'extrait aqueux donnent les valeurs les plus élevées en phénols totaux. Par ailleurs, une étude réalisée par **Naghiloo** et ses collaborateurs [202], sur les feuilles d'*Astragalus compactus*, avec un procédé extractif différent de celui que nous avons utilisé (extraction au Soxhlet), a montré que l'extrait n-hexane contenait les plus grandes quantités de phénols. De plus, le contenu phénolique total des feuilles de *Phaseolus radiatus* (Fabaceae), étudié par (**Fidrianny *et al.***) [203] ont montré que le CPT le plus élevé dans l'extrait éthanolique par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle.

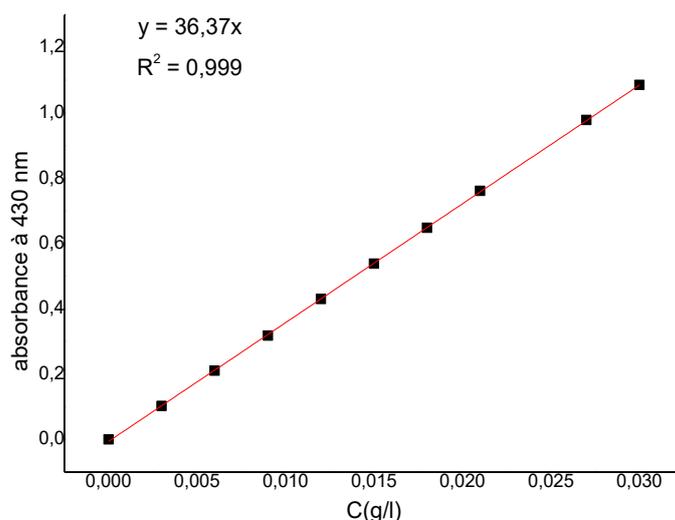
Les études menées par (**Jaradat *et al.***) [194] sur les feuilles de *A. boeticus* ont montré que l'extrait méthanolique enregistre une grande quantité de la teneur en polyphénol totaux.

D'une manière générale, les niveaux de composés phénoliques dans les plantes sont généralement dépendent des conditions par une combinaison de facteurs biologiques (génotype, ontogénie et organe) et environnementaux (température, salinité et intensité lumineuse). Le degré de polymérisation des composés phénoliques, leur interaction et le type d'extraction et de solvant utilisé affectent tous les composés phénoliques [204].

Le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux composés phénoliques, car beaucoup d'autre composés réducteurs peuvent interférer avec d'autre composée que les polyphénols tels que les protéines, les sucres simples (glucose), les glycoprotéines et les pigments [205].

### IV.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux (CFT)

La quantification des flavonoïdes des différents extraits bruts a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure IV.3) et les teneurs sont exprimées en milligrammes équivalent en quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ / g MS) à l'aide de l'équation de régression linéaire suivante obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées :  $Y = 36,37X$  ( $R^2 = 0,999$ ), où y représente la valeur de l'absorbance et X est la valeur de la concentration de Quercétine.



**Figure IV.3 :** Courbe d'étalonnage de quercétine

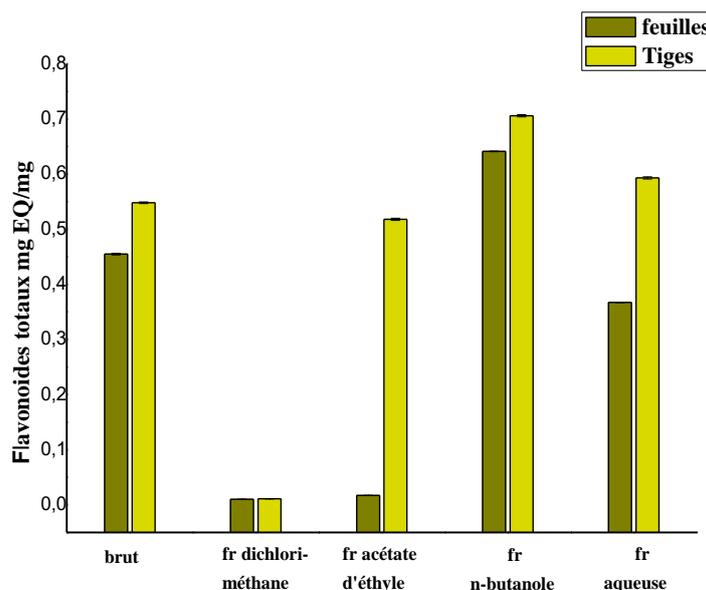
Les teneurs en flavonoïdes totaux sont comprises entre  $0,706 \pm 0,002$  et  $0,0105 \pm 0,0001$  mg EQ/g MS (Tableau IV.4). La fraction dichlorométhane chez les deux parties feuilles et tiges enregistrent la même teneur de flavonoïde avec une valeur de  $0,011$  mg EQ / g MS. La teneur la plus élevée a été trouvée dans la fraction butanolique des deux parties feuilles et tiges par rapport aux autres fractions. En général, nous observons une teneur plus élevée des flavonoïdes aux tiges par rapport aux feuilles.

**Tableau IV.4 :** Quantité des flavonoïdes totaux dans les extraits en mg EQ / g MS

Extrait	Feuilles	Tiges
<b>Brut</b>	$0,455 \pm 0,0015$	$0,548 \pm 0,0015$
<b>fraction dichlorométhane</b>	$0,010 \pm 0,0001$	$0,011 \pm 0,0001$
<b>fraction acétate d'éthyle</b>	$0,017 \pm 0,0001$	$0,518 \pm 0,002$
<b>fraction n-butanol</b>	$0,641 \pm 0,0005$	$0,706 \pm 0,002$
<b>fraction aqueuse</b>	$0,367 \pm 0,0005$	$0,593 \pm 0,002$

Nous remarquons, d'après la figure IV.4, que les tiges sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux feuilles. Ces résultats montrent que la fraction butanolique pour les deux parties est l'extrait le plus riche en flavonoïdes, suivi par la fraction aqueuse tige et la fraction brut des feuilles, où la teneur la plus élevée est constatée dans la fraction butanolique des tiges, elle est de l'ordre de  $0,706 \pm 0,002$  mg EQ /g, suivi par la fraction butanolique feuilles avec une teneur de  $0,613 \pm 0,0005$  mg EQ /g (Tableau IV.4). Ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'eau

dans le système d'extraction favorisant, ainsi, le passage de composés phénoliques de polarité importante. D'autre part, nous avons enregistré la pauvreté de l'extrait dichlorométhane en composés flavonoïdes, ce qui est principalement dû à l'hydrophobicité du solvant, qui empêche le passage des composés polaires. Nous pouvons en conclure que la teneur en flavonoïdes de notre plante varie en fonction de l'extrait, de la méthode d'extraction et de la polarité du solvant utilisé, et de la localisation géographique, de la saison de culture et de récolte, la maturité et la durée de conservation de la plante.



**Figure IV.4:** Teneur flavonoïdes des feuilles et des tiges

Les taux de flavonoïdes dans nos extraits sont inférieurs aux teneurs de phénols totaux, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques avec des structures chimiques différentes des flavonoïdes (acide phénolique, tanins, siblènes) par d'autres composants non flavonoïdes.

De nombreuses sous-classes différentes de flavonoïdes ont été décrites dans le genre *Astragalus*, notamment les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, les isoflavones, les chalcones, les ptérocarpanes et les chalcones.

(Ibrahim, *et al.*,) [206], ont rapporté une nouvelle flavone, le C-glycoside d'*Astragalus bombycinus*. Les flavonoïdes représentent le plus grand groupe de composés polyphénoliques présents dans les espèces d'astragale. Les flavonols sont les composés les plus fréquemment isolés. Parmi eux, la quercétine, le kaempférol et leurs glycosides ont été trouvés dans un plus grand nombre d'espèces d'astragale [207].

Le contenu flavonique de nos extraits est réparti en premier dans le n-butanol, qui a une polarité plus élevée extraire les formes les plus polaires qui peuvent être sous forme de glycosides, et en second, le méthanol aqueux est quant à lui efficace pour l'extraction des flavonoïdes glycosidiques et flavonoïdes aglycones à la fois [208]. Le chloroforme qui a probablement pu extraire une quantité d'aglycones, L'acétate d'éthyle qui pourrait entraîner une large gamme de structures monoglycosylées ou éventuellement aglycones.

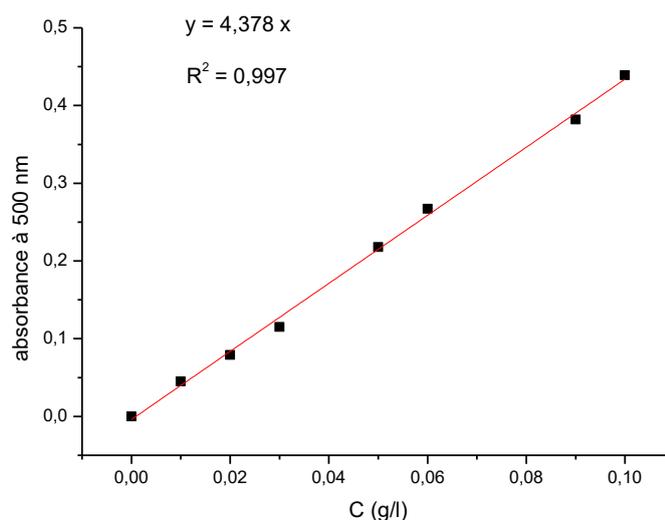
Les résultats obtenus sont conformes aux ceux de **Guettaf** et ses collaborateurs [209], qui ont travaillé sur *Ononis angustissima* (Fabaceae), ils ont montré que l'extrait aqueux issu de l'extraction hydroalcoolique, a enregistré des quantités plus élevées de flavonoïdes.

Par contre, dans une autre étude réalisée par (**Jaradat, et al.**) [194] de quatre espèces d'astragale palestinien, la teneur en flavonoïde est très loin et supérieur à nos résultats, ils ont enregistré une teneur de  $(23,97 \pm 0,40$  à  $66,37 \pm 1,1$  mg ER/g extrait). Cette teneur a été obtenue à partir de même genre poussant en palestine, ce qui laisse supposer que l'écologie de la plante est un facteur déterminant sur sa composition en flavonoïdes. (**Arumugam, et al.**) [199], trouvent des teneurs de flavonoïdes plus importantes que dans nos extraits ( $49,13 \pm 0,51$  mg d'ER/g d'extrait) sur l'extrait méthanoliques d'*Astragalus ponticus*.

En effet, les présents résultats sont en accord avec des travaux antérieurs et corroborent la présence de flavonoïdes issus des parties aériennes du genre *Astragalus* algérien [50, 63, 210, 211].

### IV.3.3. Dosage des tanins totaux (CTT)

La courbe d'étalonnage de la catéchine a été utilisée pour calculer la teneur en tanins de chaque extrait végétal, qui a ensuite été exprimée en équivalent catéchine par mg de masse sèche (mg CE/g MS). À l'aide de l'équation de régression linéaire suivante obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées  $Y = 4,378 X$  ( $R^2 = 0,997$ ) (Figure IV.5).



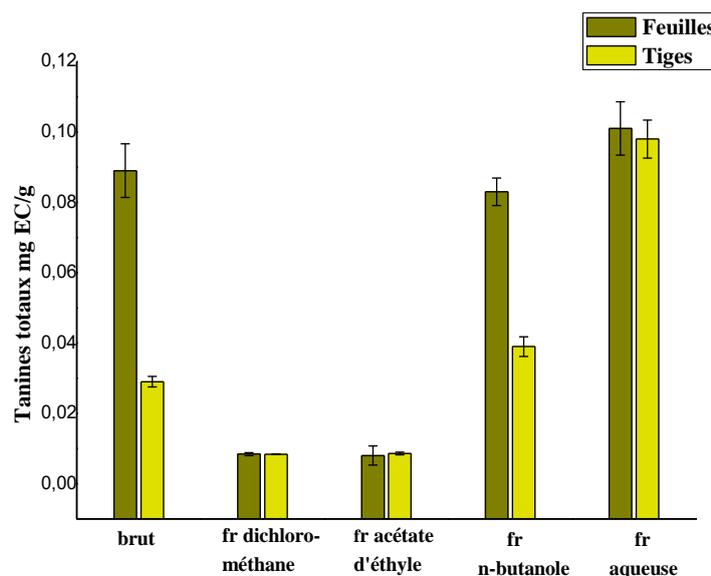
**Figure IV.5 :** Courbe d'étalonnage de catéchine

Les résultats de l'étude quantitative de teneur totale en tanins des extraits des feuilles et des tiges sont présentés dans le (tableau IV.5) et la (figure IV.6). Le contenu en tanins est compris entre ( $0,101 \pm 0,0076$  et  $0,00804 \pm 0,0027$  mg EC/g MS respectivement). Il paraît clairement que le contenu en tanins le plus élevé a été détecté dans la fraction aqueuse des feuilles et des tiges ( $0,101 \pm 0,0076$  et  $0,098 \pm 0,0054$  mg EC/g MS respectivement) suivie de l'extrait brut des feuilles ( $0,089 \pm 0,0076$  mg EC/g MS). On remarque que la fraction butanolique des feuilles enregistre une valeur supérieure à celle qui a été enregistrée dans les tiges, tandis que, le contenu de tanins dans la fraction acétate d'éthyle et la fraction dichlorométhane presque était le même dans les feuilles et tiges.

**Tableau IV. 5 :** Quantité des tanins totaux dans les extraits en mg EC/g MS

Extrait	Feuilles	Tiges
<b>Brut</b>	$0,089 \pm 0,0076$	$0,029 \pm 0,0015$
<b>fraction dichlorométhane</b>	$0,00844 \pm 0,0004$	$0,0084 \pm 0,0001$
<b>fraction acétate d'éthyle</b>	$0,00804 \pm 0,0027$	$0,0086 \pm 0,0004$
<b>fraction n-butanol</b>	$0,083 \pm 0,0039$	$0,039 \pm 0,0028$
<b>fraction aqueuse</b>	$0,101 \pm 0,0076$	$0,098 \pm 0,0054$

Les fractions aqueuses et n-butanol des tiges présentent aussi les teneurs les plus riches en tanins qui sont de  $0,098 \pm 0,0054$  et  $0,039 \pm 0,0028$  mg EC/g MS respectivement. Les autres fractions en tanins feuilles et tiges sont presque les mêmes, avec la plus faible quantité enregistrée pour la fraction dichlorométhane.



**Figure IV.6:** Teneur des tanins pour les feuilles et les tiges

La répartition des tanins dans notre étude diffère selon la nature des solvants utilisés. Les tanins condensés extraits de différents solvants ont différents degrés de polymérisation, qui peuvent être utilisés pour expliquer cette disproportion. En effet, les tanins condensés avec des degrés de polymérisation inférieurs sont solubles dans l'eau et les solvants polaires.

Les tanins à faible degrés de polymérisation sont solubles dans l'eau et les solvants polaires, tandis que ceux qui ont un haut degré de polymérisation sont solubles dans les solutions alcalines [212]. Ainsi, les tanins solubles dans une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS), les tanins insolubles et tanins solubles dans les solvants organiques [213].

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de (**Jaradat *et al.***) [194], sur l'extrait méthanolique du feuilles d'*A. boeticus*, citant un taux de tanins condensés plus importantes que dans nos extraits (22,54 mg TA/Eg). Par ailleurs, une étude réalisée par (**Guettaf *et al.***) [209] sur l'extrait aqueux d'*O. angustissima* (Fabaceae) contenait des tanins (57,14 ± 9,55 mg TAE / g extrait) deux fois plus élevés que l'étude précédente (**Jaradat *et al.***).

Une étude de (**Karamac *et al.***) [214], sur les graines de différentes espèces appartenant à la famille des Fabacées (haricots, lentilles rouges, lentilles vertes, fèves, haricots rouges et vesce) pour extraire différentes combinaisons de composés phénoliques à l'aide de plusieurs solvants : méthanol, éthanol, eau, eau-méthanol, eau-éthanol, eau-acétone et diméthylformamide-eau montre que l'acétone à 80%, assure une extraction plus complète des tanins jusqu'à 45% des extraits bruts, et une bonne activité antioxydante des extraits a été obtenue .

Enfin, il est conclu que la teneur en polyphénols des flavonoïdes et des tanins condensés est influencée par la sélectivité du solvant. Et la différence entre ces résultats pourrait être due

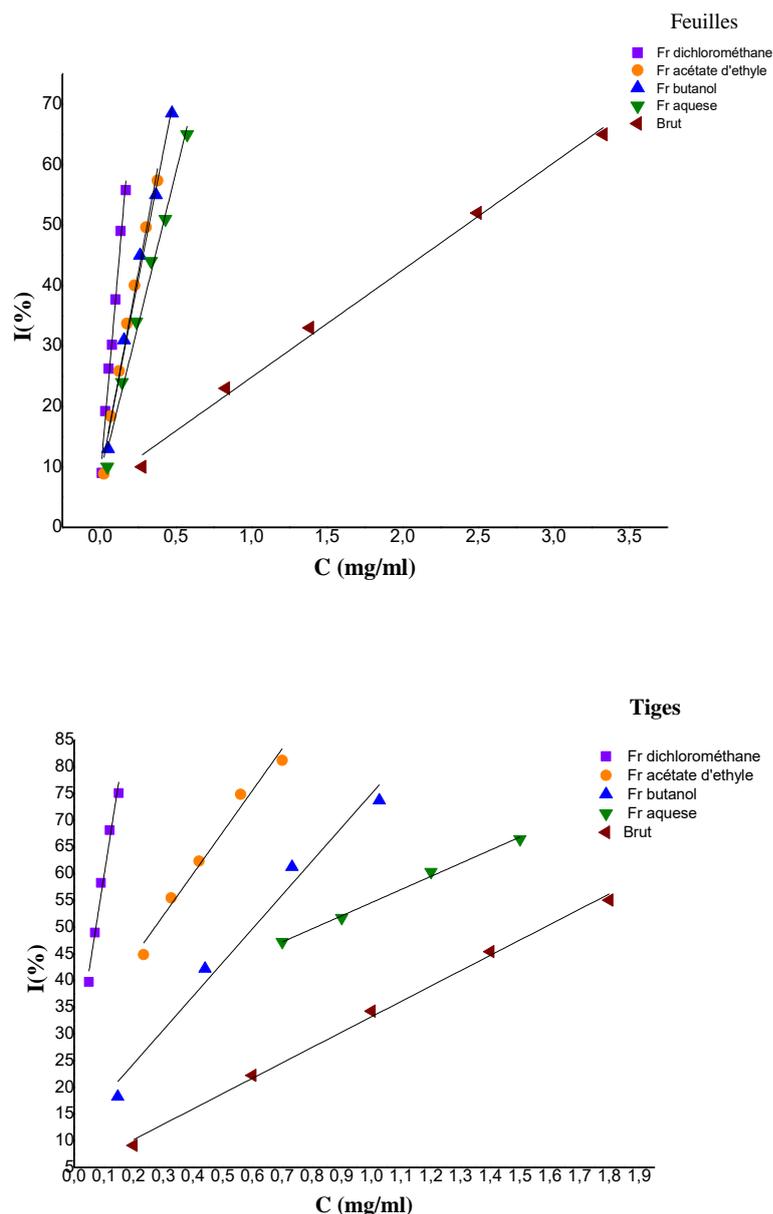
à de nombreux facteurs tels que la sensibilité des tanins à des plusieurs voie de dégradation (l'oxydation, la lumière...), les influences environnementales, les organes végétaux utilisés et la méthode d'extraction [215].

#### IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des polyphénols peuvent être attribuées à plusieurs manières qui diffèrent dans leurs principes analytiques et leurs conditions expérimentales, et les antioxydants contribuent de différentes manières au potentiel antioxydant total [216]. Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits. Dans cette étude, nous avons utilisé quatre méthodes pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* des différents extraits obtenus à partir de deux organes les feuilles et les tiges de *Astragalus gombo*. À savoir : L'évaluation de l'activité antioxydante a été déterminée par les tests : DPPH, ABTS, Réduction de Mo(VI) et radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ .

##### IV.4.1. Résultats du piégeage du radical DPPH

La capacité d'un antioxydant potentiel contre le radical DPPH $^{\bullet}$  est à la base du test antioxydant DPPH. Lorsque des antioxydants sont présents, la molécule de DPPH $^{\bullet}$  peut accepter un électron ou un atome d'hydrogène de la molécule de piégeur d'antioxydants pour se transformer en une molécule de DPPH plus stable. Visuellement, le processus de réduction du radical DPPH $^{\bullet}$  sera montré sur le changement de couleur de la solution DPPH $^{\bullet}$  qui était à l'origine violet foncé à jaune après réaction avec les composés antiradicalaires [217]. Les valeurs IC<sub>50</sub> (mg/mL), soit la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale de DPPH $^{\bullet}$ , sont utilisées pour exprimer l'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH $^{\bullet}$ . Plus le CI<sub>50</sub> est faible, plus « l'efficacité antiradicalaire » est élevée.



**Figure IV.7:** Courbes représentant les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différents extraits

Les courbes de pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'extrait utilisé sont présentées sur la figure IV.7. Comme antioxydant standard, le BHT et le BHA sont utilisés. L'interprétation des courbes révèle que lorsque la concentration de l'extrait augmente, le pourcentage d'inhibition des radicaux libres augmente sensiblement. Les valeurs des  $CI_{50}$  des extraits étudiés a été reportéessur le tableau IV.6.

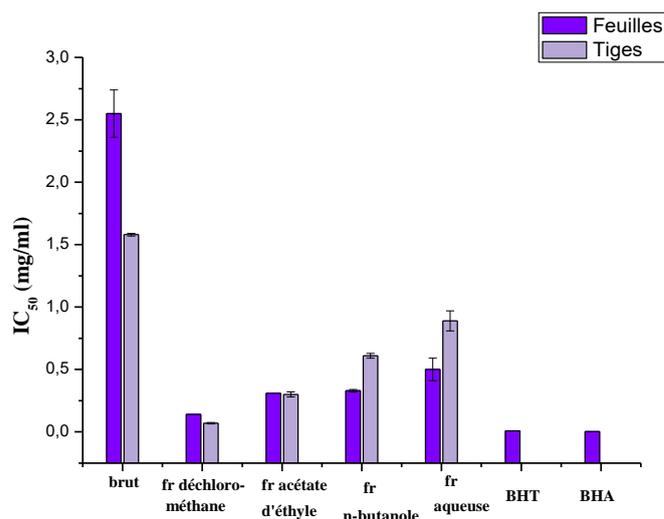
**Tableau IV.6 :** Valeurs des  $CI_{50}$  des extraits étudiées en mg/mL par piégeage du radical DPPH•

Extrait / composé	$CI_{50}$ (mg/mL)	
	Feuilles	Tiges
Brut	$2,55 \pm 0,19$	$1,58 \pm 0,011$
fraction dichlorométhane	$0,14 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,005$
fraction acétate d'éthyle	$0,31 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,02$
fraction n-butanol	$0,33 \pm 0,011$	$0,61 \pm 0,02$
fraction aqueuse	$0,5 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,08$
BHA	$0,0036 \pm 0,000$	
BHT	$0,0081 \pm 0,000$	

Les valeurs de  $CI_{50}$  variaient de  $0,07 \pm 0,00$  à  $2,55 \pm 0,19$  mg/mL (tableau IV.6). La meilleure activité antiradicalaire, correspond à la valeur  $CI_{50}$  la plus basse. Les extraits d'acétate d'éthyle de feuilles et des tiges ont montré des activités de piégeage radicalaires similaires et significatives vers le DPPH avec des valeurs de  $CI_{50}$  ( $0,31 \pm 0,00$  mg/mL et  $0,30 \pm 0,02$  mg/mL respectivement), tandis que la fraction dichlorométhane et acétate d'éthyle chez le feuilles ont montrés une activité de piégeage plus élevée contre le DPPH avec des valeurs de  $CI_{50}$  ( $0,14 \pm 0,00$  et  $0,31 \pm 0,00$  mg/mL), tandis que l'activité de piégeage la plus faible a été enregistrée dans l'extrait brut  $CI_{50}=2,55 \pm 0,19$  mg/mL. D'autre part, dans les tiges la capacité de la fraction dichlorométhane à piéger le DPPH est supérieure à celle de son extrait brut avec des  $CI_{50}$  respectifs de ( $0,07 \pm 0,00$  et  $1,58 \pm 0,01$  mg/mL). Le BHA et BHT présente un pouvoir anti radicalaire très puissant par rapport à nos extraits. De toute façon, selon (Moore, *et al.*) [218], Les antioxydants naturels indiquent souvent un pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques.

Selon la figure IV.8, les résultats obtenus par cette méthode et par comparaison avec les produits de référence, sont classés par ordre d'efficacité des fractions de feuilles et de tiges comme suit :

BHA > BHT > fraction dichlorométhane > fraction acétate d'éthyle > fraction n-butanol > fraction aqueuse > brut.



**Figure IV.8 :** Activité anti radicalaire DPPH des extraits de *A. gombo*, BHA et BHT

La capacité élevée de piégeage des radicaux libres (décoloration de la solution DPPH) de l'extrait de dichlorométhane malgré la faible teneur en composés phénoliques est probablement due à la réactivité élevée, c'est-à-dire à la qualité des composés phénoliques. Soit par le biais d'autres types de composés tels que les composés triterpéniques, les saponines. Ces activités antioxydantes dépendent fortement de la nature du solvant utilisé, en raison des potentiels antioxydants différents des composés à polarité différente.

En comparant nos résultats avec des études antérieures, nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Adiguel, et al.,**) [219], des racines de diverses espèces d'*Astragale* : *A. microcephalus*, *A. macrocephalus*, *A. erinoceus*, *A. psoraloides* et *A. arygroides*, indiquent une activité antiradicalaire importante des extraits hexane/dichlorométhane avec des valeurs de  $CI_{50}$  étaient respectivement de 0,0352 mg/mL, 0,021 mg/mL, 0,022 mg/mL, 0,0203 mg/mL et 0,038 mg/mL très proche de celle trouvée dans notre étude sur la fraction dichlorométhane. Nos résultats concordent également avec ceux de (**Belmokhtar, et al.,**) [220] , sur *Retama monosperma* L Boiss (fabaceae), démontrant que les fractions chloroformique (solvant apolaire) des fleurs ( $2,56 \pm 0,19$  mg/mL) présentent la meilleure activité de piégeage du radical libre de DPPH cette valeur est supérieur à nos valeurs. Par contre, c'est la fraction acétate d'éthyle des tiges présente une  $CI_{50}$  sont dotées d'un pouvoir antioxydant intéressant ( $1,51 \pm 0,11$  mg/mL) cette valeur est aussi supérieur à nos valeurs.

Dans une autre étude entreprise par (**Jaradat et al.,**) [194] sur le pouvoir antiradicalaire de divers extraits au solvant (aqueux, acétone, méthanol et dichlorométhane) de quatre espèces *Astragalus* Palestinian *A. aleppicus*, *A. angustifolius*, *A. annularis* et *A. boeticus* démontrant

que les extraits méthanolique présentent les  $CI_{50}$  les plus faibles et donc les pouvoir antioxydants les plus élevés; ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. Une autre étude réalisée par (**Bouezzane, et al.,**) [221], a révélé un effet inhibiteur plus puissant de l'extrait n-butanol des parties aériennes d'*A. monspessulanus* ( $CI_{50} = 0,063 \pm 0,01$  mg/mL). Les résultats de (**Arumugam, et al.,**) [199] pour un extrait méthanolique des parties aériennes et des racines d'*Astragalus ponticus* (Turquie) présentent de faibles pouvoirs antioxydants ( $28,23 \pm 0,95$  et  $23,81 \pm 1,10$  mg équivalent Trolox/g d'extrait respectivement).

Ce résultat ne concorde pas avec celui de (**Teyeb, et al.,**) [81] des parties aériennes et les racines de *Astragalus gombiformis* (tunisie) sur l'extrait méthanolique se sont révélées plus efficace à piéger le radical libre de DPPH, avec des  $CI_{50}$  de  $473,33 \pm 64,29$  et  $626,66 \pm 64,29$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Autres études sur l'*Astragalus chrysostachys* Boiss. qui donne le meilleur pouvoir antiradicalaire est meilleure que nos résultats en phase acétate d'éthyle  $0,0146$  mg/mL et en phase butanol  $0,0517$  mg/mL. Des autres études de (**Ghzeimian, et al.,**) [222], sur l'*Astragalus chrysostachys* Boiss, indiquent une activité antiradicalaire importante de la fraction acétate d'éthyle et la fraction butanolique avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $0,014$  et  $0,051$  mg/mL respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celles de notre étude.

Le fait que l'activité antioxydante et la quantité de phénols dans un extrait soient des variables qui dépendent fortement du procédé d'extraction, du type et de la polarité du solvant, et en particulier de la matière végétale, peut être utilisé pour expliquer l'écart entre les études citées [223].

En raison des doubles liaisons présentes dans le cycle C des flavonoïdes, ils ont généralement une activité antioxydante plus élevée. Les squelettes flavonoïdes et les différents et la position des groupes hydroxyle ont généralement influenceraient largement sur la capacité de piégeage les radicaux libres. Les composés avec l'activité de piégeage des radicaux la plus élevée comprennent ceux avec une structure ortho-3,4-dihydroxy au niveau du cycle B (comme la quercétine), des groupes hydroxyle en position méta 5,7, dihydroxy sur le cycle A (comme le kaempférol), et ceux avec une double liaison entre les groupes hydroxyle C2 et C3 dans l'isoliquiritigénine [224, 225].

La recherche sur les composés antioxydants naturels a reçu une attention considérable. De nombreuses espèces ont été étudiées pour leurs activités antioxydantes, et certaines d'entre elles ont montré un potentiel antioxydant élevé qui semble être corrélé principalement avec le contenu phénolique de ces plantes [226, 227].

De ce fait, nous avons établi des relations entre ces composés et l'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH.

Des corrélations entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en tanins et l'activité antioxydante ont été déterminées, afin de confirmer si ces composés phénoliques issus des extraits étaient les principaux composants du piégeage des radicaux libres testé : pouvoir antiradicalaire du DPPH en générant des courbes de régression linéaire et déterminer le coefficient de corrélation ( $R^2$ ).

Une corrélation positive ( $R^2 = 0,826$ ) est observée entre la teneur CPT et la capacité de piégeage du radical libre de DPPH des feuilles. Ces résultats indiquent également que Les flavonoïdes totaux et les tanins des feuilles ne sont que très faiblement impliqués avec des  $R^2$  de 0,141 et 0,222 respectivement.

L'activité antiradicalaire DPPH des extraits des tiges est directement corrélée aux teneurs des phénols totaux ( $R^2=0,613$ ). Mais que cette activité est faible pour les flavonoïdes totaux et les tanins avec des  $R^2$  de 0,111 et 0,152 respectivement.

Ces résultats de corrélation indiquent que les polyphénols totaux et les flavonoïdes largement attribuables dans l'activité antioxydante des extraits de feuilles et de tiges. La principale raison pour laquelle ceux-ci sont reconnus comme de puissants antioxydants est due à leur structure. Selon l'étude bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation.

**PU** et ses collaborateurs [228] ont mis en évidence la relation structure-fonction des nouveaux composés phénoliques isolés à partir de les racines de la plante l'*Astragalus taipaihanensis*, et leurs capacités de piéger le radical DPPH. Les résultats de cette étude ont révélé que les composés phénoliques isolés (chalcone (Isoliquiritigenin), Kaempferol et le glucoside, 7, 2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavane, Quercetin, d'isoflavone Ononin, l'isoflavone (Formononetin)) ont montré une forte capacité de piégeage du DPPH plus efficace que l'antioxydant utilisé comme référence : le BHA et BHT synthétique.

Les travaux de (**Jaradat, et al.,**) [194], sur les feuilles de quatre espèces d'Astragale Palestiniens *A. aleppicus*, *A. angustifolius*, *A. annularis* et *A. boeticus* notent que les teneurs totales en phénols, flavonoïdes et tanins a montré une corrélation significative entre l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) pour quatre extraits (aqueux, acétone, méthanol et dichlorométhane).

En accord avec nos résultats, (**Zhang, et al.,**) [229], confirment un coefficient de corrélation élevé  $R^2=0,95$  entre les teneurs en polyphénols totaux et le pouvoir antiradicalaire ( $CI_{50}$ ) par le test DPPH•d'un certain nombre d'extraits d'*Astragalus complanatus* obtenus dans différentes conditions d'extraction.

L'activité antioxydante la plus élevée se trouve dans les polyphénols avec un nombre élevé de groupes hydroxyle en raison de leur capacité à donner plus d'atomes, selon des études sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piègeur des radicaux libres. Afin de réduire les radicaux libres. La capacité du DPPH à donner un atome d'hydrogène et la réaction de polymérisation subséquente sont deux facteurs dans sa capacité à piéger les radicaux libres [230].

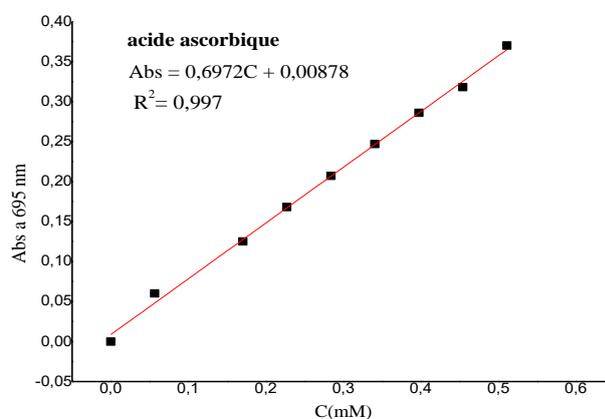
Les caractéristiques structurales de divers polyphénols sont étroitement liées à leur capacité à transférer des atomes d'hydrogène labiles au radical libre DPPH [231].

#### IV.4.2. Réduction de Mo(VI) en Mo(V)

La réduction de Mo(VI) en Mo(V) est mesurée par le test au phosphomolybdate. Ce test est une méthode quantitative pour évaluer le taux de réaction de réduction entre les antioxydants, oxydants et ligands du molybdène. Basé sur un mécanisme de transfert d'électron singulet, ce test mesure la capacité antioxydante totale [232].

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de l'acide ascorbique (vitamine C) en termes d'équivalence AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity, capacité antioxydante en équivalent d'acide ascorbique) (Figure IV.9). Ce paramètre, est défini donc comme étant la concentration de la solution standard de l'acide ascorbique (vitamine C) possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée. Plus la valeur d'AEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important [233]. Les résultats obtenus à partir des pentes prises nous ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimé dans l'absorbance en fonction de l'inverse du facteur de dilution  $1/n$ , nous avons calculé le paramètre AEAC pour chaque extrait (Tableau IV.

7).



**Figure IV.9 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C) pour la réduction de Mo (VI)

Les résultats de ce test montrent que tous les extraits présentent des capacités antioxydantes élevée meilleure que BHA (tableau IV. 7) nous observons que les valeurs d'AEAC varient de  $605,57 \pm 32,50$  à  $33,43 \pm 0,67$  mM pour les feuilles et de  $219,71 \pm 0,24$  à  $79,02 \pm 1,11$  mM pour les tiges.

Les valeurs d'AEAC les plus élevées ont été enregistrées dans la fraction butanolique et la fraction aqueuse pour les feuilles ( $605,57 \pm 32,50$  mM et  $216,26 \pm 2,81$  mM respectivement), tandis que les effets les plus faibles ont été montrés par la fraction dichlorométhane pour les feuilles et les tiges ( $33,43 \pm 0,67$  et  $79,02 \pm 1,11$  mM respectivement).

L'extrait brut a montré la meilleure activité réductrice parmi toutes les fractions de tiges, suivi par la fraction aqueuse et la fraction butanol avec des valeurs d'AEAC égale a ( $189,29 \pm 5,75$  mM et  $187,60 \pm 6,11$  mM respectivement).

**Tableau IV. 7 :** Valeurs AEAC pour toutes les fractions étudiées en mM équivalent d'acide ascorbique

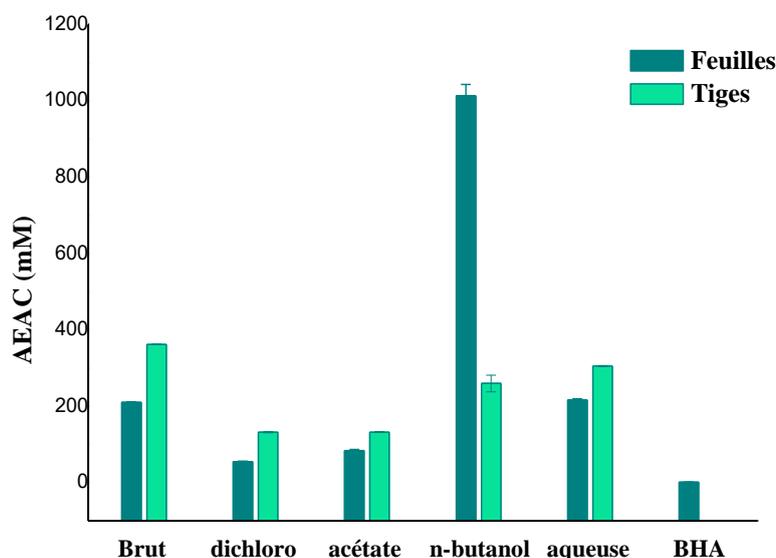
Extrait	Feuille	Tiges
Brut	$127,71 \pm 0,715$	$219,71 \pm 0,24$
fraction dichlorométhane	$33,43 \pm 0,67$	$79,02 \pm 1,11$
fraction acétate d'éthyle	$53,01 \pm 1,47$	$80,32 \pm 0,69$
fraction n-butanol	$605,57 \pm 32,50$	$187,60 \pm 6,11$
fraction aqueuse	$216,26 \pm 2,81$	$189,29 \pm 5,75$
BHA	$1,277 \pm 0,145$	

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les composés polyphénoliques ayant une activité antioxydante contre le test du phosphomolybdate ont un caractère polaire et/ou moyennement polaire, de ce fait ils seront en quantité importante dans cette fraction par rapport aux autres solvants peu polaires et donneront des meilleures valeurs d'AEAC.

Cette même remarque a été observée par (Arumugam, *et al.*,) et (Sarikurkcu, *et al.*,) et (Kurt-celep, *et al.*,) [199, 234, 235], qui ont indiqué que les extraits méthanoliques des feuilles (solvant polaire) de trois *Astragalus* (*ponticus* Pall:  $1,33 \pm 0,14$  mmol équivalent Trolox /g extrait; *macrocephalus* subsp:  $2,56 \pm 0,17$  mmol équivalent Trolox /g d'extrait ; *campylosema*:  $1,43 \pm 0,04$  mmol équivalent Trolox /g), présentait des capacités antioxydantes importantes. Ces capacités sont de loin plus faibles comparativement à nos résultats.

Il est nécessaire de noter que l'investigation dans la littérature scientifique, n'a relevé aucune étude portant sur l'activité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate des extraits phénoliques de l'espèce *Astragalus gombo*.

Nos résultats diffèrent de ceux (**Jahangir, et al.**) [236], qui indiquent une capacité antioxydante totale de l'ordre de  $0,7005 \pm 0,05$  mg EAA/g MS sur la fraction chloroforme du *Astragalus psilocentros*, suivie par les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol et la fraction de n-hexane et fraction méthanol et fraction aqueuse avec des valeurs de  $0,603 \pm 0,007$  et  $0,528 \pm 0,008$  et  $0,519 \pm 0,04$  et  $0,3475 \pm 0,01$  et  $0,2655 \pm 0,003$  mg EAA/g MS respectivement.



**Figure IV.10 :** Capacité réductrice de Mo(VI) en Mo(V) des extraits d'*Astragalus gombo*

Une corrélation positive ( $R^2 = 0,703$ ) est observée entre la teneur en flavonoïdes des feuilles et les résultats de la capacité antioxydante totale, mais que cette activité est faible le contenu phénolique et des tanins avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 0,202 et 0,318 respectivement Tableau IV.13.a.

Les données de le Tableau IV.13.a, indiquent que pour les tiges, il existe une corrélation positive ( $R^2=0,655$ ) entre les teneurs phénols totaux et la capacité antioxydante totale, tandis que les flavonoïdes totaux et les tanins une faible corrélation à cette activité  $R^2$  de 0,455 et 0,366 respectivement.

Dans la littérature, (**Kurt-celep, et al.**) [235], a montré que la capacité antioxydante totale était corrélée à la catéchine et à l'épicatéchine de (*Astragalus campylosema*), et à l'acide

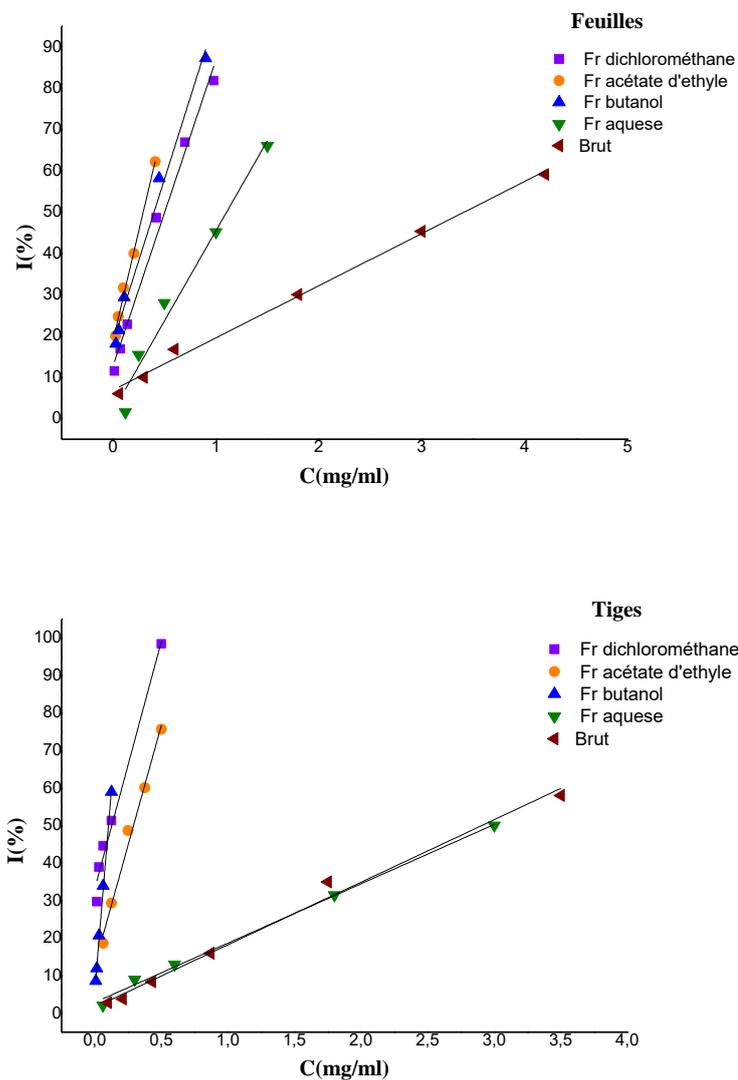
vanillique, à l'acide caféique, à l'acide syringique et à l'acide 3,5- dicaféoylquinique de (*Astragalus hirsutus*).

Les résultats de (**Sarikurkcu, et al.**) [234], démontrent une forte corrélation entre la teneur en polyphénols totaux ( $R^2= 0,982$ ) et le test de phosphomolybdenum des extraits des feuilles d'*Astragalus macrocephalus subsp*, contrairement à nos résultats dans les feuilles. En outre, ces mêmes auteurs enregistrent également une corrélation positive en flavonoïdes totaux avec un  $R^2$  de 0,792. Ces valeurs sont proches de nos résultats.

Nos résultats suggèrent l'importance des composés phénoliques sur l'activité antioxydante (test de phosphomolybdenum) des extraits végétaux.

#### IV.4.3. Piégeage du radical cation ABTS<sup>•+</sup>

La capacité des différents extraits à inhiber le radical cation ABTS<sup>•+</sup> est évaluée et les résultats exprimés en  $CI_{50}$  (mg/mL), le contrôle positif utilisé est l'acide ascorbique sont présentés dans la Figure IV.11.



**Figure IV.11:** Courbe représentant l'activité anti-radicalaire  $ABTS^{\bullet+}$  des extraits d'*Astragalus gombo*

Tous les extraits se sont avérés avoir une activité antioxydante par l'essai d' $ABTS^{\bullet+}$  avec des pourcentages d'inhibition différents. Selon le tableau IV.8, les valeurs de  $CI_{50}$  variaient de  $0,13 \pm 0,03$  à  $3,67 \pm 0,37$  mg/mL.

**Tableau IV.8** : Valeurs  $CI_{50}$  de test d'ABTS des différents extraits

Extrait / composé	$CI_{50}$	
	Feuilles	Tiges
Brut	$3,67 \pm 0,37$	$3,11 \pm 0,14$
fraction dichlorométhane	$0,55 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,01$
fraction acétate d'éthyle	$0,33 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,01$
fraction n-butanol	$0,4 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,03$
fraction aqueuse	$1,2 \pm 0,09$	$3,49 \pm 0,45$
Acide ascorbique	$0,05 \pm 0,00$	

L'activité réductrice du radical cation d'ABTS<sup>•+</sup> la plus élevée a été observée à la fraction n-butanol chez les tiges et à la fraction d'acétate d'éthyle chez les feuilles. La plus faible activité inhibitrice de l'ABTS<sup>•+</sup> a été enregistrée dans l'extrait brut chez les feuilles ( $3,67 \pm 0,37$  mg/mL). En général, les fractions de tiges ont montré une meilleure efficacité à réduire l'ABTS<sup>•+</sup>, que celles des feuilles.

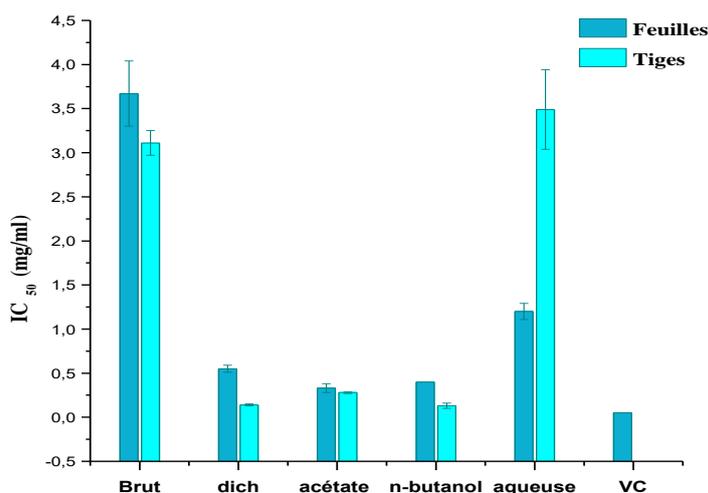
Dans les deux organes, nous constatons que toutes les  $CI_{50}$  des différents extraits sont supérieures à celles de standard l'acide ascorbique, signifiant que ces extraits sont moins efficace dans l'inhibition du radical cation d'ABTS<sup>•+</sup> en comparaison avec le standard utilisé. Nos résultats sont en accord avec les travaux de (PU, *et al.*,) [228] sur les racines l'*Astragalus taipaihanensis*, l'extraits acétate d'éthyle étaient le plus puissant pour le pouvoir inhibiteur d'ABTS<sup>•+</sup>. Ceci est concordance avec nos résultats sur la fraction acétate d'éthyle des feuilles. Selon ces mêmes auteurs ont isolé des composés à partir d'extrait d'acétate d'éthyle. Pour le test ABTS, tous les composés testés ont montré une forte capacité antioxydante. En particulier, les composés (Quercétine) et (Kaempférol) avaient une capacité antioxydante plus élevée.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de (Sarikurku, *et al.*,) [234] qui ont montré l'activité de piégeage des radicaux libres (ABTS<sup>•+</sup>) de différents organes (parties aériennes, fleurs, racines, feuilles, racines et tiges) des extraits méthanoliques d'*A. macrocephalus subsp.*, ont montré que les valeurs de  $CI_{50}$  les plus élevées étaient observées dans les extraits méthanoliques de feuilles et de parties aériennes avec des  $CI_{50}$  de  $1,45 \pm 0,04$  et  $1,66 \pm 0,01$  mg /mL, respectivement. Ces valeurs sont plus inférieures que notre extrait brut mais moins actif que la fraction acétate d'éthyle de la présente étude. Dans une autre étude entreprise par (Arumugam, *et al.*,) [199] de différents organes des extraits méthanoliques d'*A. ponticus* a été

noté que l'extrait des racines était le plus puissants pour piéger le radical protonique d'ABTS<sup>•+</sup> que les autres organes.

Le radical ABTS<sup>•+</sup> est un radical libre stable qui accepte des électrons ou des radicaux hydrogène pour devenir une molécule magnétique stable.

Des études antérieures indiquaient que les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres. Une autre explication simple à cette différence, est aussi envisageable : la présence de certaines molécules potentiellement actives dans chaque solvant qui interagisse avec chaque test différemment fonction de leur structure, la position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles [237]. Ces différences, peuvent être dues également à la nature du solvant et ces propriétés. De plus, il a été rapporté que des facteurs tels que la stéréosélectivité des radicaux ou la solubilité de l'extrait dans différents systèmes de test affectaient la capacité des extraits à réagir et à piéger différents radicaux [238]. Dans le rapport de (Wang, *et al.*) [239] ont constaté que certains composés ayant une activité de piégeage d'ABTS<sup>•+</sup> ne montraient pas d'activité de piégeage de la DPPH<sup>•</sup>. Le piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par les extraits s'est révélé être légèrement supérieur à celui du radical DPPH<sup>•</sup> [240]. Cela pourrait être dû également à la présence de molécules réductrices de haut poids moléculaire (tannins) susceptibles d'inhiber l'activité du persulfate de potassium et donc de réduire la production d'ABTS<sup>•+</sup>.



**Figure IV.12:** Activité anti-radicalaire d'ABTS des extraits d'*A. gombo* et d'acide ascorbique

Le coefficient de corrélation a été calculé entre l'activité antioxydante (piégeage du radical cation ABTS<sup>•+</sup>) et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins de la plante étudiée.

Une corrélation positive ( $R^2 = 0,666$ ) est observée entre le contenu phénolique des feuilles et la capacité de piégeage du radical cation ABTS<sup>•+</sup>, mais que cette activité est faible la teneur en flavonoïdes et des tanins avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 0,121 et 0,263 respectivement tableau IV.13.

De même, la capacité de piégeage du radical cation ABTS<sup>•+</sup> des extraits des tiges tableau IV.13 est directement corrélée aux le contenu phénolique et des tanins avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 0,920 et 0,505 respectivement. Ces résultats indiquent également que les flavonoïdes totaux des tiges ne sont que très faiblement impliqués ( $R^2 = 0,111$ ) dans le processus antiradicalaire (test de ABTS<sup>•+</sup>) des extraits.

Ces résultats de corrélation montrent que la forte corrélation positive constatée entre la capacité antioxydante et le contenu phénolique indique que les composés phénoliques de cette plante sont les constituants majoritairement à son activité antioxydante.

En effet, en essayant d'établir une corrélation entre l'activité de piégeage d'ABTS<sup>•+</sup> et la composition chimique des extraits des racines de *Astragalus taipaihanensis*, (**PU, et al.**) [228], a démontré que tous les nouveaux composés phénoliques isolés (7, 2'-dihydroxy- 3', 4'-dimethoxy-isoflavane, l'isoflavone (Formononetin), chalcone (Isoliquiritigenin), Quercetin, Kaempferol et le glucoside d'isoflavone Ononin)., dans les racines de *Astragalus taipaihanensis* est directement impliqué dans le processus antioxydant par le piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> et plus efficace que l'antioxydant utilisé comme référence : trolox synthétique.

Les travaux de (**Kurt-celep, et al.**) [235], sur les extraits des raciness de *A. campylosema*, notent que l'acide gallique, à l'acide 3-caféolquinique, à la rutine, à l'hyperoside, au kaempférol-3-O-glucoside, à la quercitrine et à la quercétine a montré une corrélation positive ( $r > 0,6$ ) avec le test de ABTS pour quatre extraits.

En accord avec nos résultats, (**Sarikurkcu, et al.**) [234], confirment une corrélation positive entre les teneurs en polyphénols totaux ( $R^2= 0,727$ ) et l'activité anti-oxydante évaluée par la méthode à l'ABTS des extraits méthanoliques des feuilles d'*A. macrocephalus subsp.* En outre, ces mêmes auteurs enregistrent une corrélation faible entre les flavonoïdes totaux d'*A. macrocephalus subsp* et de leur capacité réductrice d'ABTS<sup>•+</sup>. L'étude de (**Dawidowicz et olszowy**) [241] montre que le type d'alcool utilisé influence significativement l'estimation de l'activité antioxydante des composés phénoliques dans le test ABTS. L'activité antioxydante augmente avec l'allongement de la chaîne aliphatique dans l'alcool, cela résulte plutôt des

changements dans l'énergie de solvation de l'ABTS par les alcools employés que des variations de dissociation des composés phénoliques.

La présence d'un seul groupe donneur (tel que CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> ou OH) en position para ou ortho augmente le nombre de formes de résonance et augmente donc la capacité de piégeage des radicaux de la molécule par rapport au phénol. Deuxièmement, plus le substituant présente un comportement donneur (OH > OCH<sub>3</sub> > CH<sub>3</sub>), plus la capacité de piégeage des radicaux est faible [242].

Enfin, nos résultats suggèrent l'importance des composés phénoliques sur l'activité réductrice du radical cation d'ABTS<sup>•+</sup>.

## IV .5. Évaluation de la capacité inhibitrice de radical anion superoxyde

### IV.5.1. Évaluation par la méthode chimique

Dans l'oxydation cellulaire, le radical superoxyde se forme en premier et produit d'autres types de radicaux libres et d'agents oxydants qui endommagent les cellules.

L'évaluation de la capacité de piégeage des radicaux superoxydes par les extraits d'*Astragalus gombo* en utilisant le système d'autoxydation de pyrogallol.

Ce composé peut être oxydé rapidement dans les conditions alcalines et libère les anions superoxydes. Réciproquement, ces derniers peuvent accélérer l'autoxydation.

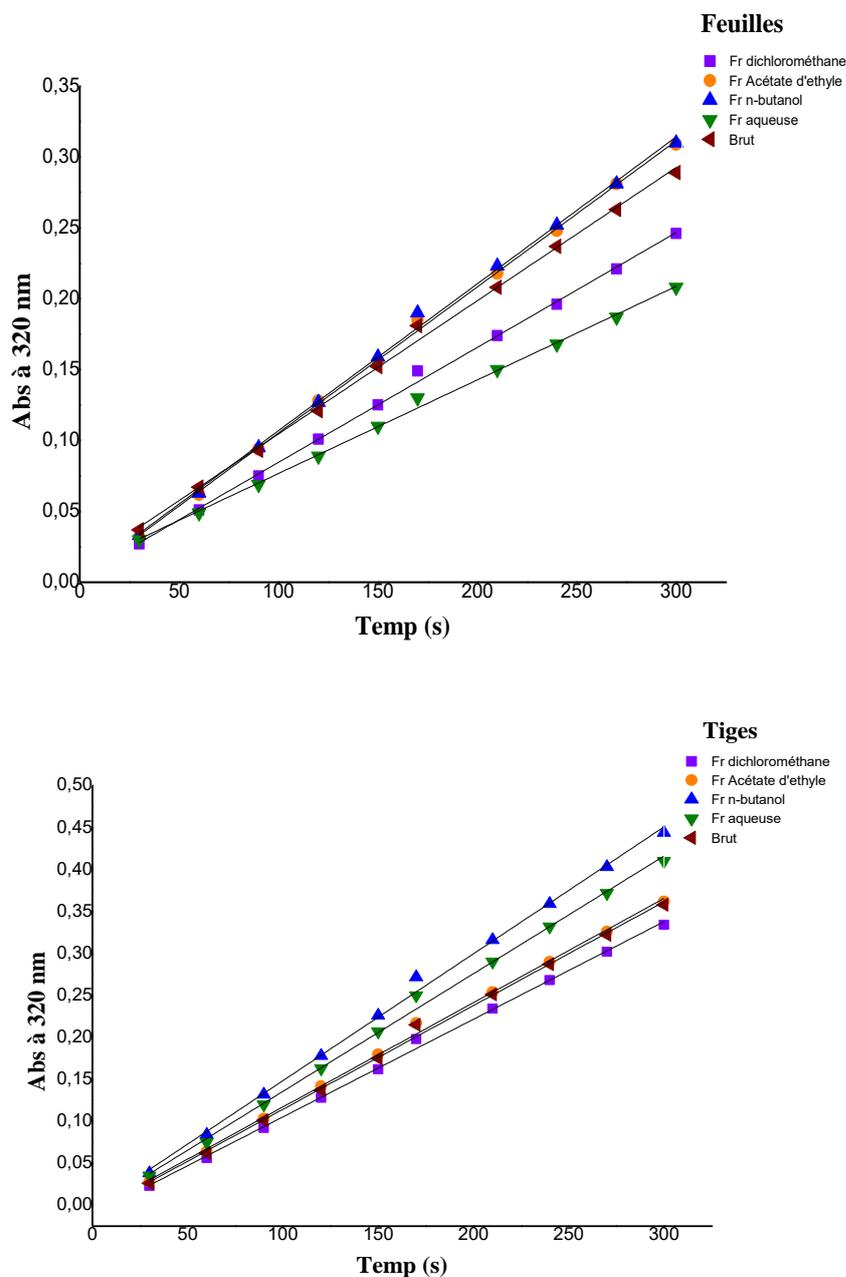
Cependant, les anions superoxydes sont piégés par l'addition des antioxydants et par conséquent, l'autoxydation de pyrogallol est diminuée voire inhibée.

D'après la figure IV.13, nous remarquons que tous les extraits présentent un effet de piégeage des anions superoxydes en présence d'une même concentration de différents extraits

**Tableau IV. 9 :** Pourcentages d'inhibition d'anions superoxydes

Extraits / composé	I % (Feuilles)	I % (Tiges)
Brut	51,12 ± 0,67	23,15± 0,52
fraction dichlorométhane	56,31 ± 0,88	24, 21± 0,00
fraction acétate d'éthyle	45,78 ± 0,00	19,82± 0,30
fraction n-butanol	51,14± 0,48	20,00± 0,52
fraction aqueuse	50,54± 1,53	22,45± 3,34
acide ascorbique (VC)	57,365 ± 1,52	
BHA	31,767 ± 1,036	

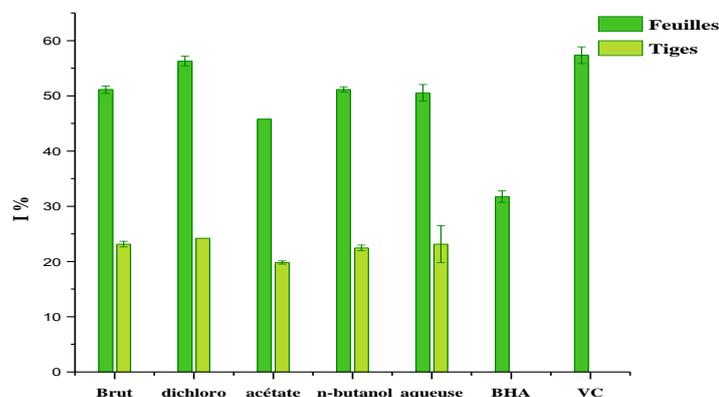
Nous déduisons la pente qui exprime la vitesse de l'autoxydation du pyrogallol en traçant l'absorbance en fonction du temps



**Figure IV.13:** Courbes de vitesse d'auto-oxxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant

Les résultats de ce test montrent que les extraits de feuilles ont les pourcentages de piégeage des radicaux plus élevés que les extraits de tiges (voir la figure IV.13). Les pourcentages de piégeage des radicaux de tous les extraits varient de  $(56,31 \pm 0,88\%$  et  $45,78\%)$  pour les feuilles et de  $24,21 \pm 0,00\%$  à  $19,82 \pm 0,30\%$  pour les tiges (Tableau IV.14).

Les pourcentages d'inhibition les plus importante est notée chez les fractions dichlorométhane et l'extrait brut des feuilles ( $56,31 \pm 0,88\%$  et  $51,12 \pm 0,67\%$  respectivement), tandis que les pourcentages d'inhibition les plus faibles ont été enregistrés à l'extrait acétate d'éthyle des feuilles et des tiges ( $45,78 \pm 0,00\%$  et  $19,82 \pm 0,30 \%$  respectivement).



**Figure IV.14:** Pourcentage d'inhibition de radical anion superoxyde par différents échantillons

Selon la figure IV.14, on classe (par ordre décroissant) la capacité inhibitrice de radical anion superoxyde de nos extraits et fractions selon les solvants utilisés comme suit :  
 Les feuilles : fraction dichlorométhane > fraction butanolique > l'extrait brut > fraction aqueuse > fraction acétate d'éthyle.

Les tiges : fraction dichlorométhane > l'extrait brut > fraction aqueuse > fraction butanolique > fraction acétate d'éthyle.

Les résultats de (**Jahnagir, et al.,**) [236], sur *Astragalus psilocentros*, indiquent une activité de piégeage importante de la fraction chloroforme avec un pourcentage d'inhibition très proche ( $55,84 \pm 1,53\%$ ) de celle trouvée dans notre étude sur la fraction dichlorométhane de feuilles. Nos résultats sont différents de ceux de (**Lim, et al.,**) [243], sur les graines d'*Astragalus sinicus* L, soulignent que l'extrait d'acétone et l'extrait d'éthanol ont donné les meilleurs pourcentages d'inhibition d'anions superoxydes ( $74,5\%$  et  $73,0\%$  respectivement).

Nous avons essayé de chercher une corrélation entre la capacité inhibitrice de radical anion superoxyde et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins mais les résultats obtenus ont montré des corrélations très faibles. Cette indépendance peut s'expliquer par le fait que les extraits étudiés renferment des molécules de structures chimiques différentes et que cette activité n'est pas limitée aux composés phénoliques, mais de leurs structures chimiques.

Selon des études sur la relation structure-activité des flavonoïdes ont constamment prouvé que la structure du catéchol du cycle B ou pyrogallol joue un rôle important dans son puissant effet de piégeage des radicaux libres [244], alors que le cycle A est moins effectif. Encore, la nature de substituant et sa position sur les cycles A et B des structures phénoliques peuvent influencer leur activité antiradicalaire [245].

#### IV.5.2. Évaluation par la méthode électrochimique

Les mesures sont effectuées dans une cellule électrochimique de 15 mL et un système à trois électrodes. Le radical anion radical superoxyde est généré par l'oxygène moléculaire commercial. Ensuite, différents quantités des extraits et des standards dissous en DMF sont injectés dans la cellule électrochimique et les voltamogrammes ont été enregistrée.

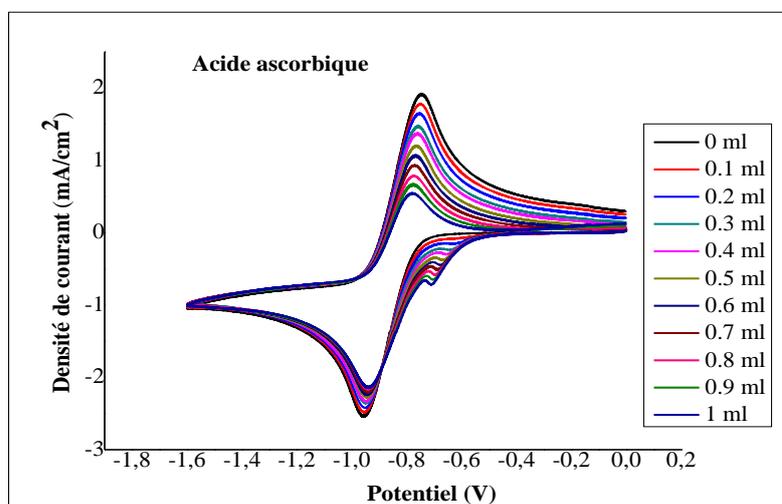
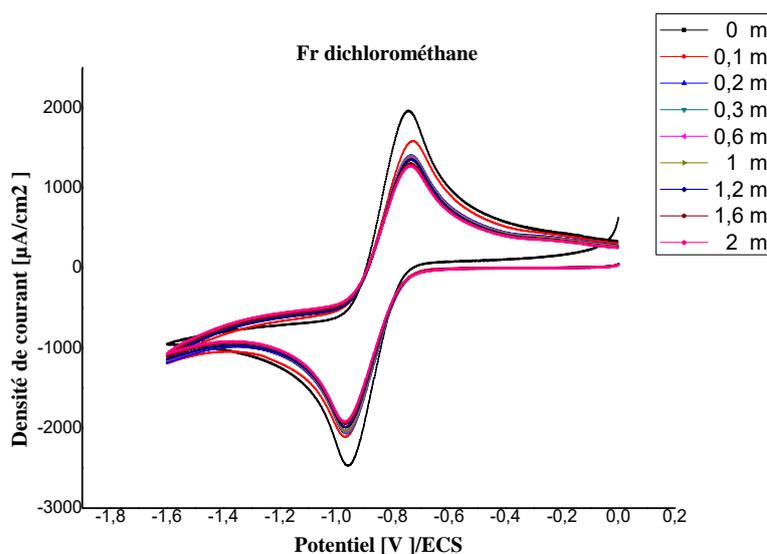
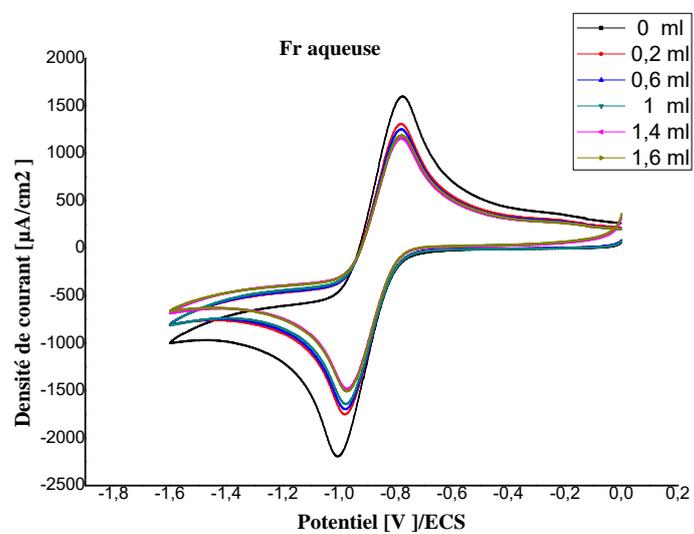
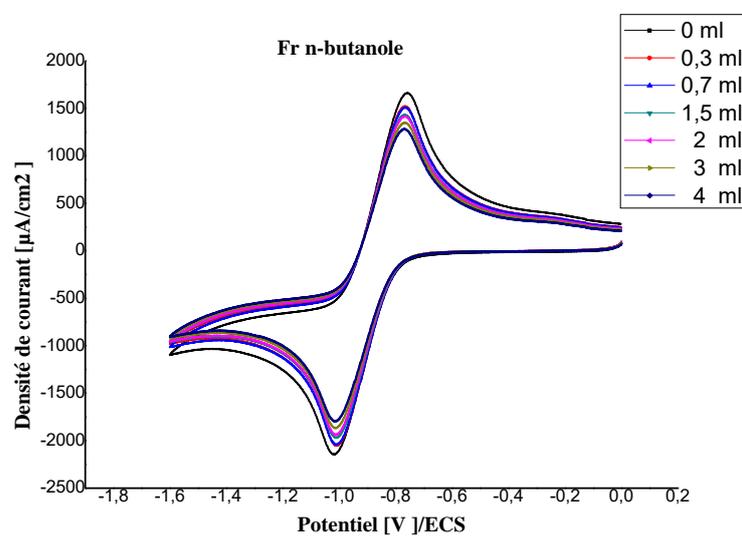
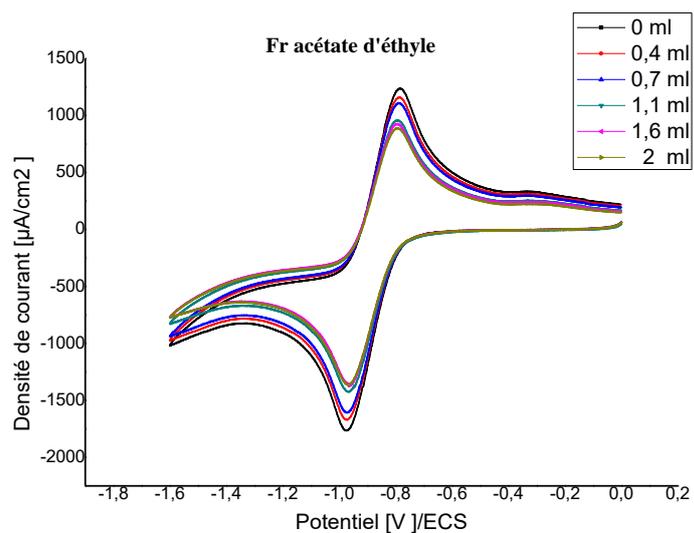
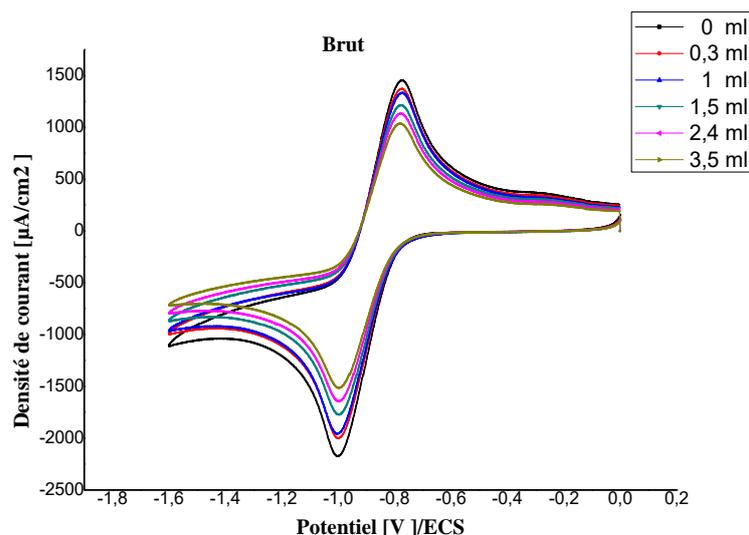


Figure IV.15: Voltamogrammes d'oxygène en présence d'acide ascorbique







**Figure IV.16:** Voltamogramme d'oxygène à la présence des différentes fractions étudiées

[milieu DMF nTBuNBF<sub>4</sub> 0,1 M; électrode CV; vitesse de balayage 0,1V.s<sup>-1</sup>]

Les voltamogrammes de la réduction des radicaux anions superoxydes ont été enregistrés (Fig. IV.16) en présence d'antioxydants (extraits ou acide ascorbique) afin d'évaluer la capacité de piégeage du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), la figure montre des pics d'oxydation et de réduction claire. Au niveau de la densité de courant anodique  $i_{p_a}$  diminue avec l'augmentant de la concentration des antioxydants, alors qu'il n'y a pas de changement au niveau du densité de courant cathodique ( $i_{p_c}$ ) sauf en cas des extraits brut et aqueuse. Une petite diminution de la densité de courant cathodique montre une plus faible disponibilité d' $O_2$  dissous car il a été consommé dans la formation de radical anion superoxyde. Il est important de mentionner que la diminution de la densité cathodique Il s'agit plutôt d'un mécanisme de type « EC » dans lequel le transfert d'électrons s'est produit, suivi d'une réaction chimique.

La diminution de densité de courant anodique de  $O_2^{\bullet-}$  suggère que le substrat (extraits de plante) réagit de manière réversible avec  $O_2^{\bullet-}$ .

A partir des droites de régression du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des fractions étudiées (C), on peut calculer les valeurs de  $CI_{50}$  (Tableau IV. 10)

**Tableau IV. 10:** Résultats de  $CI_{50}$  obtenues pour les fractions étudiées

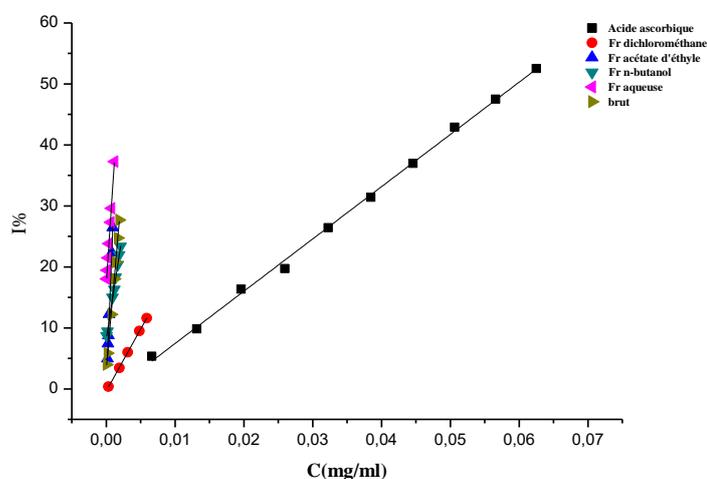
Extrait/ composé	Valeur de $CI_{50}$ (mg/mL)
	Feuilles
brut	0,00367
fraction dichlorométhane	0,025
fraction acétate d'éthyle	0,00174
fraction n-butanol	0,0058
fraction aqueuse	0,0019
Acide ascorbique	0,0596

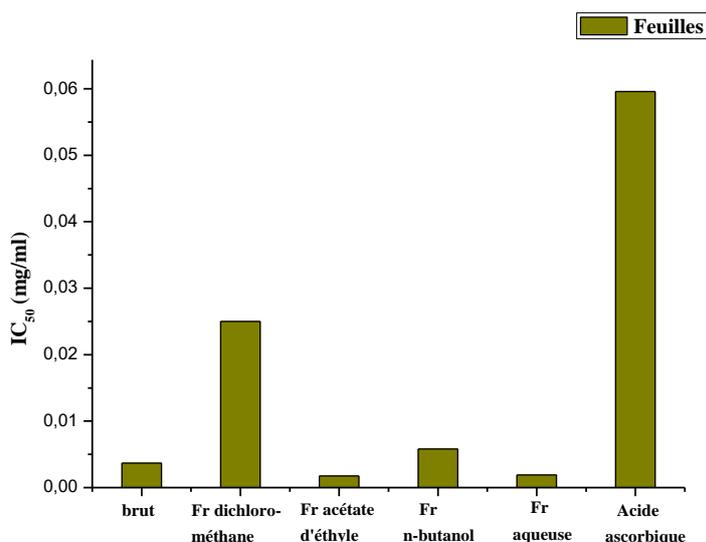
D'après les résultats obtenus (Tableau IV.10), nous remarquons que tous les extraits montrent une activité antioxydante vis-à-vis le radical anion superoxyde comparativement à l'acide ascorbique. Les valeurs de  $CI_{50}$  varient globalement entre 0,0017 à 0,025 mg/mL.

La fraction acétate d'éthyle et la fraction aqueuse des feuilles donnent la meilleure capacité de piégeage du radical anion superoxyde avec des  $CI_{50}$  (0,0017 et 0,0019 mg/mL respectivement), tandis que l'activité de piégeage  $O_2^{\cdot-}$  la plus faible a été enregistrée dans la fraction dichlorométhane (0,025 mg/mL).

D'après la figure IV.17, on peut classer la capacité de piégeage d' $O_2^{\cdot-}$  de ces fractions selon l'ordre décroissant :

Feuilles : fraction acétate d'éthyle > fraction aqueuse > extrait brut > fraction n-butanol > fraction dichlorométhane

**Figure IV.17 :** Effets d'inhibition de  $O_2^{\cdot-}$  par des différentes fractions de plante



**Figure IV.18:** Valeurs de la CI<sub>50</sub> pour l'inhibition des radicaux superoxydes par les extraits d'*A. gombo* et l'acide ascorbique

Les valeurs CI<sub>50</sub> confirment la présence d'antioxydants comme composants principaux des extraits contre les antioxydants.

La capacité antioxydante des composés phénoliques dépend du nombre et de la disposition des groupes hydroxyle en plus de la présence de substitués donneur d'électrons à la structure du cycle [246].

Il est nécessaire de noter que l'investigation dans la littérature scientifique, n'a révélé aucune étude portant l'activité antioxydante de piégeage du radical anion superoxyde par voltammétrie cyclique des extraits phénoliques d'*Astragalus gombo*.

Le coefficient de corrélation a été calculé entre l'activité antioxydante (piégeage du radical anion superoxyde par voltammétrie cyclique) et les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins de la plante étudiée.

Une corrélation très significative ( $R^2 = 0,925$ ) est observée entre le contenu phénolique des feuilles et la capacité d'inhibition du radical  $O_2^{\cdot-}$ , mais que cette activité est faible la teneur en flavonoïdes et des tanins avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 0,067 et 0,115 respectivement (Tableau IV.13.a).

D'après le tableau IV.13.a, nous avons trouvé une corrélation linéaire significative a été remarquée entre la capacité d'inhibition du radical  $O_2^{\cdot-}$  (méthode chimique et électrochimique) avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,899$ , ainsi une très forte corrélation positive est observée entre la capacité de piégeage du radical libre de DPPH des extraits des

feuilles et des tiges et celle de le piégeage du radical  $ABTS^{*+}$  avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 0,965 et 0,658 respectivement.

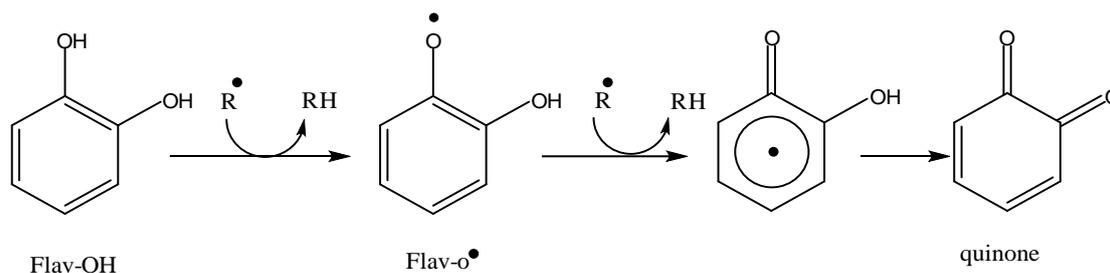
D'après les résultats obtenus, on peut déduire que les extraits ayant des teneurs élevées en phénols totaux ne sont pas forcément ceux qui ont le pouvoir antiradicalaire le plus important, c'est le cas, les fractions d'dichlorométhane présentes des feuilles et des tiges sont les plus efficaces pour piéger les radicaux  $O_2^{\cdot-}$  et DPPH, ainsi le potentiel effet antioxydant de la plante est probablement attribué à la présence de composés bioactifs présents dans ces parties. Malgré le fait que ces fractions ont une teneur en flavonoïdes et phénols inférieure à celle trouvée en fractions aqueuses chez les deux organes étudiées, nous pouvons donc envisager que l'extrait aqueux a perdu quelques principes actifs suite à la chaleur qui auraient pu donner plus d'efficacité sur la neutralisation des radicaux [247].

Plusieurs études reportent que les flavonoïdes par leurs faibles potentiels redox (haute oxydabilité électrochimique) ont un pourcentage de piégeage élevé. Les sites primaires de l'oxydation électrochimiques des flavonoïdes sont les substituants hydroxyles dans le cycle B [248].

Thermodynamiquement, les flavonoïdes (Flav-OH) peuvent réduire les radicaux libres oxydants ( $R\cdot$ ) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alcoxyde et le radical hydroxyle par transfert d'hydrogène en raison de leur faible potentiel redox :



Comme montrer la figure IV.19 le radical aroxyde résultant (Flav- O $\cdot$ ) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable [250].



**Figure IV.19** : Réaction des flavonoïdes avec les ROS [250]

Une quinone et un anion superoxyde peuvent être produits lorsque le radical aroxyde interagit avec l'oxygène. L'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes est causé par cette réaction, qui peut se produire en présence de quantités importantes de métaux de transition. Ainsi, outre le potentiel redox du couple Flav-O $\cdot$ /Flav-OH, la capacité des flavonoïdes à agir comme antioxydants dépend également de la réactivité du radical aroxyde [251].

#### IV.6. Estimation d'inhibition d' $\alpha$ -amylase *in vitro* par les extraits d'*A. gombo*

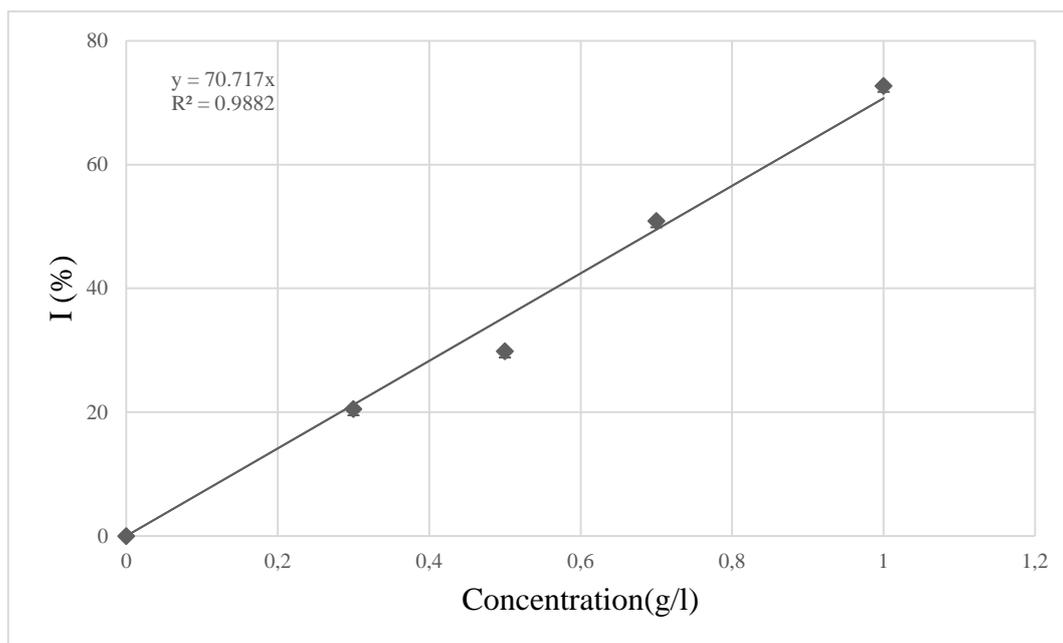
L' $\alpha$ -amylase catalyse l'hydrolyse de l'amidon et produit finalement du glucose. Le contrôle de l'activité catalytique de cette enzyme réduit la production de glucose dans la phase postprandiale, ce qui pourrait être un avantage thérapeutique pour les personnes atteintes de diabète [252]. Par conséquent, plusieurs composés (l'acarbose pour l'amylase) ont été développés comme inhibiteurs d'enzymes dans les industries pharmaceutiques. Cependant, la plupart d'entre eux ont des effets secondaires graves tels que des troubles gastro-intestinaux et une toxicité [234].

L'OMS a également recommandé la recherche et l'utilisation de médecines alternatives dans la gestion des diabétiques [199]. Par conséquent, un énorme défi réside dans le développement de nouvelles approches pour le traitement du diabète. Les thérapies alternatives devraient être plus sûres et produire peu ou pas d'effets négatifs il reste un défi pour le système médical et une cible idéale pour les chercheurs [253].

##### IV.6.1. Test de l'inhibition de l'activité d' $\alpha$ -amylase

L'activité enzymatique des six extraits (feuilles et tiges) d'*Astragalus gombo* a été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme l' $\alpha$ -amylase.

Dans le but de repérer les extraits ayant une capacité inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase, des tests d'inhibitions *in vitro* ont été effectués à la même concentration d'extraits. Nous avons permis de calculer les taux d'inhibition puis le paramètre AEIC pour chaque extrait à l'aide d'un graphique représentant le pourcentage d'inhibition (%) d'acarbose comme standard en fonction de la concentration (Figure IV.20).



**Figure.IV.20 :** Courbe d'étalonnage de l'acarbose

Les résultats sont exprimés par le paramètre AEIC (Acarbose Equivalent Inhibitory Capacity, capacité d'inhibition en équivalent d'acarbose). Ce paramètre, est défini comme étant la concentration de la solution standard de l'acarbose possédant le pouvoir inhibiteur équivalente à une solution de 1 mg/mL de de l'extrait étudié. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

**Tableau.IV.11 :** Pourcentage inhibition de l'alpha-amylase par les fractions étudiées

Extraits / composé	Feuilles		Tiges	
	I %	AEIC	I %	AEIC
fraction dichlorométhane	17,85 ± 4,81	0,25 ± 0,06	51,44 ± 1,44	0,72 ± 0,02
fraction acétate d'éthyle	26,23 ± 1,50	0,37 ± 0,02	51,76 ± 3,17	0,73 ± 0,04
fraction n-butanol	20,71 ± 3,39	0,32 ± 0,01	43,94 ± 6,60	0,62 ± 0,09

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que tous les extraits ont présenté un potentiel d'inhibition vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase à différents taux d'inhibition. Les valeurs calculées sont comprises pour les deux organes entre 17,85 ± 4,81 % et 51,76 ± 3,17 % et les valeurs AEIC entre 0,25 ± 0,06 et 0,73 ± 0,04.

A partir du tableau IV.11, on peut déduire que la fraction acétate d'éthyle de tiges et de feuilles montre le meilleur pourcentage d'inhibition ( $51,76 \pm 3,17$  % et  $26,23 \pm 1,50$  % respectivement) par rapport aux autres extraits. Les fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane des tiges ont enregistré des pourcentages d'inhibitions très proches compris de ( $51,76 \pm 3,17$ % et  $51,44 \pm 1,44$  % respectivement). Par contre la fraction dichlorométhane de feuilles a montré les taux d'inhibition les plus faibles. Les valeurs les plus élevées d'AEIC ont été enregistrées dans la fraction acétate d'éthyle et la fraction dichlorométhane de tiges  $0,73 \pm 0,04$  et  $0,72 \pm 0,02$ , respectivement. Alors que les valeurs les plus faibles d'AEIC ont été enregistrées dans la fraction dichlorométhane de feuilles qui est égal à  $0,25 \pm 0,06$ . Nos résultats ont été comparés avec le médicament de référence (acarbose) à la même concentration de nos extraits 1 mg/mL, il a donné un pourcentage d'inhibition de 70,71 %. Le pouvoir inhibiteur de l'acarbose utilisé comme standard montre une activité légèrement supérieure à celle des extraits.

Nos résultats corroborent ceux de (**Park, et al.,**) [254], a révélé une activité d'inhibition plus puissant de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Astragalus membranaceus*.

Une autre étude réalisée par (**Arumugam, et al.,**) [199], de différents organes des extraits méthanoliques d'*A. ponticus* a été enregistré dans l'extrait de feuilles le potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase le plus élevé.

À notre connaissance, aucune activité inhibitrice d' $\alpha$ - amylase rapportée sur les extraits phénoliques de l'espèce d'*Astragalus gombo* qui pourrait constituer une nouvelle source d'inhibiteurs pour le traitement du diabète sucré.

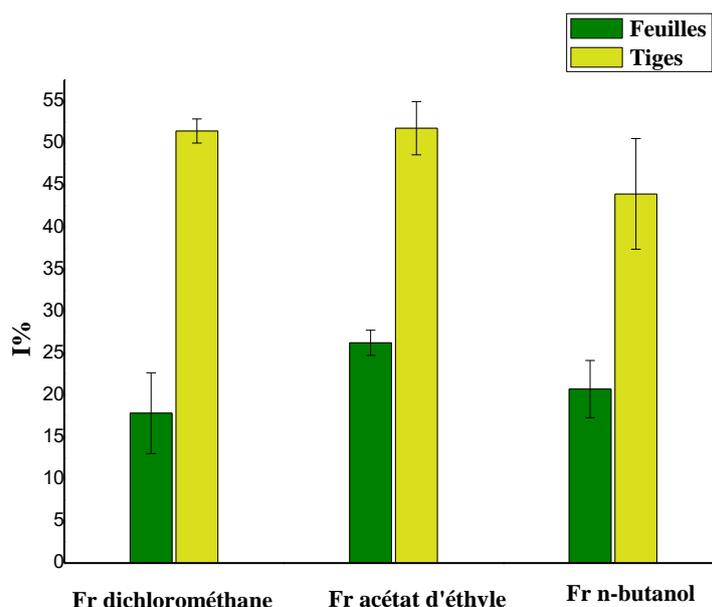
Les résultats obtenus dans le tableau IV.13.a indiquent que pour les feuilles, il a montré des corrélations très faibles ( $R < 0,1$ ) entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes en tanins et l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase . On peut expliquer cette indépendance par le fait que les résultats sont liés à la composition en composés actifs et leurs structures chimiques dans les extraits de tiges diffèrent de celles trouvées dans les extraits de feuilles et que l'activité enzymatique étudiée par ce test pour les extraits de feuilles ne dépend pas obligatoirement de la teneur en composés phénoliques, mais de leur composition chimique.

Une très forte corrélation positive est observée entre le contenu phénolique et les tanins des tiges et le pourcentage inhibition de l' $\alpha$ -amylase avec des coefficients de corrélation  $R^2$  de 1 et 0,99 respectivement, tandis que la teneur en flavonoïdes en sont faible corrélé à cette activité ( $R^2 = 0,466$ ).

Les résultats pourraient être liés à la composition chimique des extraits testés. Plusieurs études ont confirmé qu'il existe une forte corrélation entre les niveaux d'inhibition enzymatique

et le contenu phénolique. Certains des composés contenus dans les extraits tels que l'hyperoside, l'acide férulique et l'apigénine ont été signalés comme agents inhibiteurs dans des études antérieures [255, 256]. En outre, plusieurs flavonoïdes, tels que la rutine, la myricétine, le kaempférol et la quercétine, pour l'inhibition d'enzyme l' $\alpha$ -amylase ont montré des effets hypoglycémiant et antioxydants significatifs chez les animaux diabétiques [257, 258], telles que la position et le nombre d'hydroxyles et le nombre de doubles liaisons sur les cycles aromatiques A et B ainsi que sur le cycle hétérocyclique C. on peut donc en déduire que l'hydroxyle sur le cycle B (C-4') est plus efficace que celui sur le cycle A (C-6) dans les effets inhibiteurs enzymatiques [259]. De plus, ce qui est important pour la méthode d'extraction, des différences ont été trouvées dans les performances inhibitrices des extraits testés [260].

On conclut que l'extrait de tige d'*Astragalus gombo* a présenté une excellente activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase par rapport à celle des feuilles. Cela peut être justifié par le fait que l'extrait de tige contenaient des molécules actives de structure plus au moins rapproché ou ayant le même mécanisme d'action inhibitrice [261].



**Figure IV.21 :** Les taux d'inhibition des extraits d'*Astragalus gombo* vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase

#### IV.7. Évaluation de l'activité antiurolithiasique

Dans notre travail, nous avons entrepris l'étude *in vitro* afin d'évaluer l'activité antiurolithiasique des extraits des plantes investiguées a été effectué par deux tests (modèles) chimique *in vitro* ; un modèle turbidimétrique mesurant ainsi l'inhibition de formation d'oxalate de calcium en présence et en absence d'inhibiteur et un modèle gravimétrique mettant en

évidence le pouvoir de dissolution des calculs urinaires composés d'urate de calcium et de phosphates de calcium par les extraits des feuilles et des tigees d'*Astragalus gombo*.

Au cours de la cinquantaine dernière années, des analyses de calculs urinaires dans le monde entier ont révélé que l'oxalate de calcium était le composant principal. Aussi bien chez l'homme que chez la femme. Ils existent sous forme de la whewellite (oxalate de calcium monohydraté) et la weddellite (oxalate de calcium dihydraté) [262, 263].

La pathogenèse des calculs d'oxalate de calcium est un processus en plusieurs étapes et comprend principalement la nucléation, la croissance des cristaux, l'agrégation des cristaux et la rétention des cristaux. La formation de calculs nécessite une urine sursaturée, la sursaturation dépend également du pH urinaire, de la force ionique, de la concentration en soluté et des complexations [97, 99].

Un risque cristallogène dans le développement des calculs d'oxalate de calcium est lié au déséquilibre entre le calcium et l'oxalate, une substance promotrice, et les inhibiteurs qui peuvent ralentir ou empêcher la formation d'oxalate de calcium [264, 265].

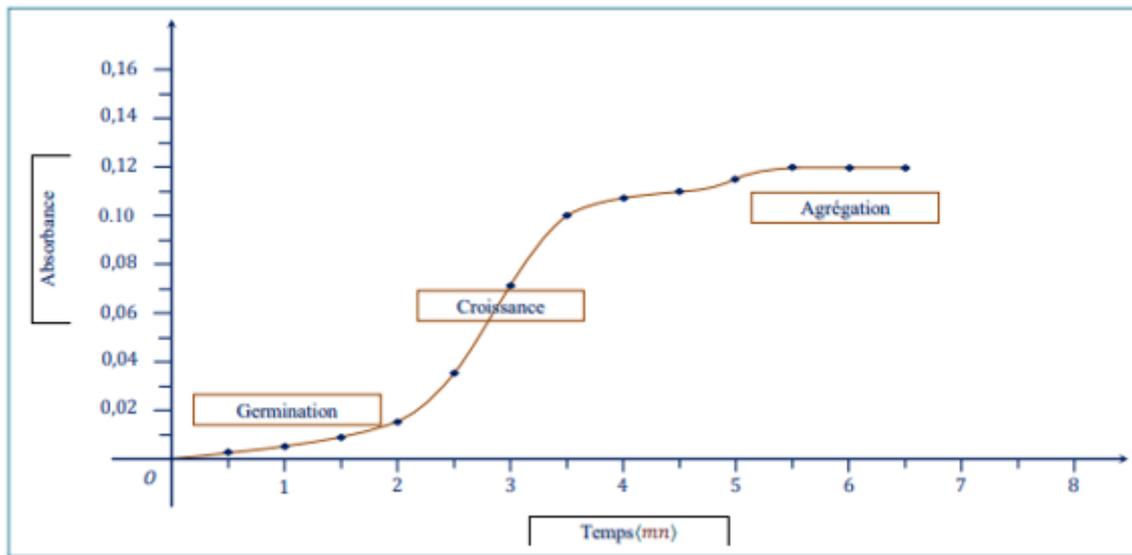
Le principe de turbidimétrie, qui fait référence à la croissance cristalline, qui comprend la nucléation, la croissance et l'agrégation., constitue la base du modèle d'étude des inhibiteurs de cristallisation oxalocalcique que nous avons adopté [266].

La densité optique transmise d'une suspension dont nous nous intéressons à la variation d'absorbance en fonction du temps est utilisée dans cette technique basée sur l'analyse cinétique. Alors, dans notre travail, le modèle turbidimétrique a été utilisé pour cristalliser l'oxalate de calcium *in vitro* dans un système fermé à 37 °C. Cette méthode présente plus d'avantages car elle assure le suivi continu de la cinétique de la cristallisation tout en étant plus simple à mettre en oeuvre et la bonne productivité [267].

Les paramètres turbidimétriques suivants définissent l'allure générale des courbes turbidimétriques obtenues (absorbance en fonction du temps) du profil triphasique (nucléation, croissance et agrégation) [266] (Figure.IV.22) :

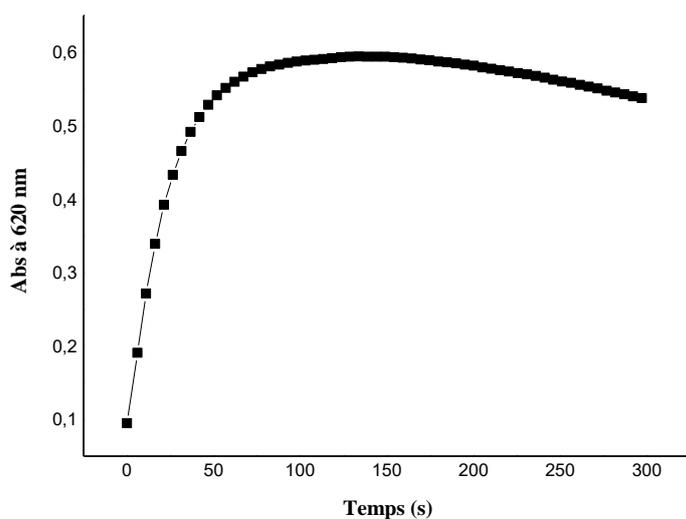
- Le temps d'induction ( $t_i$ ), qui est caractérisée les temps de latence, est pratiquement nul pendant la phase de nucléation ou d'absorption.
- La pente turbidimétrique (P) est déterminée sur la partie linéaire de la courbe correspondant à une forte croissance ou décroissance de l'absorbance apparente (phase de croissance ou agrégation de cristaux).

- Une lente décroissance de l'absorbance après un passage par un maximum traduisant l'étape d'agrégation.

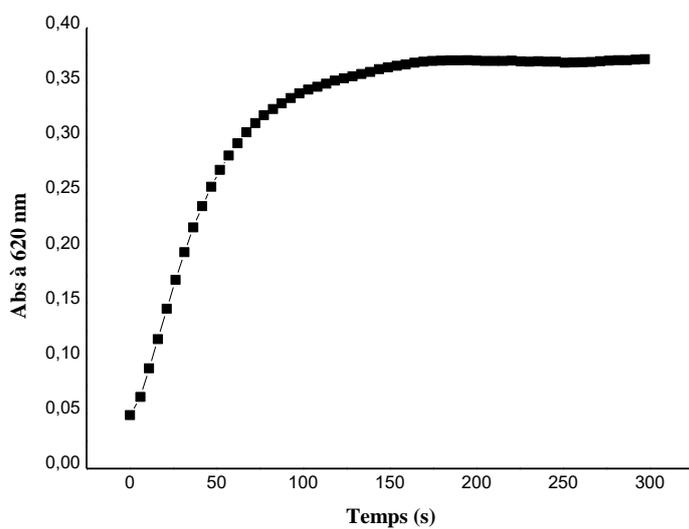


**Figure.IV.22 :** Allure générale de la courbe turbidimétrique

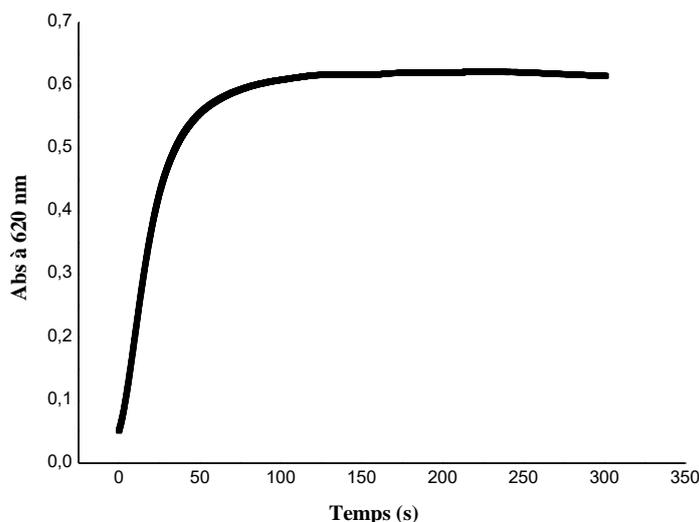
Dans notre étude, l'incubation de trois types d'urine résulte : d'urine de 24 h d'un homme sans antécédents lithiasiques (urine de sujet sain), urine de 24 h d'un homme d'une maladie des calculs rénaux (urine de sujet malade) et urine artificielle la précipitation de l'oxalate de calcium. Les mesures des densités optiques d'oxalate de calcium formés en fonction du temps nous ont permis de tracer les courbes suivantes (Figure.IV.23 - Figure.IV.25):



**Figure.IV.23:** Courbe de cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel sans inhibiteur



**Figure.IV.24:** Courbe d'oxalocalcique aux l'urine de sujet malade sans inhibiteur



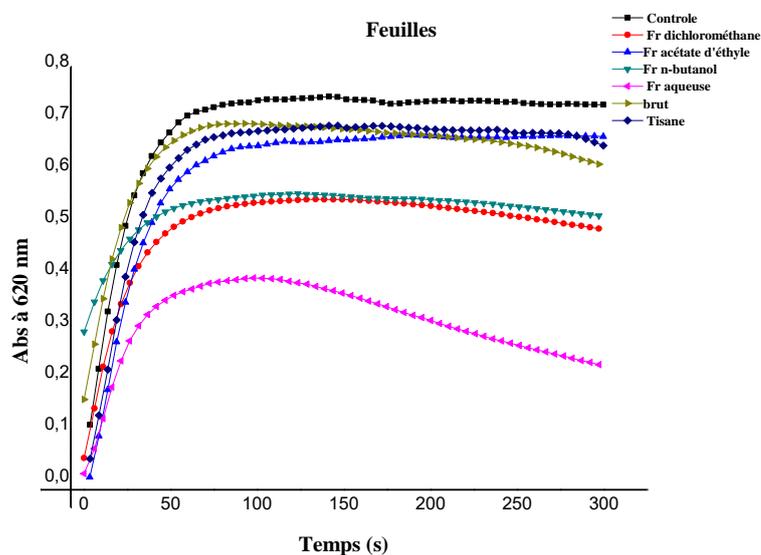
**Figure.IV.25:** Courbe d'oxalocalcique aux l'urine de sujet normale sans inhibiteur

On remarque que la courbe obtenue a une allure similaire à celle rapportée dans des travaux courants en par turbidimétrie. L'absorbance ou densité optique a été mesurée toutes les 0.1 secondes pendant une durée moyenne de 300 s qui s'est avérée être le temps réactionnel correspond à la croissance d'oxalate de calcium. On obtient la courbe de variation d'intensité optique en fonction du temps (t), puis nous calculons la pente turbidimétrique de la partie de croissance cristalline, où le coefficient de corrélation  $R > 0,96$  [262, 268, 269].

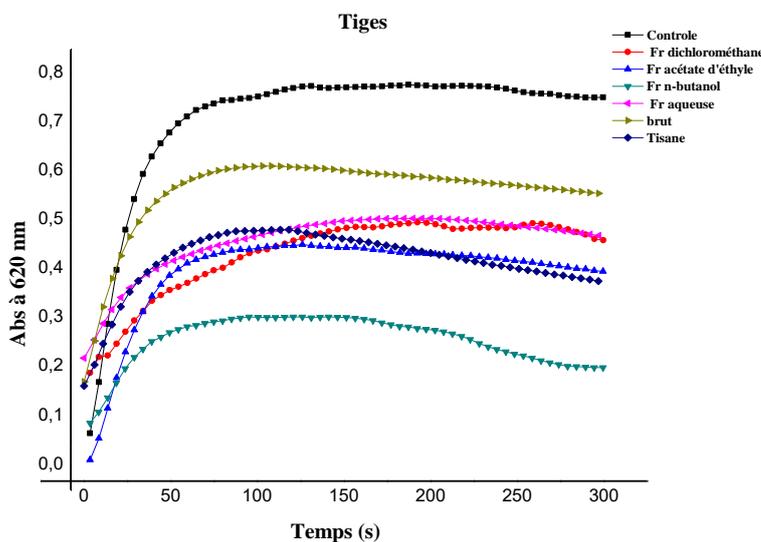
Il peut y avoir des substances dans les extraits de plantes qui inhibent la croissance des cristaux d'oxalate de calcium. Étant donné que les cristaux d'oxalate de calcium causés par les macromolécules urinaires étaient moins étroitement liés aux surfaces des cellules épithéliales et donc excrétés avec l'urine, cette caractéristique des plantes peut être cruciale pour prévenir la formation de calculs rénaux. L'extrait peut également contenir des substances qui inhibent l'aggrégation des cristaux d'oxalate de calcium ; l'agglomération des particules est une étape critique dans la formation de calculs urinaires, car les cristaux plus gros sont moins susceptibles de passer spontanément dans les voies urinaires. Si l'extrait maintient les particules d'oxalate de calcium dispersées en solution, elles sont plus facilement éliminées [270]. Dans le but de tester l'effet prophylactique des extraits feuilles et tiges d'*Astragalus gombo*, nous avons entrepris l'étude *in vitro* de l'effet de ces extraits et nous avons testé deux substances inhibitrices comme référence : Foncurine, Lithos sur la cristallisation oxalocalcique de trois types d'urine : d'un homme sans antécédents lithiasiques (urine de sujet sain), d'un homme d'une maladie des calculs rénaux (urine de sujet malade) et urine artificiel.

Nous avons travaillé avec des concentrations égales à 1 g/L pour tous les inhibiteurs étudiés (extraits et références)

Chaque courbe de cristallisation de différents extraits de feuilles et tiges a été comparée à celle sans inhibiteur et à celle avec référence pour trois types : urine de sujet sain, urine de sujet malade et urine artificiel (Figure IV.26 - Figure IV.34) :



**Figure IV.26:** Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des extraits de feuilles d'*Astragalus gombo*



**Figure IV.27 :** Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des extraits de tiges d'*Astragalus gombo*

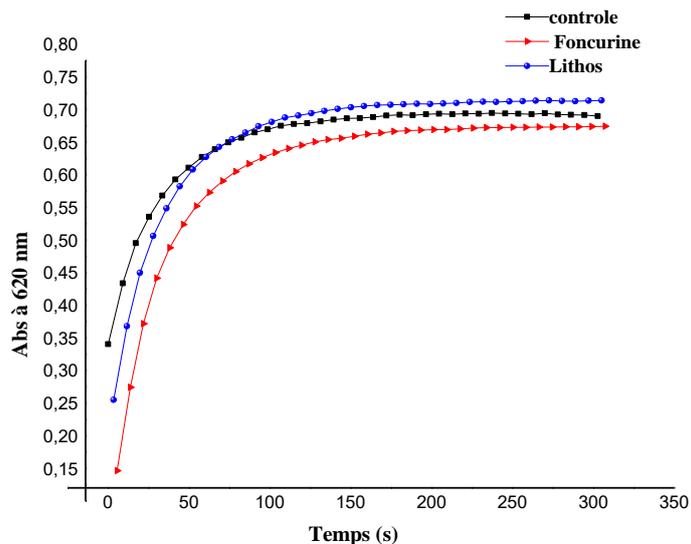


Figure IV.28: Cristallisation d'oxalocalcique aux l'urine artificiel en présence des références

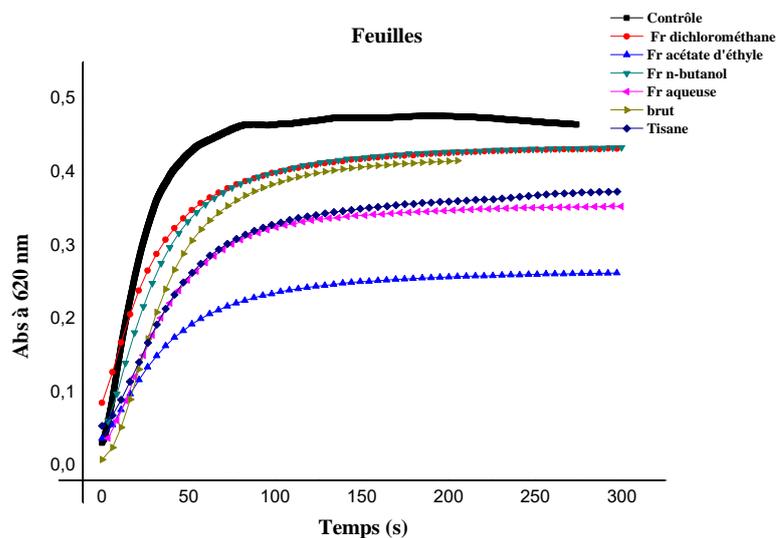
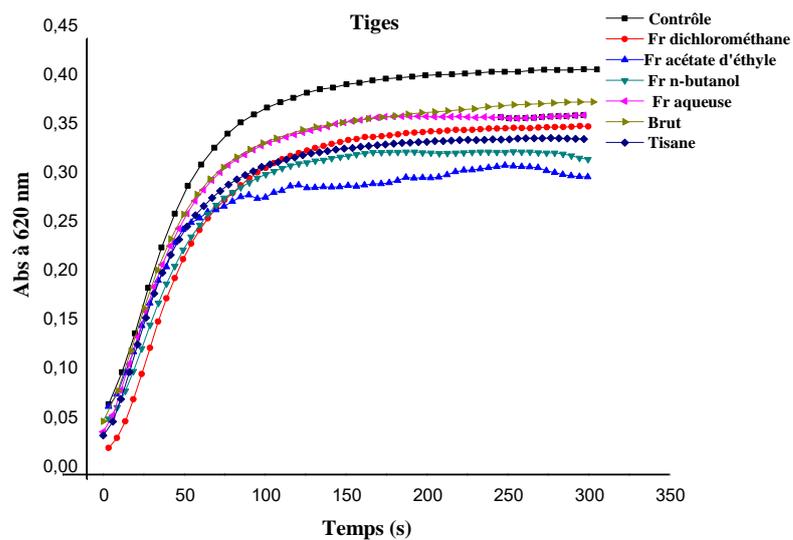
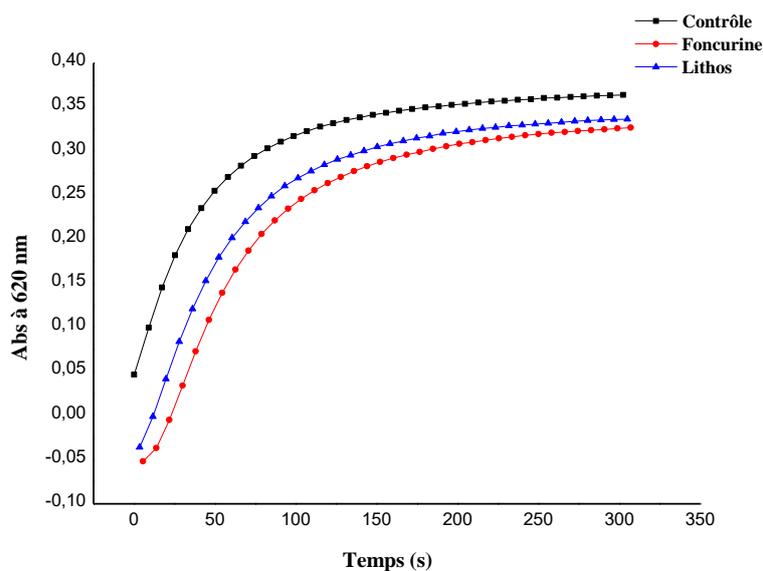


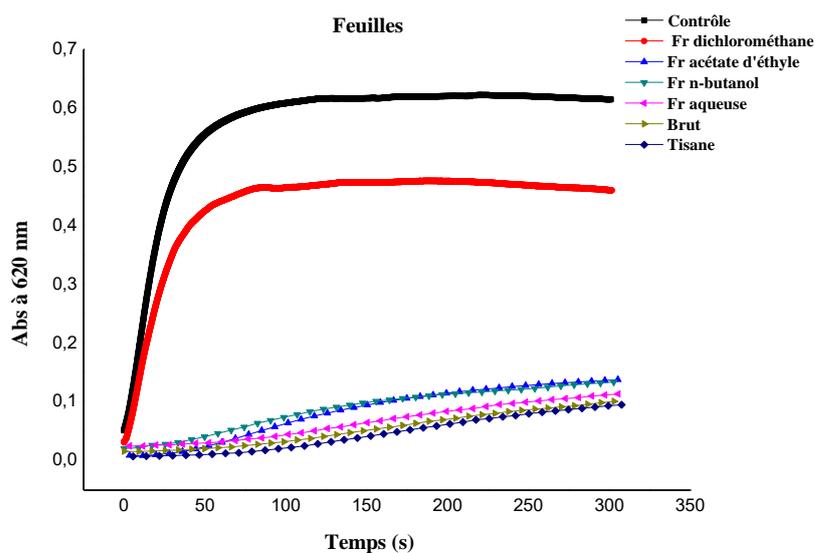
Figure IV.29: Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet malade en présence des extraits de feuilles d'Astragalus gombo



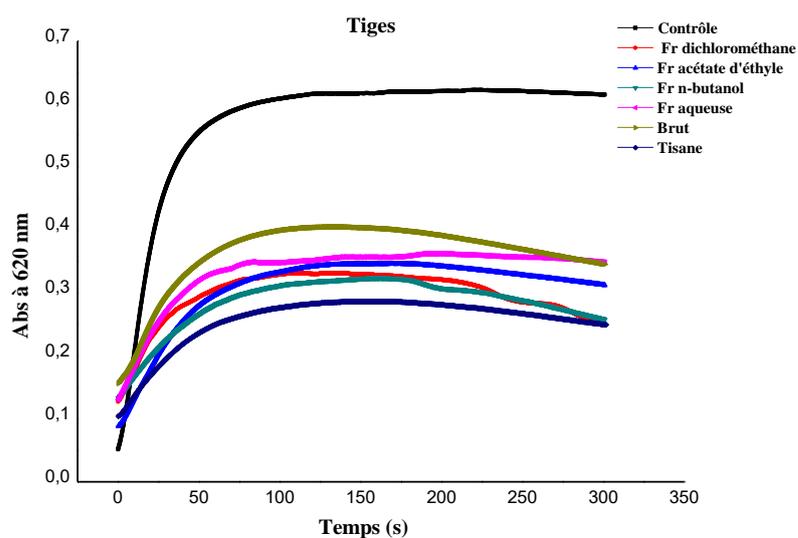
**Figure IV.30:** Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet malade en présence des extraits de tiges d'*Astragalus gombo*



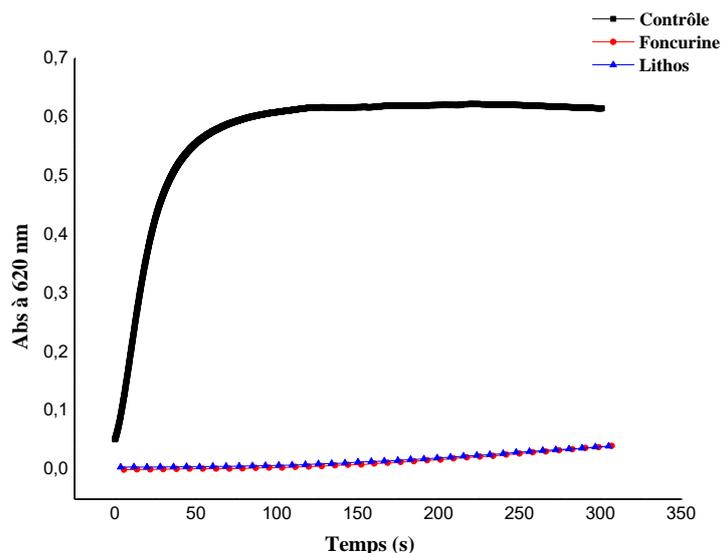
**Figure IV.31:** Cristallisation d'oxalocalcique aux les urines de sujet malade en présence des références



**Figure IV.32:** Cristallisation d'oxalocalcique aux urines de sujet normale en présence des extraits de feuilles d'*Astragalus gombo*



**Figure IV.33:** Cristallisation d'oxalocalcique aux urines de sujet normale en présence des extraits de tiges d'*Astragalus gombo*



**Figure IV.34:** Cristallisation d'oxalocalcique aux urines de sujet normale en présence des références

D'après les figures (Fig. IV.26 - Fig. IV.34), les courbes de cristallisation en présence des extraits présentent le même allure qu'en l'absence de l'inhibiteur, elle montre également que la différence d'inhibition dépend de la nature de l'extrait testé. De plus, Le temps d'induction ( $t_i$ ) varie également avec la nature de l'extrait indiquant que la méthode d'inhibition est une complexation. Nous avons ensuite calculé le pourcentage d'inhibition oxalocalcique déterminé à partir des pentes troubles, et les mesures ont été répétées trois fois pour calculer la moyenne des pentes troubles. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau IV.12

**Tableau IV.12 :** les taux d'inhibition de cristallisation oxalocalcique pour toutes les fractions étudiées et références pour des concentrations égales à 1 g/L.

Extraits / composé	Urine artificiel I%		Urine de sujet malade I%		Urine de sujet sain I%	
	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Brut	18,93 ± 0,14	13,63 ± 0,66	30,69 ± 0,99	26,15 ± 0,25	98,25 ± 0,55	76,74 ± 0,2
fraction dichlorométhane	31,06 ± 0,32	56,06 ± 0,32	15,38 ± 0,94	32,50 ± 0,54	37,20 ± 0,8	79,06 ± 0,32
fraction acétate d'éthyle	21,96 ± 0,51	57,57 ± 0,98	46,15 ± 0,44	48,18 ± 0,87	96,51 ± 0,26	82,55 ± 0,85
fraction n-butanol	24,24 ± 0,2	66,66 ± 0,25	21,53 ± 0,58	41,53 ± 0,69	95,93 ± 0,33	84,88 ± 0,29
fraction aqueuse	38,63 ± 0,55	16,66 ± 0,44	36,92 ± 0,66	30,76 ± 0,33	97,67 ± 0,71	77,90 ± 0,87
Tisane	17,42 ± 0,67	26,51 ± 0,31	32,30 ± 0,33	34,26 ± 0,88	98,83 ± 0,24	87,20 ± 0,95
Foncurine	37,77 ± 0,3		69,23 ± 0,6		95,01 ± 0,5	
Lithos	21,11 ± 0,5		53,84 ± 0,1		90,21 ± 0,9	

Plusieurs médicaments ont été utilisés pour traiter le problème de la lithiase rénale.

Le foncurine et le Lithos font partie des médicaments fréquemment utilisés par les médecins pour le traitement d'appoint des calculs rénaux [86]. Par conséquent, ces médicaments de référence ont été utilisés pour comparer l'activité antiurolithiasique avec nos extraits.

Sur la base des résultats obtenus, le tableau IV.12, on observe que tous les extraits et références dans l'urine artificiel ont montré les valeurs les plus faibles du pourcentage d'inhibition par rapport aux autres types d'urine. D'ailleurs, ces valeurs atteignent une valeur maximale de 66,66 ± 0,25 % de l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique de la fraction butanolique des tiges. Cette valeur est supérieure à celle obtenue en référence, tandis que Les extraits tisane et de le brut pour les feuilles ont montré des pourcentages d'inhibition la plus faible (valeurs de 17,42 ± 0,67 % et 18,93 ± 0,14 % respectivement).

D'autre part, on remarque que l'urine d'un sujet sain a montré les pourcentages d'inhibition les plus élevés par rapport aux autres types d'urine dans les deux organes, feuilles et tiges. Les extraits des feuilles présentent une activité anticristallo-oxalocalcique nettement supérieures à celles des extraits de tiges (Tableau IV.12), ces pourcentages d'inhibitions varient de 98,83 ± 0,24 % à 37,20 ± 0,8 % pour les feuilles et de 87,20 ± 0,95 % à 76,74 ± 0,2 % pour les tiges

Les valeurs plus élevée a été enregistré avec l'extrait de tisane  $98,83 \pm 0,24$  % l'extrait brut  $98,25 \pm 0,55$  % Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues en référence. La fraction n-butanol des feuilles présentait presque la même pourcentage d'inhibition du référence Foncurine.

Pour les résultats de l'urine de sujet malade, il a été constaté que tous les extraits se sont avérés avoir une activité anticristallo-oxalocalcique avec des taux d'inhibition différents. D'après le tableau IV.12, le pouvoir d'activité anticristallo-oxalocalcique des références Foncurine et Lithos apparait plus marqué que celui des extraits, la fraction acétate d'éthyle des tiges présente le pourcentage le plus élevé d'inhibition de l'anticristallo-oxalocalcique  $48,18 \pm 0,87$  %, tandis que le pourcentage d'inhibition le plus faible a été montré par la fraction de dichlorométhane pour les feuilles  $15,38 \pm 0,94$  % (Tableau IV.12).

Nous avons trouvé une corrélation linéaire positive a été remarquée entre l'activité antiurolithiasique (urine artificiel) et la teneur en phénols totaux avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,795$ , mais que cette activité est faible la teneur en flavonoïdes et des tanins tableau IV.13b.

Dans les extraits étudiés sur le type d'urine d'un sujet sain, une faible corrélation a été montrée avec l'activité antiurolithiasique des extraits (feuilles et tiges) et leur teneur en phénols totaux, teneur en flavonoïdes et en tanins.

De même, les résultats d'extraits étudiés sur les urines de sujet malade, aucune corrélation positive est observée entre l'activité antiurolithiasique des extraits (feuilles et tiges) et leurs teneur en phénols totaux, teneur en flavonoïdes et des tanins.

L'activité antiurolithiasique de la plante *Astragalus gombo* est la première réalisée sur cette espèce.

Nous avons utilisé trois types d'urine et d'oxalate de sodium pour déterminer la croissance et l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium. Mais la croissance de cristaux dans l'urine artificielle dans un environnement statique peut être utile dans une certaine mesure pour expliquer la croissance des calculs urinaires chez l'homme. La principale différence entre ces types d'urine est la présence d'inhibiteurs de croissance moléculaire et d'inducteurs de nucléation dans l'urine humaine [271].

D'après le screening phytochimique, notre plante contient certains groupes chimiques par exemple, des flavonoïdes, des tanins, des dérivés d'anthracène libres, des triterpènes, des coumarines, des saponosides, des polyphénols, des composés réducteurs, des protéines. Les saponines sont connues pour avoir des propriétés anti-cristallisation en désagrégeant la suspension de mucoprotéines, promoteurs de la cristallisation et cela concorde avec les conclusions formulées dans la littérature qui indiquent que les flavonoïdes réduisent la cristallisation oxalocalcique [272, 273].

Cette différence dans les résultats obtenus peut s'expliquer par la capacité de l'extrait à réduire la nucléation, Ce qui augmente la limite instable de l'oxalate dans l'urine et empêche la précipitation des cristaux d'oxalate de calcium. Divers inhibiteurs physiologiques de la lithiase urinaire présents dans l'urine, notamment des substances organiques (par exemple, le citrate, le fragment de prothrombine urinaire 1, les glycosaminoglycanes et d'autres macromolécules) et inorganiques (par exemple, le magnésium) sont connus pour inhiber la formation de calculs [274].

Cette indépendance peut s'expliquer par le fait que les extraits étudiés d'types d'urine qui n'ont pas montré un corrélation linéaire contiennent des molécules de structures chimiques différentes et que cette activité n'est pas limitée aux composés phénoliques, mais à leurs structures chimiques.

**Tableau IV.13.a:** Les coefficients de corrélation entre les teneurs des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités biologiques

	Feuilles								$\alpha$ - amylase
	CPT	CFT	CTT	DPPH	ABTS	PPM	Chimie $O_2^{\bullet-}$	Electrochimique $O_2^{\bullet-}$	
CPT	1								
CFT		1							
CTT			1						
DPPH	0,826	0,141	0,222	1					
ABTS	0,666	0,121	0,263	0,965	1				
PPM	0,202	0,703	0,318	0,021	0,041	1			
Chimique $O_2^{\bullet-}$	0,014	4,00E-05	0,224	0,002	0,003	5,00E-04	1		
Electrochimique $O_2^{\bullet-}$	0,925	0,067	0,115	0,378	0,327	0,256	0,899	1	
$\alpha$ -amylase	0,0008	0,029	0,034						1
Tiges									
	CPT	CFT	CTT	DPPH	ABTS	PPM	Chimique $O_2^{\bullet-}$	$\alpha$ -amylase	
CPT	1								
CFT		1							
CTT			1						
DPPH	0,613	0,291	0,152	1					
ABTS	0,920	0,111	0,505	0,658	1				
PPM	0,655	0,455	0,366	0,783	0,495	1			
Chimique $O_2^{\bullet-}$	0,076	0,212	0,365	0,051	0,004	0,012	1		
$\alpha$ -amylase	1	0,466	0,99					1	

**Tableau IV.13.b:** Les coefficients de corrélation entre les teneurs des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités biologiques

Feuilles (antiuroliithiasique)						
	CPT	CFT	CTT	Urine artificiel	Urine de sujet malade	Urine de sujet sain
CPT	1					
CFT		1				
CTT			1			
Urine artificiel	0.423	0.017	0.025	1		
Urine de sujet malade	0.042	0.038	0.0001		1	
Urine de sujet sain	0.345	0.334	0.379			1
Tiges ( antiuroliithiasique)						
	CPT	CFT	CTT	Urine artificiel	Urine de sujet malade	Urine de sujet sain
CPT	1					
CFT		1				
CTT			1			
Urine artificiel	0.795	0.037	0.33	1		
Urine de sujet malade	0.45	0.047	0.132		1	
Urine de sujet sain	0.373	0.105	0.075			1

Après une évaluation de l'activité anticristallo-oxalocalcique par modèle de turbidimétrique de nos extraits, un autre test a été réalisé de manière très simple pour tester la capacité des

extraits étudiés vis-à-vis la dissolution des calculs rénaux ; c'est le modèle gravimétrique. Pour cela, nous avons comparé l'effet des extraits et références par contact avec des fragments de trois types de calculs collectés chez différents patients souffrant de lithiase rénale.

Les calculs rénaux sont un problème dans de nombreux pays, l'oxalate de calcium étant la forme cristalline la plus répandue. L'Algérie est l'une de ces nations. Nous avons choisi deux types de calculs, l'urate de calcium et son sel, l'urate de calcium, car ces types de calculs sont souvent plus difficiles à traiter et à prévenir avec les procédures médicales et urologiques actuellement disponibles. Les deux types de calculs sont d'abord soumis à des analyses structurales par diffraction des rayons (DRX) afin d'identifier leur structure cristalline. on a pu affirmer que le type du calcul de type 1 est l'urate de calcium, avec le numéro CAS 98-000-9202 et la formule  $C_2H_6CaN_4O_4$ , tandis que le deuxième calcul est basé sur phosphates de calcium, avec le numéro CAS 98-003-5254 et la formule  $C_4H_{20}CaN_8O_{12}P_2$ , selon les diffractogrammes obtenus des deux types de calculs et comparés aux diffractogrammes de deux composés de référence (urate de calcium et phosphates de calcium) (Voir annexe (1)).

Aucun changement perceptible après 24 heures ou après cinq jours. Les calculs ont été laissés au contact des extraits pendant deux semaines, puis l'activité des extraits a été évaluée en calculant le taux de dissolution des calculs après passage dans le milieu expérimental et en comparant le poids résiduel des calculs à leur poids initial. Le tableau suivant (tableau IV.14) présente la capacité de différents extraits à dissoudre les calculs sur une période de deux semaines, ainsi que les inhibiteurs de référence.

**Tableau IV.14:** Effet des extraits de plantes sur la dissolution *in vitro* des calculs urinaires

Extraits / calculs	Pourcentage de dissolution (D%)			
	Feuilles		Tiges	
	C1	C2	C1	C2
Brut	2,01	12,01	1,45	3,10
fraction dichlorométhane	0,88	2,37	1,14	3,40
fraction acétate d'éthyle	2,20	3,13	2,19	4,12
fraction n-butanol	2,04	1,17	2,92	4,88
fraction aqueuse	3,13	11,90	1,11	9,57
Tisane	3,20	2,31	3,01	8,37
Foncurine	2,02	10,33	2,02	10,33
Lithos	1,94	8,20	1,94	8,20

Nos résultats n'ont pas permis de voir une différence significative entre les extraits ni entre les extraits et la solution de référence en ce qui concerne la perte de masse des calculs d'urate de calcium et phosphates de calcium sur la période expérimentale choisie.

En ce qui concerne la perte de masse des calculs d'urate de calcium et de phosphate de calcium sur la période expérimentale choisie, nos résultats n'ont pas révélé de différence significative entre les extraits ou entre les extraits et la solution de référence.

Les résultats du tableau IV.14 montrent que les extraits végétaux ont surperformé la solution foncurine et lithos utilisée comme référence tant en qualitativement et quantitativement, avec des pourcentages de dissolution qui ne dépassent pas 12 %.

D'ailleurs, l'extrait brut et la fraction aqueuse de feuilles a donné des taux de réduction de masse de 12,01 % et 11,90 % du calcul C2, respectivement. Tandis que Foncurine et Lithos, utilisés comme références, ont montré des forces de solubilité estimées à 10,33 % et 8,20 % en présence du type morphologique de calcul C2, respectivement. Par contre on marque une faible réduction de poids sur le premier type de calcul C1 pour les feuilles et les tiges avec des pourcentages de dissolution compris entre 0,88 % et 3,20 %. Le pouvoir de solubilisation la plus élevée de

l'extrait de Tisane a été enregistrée pour les feuilles et les tiges par rapport aux deux références utilisées.

Par contre, la fraction aqueuse et l'extrait de Tisane ont donné le pouvoir de dissolution le plus élevé pour les tiges dans le calcul de perte de poids C2 avec 9,57 % et 8,37 %, respectivement. Tandis que, l'utilisation de la Foncurine de référence a montré une force de dissolution plus élevée par rapport aux extraits des tiges de calcul morphologique de type C2.

Par ailleurs, l'extrait brut et la fraction aqueuse dissolvaient plus de calculs de type de phosphate de calcium que d'urate de calcium, Cela implique que le mécanisme sous-jacent à la dissolution des calculs par les extraits de plantes est probablement lié à l'état de surface de la calcul. Le bon pouvoir dissolvant de l'extrait brut et la fraction aqueux sur les calculs étudiés résulte d'une interaction entre le phosphate de calcium et les molécules présentes dans cet extrait au cours du processus de dissolution. On pense que l'activité dissolvante de ces deux extraits peut être causée par la présence de polyphénols et de flavonoïdes sur la base de l'analyse phytochimique de ces deux extraits. Certaines recherches étayent cette conclusion [275, 276]. Cependant, l'extrait peut être plus efficace s'il est exposé plus longtemps et/ou si sa concentration est plus élevée.

*Conclusion*

*Générale*

### Conclusion Générale

L'utilisation des plantes médicinales et de leurs divers extraits ont toujours été une source essentielle de substances bioactives naturelles telles que les polyphénols, qui actuellement l'intérêt de plusieurs chercheurs en raison des bénéfices pour la santé qu'elles pourraient procurer à l'homme.

Au cours du présent travail de thèse, ayant pour le but de mieux d'étudier la phytochimie d'une plante récoltée dans le Sahara septentrional algérien : *Astragalus gombo* au travers de l'étude de leur métabolisme secondaire, Des extraits de feuilles et de tiges de cette plante ont été évalués par leurs effets biologiques sur la composition chimique.

Le screening phytochimique nous a permis de trouver une composition riche et variée en métabolites secondaires tels que : Flavonoïdes, tanins, dérivés anthracéniques libres, triterpènes, coumarines, saponosides, Polyphénols, les composés réducteur, protéines.

Les résultats de ce balayage phytochimique nous amène à extraire les composés phénoliques de notre plante par la macération dans des solvants à polarité croissante.

Les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins ont été quantifiés des extraits phénoliques par des méthodes colorimétriques. Cela nous a permis de confirmer que la plante est riche en composés phénoliques, à l'exception des tanins qui sont présents en faible quantité.

Ensuite, nous avons passés à l'évaluation du pouvoir antioxydant dans les différents systèmes utilisés : piégeage des radicaux DPPH et ABTS, réduction du phosphomolybdate, radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  par deux voies (chimique et électrochimique). Les fractions dichlorométhane des tiges et des feuilles qui présentent des fortes activités de piégeage de DPPH $\bullet$ , avec des  $IC_{50}$  de  $0,07 \pm 0,005$  et  $0,14 \pm 0,00$  mg/mL respectivement. La plus élevée activité de piégeage de radical ABTS $^{\cdot+}$  a été observée dans la fraction d'acétate d'éthyle chez les feuilles avec  $IC_{50} = 0,33 \pm 0,05$  mg/mL. La fraction n-butanol des feuilles possède une capacité réductrice très intéressante  $AEAC = 605,57 \pm 32,50$  mM. Le pourcentage d'inhibition d' $O_2^{\bullet-}$  par la méthode l'auto-oxydation de pyrogallol le plus importante ont été enregistré avec la fraction dichlorométhane des feuilles ( $56,31 \pm 0,88$  %), et la méthode électrochimique par la voltamétrie cyclique avec  $CI_{50} = 0,00174$  pour la fraction acétate d'éthyle des feuilles.

Nous avons fait le test biologique de l'effet inhibiteur des différents extraits des feuilles et des tiges sur  $\alpha$  - amylase. Nous avons pu prouver *in vitro* à travers cette étude la capacité inhibitrice de ces extraits vis-à-vis de l'enzyme. Nous avons enregistré le meilleur pourcentage de inhibition dans la fraction acétate d'éthyle des tiges avec  $51,76 \pm 3,17$  %, le même extrait enregistre la valeur AEIC la plus élevée  $0,73 \pm 0,04$  pour les tiges.

Nous avons mené une étude *in vitro* sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique (méthode turbidimétrique) de trois types d'urine : d'un homme sans antécédents lithiasiques (urine de sujet sain), d'un homme d'une maladie des calculs rénaux (urine de sujet malade) et urine artificiel et dissolution des calculs rénaux (méthode gravimétrique) en présence d'extraits de feuilles et de tiges.

Nous avons pu suivre la cinétique de formation de lithiase calcique et de déterminer le pouvoir d'inhibition dans les différents extraits étudiés par la méthode turbidimétrique. Les résultats ont montré que tous les extraits de feuilles et de tiges testés sur l'urine de sujets sains présentent un pouvoir antilithiasique confirmé, en particulier les extraits de tisane et l'extrait brut comparativement aux inhibiteurs de référence le foncurine et le lithos.

De plus, l'extrait brut et la fraction aqueuses de feuilles sont les seuls à avoir un effet de solubilisation remarquable sur calcul C2 comparativement au foncurine et lithos, selon les changements du modèle gravimétrique dans les caractéristiques structurelles des calculs rénaux de l'urate de calcium et du phosphate de calcium type après traitement aux extraits de plantes.

Une corrélation positive a été obtenue entre les activités antioxydantes, les activités biologiques et le contenu phénolique, flavonoïdique et tanins, ce qui indique la contribution d'une partie de ces activités par la richesse de l'espèce en métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes.

On conclut donc que les résultats obtenus à travers ce travail peuvent améliorer le niveau de connaissance sur les métabolites secondaires d'*Astragalus gombo*, vu sa richesse en molécules bioactives. Cela permet d'étudier de nombreuses autres voies d'études intéressantes à explorer.

Pour la poursuite de nos investigations, nous pensons nous intéresser d'avantage à la même plante qui jusqu'à présent, n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études phytochimiques et pharmacologiques, ainsi que des activités anti oxydante, antidiabétique, et antiurolithiasique qui a été la première étude que nous avons menée sur cette plante. Cela nous permettra peut-être d'isoler les métabolites secondaires responsables à la bio-activité de cette plante,

notamment l'identification et la purification des autres molécules qui n'ont pas été à ce jour isolées et de comparer leurs activités biologiques.

De nombreuses perspectives peuvent être tirées des résultats obtenus dans ce travail Pour la continuité de ce travail avec plus d'efficacité, dont les suivants :

- isoler et identifier les principes actifs responsables de l'activité biologique.
- étudier la toxicité des extraits pour déterminer leur utilisation.
- De tester ces molécules purifiées sur des modèles biologiques, *in vivo*, afin de concrétiser leur usage thérapeutique et/ou industriel.
- étudier les propriétés phytochimiques, ethnobotaniques et pharmaceutiques et d'autres plantes locales utiles qui n'ont pas été étudiées et qui mériteraient d'être investiguées dans les domaines étudiés.

### Références

1. Singhal, R., *Medicinal plants and primary health care: the role of gender*. Journal of Health Management, 2005. **7**(2): p. 277-293.
2. Zuin, V.G. and J.H. Vilegas, *Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2000. **14**(2): p. 73-88.
3. Gahukar, R.T., *Management of pests and diseases of important tropical/subtropical medicinal and aromatic plants: A review*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2018. **9**: p. 1-18.
4. Al-Waili, N., et al., *Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials*. Redox Report, 2017. **22**(3): p. 99-118.
5. Hanifi, N., *Importance des ressources phylogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales*. Publication des Actes éditions, 1991. **16**: p. 47-49.
6. Rios, J. and P. Waterman, *A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products, 1997. **11**(6): p. 411-418.
7. Niu, Y., et al., *Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of Astragalus membranaceus (Fisch) Bge. var. mongolicus (Bge.) Hsiao*. Food Chemistry, 2011. **128**(3): p. 620-626.
8. Medjekal, S. and H. Bousseboua, *Effects of season on potential nutritive value, methane production and condensed tannin content of Astragalus gombo*. Livestock Research for Rural Development, 2016. **28**(12).
9. Ozenda, P., *Flore et végétation du Sahara*, 1992, Elsevier Masson.
10. Firdaus, R. and A. Mazumder, *Review on Butea monosperma*. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 2012. **2**(4): p. 1035-1039.
11. Quézel, P. and S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. 1962.

12. Spichiger, R.-E., M. Figeat-Hug, and D. Jeanmonod, *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales* 2002: PPUR presses polytechniques.
13. Griesmann, M., et al., *Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis*. *Science*, 2018. **361**(6398): p. eaat1743.
14. Peirs, C., *Contribution à l'étude phytochimique de Galega officinalis L.(Fabaceae)*, 2005.
15. Pistelli, L., *Secondary metabolites of genus Astragalus: Structure and biological activity*. *Studies in natural products chemistry*, 2002. **27**: p. 443-545.
16. James, L., et al., *Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitro-bearing Astragalus or their toxins*. *American journal of veterinary research*, 1980. **41**(3): p. 377-382.
17. Chouana, T., *Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'Astragalus gombo bunge*, 2017, Université Clermont Auvergne(2017-2020).
18. Verotta, L. and N.A. El-Sebakhy, *Cycloartane and oleanane saponins from Astragalus sp*. *Studies in natural products chemistry*, 2001. **25**: p. 179-234.
19. Bedir, E., et al., *Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from Astragalus species*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000. **23**(7): p. 834-837.
20. Özipek, M., et al., *Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from Astragalus oleifolius*. *Phytochemistry*, 2005. **66**(10): p. 1168-1173.
21. Gariboldi, P., et al., *Cycloartane triterpene glycosides from Astragalus trigonus*. *Phytochemistry*, 1995. **40**(6): p. 1755-1760.
22. Sevimli-Gur, C., et al., *Wound healing effects of cycloartane-type triterpenes isolated from Astragalus species*. 2011.
23. Lee, D.-Y., et al., *Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of Astragalus membranaceus*. *Molecules*, 2013. **18**(4): p. 3725-3732.
24. Radwan, M.M., et al., *Kahiricosides II–V, cycloartane glycosides from an Egyptian collection of Astragalus kahiricus*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(21): p. 2909-2913.
25. Tang, W. and G. Eisenbrand, *Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine* 2013: Springer Science & Business Media.
26. Avunduk, S., et al., *Triterpene glycosides from the roots of Astragalus flavescens*. *Journal of Natural products*, 2008. **71**(1): p. 141-145.

27. Yu, D.-H., et al., *Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from Astragalus mongholicus Bunge*. Biomedical and Environmental Sciences, 2005. **18**(5): p. 297.
28. Yu, D., et al., *Isoflavonoids from Astragalus mongholicus protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **98**(1-2): p. 89-94.
29. Xiaoxing, Y., et al., *The antioxidative effects of astragalus saponin I protect against development of early diabetic nephropathy*. Journal of pharmacological sciences, 2006. **101**(2): p. 166-173.
30. Oezbek, T., et al., *Antimutagenic Activities of Methanol Extracts of Some Endemic Astragalus Species*. Asian Journal of Chemistry, 2009. **21**(1): p. 451-458.
31. Lysiuk, R. and R. Darmohray, *Pharmacology and ethnomedicine of the genus Astragalus*. International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine, 2016. **3**: p. 46-53.
32. Savran, T., et al., *Cycloartane glycosides from Astragalus erinaceus*. Records of Natural Products, 2012. **6**(3): p. 230.
33. Lev, E., *Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham*. Journal of ethnopharmacology, 2002. **80**(2-3): p. 167-179.
34. Cakilcioglu, U. and I. Turkoglu, *An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey)*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **132**(1): p. 165-175.
35. Yesilada, E., et al., *Effects of triterpene saponins from Astragalus species on in vitro cytokine release*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **96**(1-2): p. 71-77.
36. Ivancheva, S., M. Nikolova, and R. Tsvetkova, *Pharmacological activities and biologically active compounds of Bulgarian medicinal plants*. Phytochemistry: Advances in Research, 2006. **37661**: p. 87-103.
37. Dimitrov, M., et al., *Preparation of hydrogel tablets based on polyethylene oxide with standardized dry extract of Astragalus corniculatus Bieb.(Fabaceae)*. Pharma News, 2003. **32**: p. 3-17.
38. Liu, X., et al., *Isolation of astragalin and its immunological activities*. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, 1994. **6**: p. 23-31.
39. Evans, W., *Trease and Evans Pharmacognosy 14th edition WB Saunders Company Limited*. 1998.

40. Abd El-Ghani, M.M., et al., *Biosystematic study on some Egyptian species of Astragalus L.(Fabaceae)*. Agriculture, 2021. **11**(2): p. 125.
41. Chen, J., et al., *Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected Astragalus adsurgens*. Food Chemistry, 2012. **131**(2): p. 546-551.
42. Yürüker, A., et al., *Cycloartane triterpene glycosides from the roots of Astragalus melanophrurius*. Planta medica, 1997. **63**(02): p. 183-186.
43. Isaev, M., M. Gorovits, and N. Abubakirov, *Progress in the chemistry of the cycloartanes*. Chemistry of Natural Compounds, 1989. **25**: p. 131-147.
44. Khushbaktova, Z., et al., *Influence of cycloartanes from plants of the genus Astragalus and their synthetic analogs on the contractive function of the myocardium and the activity of Na, K-ATPase*. Chemistry of Natural Compounds, 1994. **30**(4): p. 469-473.
45. Nalbantsoy, A., et al., *Adjuvant effects of Astragalus saponins Macrophyllosaponin B and Astragaloside VII*. Journal of ethnopharmacology, 2011. **134**(3): p. 897-903.
46. Tomoda, M., N. Shimizu, and S. Ishii, *A reticuloendothelial system-activating glycan from the roots of Astragalus membranaceus*. Phytochemistry, 1992. **31**(1): p. 63-66.
47. SHIMIZU, N., et al., *An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the root of Astragalus mongholicus*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1991. **39**(11): p. 2969-2972.
48. Horo, I., et al., *Saponins from Astragalus hareftae (NAB.) SIRJ*. Phytochemistry, 2012. **84**: p. 147-153.
49. Horo, I., et al., *Triterpene glycosides from Astragalus icmadophilus*. Phytochemistry, 2010. **71**(8-9): p. 956-963.
50. Benchadi, W., et al., *Secondary metabolites of Astragalus cruciatus Link. and their chemotaxonomic significance*. Records of Natural Products, 2013. **7**(2).
51. Krasteva, I. and S. Nikolov, *Flavonoids in Astragalus corniculatus*. Química Nova, 2008. **31**: p. 59-60.
52. Guzhva, N., *Flavonoids and hydroxycinnamic acids from Astragalus asper*. Chemistry of Natural Compounds, 2010. **46**(2): p. 303-304.
53. Pistelli, L., et al., *Further saponins and flavonoids from Astragalus verrucosus Moris*. Pharmaceutical biology, 2003. **41**(8): p. 568-572.
54. Yahara, S., M. Kohjyouma, and H. Kohoda, *Flavonoid glycosides and saponins from Astragalus shikokianus*. Phytochemistry, 2000. **53**(4): p. 469-471.

55. Montoro, P., et al., *LC-ESI-MS quali-quantitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated Astragalus gombiformis*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2013. **72**: p. 89-98.
56. Semmar, N., et al., *Two New Glycosides from Astragalus c aprinus*. Journal of natural products, 2001. **64**(5): p. 656-658.
57. El-Hawiet, A.M., et al., *Chemical constituents from Astragalus annularis Forssk. and A. trimestris L., Fabaceae*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2010. **20**: p. 860-865.
58. Gülcemal, D., et al., *Oleanane glycosides from Astragalus tauricolus: Isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling*. Phytochemistry, 2013. **86**: p. 184-194.
59. Maamria, L., et al., *An isoflavan and saponins from Astragalus depressus L.* Journal of the Serbian Chemical Society, 2015. **80**(2): p. 137-142.
60. Çalış, İ., et al., *Cycloartane glycosides from Astragalus campylosema Boiss. ssp. campylosema*. Phytochemistry, 2008. **69**(14): p. 2634-2638.
61. Pistelli, L., et al., *Three cycloastragenol glucosides from Astragalus verrucosus*. Phytochemistry, 1997. **45**(3): p. 585-587.
62. Pistelli, L., et al., *Cicloastragenol glycosides from Astragalus verrucosus*. Phytochemistry, 1998. **49**(8): p. 2467-2471.
63. Maamria, L., et al., *Cycloartane glycosides from Astragalus gombo*. Phytochemistry Letters, 2015. **11**: p. 286-291.
64. Rao, Y.J., et al., *Phytochemical investigation of the whole plant of Astragalus leucocephalus*. 2009.
65. Iskenderov, D., B. Keneshov, and M. Isaev, *Triterpene glycosides from Astragalus and their genins. LXXVI. Glycosides from A. sieversianus*. Chemistry of Natural Compounds, 2008. **44**: p. 319-323.
66. Niknam, V. and Y.S. Lisar, *Chemical composition of Astragalus: Carbohydrates and mucilage content*. Pakistan Journal of Botany, 2004. **36**(2): p. 381-388.
67. Çalış, I., et al., *Secondary metabolites from the roots of Astragalus zahlbruckneri*. Journal of natural products, 2001. **64**(9): p. 1179-1182.
68. Hamdi-Aissa, B., et al., *Soils and brine geochemistry and mineralogy of hyperarid desert playa, Ouargla Basin, Algerian Sahara*. Arid Land Research and Management, 2004. **18**(2): p. 103-126.

69. Sahnoun, A.M., S.E. Doumandji, and L. Desutter-Grandcolas, *A check-list of Ensifera from Algeria (Insecta: Orthoptera)*. Zootaxa, 2010. **2432**(1): p. 1–44-1–44.
70. Hannachi, S., *Inventaire variétal de la palmeraie algérienne*. (No Title), 1998.
71. Chehma, A., *Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien* 2019: Éditions universitaires européennes.
72. Benchelah, A.-C., H. Bouziane, and M. Maka, *Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili*. Phytothérapie, 2004. **2**: p. 191-197.
73. El Hafed, K.M., et al., *Atlas floristique de la vallée de Oued-Righ par écosystème*. Centre de recherche scientifique et technique sur la région aride, Omar El Bernaoui, Station Milieu biophysique-Touggourt, 173p, 2010.
74. Song, Y.-R., et al., *Isolation, purification, and characterization of novel polysaccharides from lotus (Nelumbo nucifera) leaves and their immunostimulatory effects*. International journal of biological macromolecules, 2019. **128**: p. 546-555.
75. Maamria, L., *Etude phytochimique de deux plantes Leguminosae: Astragalus depressus L. et Astragalus gombo Coss. et Dur*, 2015, UB1.
76. Rima, S., B. Selma, and K. Ahmed. *SEPARATION ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES BIOACTIVES DE LA PHASE ACETATE D'ETHYLE DE L'ESPECE ASTRAGALUS GOMBO COSS. & DUR*. in *Proceeding of the 2nd African Congress on Biology & Health University Ferhat Abbas Setif1*. 2012.
77. Menichini, F., et al., *Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four Teucrium essential oils from Greece*. Food Chemistry, 2009. **115**(2): p. 679-686.
78. Yan, R., et al., *Cytotoxicity and antibacterial activity of Lindera strychnifolia essential oils and extracts*. Journal of ethnopharmacology, 2009. **121**(3): p. 451-455.
79. Sutharsan, J., et al., *Molecular rotors: synthesis and evaluation as viscosity sensors*. Tetrahedron, 2010. **66**(14): p. 2582-2588.
80. Vejdělek, Z. and M. Protiva, *Potential antidepressants and tranquillizers: Synthesis of some 9-(aminoalkoxy)-2, 3, 6, 7-tetrahydro-1H, 5H-benzo [ij] quinolizines and 1-(substituted amino)-3-(1-naphthoxy)-2-propanols*. Collection of Czechoslovak chemical communications, 1990. **55**(5): p. 1290-1296.
81. Teyeb, H., et al., *Biological and chemical study of Astragalus gombiformis*. Zeitschrift für Naturforschung C, 2012. **67**(7-8): p. 367-374.

82. Daudon, M., et al., *Épidémiologie des lithiases urinaires*. Progrès en urologie, 2008. **18**(12): p. 802-814.
83. Oulghoul, O., *Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la lithiase urinaire au service d'urologie de CHU Med VI Marrakech: expérience de 10 ans*, 2015, Thèse Med (Maroc) 2015.
84. Oumar, M.K., *Etude de la lithiase urinaire infectée au service d'urologie du centre hospitalier universitaire du Point G*. 2006.
85. Daudon, M., P. Jungers, and O. Traxer, *Lithiase urinaire* 2012: Lavoisier.
86. Dalibon, P., *La lithiase urinaire, une affection sous surveillance*. Actualités Pharmaceutiques, 2015. **54**(542): p. 23-29.
87. Yadav, R.D., et al., *Herbal plants used in the treatment of urolithiasis: a review*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2011. **2**(6): p. 1412-1420.
88. Letavernier, E. and M. Daudon, *La plaque de Randall: à l'origine des calculs rénaux*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2016. **200**(6): p. 1129-1140.
89. Traxer, O., E. Lechevallier, and C. Saussine, *Diététique et lithiase rénale. Le rôle de l'urologue*. Progrès en urologie, 2008. **18**(12): p. 857-862.
90. Grases, F., A. Costa-Bauza, and R.M. Prieto, *Renal lithiasis and nutrition*. Nutrition journal, 2006. **5**(1): p. 1-7.
91. Daudon, M., *L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant*. Archives de pédiatrie, 2000. **7**(8): p. 855-865.
92. KHALED, M.S., *Diplôme de Doctorat en Sciences*, 2011, Université de Béchar.
93. Besancenot, J.-P., *Sécheresses et lithiases urinaires*. Science et changements planétaires/Sécheresse, 1992. **3**(4): p. 211-217.
94. Tosukhowong, P., et al., *Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007*. 2007.
95. Chabannes, É., et al., *Prise en charge urologique des calculs rénaux et urétéraux de l'adulte. Mise au point du Comité lithiase de l'Association française d'urologie (CLAFU). Aspects généraux*. Progrès en urologie, 2013. **23**(16): p. 1389-1399.
96. El Kabbaj, S., F. Meiouet, and A. El Amrani, *Analyse des calculs urinaires par spectrophotométrie infrarouge à propos de 218 cas au Maroc*. Biol Sante, 2000. **1**(1): p. 14-23.

97. Daudon, M., et al., *La lithogénèse*. Progrès en urologie, 2008. **18**(12): p. 815-827.
98. Jungers, P., M. Daudon, and P. Conort, *Lithiase rénale: diagnostic et traitement* 1999: Flammarion Médecine-Sciences.
99. Basavaraj, D.R., et al., *The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones*. EAU-EBU update series, 2007. **5**(3): p. 126-136.
100. Ryall, R.L., *Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation*. World journal of urology, 1997. **15**: p. 155-164.
101. Marangella, M., et al., *Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis*. Urologia internationalis, 2004. **72**(Suppl. 1): p. 6-10.
102. Doré, B., *Les lithiases rénales*. Ed springer, paris 2004 ISSN: 9782287597473; 420p.
103. Khan, S.R., *Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats*. American journal of kidney diseases, 1991. **17**(4): p. 398-401.
104. Daudon, M., et al., *Opportunities offered by Scanning electron microscopy, powder neutron diffraction in the study of whewellite kidney stones*. J App Cryst, 2009. **42**: p. 109.
105. Daudon, M. and V. Frochot, *Crystalluria*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2015. **53**(s2): p. s1479-s1487.
106. Shirley, R. and D.J. Sutor, *Anhydrous uric acid: nature and occurrence of a new form in urinary calculi*. Science, 1968. **159**(3814): p. 544-544.
107. Normand, M., *Le traitement médical de la lithiase urique*. Progrès en Urologie-FMC, 2013. **23**(3): p. F77-F83.
108. Estrade, V., et al., *Pourquoi l'urologue doit savoir reconnaître un calcul et comment faire? Les bases de la reconnaissance endoscopique*. Progrès en Urologie-FMC, 2017. **27**(2): p. F26-F35.
109. Sadki, C. and F. Atmani, *Évaluation de l'effet antilithiasique, oxalo-calcique et phospho-ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'Erica multiflora L*. Progrès en urologie, 2017. **27**(16): p. 1058-1067.
110. Klee, L.W., C.G. Brito, and J.E. Lingeman, *Clinical Implications of Brushite Calculi*. The Journal of urology, 1991. **145**(4): p. 715-718.
111. Williams Jr, J.C., et al., *Fragility of brushite stones in shock wave lithotripsy: absence of correlation with computerized tomography visible structure*. The Journal of urology, 2012. **188**(3): p. 996-1001.

112. BARBEY, F., et al., *Medical treatment of cystinuria: critical reappraisal of long-term results*. The Journal of urology, 2000. **163**(5): p. 1419-1423.
113. BURNETT, C.H. and T.F. WILLIAMS, *An analysis of some features of renal tubular dysfunction*. AMA Archives of Internal Medicine, 1958. **102**(6): p. 881-890.
114. Daudon, M. and P. Jungers, *Drug-induced renal calculi: epidemiology, prevention and management*. Drugs, 2004. **64**: p. 245-275.
115. Khan, A., *In vitro and in vivo models for the study of urolithiasis*. Urologia Journal, 2018. **85**(4): p. 145-149.
116. Kavanagh, J.P., *In vitro calcium oxalate crystallisation methods*. Urological research, 2006. **34**: p. 139-145.
117. Ahmed, S., M.M. Hasan, and Z.A. Mahmood, *In vitro urolithiasis models: An evaluation of prophylactic management against kidney stones*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2016. **5**(3): p. 28-35.
118. Chitme, H.R., et al., *Herbal treatment for urinary stones*. Int J Pharm Sci Res, 2010. **1**(2): p. 24-31.
119. Aggarwal, A., S. Singla, and C. Tandon, *Urolithiasis: Phytotherapy as an adjunct therapy*. 2014.
120. Shukla, A.K., et al., *A review on anti-urolithiatic activity of herbal folk plants*. Asian Journal of Biomaterial Research, 2017. **3**(2): p. 1-11.
121. Khan, A., S.R. Khan, and A.H. Gilani, *Studies on the in vitro and in vivo antiurolithic activity of Holarrhena antidysenterica*. Urological research, 2012. **40**: p. 671-681.
122. Eddouks, M., et al., *Antihypertensive activity of the aqueous extract of Retama raetam Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Herbal Pharmacotherapy, 2008. **7**(2): p. 65-77.
123. Das, I., et al., *In vitro inhibition and dissolution of calcium oxalate by edible plant Trianthema monogyna and pulse Macrotyloma uniflorum extracts*. Journal of crystal growth, 2005. **273**(3-4): p. 546-554.
124. Singh, R.G., S.K. Behura, and R. Kumar, *Litholytic property of Kulattha (Dolichous biflorus) vs potassium citrate in renal calculus disease: a comparative study*. The Journal of the Association of Physicians of India, 2010. **58**: p. 286-289.
125. Doddola, S., et al., *Evaluation of Sesbania grandiflora for antiurolithiatic and antioxidant properties*. Journal of natural medicines, 2008. **62**: p. 300-307.

126. Kumar, S., et al., *Anti-urolithiatic Activity of Aqueous Extracts of Asparagus Racemosus Willd., and Tamarindus Indica Linn., in Rats*. Pharmacologyonline, 2009. **2**: p. 625-630.
127. Rangasamy, P., et al., *Phytochemical analysis and evaluation of in vitro antioxidant and anti-urolithiatic potential of various fractions of Clitoria ternatea L. Blue flowered leaves*. Asian Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019. **9**(2): p. 67-76.
128. Patel, V.B. and N. Acharya, *Effect of Macrotyloma uniflorum in ethylene glycol induced urolithiasis in rats*. Heliyon, 2020. **6**(6): p. e04253.
129. Sheng, B.-W., et al., *Astragalus membranaceus reduces free radical-mediated injury to renal tubules in rabbits receiving high-energy shock waves*. Chinese medical journal, 2005. **118**(01): p. 43-49.
130. Laroubi, A., et al., *Prophylaxis effect of Trigonella foenum graecum L. seeds on renal stone formation in rats*. Phytotherapy Research, 2007. **21**(10): p. 921-925.
131. Kerner, W. and J. Brückel, *Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus*. Experimental and clinical endocrinology & diabetes, 2014. **122**(07): p. 384-386.
132. Marso, S.P., et al., *Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2016. **375**: p. 1834-1844.
133. Ogurtsova, K., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040*. Diabetes research and clinical practice, 2017. **128**: p. 40-50.
134. Leon, B.M. and T.M. Maddox, *Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research*. World journal of diabetes, 2015. **6**(13): p. 1246.
135. Papatheodorou, K., et al., *Complications of diabetes 2016*, 2016, Hindawi.
136. Domingueti, C.P., et al., *Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications*. Journal of Diabetes and its Complications, 2016. **30**(4): p. 738-745.
137. Prabhakar, P.K. and M. Doble, *A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants*. Current Diabetes Reviews, 2008. **4**(4): p. 291-308.
138. Patel, D., et al., *Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012. **2**(3): p. 239-250.

139. Gupta, R., et al., *An overview of Indian novel traditional medicinal plants with anti-diabetic potentials*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2008. **5**(1): p. 1-17.
140. Röder, P.V., et al., *Pancreatic regulation of glucose homeostasis*. Experimental & molecular medicine, 2016. **48**(3): p. e219-e219.
141. Seino, S., T. Shibasaki, and K. Minami, *Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(6): p. 2118-2125.
142. Rorsman, P. and M. Braun, *Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets*. Annual review of physiology, 2013. **75**: p. 155-179.
143. Asmat, U., K. Abad, and K. Ismail, *Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review*. Saudi pharmaceutical journal, 2016. **24**(5): p. 547-553.
144. Rösen, P., et al., *The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2001. **17**(3): p. 189-212.
145. Calcutt, N.A., et al., *Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials*. Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(5): p. 417-430.
146. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. Circulation research, 2010. **107**(9): p. 1058-1070.
147. Evans, J.L., et al., *Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction?* Diabetes, 2003. **52**(1): p. 1-8.
148. Bloch-Damti, A. and N. Bashan, *Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress*. Antioxidants & redox signaling, 2005. **7**(11-12): p. 1553-1567.
149. Giacco, F. and M. Brownlee, *Mechanisms of hyperglycemic damage in diabetes*. Atlas of Diabetes: Fourth Edition, 2011: p. 217-231.
150. Wallace, J.I., *Management of diabetes in the elderly*. Clinical Diabetes, 1999. **17**(1): p. 19-20.
151. Rains, J.L. and S.K. Jain, *Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **50**(5): p. 567-575.

152. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
153. Negrean, M., et al., *Effects of low-and high-advanced glycation endproduct meals on macro-and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus*. The American journal of clinical nutrition, 2007. **85**(5): p. 1236-1243.
154. Verma, S. and S. Singh, *Current and future status of herbal medicines*. Veterinary world, 2008. **1**(11): p. 347.
155. Chauhan, A., et al., *Plants having potential antidiabetic activity: a review*. Der Pharmacia Lettre, 2010. **2**(3): p. 369-387.
156. Marles, R.J. and N.R. Farnsworth, *Antidiabetic plants and their active constituents*. Phytomedicine, 1995. **2**(2): p. 137-189.
157. Li, W., et al., *Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus*. Journal of ethnopharmacology, 2004. **92**(1): p. 1-21.
158. Soulama, S., et al., *Teneurs en coumarines de 15 ligneux fourragers du Burkina Faso*. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2013. **7**(6): p. 2283-2291.
159. Mace, M., *Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots*. Physiologia plantarum, 1963. **16**(4): p. 915-925.
160. Shah, B.N., *Textbook of pharmacognosy and phytochemistry* 2009: Elsevier India.
161. Zeidan, S., et al., *Extraction of phenolic compounds and flavonoids from Eryngium creticum L. by conventional and nonconventional extraction techniques*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS), 2014. **3**(7): p. 1889-1898.
162. Evans, W.C., *Trease and Evans' pharmacognosy* 2009: Elsevier Health Sciences.
163. Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventós, *[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*, in *Methods in enzymology* 1999, Elsevier. p. 152-178.
164. Kamboj, A., et al., *Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from extracts of Terminalia bellerica*. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 2015. **2**(3): p. 201-215.
165. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**(3): p. 144-158.

166. Tiwari, B.K., N. Brunton, and C.S. Brennan, *Handbook of plant food phytochemicals* 2015: Wiley Online Library.
167. Lamaison, J. and A. Carnart, *Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de Crataegus monogyna Jacq. et de Crataegus laevigata (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation*. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1991. **25**(1): p. 12-16.
168. Wang, H., et al., *In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit*. *Food Chemistry*, 2008. **106**(3): p. 888-895.
169. Medini, F., et al., *Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for science*, 2014. **8**(3): p. 216-224.
170. Mariem, S., et al., *Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte Retama raetam*. *South African Journal of Botany*, 2014. **94**: p. 114-121.
171. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. *Nature*, 1958. **181**: p. 1199-1200.
172. Hsu, B., I.M. Coupar, and K. Ng, *Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*, 2006. **98**(2): p. 317-328.
173. Kim, H.-J., et al., *Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (Melaleuca alternifolia) oil and its components*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2004. **52**(10): p. 2849-2854.
174. Kasangana, P.B., P.S. Haddad, and T. Stevanovic, *Study of polyphenol content and antioxidant capacity of Myrianthus arboreus (Cecropiaceae) root bark extracts*. *Antioxidants*, 2015. **4**(2): p. 410-426.
175. Prieto, P., M. Pineda, and M. Aguilar, *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E*. *Analytical biochemistry*, 1999. **269**(2): p. 337-341.
176. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free radical biology and medicine*, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
177. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
178. Ramasarma, T. and A.V. Rao, *Catalytic activity of superoxide dismutase: A method based on its concentration-dependent constant decrease in rate of autoxidation of pyrogallol*. *Current science*, 2007. **92**(11): p. 1481-1482.

179. Li, H.M., et al., *Preparation of corn (Zea mays) peptides and their protective effect against alcohol-induced acute hepatic injury in NH mice*. Biotechnology and applied biochemistry, 2007. **47**(3): p. 169-174.
180. Pisoschi, A.M. and G.P. Negulescu, *Methods for total antioxidant activity determination: a review*. Biochem Anal Biochem, 2011. **1**(1): p. 106.
181. Christophe, C., *Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies "Silicium et Polymères" pour l'étude du stress oxydant. Application à la biochimie cutanée*, 2010, Université Paul Sabatier-Toulouse III.
182. Evans, D.H., et al., *Cyclic voltammetry*, 1983, ACS Publications.
183. Mittal, A., et al., *The redox status of experimental hemorrhagic shock as measured by cyclic voltammetry*. Shock, 2010. **33**(5): p. 460-466.
184. Le Bourvellec, C., et al., *Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids*. Talanta, 2008. **75**(4): p. 1098-1103.
185. Pulicani, J.-P., *étude du comportement électrochimique de composés polyfonctionnels et de dérivés comportant un groupement xanthate*, 2013, Ecole Polytechnique X.
186. Rahmani, Z., A. Douadi, and Z. Rahmani, *in vitro inhibition of  $\alpha$ -amylase enzyme, phytochemical study and antioxidant capacity for cupressus sempervirens extracts growing in arid climat*. Asian Journal of Research in Chemistry, 2019. **12**(6): p. 359-365.
187. Miller, G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.
188. Khacheba, I., A. Djeridane, and M. Yousfi, *Twenty traditional Algerian plants used in diabetes therapy as strong inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity*. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2014. **2014**.
189. Burns, J. and B. Finlayson, *A proposal for a standard reference artificial urine in in vitro urolithiasis experiments*. Investigative urology, 1980. **18**(2): p. 167-169.
190. Srinivasa, A.K.B., et al., *Antiuro lithiatic activity of Gokhsuradi churan, an ayurvedic formulation by in vitro method*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2013. **3**(2): p. 477.
191. Fouada, A., et al., *In vitro and in vivo antilithiasic effect of saponin rich fraction isolated from herniaria hirsuta*. J Bras Nefrol, 2006. **28**(4): p. 199-203.
192. Saso, L., et al., *Development of an in vitro assay for the screening of substances capable of dissolving calcium oxalate crystals*. Urologia internationalis, 1999. **61**(4): p. 210-214.

193. Kim, K.-H., et al., *Isolated protein of Astragalus membranaceus acts as an allergen by binding human immunoglobulin E on human sera*. BioChip Journal, 2016. **10**: p. 95-102.
194. Jaradat, N.A., et al., *Phytochemical and biological properties of four Astragalus species commonly used in traditional Palestinian medicine*. European Journal of Integrative Medicine, 2017. **9**: p. 1-8.
195. Shojaii, A., et al., *Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of the extract and fractions of Astragalus hamosus in animal models*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 2015. **14**(1): p. 263.
196. Aronson, J.K., *Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions* 2015: Elsevier.
197. Li-Xian, C., H. Xlao-Bing, and C. Yu-Qun, *The structures of thirteen astrasieversianins from Astragalus sieversianus*. Phytochemistry, 1986. **25**(10): p. 2389-2393.
198. Semmar, N., et al., *Chemotaxonomic analysis of Astragalus caprinus (Fabaceae) based on the flavonic patterns*. Biochemical systematics and ecology, 2005. **33**(2): p. 187-200.
199. Arumugam, R., B. Kirkan, and C. Sarikurkcu, *Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of Astragalus ponticus Pall.* South African Journal of Botany, 2019. **120**: p. 268-273.
200. Truong, D.-H., et al., *Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of Severinia buxifolia*. Journal of food quality, 2019. **2019**.
201. Niknam, V. and H. Ebrahimzadeh, *Phenolics content in Astragalus species*. Pak. J. Bot, 2002. **34**(3): p. 283-289.
202. Naghiloo, S., et al., *Ontogenetic variation of volatiles and antioxidant activity in leaves of Astragalus compactus Lam.(Fabaceae)*. EXCLI journal, 2012. **11**: p. 436.
203. Fidrianny, I., T. Aristya, and R. Hartati, *Antioxidant capacities of various leaves extracts from three species of legumes and correlation with total flavonoid, phenolic, carotenoid content*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2015. **7**(3): p. 628-634.
204. Ksouri, R., et al., *Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes*. Comptes Rendus Biologies, 2008. **331**(11): p. 865-873.

205. Gómez-Caravaca, A., et al., *Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2006. **41**(4): p. 1220-1234.
206. Ibrahim, L.F., et al., *Flavonoid constituents and biological screening of Astragalus bombycinus Boiss*. Natural product research, 2013. **27**(4-5): p. 386-393.
207. Bratkov, V.M., et al., *Flavonoids from the genus Astragalus: phytochemistry and biological activity*. Pharmacognosy Reviews, 2016. **10**(19): p. 11.
208. Mabry, T., K.R. Markham, and M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids* 2012: Springer Science & Business Media.
209. Guettaf, S., et al., *Evaluation of antioxidant potential and Phytochemical studies of Ononis angustissima L.(fabaceae)*. World Journal of Pharmaceutical Research, 2016. **5**(3): p. 1793-1815.
210. Khalfallah, A., et al., *A new flavonol triglycoside and other flavonol glycosides from Astragalus armatus Willd.(Fabaceae)*. Records of Natural Products, 2014. **8**(1): p. 12.
211. Labeled, A., et al., *Compounds from the pods of Astragalus armatus with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities*. Pharmaceutical biology, 2016. **54**(12): p. 3026-3032.
212. Frihart, C.R., *Wood adhesion and adhesives*. Handbook of wood chemistry and wood composites, 2005: p. 215-278.
213. Terrill, T., et al., *Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992. **58**(3): p. 321-329.
214. Karamac, M., et al., *Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material*. Polish journal of food and nutrition sciences, 2007. **57**(4): p. 471-474.
215. Julkunen-Tiitto, R., *Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 1985. **33**(2): p. 213-217.
216. Wojdyło, A., J. Oszmiański, and R. Czemerys, *Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs*. Food Chemistry, 2007. **105**(3): p. 940-949.
217. Molyneux, P., *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. sci. technol, 2004. **26**(2): p. 211-219.

218. Moure, A., et al., *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chemistry, 2001. **72**(2): p. 145-171.
219. Adiguezuel, A., et al., *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, 2009. **33**(1): p. 65-71.
220. Belmokhtar, Z., *Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de Retama monosperma. L Boiss, intérêt pharmaceutique* (2015), Université Mohamed Boudiaf d'Oran.
221. Bourezzane, S., et al., *Chemical composition and antioxidant activity of Astragalus monspessulanus L. growing in semiarid areas of Algeria*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2018. **83**(1): p. 31-38.
222. Ghasemian-Yadegari, J., et al., *Evaluation of phytochemical, antioxidant and antibacterial activity on Astragalus chrysostachys boiss. roots*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 2019. **18**(4): p. 1902.
223. Kähkönen, M.P., et al., *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 1999. **47**(10): p. 3954-3962.
224. Cai, Y.-Z., et al., *Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants*. Life sciences, 2006. **78**(25): p. 2872-2888.
225. Loganayaki, N., P. Siddhuraju, and S. Manian, *Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from Helicteres isora L. and Ceiba pentandra L.* Journal of food science and technology, 2013. **50**: p. 687-695.
226. Albayrak, S., et al., *Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from Turkey*. Food Chemistry, 2010. **119**(1): p. 114-122.
227. Lizcano, L.J., et al., *Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use*. Food Chemistry, 2010. **119**(4): p. 1566-1570.
228. Pu, W., D. Wang, and D. Zhou, *Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds from Astragalus taipaishanensis and their structure-activity relationship*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 1-11.

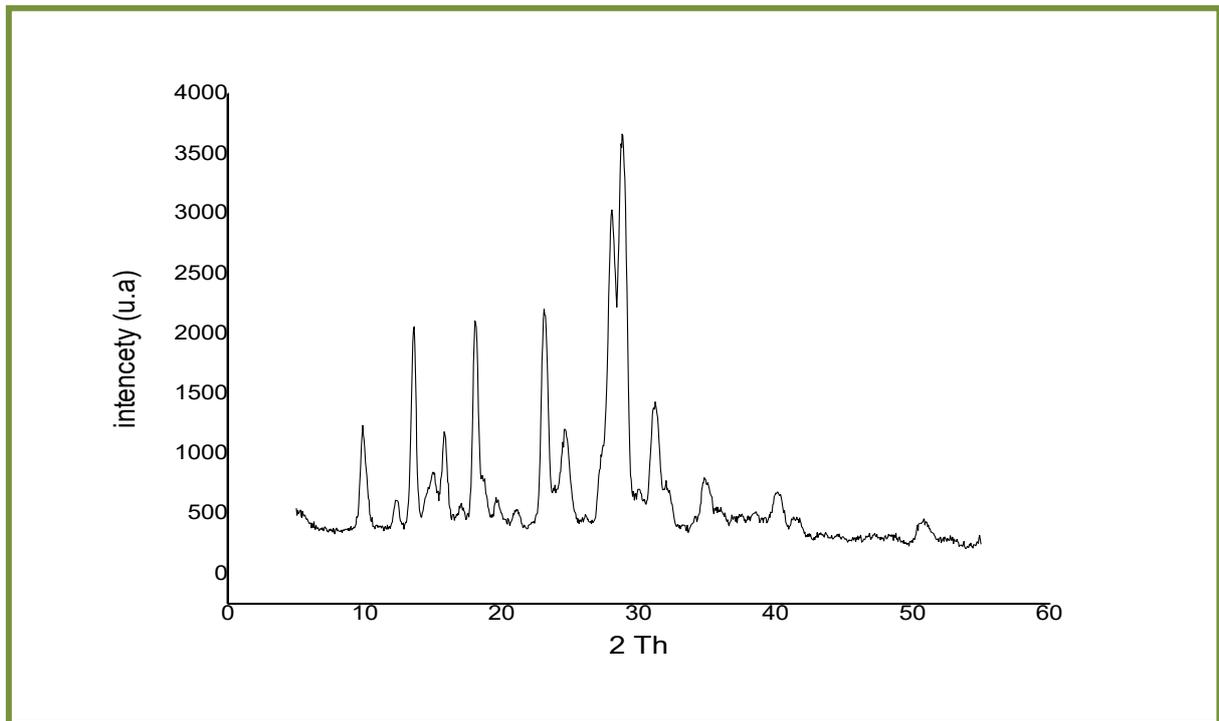
229. Zhang, Q.-A., et al., *Extraction, antioxidant capacity and identification of Semen Astragali Complanati (Astragalus complanatus R. Br.) phenolics*. Food Chemistry, 2013. **141**(2): p. 1295-1300.
230. Hotta, H., et al., *Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2002. **1572**(1): p. 123-132.
231. Goupy, P., et al., *Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 2003. **51**(3): p. 615-622.
232. Agbo, M.O., et al., *Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of selected Nigerian medicinal plants*. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **14**(1): p. 35-41.
233. Saha, M.R., et al., *In vitro free radical scavenging activity of Ixora coccinea L.* Bangladesh Journal of Pharmacology, 2008. **3**(2): p. 90-96.
234. Sarikurkcü, C. and G. Zengin, *Polyphenol profile and biological activity comparisons of different parts of Astragalus macrocephalus subsp. finitimus from Turkey*. Biology, 2020. **9**(8): p. 231.
235. Kurt-Celep, İ., et al., *Comprehensive evaluation of two Astragalus species (A. campylosema and A. hirsutus) based on biological, toxicological properties and chemical profiling*. Food and Chemical Toxicology, 2021. **154**: p. 112330.
236. Jahangir, M., et al., *Antimicrobial and Antioxidant Potential of Astragalus psilocentros*. Asian Journal of Chemistry, 2013. **25**(1).
237. Marfak, A., *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides*. Mémoire, Université de Limoges, Limoges, 2003.
238. Zheng, W. and S.Y. Wang, *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 2001. **49**(11): p. 5165-5170.
239. Wang, M., et al., *Antioxidative phenolic compounds from sage (Salvia officinalis)*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 1998. **46**(12): p. 4869-4873.
240. Wang, T.-y., Q. Li, and K.-s. Bi, *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*. Asian journal of pharmaceutical sciences, 2018. **13**(1): p. 12-23.

241. Dawidowicz, A.L. and M. Olszowy, *The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay*. European Food Research and Technology, 2013. **236**: p. 1099-1105.
242. Cesari, L., F. Mutelet, and L. Canabady-Rochelle, *Antioxidant properties of phenolic surrogates of lignin depolymerisation*. Industrial Crops and Products, 2019. **129**: p. 480-487.
243. Lim, D.-H., et al., *Effect of Astragalus sinicus L. seed extract on antioxidant activity*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2011. **17**(3): p. 510-516.
244. Spiegel, M., T. Andruniów, and Z. Sroka, *Flavones' and flavonols' antiradical structure–activity relationship—A quantum chemical study*. Antioxidants, 2020. **9**(6): p. 461.
245. Lu, Y. and L.Y. Foo, *Antioxidant activities of polyphenols from sage (Salvia officinalis)*. Food Chemistry, 2001. **75**(2): p. 197-202.
246. Simić, A., et al., *Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics*. Molecules, 2007. **12**(10): p. 2327-2340.
247. Lafka, T.-I., V. Sinanoglou, and E.S. Lazos, *On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes*. Food Chemistry, 2007. **104**(3): p. 1206-1214.
248. Furuno, K., T. Akasako, and N. Sugihara, *The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(1): p. 19-23.
249. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
250. Pietta, P.-G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
251. Rice-Evans, C., *Flavonoid antioxidants*. Current medicinal chemistry, 2001. **8**(7): p. 797-807.
252. Chaudhury, A., et al., *Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management*. Frontiers in endocrinology, 2017. **8**: p. 6.
253. Etxeberria, U., et al., *Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase*. Expert opinion on therapeutic targets, 2012. **16**(3): p. 269-297.

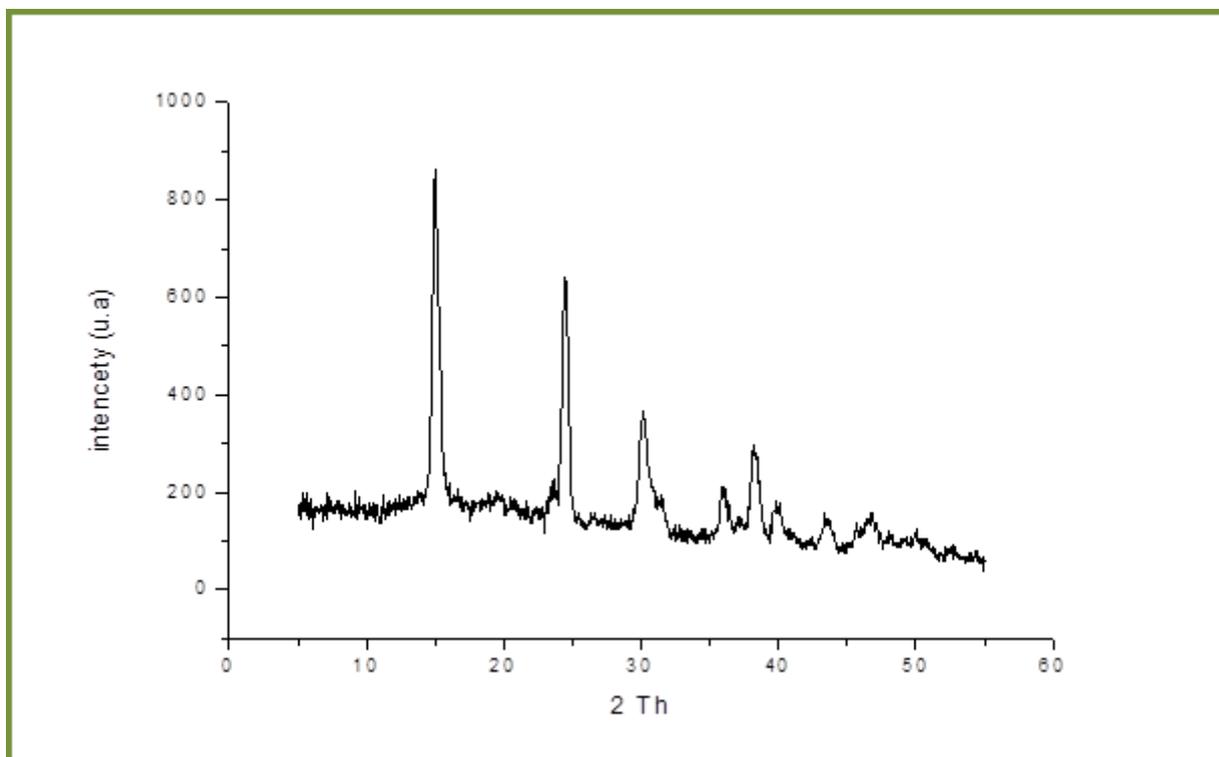
254. Park, J.H., Y. Yin, and M.-H. Wang, *Antioxidant and anti-diabetes activities of methanolic extract and fractions of Astragalus membranaceus roots*. Journal of Food Science and Nutrition, 2010. **15**(1): p. 30-35.
255. Liao, L., et al., *Screening and binding analysis of flavonoids with alpha-amylase inhibitory activity from lotus leaf*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2018. **29**: p. 587-593.
256. Zheng, Y., et al., *Inhibition mechanism of ferulic acid against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase*. Food Chemistry, 2020. **317**: p. 126346.
257. Wang, H., Y.-J. Du, and H.-C. Song,  *$\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of guava leaves*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 6-13.
258. Kamalakkannan, N. and P.S.M. Prince, *Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues*. Molecular and cellular biochemistry, 2006. **293**: p. 211-219.
259. Li, K., et al., *Inhibitory effects against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase of the flavonoids-rich extract from Scutellaria baicalensis shoots and interpretation of structure–activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method*. Chemistry Central Journal, 2018. **12**(1): p. 1-11.
260. Ali, H., P. Houghton, and A. Soumyanath,  *$\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus*. Journal of ethnopharmacology, 2006. **107**(3): p. 449-455.
261. Złotek, U., et al., *The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (Ocimum basilicum L.) extracts*. Saudi journal of biological sciences, 2016. **23**(5): p. 628-633.
262. Bensatal, A. and M. Ouahrani, *Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of Tamarix gallica L*. Urological research, 2008. **36**(6): p. 283-287.
263. Daudon, M., et al., *Composition des calculs observés aujourd’hui dans les pays non industrialisés*. Prog Urol, 2004. **14**(6): p. 1151-61.
264. Daudon, M., *Cristallurie*. Néphrologie & Thérapeutique, 2015. **11**(3): p. 174-190.
265. Atmani, F., *Medical management of urolithiasis, what opportunity for phytotherapy?* Frontiers in Bioscience-Landmark, 2003. **8**(6): p. 507-514.
266. Abdelmalek, F., et al., *Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalocalcique en présence de quelques inhibiteurs*. Phys Chem, 2001. **4**: p. 96-107.

267. Antinozzi, P.A., C.M. Brown, and D.L. Purich, *Calcium oxalate monohydrate crystallization: citrate inhibition of nucleation and growth steps*. Journal of crystal growth, 1992. **125**(1-2): p. 215-222.
268. Sekkoum, K., et al., *Inhibition effect of some Algerian Sahara medicinal plants on calcium oxalate crystallization*. Asian Journal of Chemistry, 2010. **22**(4): p. 2891.
269. Sasidharan, H., et al., *In-vitro evaluation of Scoparia dulcis Linn. for anti-urolithiatic activity*. The Journal of Phytopharmacology, 2018. **7**(3): p. 284-286.
270. Sasikala, V., S.R. Radha, and B. Vijayakumari, *In vitro evaluation of Rotula aquatica Lour. for antiurolithiatic activity*. Journal of Pharmacy Research, 2013. **6**(3): p. 378-382.
271. Kavanagh, J., L. Jones, and P. Rao, *Calcium oxalate crystallization kinetics studied by oxalate-induced turbidity in fresh human urine and artificial urine*. Clinical Science, 2000. **98**(2): p. 151-158.
272. Saha, S. and R.J. Verma, *Inhibition of calcium oxalate crystallisation in vitro by an extract of Bergenia ciliata*. Arab journal of urology, 2013. **11**(2): p. 187-192.
273. Grases, F., et al., *Effect of Herniaria hirsuta and Agropyron repens on calcium oxalate urolithiasis risk in rats*. Journal of ethnopharmacology, 1995. **45**(3): p. 211-214.
274. Pareta, S.K., K.C. Patra, and H. Ranjit, *In-vitro calcium oxalate crystallization inhibition by Achyranthes indica Linn. hydroalcoholic extract: an approach to antilithiasis*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2011. **2**(1).
275. Khouchlaa, A., et al., *Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de Zizyphus lotus L. d'origine marocaine*. Phytothérapie, 2018. **16**(1): p. 14-19.
276. Hannache, B., et al., *Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro: étude à l'échelle mésoscopique*. Progrès en urologie, 2012. **22**(10): p. 577-582.

# *ANNEX*



**Spectre de diffraction des rayons X du calcul 1 (C1)**



**Spectre de diffraction des rayons X du calcul 2 (C2)**

