



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De l'enseignement Supérieur Et De La Recherche
Scientifique



Université Abbes Laghrou Khenchela

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département : De Biologie Cellulaire Et Moléculaire

Mémoire

Présenté Pour L'obtention Du Diplôme De :

Master Académique

Filière : Science Biologique

Option : Génétique

Thème :

**Évaluation in vivo de l'activité cytotoxique d'un extrait de plante
médicinale sur deux espèces de crustacés génétiquement distinctes et étude in
silico de l'activité anti-inflammatoire.**

Présenté par:

-Ounissi manar

Encadré par :

Dr. LEKMINE Sabrina

	Nom et prénom	Grade
Président	Dr KADI Kenza	Prof
Promotrice	Dr LEKMINE Sabrina	MCB
Examineur	Pr Yahia Massinissa	MCA

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements

Je suis reconnaissant envers Dieu Tout-Puissant pour m'avoir accordé la santé et la détermination nécessaires pour entreprendre et achever ce mémoire.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers Dr Lekmine Sabrina pour sa patience, sa précision, son assistance pratique, son soutien moral et ses encouragements précieux tout au long de ce processus.

Je tiens également à remercier chaleureusement l'ensemble de nos professeurs pour leur générosité et les connaissances qu'ils ont partagées avec nous tout au long de ces années d'études.

Dédicace

Mon cheminement universitaire a pris fin après les défis et les moments éprouvants, et je conclus ici mes recherches de fin d'études avec tout le zèle et l'énergie que je n'aurais pu avoir sans la grâce de Dieu qui m'a accompagnée du début à la fin.

Je dédie cet humble effort

À celui qui a donné tout ce qu'il avait jusqu'à ce que je devienne une plante debout sur sa tige, la graine dont les cultivateurs admirent les récoltes, le secret de ma réussite et la lumière guidant le chemin de mon père.

À la source de l'amour, de la tendresse, de la fidélité et de la chose la plus précieuse que j'aie,

Ma chère mère

À ceux qui ont été mon soutien dans la vie, mes frères

À ma chère tante Sabouha

À celui qui m'a encouragée et a marché à mes côtés,

Mon mari

À toute ma famille et à mes professeurs

Résumé

Ce travail a pour objectif l'étude quantitative d'une plante saharienne, *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis*, appartenant à la famille des Fabaceae, et l'évaluation de ses effets cytotoxiques sur deux types de crustacés : *Artemia salina* et *Daphnia magna*

Le protocole d'extraction débute par la récolte des parties aériennes de la plante, suivie de la macération dans un mélange éthanol-eau. Après filtration, l'extrait est concentré pour obtenir un résidu enrichi en composés bioactifs. Les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont dosés par des méthodes spectrophotométriques. La cytotoxicité est évaluée contre *Artemia salina*, qui vit dans des eaux salines, et *Daphnia magna*, dans des eaux douces.

Le rendement de l'extraction s'élève à 22.5%, indiquant un potentiel élevé en composés bioactifs. Les analyses révèlent une concentration notable en composés phénoliques, incluant les flavonoïdes et les tanins. Les tests de cytotoxicité montrent une activité significative avec une IC_{50} de 28.84 $\mu\text{g/ml}$ contre *Artemia salina* et de 5 $\mu\text{g/ml}$ contre *Daphnia magna*, suggérant un potentiel d'application dans le traitement du cancer. Les résultats hypothétiques de docking indiquent que l'Hesperetin a une forte affinité pour la protéine TNF- α , avec un score de liaison de -9.8 kcal/mol.

La discussion met en lumière l'importance des composés phénoliques dans l'activité cytotoxique des extraits et explique les différences de sensibilité entre les deux espèces de crustacés testées. En conclusion, l'étude souligne le potentiel thérapeutique des extraits d'*A. arpilobus* et ouvre la voie à de futures recherches sur leurs applications médicinales. Cette plante, grâce à ses propriétés bioactives, pourrait devenir une source précieuse de molécules thérapeutiques.

Mots clés : *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis*, Composés Phénoliques, Cytotoxicité, *Artemia salina*, *Daphnia magna*.

Abstract

This work investigates the quantitative study of *Astragalus arpilobus* subsp. *Hauarensis* plant, belonging to the *Fabaceae* family, and the evaluation of its cytotoxic effects on two types of crustaceans: *Artemia salina* and *Daphnia magna*.

The extraction protocol begins with the collection of the aerial parts of the plant, followed by maceration in an ethanol-water mixture. After filtration, the extract is concentrated to obtain a residue enriched in bioactive compounds. Phenolic compounds, flavonoids, and tannins are quantified using spectrophotometric methods. Cytotoxicity is evaluated against *Artemia salina*, which lives in saline waters, and *Daphnia magna*, in freshwater.

The extraction yield is 22.5%, indicating a high potential for bioactive compounds. Analyses reveal a notable concentration of phenolic compounds, including flavonoids and tannins. Cytotoxicity tests show significant activity with an IC₅₀ of 28.84 µg/ml against *Artemia salina* and 5 µg/ml against *Daphnia magna*, suggesting potential applications in cancer treatment. The hypothetical docking results indicate that Hesperetin has a strong affinity for the TNF-α protein, with a binding score of -9.8 kcal/mol.

The discussion highlights the importance of phenolic compounds in the cytotoxic activity of the extracts and explains the differences in sensitivity between the two tested crustacean species. In conclusion, the study underscores the therapeutic potential of *A. arpilobus* extracts and paves the way for future research on their medicinal applications. This plant, due to its bioactive properties, could become a valuable source of therapeutic molecules.

Keywords: *Astragalus arpilobus* subsp. *Hauarensis*, Phenolic Compounds, Polyphenols, Cytotoxicity, *Artemia Salina*, *Daphnia Magna*.

ملخص

هذا العمل مخصص للدراسة الكمية لنبات صحراوي، *Astragalus arpilobus subsp. hauarensis*، الذي ينتمي إلى عائلة الفاباسيا (Fabaceae)، وتقييم تأثيراته السامة على نوعين من القشريات *Artemia salina* و *Daphnia magna*.

يبدأ بروتوكول الاستخلاص بجمع الأجزاء الهوائية من النبات، يتبعها النقع في خليط من الإيثانول والماء. بعد الترشيح، يتم تركيز المستخلص للحصول على بقايا غنية بالمركبات النشطة بيولوجيًا. يتم قياس المركبات الفينولية، والفلافونويدات، والتانينات باستخدام طرق قياس الطيف الضوئي. يتم تقييم السمية الخلوية ضد *Artemia salina*، التي تعيش في المياه المالحة، و *Daphnia magna*، التي تعيش في المياه العذبة.

بلغت نسبة الاستخلاص 22.5٪، مما يشير إلى إمكانات عالية للمركبات النشطة بيولوجيًا. تكشف التحليلات عن تركيز ملحوظ من المركبات الفينولية، بما في ذلك الفلافونويدات والتانينات. تظهر اختبارات السمية الخلوية نشاطًا كبيرًا مع IC50 يبلغ 28.84 ميكروغرام/مل ضد *Artemia salina* و 5 ميكروغرام/مل ضد *Daphnia magna*، مما يشير إلى إمكانات التطبيق في علاج السرطان. تشير النتائج الافتراضية للتراكب الجزيئي إلى أن الهيسبيريتين لديه تقارب قوي لبروتين TNF- α ، مع درجة ارتباط تبلغ -9.8 كيلو كالوري/مول.

تسلط المناقشة الضوء على أهمية المركبات الفينولية في نشاط السمية الخلوية للمستخلصات وتشرح الفروق في الحساسية بين نوعي القشريات المختبرين. في الختام، تؤكد الدراسة على الإمكانيات العلاجية لمستخلصات *A. arpilobus* وتفتح الطريق لمزيد من الأبحاث حول تطبيقاتها الطبية. هذا النبات، بفضل خصائصه النشطة بيولوجيًا، يمكن أن يصبح مصدرًا قيمًا للجزيئات العلاجية.

الكلمات المفتاحية: *Astragalus arpilobus subsp. hauarensis*، المركبات الفينولية، متعددات الفينول، السمية الخلوية، *Artemia salina*، *Daphnia magna*.

Liste des abréviations

ADN. : Acide du noyau des cellules vivantes

ARN. :Acide Ribonucléique

MTT : test Multi Tables Tournements

LDH :Test Lactate déshydrogénase

LC50 :désigne les concentrations du produit chimique dans l'air qui causent la mort de 50 % des animaux de laboratoire au cours de la période d'observation

A1 : antennes1

A2 : antennes 2

R% : rendement exprimé en%

M :. masse en gramme de l'extrait sec obtenu 4g

MO :masse en gramme de la poudre végétale utilisée

gMS :gramme de matière sèche

mgGAE : milligrammes d' équivalents acide gallique

ALCL3 :chlorure d'aluminium

mgQE : milligrammes d'équivalents quercétine par gramme de matière sèche

HCL. : Hydrochlorique acide

mgEC : exprimés en équivalents

PH potentiel hydrogène

NaOH : Sodium hydroxide

CI50. :concentration d'inhibition de 50%

CTP :contenu total en phénoliques

CTF : contenu total en falvonoïdes

CTT :contenu total en tanins

DMSO. Diméthylsulfoxyde

DC50. : the half-maximal degradation concentration That makes a protéine for 50%
dégradation

Liste des tableaux

Tableau 1: classification d' <i>A. arpilobus</i> (Dobignard and Chatelain, 2010).	23
Tableau 2: Contenu total en phénoliques, flavonoïdes et tanins d' <i>A. arpilobus</i>	38
Tableau 3: Le taux de mortalité de <i>l'Artémia salina</i> à différentes concentrations d'extrait éthanolique d' <i>A. arpilobus</i> et du K ₂ Cr ₂ O ₇ utilisé comme référence.	39
Tableau 4: Le taux de mortalité de <i>Daphnia magna</i> à différentes concentrations d'extrait éthanolique d' <i>A. arpilobus</i> et du K ₂ Cr ₂ O ₇ utilisé comme référence.	40

Liste des figures

Figure 1:Classification des composes phénoliques	7
Figure 2: Aspectdel' <i>Artémia salina</i>	13
Figure 3: Daphnia magna (Massarin, 2010)	17
Figure 4: La répartition mondiale de genre <i>Astragalus</i> (Coulot et al., 2021)	21
Figure 5: Photo de l' <i>Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis</i>	22
Figure 6: Protocole de préparation d'extrait hydro-éthanolique de la partie aérienne d' <i>A. arpilobus</i>	27
Figure 7 : la méthode utilisée pour quantifier les polyphénols dans l'extrait	29
Figure 8 : le protocole de évaluation la concentration en flavonoïdes	31
Figure 9 : observation d'artémia sur le microscope X40	33
Figure 10 : observation du daphnia sur le microscope X40	35

Sommaire

remerciements	2
Dedicaces	3
Resume	4
Abstract	5
ملخص	6
Liste Des Abreviations	7
Liste Des Tableaux	8
Liste Des Figures	9
Sommaire	10
Introduction	1
Partie 1 : Etude Bibliographique	3
Chapitre 1 : Les Metabolites Primaires Et Secondaire	4
1. Les Métabolites Primaires	5
2. Les Métabolites Secondaires	5
2.1. Classification Des Métabolites Secondaires	5
3. Les Composés Phénoliques	6
3.1. Classification Des Composer Phénoliques	6
Chapitre 2 : La Cytotoxicite	8
1. La Cytotoxicité	9
2. Importance De L'étude De La Cytotoxicité	9
3. Méthodes <i>In Vitro</i> D'évaluation De La Cytotoxicité	9
4. Méthodes <i>In Vivo</i> D'évaluation De La Cytotoxicité	10
5. Évaluation De La Cytotoxicité Par La Méthode Des Nauplies D' <i>artemia Salina</i> 11	
5.1. Principe Du Test De La Cytotoxicité Contre L' <i>artémia</i>	11
5.2. Objectifs Du Test	11
5.3. Avantages Et Limitations	12
5.3.1. Avantages :	12
5.3.2. Limitations :	12
5.4. <i>Artémia</i>	12
5.4.1. Classification	13
5.4.2. Morphologie	14
6. Évaluation De La Cytotoxicité Par La Méthode Des <i>Daphnia Megna</i>	14

6.1.	Principe Du Test De Cytotoxicité Avec <i>Daphnia Megna</i>	14
6.2.	Objectifs Du Test	14
6.3.	Avantages Et Limitations	15
6.3.1.	Avantages :	15
6.3.2.	Limitations :	15
6.4.	Daphniamegna	15
6.4.1.	Classification	16
6.4.2.	Morphologie De Daphnia	16
Chapitre 3 : Presentation De La Plante Etudiee		18
1.	Famille Fabaceae	19
2.	Le Genre <i>Astragalus</i>	19
2.1.	La Répartition Mondiale Du Genre <i>Astragalus</i>	20
2.2.	Caractéristiques Morphologiques Du Genre <i>Astragalus</i>	21
3.	<i>Astragalus Arpilobus</i> Subsp. <i>Hauarensis</i>	22
3.1.	Présentation De La Plante <i>Astragalus Arpilobus</i> Subsp. <i>Hauarensis</i>	22
3.2.	Classification Botanique	22
4.	Description Botanique	23
Partie 2 : Etude Experimentale		24
Chapitre 1 : Materiels Et Methodes		25
1.	Matériel Végétal Et Extraction	26
2.	Rendement De L'extraction	28
3.	Teneur En Composés Bioactifs	28
3.1.	Dosage Des Composés Phénoliques Totaux	28
3.1.1.	Mode Opérateur	28
3.2.	Dosage Des Flavonoïdes Totaux	30
3.2.1.	Mode Opérateur	30
3.3.	Dosage Des Tanins Totaux	32
3.3.1.	Mode Opérateur	32
4.	Test De Cytotoxicité	32
4.1.	Test De Cytotoxicité Contre <i>L'artémia Salina</i>	32
4.1.1.	Modeopérateur	32
4.2.	Test De Cytotoxicité Contre <i>Daphnia Magna</i>	33
4.2.1.	Mode Opérateur	33
5.	Etude in silico de lactovite antiinflammatoire	

Chapitre 2 : Resultats Et Discussion	37
1. Rendement De L'extraction	38
2. Dosage Des Composés Phénoliques	38
3. La Cytotoxicité Contre Artemia Salinaet Daphnia Magna	39
4. Etude in silico de l'activité anti-inflammatoire	
4. Discussion Générale	41
5. La Corrélation Entre La Cytotoxicité Et Les Composés Phénoliques	42
Conclusion	44
References	45

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont considérées comme la source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Vaou et al., 2022) . Elles restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, car elles contiennent des métabolites secondaires synthétisés en réponse aux stress biotiques et abiotiques, qui possèdent diverses propriétés biologiques telles que l'antimicrobienne, antioxydante, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérogène, anti-parasitaire et insecticide(Shoaib et al., 2023)

Une des particularités majeures des plantes médicinales réside dans leur capacité à produire une grande diversité de substances naturelles. En plus des métabolites primaires classiques (glucides, protéines, lipides, acides nucléiques) (Peters et al., 2019) , elles accumulent fréquemment des métabolites secondaires. Bien que la fonction physiologique de ces derniers ne soit pas toujours évidente, ils constituent une source importante de molécules bioactives, utilisables par l'homme dans des domaines variés tels que la pharmacologie et l'agroalimentaire(Peters et al., 2019).

La matière végétale renferme une vaste gamme de molécules présentant des intérêts diversifiés, exploités dans plusieurs secteurs industriels, notamment l'alimentation, la cosmétologie et la dermatopharmacie. Parmi ces composés, on trouve les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les lignines, les terpènes et les flavonoïdes(Eldahshan et al., 2009) . Ces substances sont reconnues pour leurs potentiels biologiques variés, incluant des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antimicrobiennes et antioxydantes. Ces propriétés bioactives font des plantes une source précieuse pour le développement de nouveaux produits et traitements dans ces domaines(Bagdass et al., 2020).

Grâce à son climat diversifié, l'Algérie possède une flore riche en plantes médicinales et aromatiques, largement utilisées dans la médecine traditionnelle. Les connaissances sur l'utilisation de ces plantes sont transmises de génération en génération. Actuellement, la valorisation des plantes médicinales constitue un enjeu majeur en Algérie. Une des approches pour valoriser cette richesse naturelle consiste à extraire et à appliquer les substances actives présentes dans ces plantes(Lekmine et al., 2022).

Parmi les nombreuses plantes à vertus thérapeutiques, et dans le but de mieux faire connaître le patrimoine naturel en plantes médicinales en Algérie, nous avons choisi

Introduction

d'étudier *Astragalus arpilobus subsp. hauarensis*, une plante de la famille des Fabaceae. Cette plante herbacée vivace est originaire des régions montagneuses d'Asie centrale, notamment d'Iran, d'Afghanistan et du Turkménistan (Maassoumi, 2022). Elle se distingue par ses feuilles composées pennées et ses fleurs papilionacées variant du jaune au pourpre. *A. arpilobus* joue un rôle crucial dans les écosystèmes semi-arides et montagneux où elle se développe (Mahmoudi et al., 2021). Outre son rôle écologique en tant que fixateur d'azote et source de nourriture pour divers herbivores, cette plante est également étudiée pour ses propriétés médicinales potentielles. Dans la médecine traditionnelle, certaines cultures utilisent différentes parties de la plante pour traiter des affections telles que les troubles gastro-intestinaux, les infections respiratoires et les problèmes immunitaires (Mahmoudi et al., 2021)

Notre problématique met en lumière que, malgré le potentiel thérapeutique intéressant de ces plantes médicinales, il est crucial de reconnaître qu'elles peuvent également être toxiques pour la santé humaine, même à des concentrations relativement faibles. Par conséquent, notre étude comprend une évaluation de la toxicité de l'extrait d'*A. arpilobus* sur *Artemia salina* et *Daphnia magna*, deux espèces de crustacés génétiquement distinctes. De plus, la toxicité observée sur des cellules telles que *Artemia salina* et *Daphnia magna* peut servir d'indicateur pour évaluer l'effet antiprolifératif et anticancéreux de ces plantes.

Partie 1 : étude bibliographique

Chapitre 1 : Les métabolites primaires et secondaire

Chapitre 1 : Les métabolites primaires et secondaire

1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des molécules produites par un organisme, essentielles à ses fonctions vitales de base, incluant la nutrition, la croissance et la reproduction (Kliebenstein, 2012) . Les métabolites primaires sont cruciaux pour le maintien des processus métaboliques fondamentaux de l'organisme.

Ces métabolites essentiels, composés principalement d'atomes de carbone, d'oxygène et d'azote, se regroupent en quatre grandes catégories biochimiques : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques. Les glucides, comme le glucose et l'amidon, sont des molécules organiques constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, fournissant l'énergie indispensable aux processus vitaux de l'organisme (Ummahan, 2024) . Les lipides, incluant les graisses et les huiles, sont des composants structuraux des membranes cellulaires et servent de réserves énergétiques. Les acides aminés, les blocs de construction des protéines, sont essentiels pour la croissance et la réparation des tissus. Enfin, les acides nucléiques, comme l'ADN et l'ARN, contiennent les informations génétiques nécessaires à la reproduction et à la régulation des activités cellulaires.

2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules synthétisées par les organismes qui ne sont pas essentielles à leurs fonctions vitales de base, mais qui jouent souvent un rôle crucial dans leur adaptation et survie dans l'environnement. Ces composés incluent des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpènes, et des polyphénols. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires sont souvent impliqués dans des interactions écologiques, comme la défense contre les prédateurs, la protection contre les stress abiotiques, ou la communication avec d'autres organismes. Par exemple, les polyphénols sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, ce qui en fait des candidats potentiels pour le développement de médicaments.

2.1. Classification des métabolites secondaires

La classification des métabolites secondaires repose sur plusieurs caractéristiques chimiques, incluant leur structure moléculaire, leur composition, leur solubilité dans divers solvants, ainsi que leur voie de biosynthèse.

Chapitre 1 : Les métabolites primaires et secondaire

Le système de classification principal regroupe ces molécules en trois grandes classes. Les alcaloïdes sont des composés organiques contenant un groupement azote, souvent présents dans les plantes, et peuvent être subdivisés en plusieurs sous-groupes comme les alcaloïdes aminés, les alcaloïdes lactones et les alcaloïdes terpéniques. Les terpènes sont des composés organiques renfermant un groupement carbonyle, également fréquents dans le règne végétal, et peuvent être classés en monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes entre autres. Enfin, les composés phénoliques sont des molécules contenant un groupement phénolique, souvent observées chez les plantes, Les composés phénoliques sont considérés comme les métabolites secondaires les plus importants dans les plantes, surpassant d'autres classes de métabolites secondaires en raison de leur diversité structurale et de leurs fonctions multiples. Ces composés, qui comprennent les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques et les lignines, jouent un rôle crucial dans la défense des plantes contre les stress abiotiques et biotiques(Peters et al., 2019).

3. *Les composés phénoliques*

Les composés phénoliques constituent une vaste classe de métabolites secondaires présents dans les plantes. Ils remplissent des fonctions essentielles telles que la défense contre les agents pathogènes, la protection contre les rayonnements ultraviolets (UV) et la prévention des dommages oxydatifs grâce à leurs puissantes propriétés antioxydantes (Kyselova, 2011).

3.1. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés en différentes catégories en fonction de leur structure chimique et de la complexité de leurs molécules(Nouioura et al., 2024)(Figure 1). On distingue :

- ❖ **Acides phénoliques** : Ils comprennent les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Exemples :acidegallique, acidecaféique.
- ❖ **Flavonoïdes** : Une grande famille de composés polyphénoliques avec des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Exemples :quercétine, kaempférol.
- ❖ **Stilbènes** : Composés caractérisés par une structure de 1,2-diphényléthylène. Exemples :resvératrol.

Chapitre 1 : Les métabolites primaires et secondaire

- ❖ **Lignanes et lignines** : Polymères phénoliques trouvés principalement dans les parois cellulaires des plantes. Exemples : secoisolariciresinol, lignine.
- ❖ **Tanins** : Composés phénoliques à haute masse moléculaire, divisés en tanins hydrolysables et condensés. Exemples : acide tannique, proanthocyanidines.

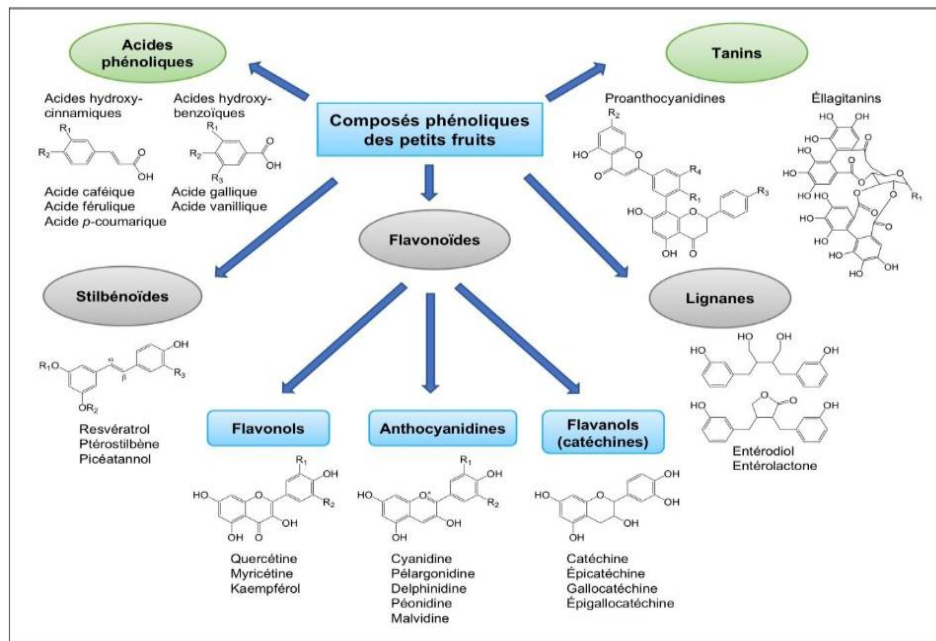


Figure 1: Classification des composés phénoliques

La diversité structurale des composés phénoliques leur permet d'assumer diverses fonctions écologiques et biologiques, comme la protection contre les herbivores et les pathogènes, la régulation de la croissance et du développement des plantes, ainsi que la participation aux interactions plantes-environnement.

Chapitre 2 : La cytotoxicité

Chapitre 2 : La cytotoxicité

1.1. La cytotoxicité

L'activité cytotoxique se réfère à la capacité d'une substance à induire des dommages cellulaires ou à provoquer la mort des cellules. Cette propriété est d'une importance capitale dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale et pharmaceutique, notamment pour le développement de traitements anticancéreux, de pesticides biologiques et de nouvelles thérapies antiparasitaires. Les substances cytotoxiques peuvent être d'origine naturelle, dérivées de plantes, ou synthétiques, produites en laboratoire (Ungureanu et al., 2023).

1.2. Importance de l'Étude de la Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité est essentielle pour déterminer la sécurité et l'efficacité des nouveaux composés. Dans le domaine médical, elle permet d'identifier les agents potentiels pour le traitement des cancers en ciblant les cellules tumorales sans affecter les cellules normales (Graziani et al., 2019). Dans l'agriculture, la cytotoxicité des extraits de plantes est explorée pour développer des pesticides biologiques qui sont moins nocifs pour l'environnement comparés aux produits chimiques traditionnels. De plus, la cytotoxicité est cruciale dans le développement de traitements antiparasitaires efficaces, en ciblant spécifiquement les parasites sans nuire à l'hôte (Ji et al., 2023).

1.3. Méthodes In Vitro d'Évaluation de la Cytotoxicité

Les méthodes in vitro sont des techniques réalisées en dehors d'un organisme vivant, utilisant des cellules cultivées dans des conditions contrôlées. Voici quelques exemples courants :

- a- Test MTT :** Le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) est une méthode colorimétrique qui mesure l'activité métabolique des cellules. Les cellules vivantes réduisent le MTT en formazan violet, un processus quantifiable par spectrophotométrie. Ce test est utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire après l'exposition à une substance cytotoxique (Karatop et al., 2022).
- b- Essai de Libération de Lactate Déshydrogénase (LDH) :** La libération de LDH dans le milieu de culture est un indicateur de dommages membranaires cellulaires. Une augmentation de l'activité LDH dans le milieu indique une cytotoxicité élevée,

Chapitre 2 : La cytotoxicité

car le LDH est libéré lorsque la membrane cellulaire est compromise(Rochard et al., 2024).

- c- **Test de la Neutralisation Rouge Alizarine** : Ce test utilise le colorant rouge neutre, qui est absorbé par les cellules vivantes et se localise dans les lysosomes (Ahangari et al., 2016). La perte de capacité des cellules à absorber le rouge neutre indique une diminution de la viabilité cellulaire.

1.4. Méthodes *In Vivo* d'Évaluation de la Cytotoxicité

Les méthodes *in vivo* impliquent l'utilisation d'organismes vivants pour évaluer l'effet des substances. Ces méthodes sont essentielles pour comprendre les effets systémiques et la toxicité sur l'organisme entier. Quelques exemples incluent :

- a. **Modèles de Souris Xénogreffées** : Des cellules tumorales humaines sont implantées chez des souris immunodéficientes pour étudier l'efficacité et la toxicité des agents anticancéreux. Ces modèles permettent de surveiller la croissance tumorale et les effets secondaires des traitements(Sofia et al., 2024)
- b. **Test d'Artémia salina** : Comme mentionné précédemment, ce test utilise les nauplies d'Artémia pour évaluer la toxicité aiguë des extraits de plantes ou des composés synthétiques. La mortalité des artémias après exposition à différentes concentrations de la substance testée fournit une indication de la cytotoxicité(Kantureyeva et al., 2024).
- c. **Essais de Toxicité Aiguë et Subaiguë sur les Rongeurs** : Ces essais consistent à administrer la substance testée aux rongeurs (souris ou rats) sur des périodes courtes (aiguës) ou prolongées (subaiguës) et à observer les effets sur divers paramètres biologiques et comportementaux. Ces études sont cruciales pour déterminer les doses sûres et les effets toxiques potentiels avant les essais cliniques humains(Mikolo et al., 2020).

Chapitre 2 : La cytotoxicité

1.5. Évaluation de la cytotoxicité par la méthode des nauplies d'*Artemia salina*

L'utilisation du test de la cytotoxicité des extraits de plantes contre l'artémia (ou *Artemia salina*) est une méthode couramment employée pour évaluer les activités biologiques des composés naturels, y compris leur potentiel pesticide, anticancéreux, larvicide, antiparasitaire et cytotoxique (Spinelli et al., 2024).

1.6. Principe du Test de la Cytotoxicité contre l'Artémia

L'*artémia*, souvent appelée "crevette de mer", est un crustacé planctonique d'eau salée largement utilisé dans les tests de toxicité. Le test de cytotoxicité utilisant l'artémia repose sur l'exposition de ces organismes à différents extraits de plantes pour observer les effets létaux ou sublétaux. La survie ou la mortalité de l'artémia est ensuite mesurée pour évaluer la toxicité des extraits.

1.7. Objectifs du Test

- a. **Évaluer l'Activité Pesticide** : Les extraits de plantes sont testés pour leur capacité à tuer ou à inhiber la croissance des parasites ou des insectes nuisibles. Une haute mortalité de l'artémia peut indiquer un potentiel comme pesticide naturel.
- b. **Déterminer le Potentiel Anticancéreux** : Les composés cytotoxiques qui peuvent tuer l'artémia peuvent également avoir des effets similaires sur les cellules cancéreuses. Ce test préliminaire permet de sélectionner les extraits les plus prometteurs pour des études plus approfondies sur les cellules cancéreuses humaines (Krimat et al., 2019).
- c. **Tester l'Activité Larvicide** : Les larves de moustiques, par exemple, sont une cible pour le contrôle de maladies comme le paludisme. Des extraits de plantes toxiques pour les larves d'artémia peuvent également être efficaces contre les larves de moustiques (Bomfim et al., 2009).
- d. **Évaluer l'Activité Antiparasitaire** : Ce test permet de dépister des extraits de plantes capables de tuer ou d'inhiber la croissance de parasites, ce qui est crucial pour le développement de traitements antiparasitaires. (Jacquet and Boutibonnes, 1970)

Chapitre 2 : La cytotoxicité

- e. **Mesurer la Cytotoxicité Générale** : En général, le test aide à identifier la toxicité des extraits de plantes, qui est essentielle pour évaluer la sécurité et les doses non toxiques pour les futures applications thérapeutiques ou agricoles.

1.8. Avantages et Limitations

1.9. Avantages :

- **Rapide et Économique** : Le test est relativement simple, rapide et peu coûteux.
- **Bonne Corrélation** : Les résultats peuvent souvent être corrélés avec les effets sur d'autres organismes.
- **Criblage Préliminaire** : Efficace pour le criblage préliminaire d'un grand nombre d'échantillons.

1.10. Limitations :

- **Spécificité Limitée** : L'artémia peut ne pas toujours représenter avec précision la toxicité pour d'autres organismes, y compris les humains.
- **Ne Remplace pas les Tests Avancés** : Les résultats positifs nécessitent des tests supplémentaires sur des modèles plus complexes (cellules humaines, animaux de laboratoire, etc.) pour confirmer les effets observés.

1.11. Artémia Salina

L'artémie (*Artemia salina*) est une espèce de crustacé qui vit dans les lacs salés, les lagunes et les marais salants, notamment dans le Grand Lac Salé au nord de l'Utah, sur la côte rocheuse au sud de San Francisco, et en mer Caspienne.(HACHEM et al., 2011).

1.12. Classification

• Règne	Animal
• Embranchement	Custace
• Classe	Arthropode
• Sousclasse	Branchiopode
• Ordre	Anostrace
• Famille	Artemidae
• Genre	Artemia
• Espèce	<i>Artemiasalina</i>

Lorsque les conditions de vie du milieu ne sont plus favorables, l'artémie est capable de produire des oocystes, qui ont la faculté de pouvoir, après réhydratation, donner naissance à une larve appelée nauplius (nauplii au pluriel), et ce parfois même des années après. La résistance des oocystes aux changements de milieu, en état de cryptobiose, leur permet de survivre à des températures extrêmes (-190 °C), et un petit pourcentage, est capable de résister dans l'eau bouillante (105°C) pendant plus de deux heures (Lenz, 1984)

Mais la facilité de stockage des oocystes et les qualités nutritionnelles des nauplii en ont surtout fait une nourriture de choix pour la plupart des écloseries de poissons et de crustacés dans le monde. Les nauplii sont distribués aux larves dès l'éclosion ou après 24 à 48 h d'enrichissement en protéines et lipides (à ce stade ce sont des méta-nauplii). Les élevages aquacoles sont donc de gros consommateurs d'œufs d'*Artémia* (Lincoln et al., 1996)

On utilise aussi les *Artémia* en aquariophilie : ce sont alors souvent les individus adultes qui sont utilisés, frais ou congelés.



Figure 2: Aspect de l'*Artémia salina*

Chapitre 2 : La cytotoxicité

1.13. Morphologie

Artémiasalina mesure en moyenne 8 à 10 mm, mais peut atteindre 15 mm en fonction de son environnement. Son corps allongé est généralement divisé en 20 segments, et comporte 10 paires de *pattes*, appendices ressemblant à des feuilles et qui oscillent à un rythme régulier. Les adultes peuvent être de couleur pâle, blanc, rose, vert ou transparent, et vivent généralement quelques mois. L'*Artémiasalina* est de l'ordre *Anostraca*, qui signifie littéralement *sans coquille*. Son appartenance à la classe des branchiopodes indique que ses branchies sont situées sur le côté des pattes (Lincoln et al., 1996)

1.14. Évaluation de la cytotoxicité par la méthode des *Daphnia Megna*

L'évaluation de la cytotoxicité par la méthode des *Daphnia Megna* est une technique largement utilisée pour tester la toxicité des substances chimiques, des extraits de plantes et des composés synthétiques. *Daphnia Megna* communément appelée "puce d'eau", est un petit crustacé d'eau douce qui sert de modèle biologique dans les tests écotoxicologiques en raison de sa sensibilité aux contaminants environnementaux.

1.15. Principe du Test de Cytotoxicité avec *Daphnia Megna*

Le principe de base de ce test consiste à exposer les *Daphnia Megna* à différentes concentrations de la substance testée et à observer les effets sur leur survie et leur comportement. La mesure principale est généralement la mortalité, bien que d'autres effets sublétaux, comme les anomalies de comportement ou de reproduction, puissent également être évalués.

1.16. Objectifs du Test

- a. **Évaluation de la Toxicité Aiguë** : Le test permet de déterminer les concentrations létales médianes (LC50) des substances, c'est-à-dire la concentration qui cause la mort de 50% des *Daphnia magna* après une période d'exposition définie (généralement 24 à 48 heures).
- b. **Détection de la Toxicité Chronique** : En plus de la toxicité aiguë, le test peut être utilisé pour évaluer les effets à long terme des substances sur la reproduction, la croissance et d'autres paramètres physiologiques des *Daphnia magna*.

Chapitre 2 : La cytotoxicité

- c. **Criblage de Composés Bioactifs** : Le test est utilisé pour identifier les composés naturels ou synthétiques ayant des effets cytotoxiques potentiels, ce qui est pertinent pour le développement de nouveaux médicaments, pesticides et autres produits chimiques.
- d. **Évaluation de la Sécurité Environnementale** : En tant qu'indicateur écologique, *Daphnia magna* aide à évaluer l'impact potentiel des contaminants sur les écosystèmes aquatiques, contribuant ainsi à la gestion des risques environnementaux.

1.17. *Avantages et Limitations*

1.18. *Avantages :*

- **Rapidité et Simplicité** : Le test est relativement simple à mettre en œuvre et peut fournir des résultats en peu de temps.
- **Sensibilité** : *Daphnia magna* est très sensible à une large gamme de contaminants, ce qui permet de détecter des niveaux faibles de toxicité.
- **Reproductibilité** : Les conditions standardisées du test permettent une bonne reproductibilité des résultats.

1.19. *Limitations :*

- **Spécificité Limitée** : Comme pour l'artémia, les résultats obtenus avec *Daphnia magna* peuvent ne pas toujours être directement applicables à d'autres espèces, y compris les humains.
- **Nécessité de Tests Complémentaires** : Les résultats positifs nécessitent des tests supplémentaires sur des modèles plus complexes (cellules humaines, animaux de laboratoire) pour confirmer les effets observés et évaluer la pertinence clinique ou écologique des substances testées.

1.20. *Daphniamegna*

Daphnia magna, également appelée "puce d'eau", est un microcrustacé appartenant à l'ordre des cladocères, communément trouvé dans les eaux douces des régions tempérées.

Chapitre 2 : La cytotoxicité

Cet organisme, largement répandu dans l'hémisphère Nord, colonise divers types d'habitats d'eau douce tels que les mares (temporaires ou permanentes), les étangs, les lacs, les canaux, les cours d'eau à faible débit et les bassins riches en matière organique et peu oxygénés (Montassir et al., 2017) En tant qu'herbivore ou décomposeur, *Daphnia magna* joue un rôle crucial dans le transfert de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques. Il constitue une source alimentaire importante pour les poissons planctonophages ou omnivores, ainsi que pour les alevins et autres invertébrés aquatiques (Figure 1). Dans la nature, les individus mesurent généralement entre 1 et 2 mm, mais peuvent atteindre jusqu'à 5 mm, avec un poids sec variant de 50 à 400 µg (Yu, 2023)

1.21. *Classification*

- Règne : Animalia
- Ebranchement : Arthropoda
- Classe : Crustacea
- Ordre : Cladocera
- Famille : Daphniidae
- Genre : *Daphnia*
- Espèce : magna

1.22. *Morphologie de Daphnia*

La morphologie des daphnies fluctue périodiquement au cours des cycles saisonniers, influençant particulièrement la forme de la tête et de la carapace, la taille de l'œil composé et la longueur de l'épine caudale. Ce processus, nommé cyclomorphose (Hazelwood, 1966) est modulé par diverses conditions environnementales telles que la température, la turbidité, la lumière, et les kairomones solubles émises par certains prédateurs (Tollrian, 1994). La cyclomorphose permet aux daphnies de se protéger contre les prédateurs en développant des structures morphologiques spécifiques qui compliquent leur capture. Les daphnies adultes mesurent entre 3 et 5 mm et sont constituées de deux parties principales : la tête et le corps.

La tête comporte un œil composé, une bouche, deux antennes (A2) facilitant leur locomotion saccadée, et deux antennules (A1) servant de crochets lors de l'accouplement chez les mâles. Les embryons possèdent deux ébauches d'yeux qui fusionnent à la fin de

Chapitre 2 : La cytotoxicité

leur développement pour former un œil unique et mobile, essentiel à l'orientation. Le système nerveux comprend un ganglion cérébral situé entre l'œil et le début du tube digestif (Hazelwood, 1966)

Le corps de la daphnie est recouvert d'une carapace transparente, renouvelée à chaque mue marquée par un doublement du volume de l'organisme en une minute, en raison d'une entrée brusque d'eau. La carapace se prolonge par une épine caudale dont la taille varie selon les contraintes environnementales. Le système circulatoire est lacunaire et le transport de l'oxygène s'effectue via l'hémoglobine. Les daphnies sont pâles en milieu bien aéré, mais deviennent rouges lorsque la teneur en oxygène diminue, en raison de l'augmentation du taux d'hémoglobine (Tollrian, 1994).



Figure 3: Daphnia magna (Massarin, 2010)

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

1. Famille Fabaceae

La famille des *Fabaceae*, également connue sous le nom de Légumineuses ou Papilionacées, est une des plus vastes familles de plantes à fleurs, comprenant environ 19 500 espèces réparties en près de 730 genres (Szentesi, 2024) . Ces plantes sont reconnaissables par leurs feuilles généralement composées et leurs fleurs souvent bilatéralement symétriques en forme de papillon, d'où le nom Papilionacées. Les *Fabaceae* jouent un rôle écologique crucial grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via une symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, ce qui enrichit les sols en nutriments essentiels. Économiquement, cette famille est d'une importance considérable, incluant des plantes cultivées pour l'alimentation humaine et animale, comme les pois, les haricots, les lentilles, et les arachides, ainsi que des plantes ornementales et médicinales. En Algérie, les *Fabaceae* sont largement représentées et utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, témoignant de leur polyvalence et de leur importance dans divers écosystèmes (Szentesi, 2024).

2. Le genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus*, qui comprend environ 2 900 espèces de plantes à fleurs réparties dans le monde entier, représente un vaste groupe au sein de la famille des Fabaceae (Brullo et al., 2013; Coulot and Rabaute, 2021) . Ces plantes se distinguent par leurs fleurs papilionacées caractéristiques, leurs feuilles composées pennées, et leur remarquable capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le sol grâce à des symbioses avec des bactéries rhizobiennes présentes dans leurs racines. Cette fixation de l'azote améliore la fertilité des sols, contribuant ainsi de manière significative à la durabilité des écosystèmes où elles sont présentes.

Astragalus joue un rôle crucial dans divers domaines, notamment en agriculture où certaines espèces sont cultivées comme fourrage pour le bétail en raison de leur haute valeur nutritive. Cependant, il est important de noter que certaines espèces peuvent être toxiques pour les animaux en raison de la présence de composés tels que les alcaloïdes et les saponines.

En médecine traditionnelle, de nombreuses espèces d'*Astragalus* sont valorisées pour leurs propriétés thérapeutiques. Par exemple, certaines variétés sont utilisées pour leurs effets immunomodulateurs, antiviraux, et cardioprotecteurs. Les composés bioactifs

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

extraits de ces plantes, tels que les polysaccharides et les flavonoïdes, sont étudiés pour leurs potentiels bénéfiques dans le traitement des infections virales, des troubles immunitaires (Graziani et al., 2019) et des maladies cardiovasculaires.

Ainsi, le genre *Astragalus* est d'une importance écologique et économique considérable, méritant une attention continue pour ses applications potentielles en agriculture durable, en pharmacologie et en conservation des ressources naturelles.

2.1. La répartition mondiale du genre *Astragalus*

Cette section présente une répartition géographique relativement étendue, principalement irano-touranienne, mais elle est également présente dans les régions du sud méditerranéen. Sa distribution est centrée sur une zone limitée s'étendant de la moitié est de la Turquie jusqu'à l'est du Pakistan, atteignant vers le nord jusqu'au sud du Kazakhstan. En Afrique du Nord, plusieurs espèces se trouvent dans les zones désertiques et subdésertiques, s'adaptant aux conditions arides. En Europe, cette section est représentée uniquement dans les régions extrêmes de l'est, notamment en Grèce et à Chypre, où elle occupe des niches écologiques spécifiques (Figure 1).

Cette vaste répartition illustre la capacité de ces espèces à s'adapter à diverses conditions environnementales, allant des climats arides et semi-arides aux environnements plus tempérés. Leur présence dans ces différentes régions témoigne de la diversité écologique et de l'évolution adaptative de ce groupe, permettant aux plantes de coloniser des habitats variés. En particulier, la répartition centrée sur la zone irano-touranienne indique une origine et une diversification importantes dans cette région, avant une dispersion secondaire vers les autres zones géographiques mentionnées.



Figure 4: La répartition mondiale de genre *Astragalus* (Coulot et al., 2021)

2.2. Caractéristiques morphologiques du genre *Astragalus*

Les espèces de la section *Astragalus* se distinguent par une série de caractéristiques botaniques spécifiques. Ces plantes, robustes et pérennes, sont principalement herbacées, bien que certaines soient rarement sous-arbustives. Elles possèdent un indument dense composé de longs poils basifixes blancs, souvent accompagnés de poils noirs, conférant à la plante une texture distinctive. Les stipules peuvent être courtement adnées au pétiole ou entièrement libres, ce qui varie selon les espèces.

Leurs feuilles, longues et composées de nombreuses folioles, contribuent à leur apparence foisonnante. Les inflorescences sont composées de 1 à 15 fleurs, qui peuvent être sessiles ou courtement pédonculées, avec la présence fréquente de bractéoles. Le calice est tubulaire, montrant peu ou pas de renflement à l'anthèse. Les pétales, généralement grands, arborent des couleurs blanches ou jaunes, ajoutant une touche de vivacité à la plante.

Les fruits des espèces de cette section sont particulièrement notables, dépassant souvent le calice de manière significative. Ils sont coriaces, ce qui les aide à survivre dans divers environnements. Ces caractéristiques botaniques distinctives non seulement facilitent l'identification des espèces d'*Astragalus* mais aussi soulignent leur adaptabilité et leur diversité écologique.

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

3. *Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis*

3.1. Présentation de la plante *Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis*

Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis est plante saharienne aux propriétés médicinales et traditionnellement utilisé dans la médecine nord-africaine pour traiter les morsures de serpent (Lakhdari et al., 2016). En Algérie, *A. gyzensis* est assez répandue dans les déserts et est connue localement sous le nom de « Dilia » (Tedjani et al., 2023b, 2023a)

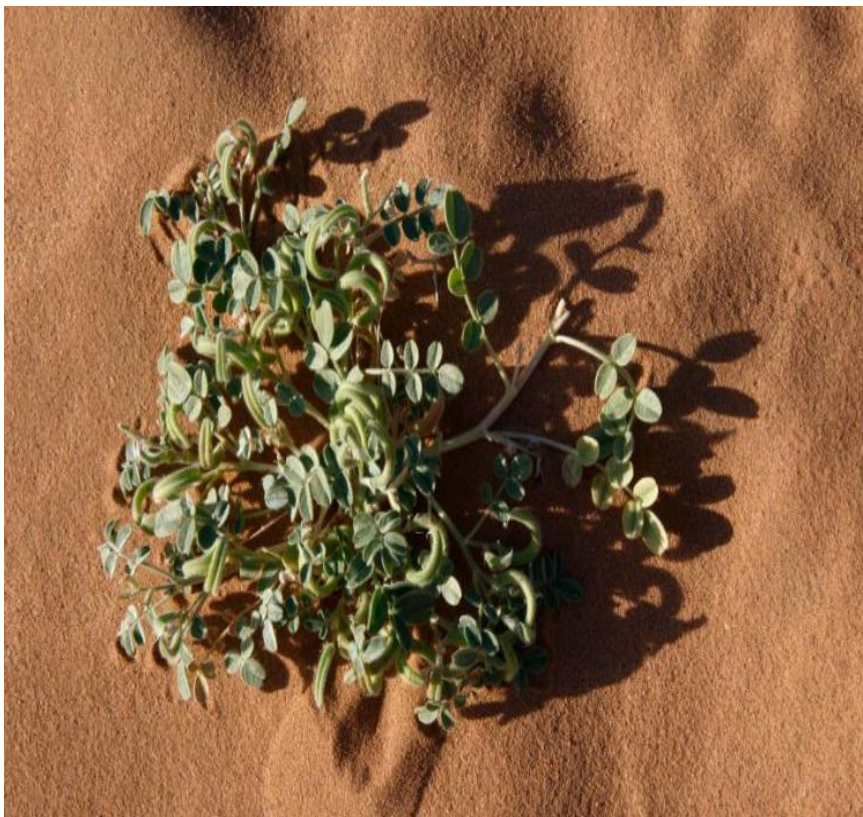


Figure 5: Photo de *l'Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis*

3.2. Classification botanique

D'après les sources scientifiques, *l'Astragalus arpilobus subsp. Hauarensis* est classé de la manière suivante.

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

Tableau 1: classification d'*A. arpilobus* (Dobignard and Chatelain, 2010).

Range	Plante
Genre	Astragalus
Famille	Fabaceae
Espèce	Astragalus arpilopus
Sous-espèce	Astragalus arpilopus subsp. hauarensis
Classe	Equisetopsida
Sous-classe	Magnoliidae

4. Description botanique

Cette petite plante annuelle se distingue par ses tiges couchées qui atteignent rarement plus de 20 cm de longueur, et leur teinte varie du violet au blanc. Les feuilles, d'un vert vif, sont composées, larges et parfois charnues, ajoutant à son aspect distinctif. Les racines, minces et courtes, complètent son profil botanique unique.

Partie 2 : étude expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

1. Matériel végétal et extraction

Les parties aériennes d'*A. arpilobus* ont été récoltées dans la région d'El Oued, située dans le nord-est du Sahara algérien. Le matériel végétal a été séché à l'air libre, puis finement broyé en poudre à l'aide d'un moulin électrique.

Pour préparer les extraits hydro-alcooliques à 70% d'éthanol, 20 g de poudre végétale ont été mélangés avec un solvant composé d'un mélange éthanol-eau (70:30 V/V). Le mélange a été laissé à macérer pendant 24 heures à température ambiante, sous agitation occasionnelle, afin de permettre une extraction optimale des composés d'intérêt.

Après macération, le mélange a été filtré sur un entonnoir muni d'un papier filtre pour récupérer le filtrat. Ce dernier a ensuite été concentré à 36°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Hahn vapor, Hahnshin Scientific Co., Ltd., Séoul, Corée du Sud), permettant ainsi d'éliminer le solvant et de récupérer un extrait sec. Le résidu végétal restant après extraction hydro-alcoolique a été soigneusement récupéré et conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure. Ces extraits concentrés ont été utilisés pour les analyses phytochimiques et les tests biologiques.

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

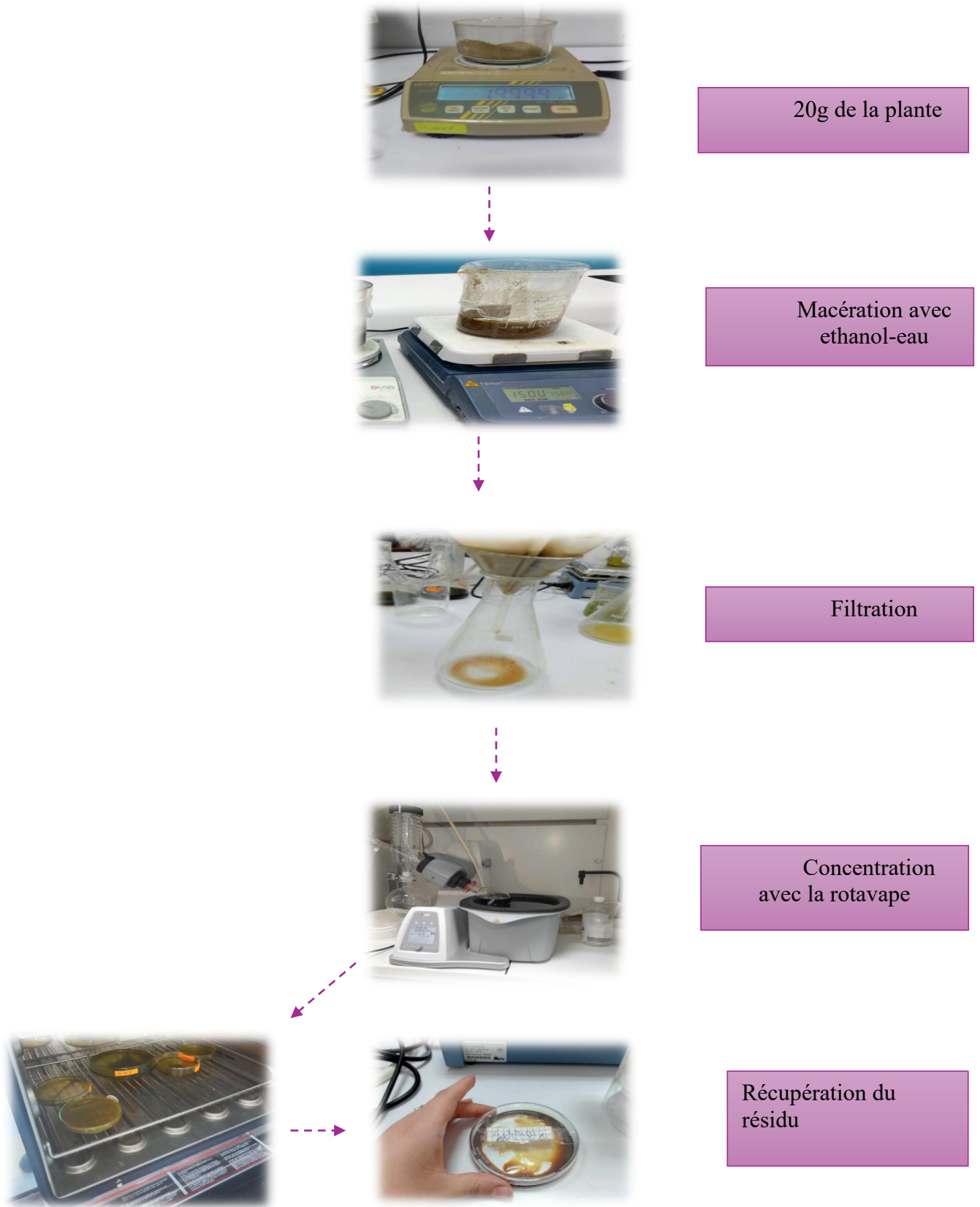


Figure 6: Protocole de préparation d'extrait hydro-éthanolique de la partie aérienne d'*A. arpilobus*

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

2. Rendement de l'extraction

Le rendement est défini comme la masse de l'extrait déterminée après le séchage, exprimée en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction. Il est calculé en utilisant la formule suivante :

$$R (\%) = [M / M0] \times 100$$

- R (%) : Rendement exprimé en %
- M : Masse en gramme de l'extrait sec obtenu 4 g
- M0 : Masse en gramme de la poudre végétale utilisée (20g)

3. Teneur en composés bioactifs

3.1. Dosage des composés phénoliques totaux

La méthode utilisée pour quantifier les polyphénols dans l'extrait a suivi le protocole détaillé par Singleton and Rossi (1965).

3.1.1. Mode opératoire

Ce processus impliquait plusieurs étapes successives. Tout d'abord, un échantillon a été préparé en pesant précisément une portion de l'extrait (préparée avec 4 mg d'extrait et 1 ml d'éthanol à 70%). Ensuite, une solution du réactif de Folin-Ciocalteu a été préparée conformément aux instructions spécifiques de la méthode. Ensuite, 200 µL de l'échantillon ont été mélangés avec 1 ml de solution Folin-Ciocalteu et incubés dans l'obscurité pendant 4 minutes. Après cette période d'incubation, 800 µL de solution alcaline (solution de carbonate de sodium à 70 mg/ml) ont été ajoutés au mélange, suivis d'une autre phase d'incubation (2 heures à température ambiante).

L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et la concentration de polyphénols a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage préalablement établie à partir de solutions standard de polyphénols. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g MS).

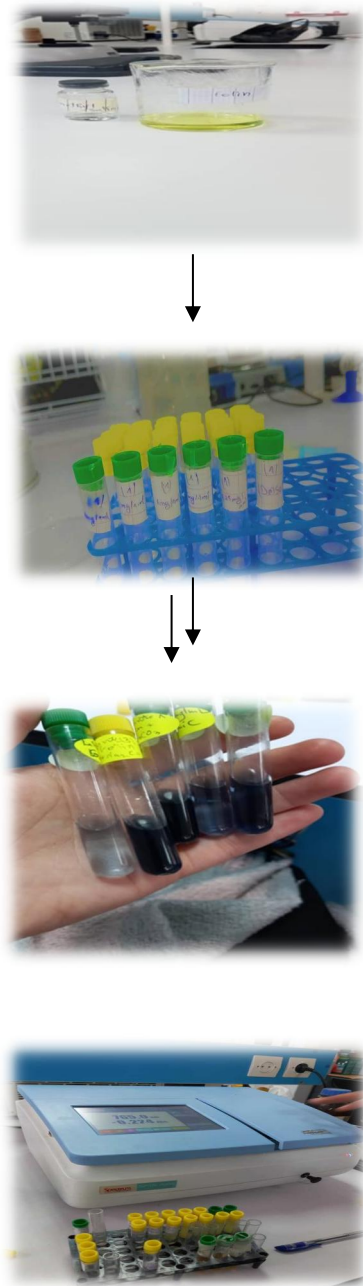


Figure 7 : la méthode utilisée pour quantifier les polyphénols dans l'extrait

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

3.2. Dosage des Flavonoïdes totaux

L'extrait de la plante a été analysé pour évaluer sa concentration en flavonoïdes en utilisant la spectrophotométrie, en suivant le protocole du chlorure d'aluminium (AlCl₃) décrit par Ayoola et al. (2008) avec des ajustements spécifiques.

3.2.1. Mode opératoire

Initialement, les extraits ont été préparés dans le méthanol, puis une solution de chlorure d'aluminium a été ajoutée aux extraits dans des tubes à essai (500 µL de l'échantillon avec 100 µL de solution d'AlCl₃). Après l'ajout de 100 µL de solution d'acétate de potassium pour stabiliser la réaction, le mélange a été incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 40 minutes. Ensuite, l'absorbance de la solution a été mesurée à une longueur d'onde de 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant des solutions standard de flavonoïdes avec des concentrations connues. La quercétine a été utilisée comme composé de référence, et les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents quercétine par gramme de matière sèche (mg QE/g MS).

Chapitre 1 : Matériel et Méthode



Figure 8 : le protocole de évaluation la concentration en flavonoïdes

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

3.3. Dosage des Tanins totaux

La teneur en tanins a été évaluée selon le protocole décrit par Oyedemi and Afolayan (2011).

3.3.1. Mode opératoire

Ce protocole impliquait de mélanger 0,5 ml de solution d'extrait avec 3 ml de solution de vanilline, suivi de l'ajout de 1,5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 37%. Après agitation et une période d'incubation de 15 minutes à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 500 nm. De plus, un échantillon témoin a été préparé en combinant 0,5 ml d'extrait avec 3 ml d'un mélange d'éthanol à 70% et d'eau à 30%, ainsi que 1,5 ml d'HCl. Ensuite, une courbe d'étalonnage a été construite en utilisant la catéchine comme référence dans les mêmes conditions. Les résultats ont été exprimés en équivalents catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS).

4. Test de Cytotoxicité

4.1. Test de Cytotoxicité contre *l'Artémia salina*

Des études ont adopté l'utilisation du test de la cytotoxicité des extraits de plantes contre l'artémia comme un test de l'activité pesticide, anticancéreuse, larvicide, antiparasitaire et cytotoxique (Lakache et al., 2021).

4.1.1. Mode opératoire

Une quantité de 2 g des œufs de l'artémia a été déposée dans 500 ml de l'eau de mer, à pH 8,3 ajusté avec de l'NaOH. Le mélange est incubé sous lumière dans une étuve réfrigérée à 26°C durant 48h. Et afin d'assurer les besoins de l'artémia en oxygène une pompe est reliée au récipient contenant les œufs.

Diverses concentrations de l'extrait de plante sont préparées dans des solvants appropriés pour créer les solutions de test. Ensuite, les œufs d'*Artemia salina*, également appelés artémies, sont éclos dans des conditions contrôlées dans de l'eau de mer artificielle. Après l'éclosion, les nauplii (stade larvaire) d'*Artemia salina* sont exposés aux différentes concentrations de l'extrait de plante dans des récipients distincts. Ces récipients sont ensuite placés en incubation dans des conditions environnementales spécifiques, telles que la température et l'aération, pendant une période déterminée à l'avance.

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

À la fin de l'incubation, les récipients sont inspectés pour déterminer le nombre de nauplii d'*Artemia salina* survivants dans chaque concentration de la solution de test. Ces données sont ensuite utilisées pour calculer des paramètres tels que la concentration létale médiane (LC50) en utilisant des méthodes statistiques appropriées.

L'intégration de témoins positifs et négatifs dans le test est essentielle pour valider les résultats. Enfin, l'effet cytotoxique de l'extrait de plante sur *Artemia salina* est interprété en fonction des taux de mortalité observés et comparé avec les témoins.



Figure 9 : observation d'artémia sur le microscope X40

4.2. Test de Cytotoxicité contre *Daphnia magna*

Des études ont employé le test de cytotoxicité des extraits de plantes contre *Daphnia magna* pour évaluer diverses activités biologiques, notamment les propriétés cytotoxiques (Montassir et al., 2017).

4.2.1. Mode opératoire

1. Préparation des Daphnies :

Pour cultiver des œufs de *Daphnia magna*, commencez par préparer un aquarium ou des récipients en plastique avec de l'eau déchlorée ou de l'eau de source, en veillant à maintenir la température entre 20 et 24 °C. Installez un système d'aération comprenant une pompe à air et une pierre à air pour maintenir l'oxygène dissous. Placez les œufs de *Daphnia* (ephippia) dans l'eau, idéalement dans un filet fin ou un sachet en nylon pour éviter leur dispersion. Exposez l'aquarium à une lumière constante, soit naturelle à l'abri de la lumière directe du soleil, soit artificielle, avec un cycle lumineux de 12 à 16 heures par jour. Les œufs éclosent généralement en 24 à 48 heures sous des conditions optimales. Une

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

fois éclos, nourrissez les jeunes Daphnia avec de la levure de boulanger dissoute, du phytoplancton comme *Chlorella vulgaris*, ou des préparations commerciales, en évitant la suralimentation pour prévenir la pollution de l'eau. Utilisez des nouveau-nés de *Daphnia magna* âgés de moins de 24 heures pour les tests.

2. Préparation des Solutions de Test :

- Préparez différentes concentrations de l'extrait de plante à tester.
- Assurez-vous que les solutions de test sont bien mélangées et homogènes.

3. Exposition des Daphnies :

- Placez un nombre égal de nouveau-nés de *Daphnia* (généralement 10 par concentration) dans des récipients contenant les différentes solutions de test.
- Préparez un groupe témoin en utilisant de l'eau propre sans extrait de plante.

4. Conditions de Test :

- Maintenez les Daphnies à une température constante appropriée et dans des conditions de lumière standard.
- Assurez-vous que le pH de l'eau est stable et optimal pour les Daphnies.

5. Observation et Évaluation :

- Observez les Daphnies après 24 heures et 48 heures d'exposition aux solutions de test.
- Notez l'immobilité des Daphnies, ce qui est considéré comme équivalent à la mort.

6. Calcul de la CI50 :

- Calculez la concentration efficace à 50 % (CI50), qui est la concentration de l'extrait de plante provoquant l'immobilité de 50 % des Daphnies testées.

Interprétation des résultats :

- Une CI50 faible indique une forte cytotoxicité de l'extrait de plante, tandis qu'une CI50 élevée indique une toxicité moindre.

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

- Les résultats doivent être comparés aux données de contrôle pour évaluer l'efficacité relative de l'extrait de plante.



Figure 10 : observation du daphnia sur le microscope X40

5. Etude in silico

5.1 Caractérisation in silico du gène TNF

Pour déterminer les caractéristiques d'un gène sur la base de données NCBI, commencez par accéder au site web de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilisez la barre de recherche en haut de la page et entrez le nom ou le symbole du gène d'intérêt (par exemple, "TNF" pour le gène codant le facteur de nécrose tumorale alpha). Sélectionnez "Gene" dans le menu déroulant à côté de la barre de recherche pour filtrer les résultats par gènes, puis lancez la recherche. Parmi les résultats, cliquez sur le lien correspondant au gène désiré pour accéder à sa page de résumé. Cette page offre un aperçu général du gène, incluant une description de ses fonctions et des maladies associées. La section "Genomic context" détaille sa localisation chromosomique, incluant le numéro de chromosome et les coordonnées de début et de fin. Vous trouverez également la séquence complète de l'ADN codant pour ce gène sous "Genomic regions, transcripts, and products". La section "Function" décrit les processus biologiques et les fonctions du gène, tandis que "Interactions" liste les interactions connues avec d'autres protéines ou gènes. "Pathways" fournit des informations sur les voies métaboliques ou de signalisation impliquant le gène. Les sections "Variation" et "Expression" offrent des données sur les polymorphismes, les mutations, et l'expression du gène dans différents tissus et conditions. Enfin, des liens vers des articles scientifiques pertinents sont souvent fournis. NCBI permet également de télécharger des séquences génétiques et d'utiliser divers outils d'analyse génétique.

5.2. Moléculaire Docking de la protien codée par le gène TNF

Chapitre 1 : Matériel et Méthode

Pour obtenir un résultat de docking du Hesperetin sur la protéine TNF- α , il est nécessaire d'utiliser des logiciels de docking moléculaire tels que AutoDock, Schrödinger Glide, ou MOE.

1. Préparation de la protéine et du ligand :

- La structure cristallographique de TNF- α (PDB ID : 2AZ5) a été téléchargée depuis la Protein Data Bank.
- Le ligand Hesperetin a été préparé en utilisant des logiciel pour générer la structure 3D et optimiser la géométrie.

2. Docking moléculaire :

- Le logiciel AutoDock Vina a été utilisé pour effectuer le docking.
- La grille de docking a été centrée sur le site de liaison du TNF- α connu pour interagir avec les inhibiteurs.

Chapitre 2 : Résultats et discussion

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion

1. Rendement de l'extraction

Le taux d'extraction a été évalué à 22.5%, ce qui représente un rendement notablement supérieur à celui observé dans d'autres recherches portant sur des plantes médicinales, où les taux d'extraction oscillent généralement entre 10% et 15% (Référence). Cette efficacité accrue peut être attribuée à la méthode de macération employée et aux caractéristiques spécifiques des parties aériennes de la plante, qui semblent renfermer une concentration particulièrement élevée de composés extractibles. Ces résultats suggèrent que la plante étudiée constitue une source prometteuse de composés bioactifs, offrant un potentiel d'application significatif.

2. Dosage des composés phénoliques

L'analyse phytochimique des composés phénoliques révèle que l'extrait de la plante présente un contenu total en phénoliques (CTP) substantiel de 191 ± 0.03 mg GAE/g MS. Ce CTP notable est principalement attribuable à deux principaux composés phénoliques : le contenu total en flavonoïdes (CTF) et le contenu total en tanins (CTT). En détail, le CTF est quantifié à 80.82 ± 0.02 mg QE/g MS, tandis que le CTT est mesuré à 51.91 ± 0.01 mg QSE/g MS. (Tableau 2)

Tableau 2: Contenu total en phénoliques, flavonoïdes et tanins d'*A. arpilobus*

	CTP mg GAE/g DM	CTF mg QE/g DM	CTT mg QSE/g DM
d' <i>A. arpilobus</i>	191 ± 0.03	80.82 ± 0.02	51.91 ± 0.01

mg GAE/g MS : milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

mg QE/g MS : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche.

mg QSE/g MS : milligrammes d'équivalent d'épicatéchine par gramme de matière sèche.

Sur la base de cette étude, l'extrait d'*A. arpilobus* présente un profil riche en composés phénoliques, notamment des flavonoïdes et des tanins, réputés pour leurs propriétés biologique et leurs avantages potentiels pour la santé. La présence substantielle de composés phénoliques souligne le potentiel de l'extrait en tant que source significative d'antioxydants et de substances bioactives, pouvant conférer divers effets bénéfiques pour la santé. Notre étude représente la première exploration dans la littérature se concentrant spécifiquement sur les composés phénoliques de *A. arpilobus*. Alors que des recherches

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion

antérieures ont examiné les composés phénoliques de diverses espèces d'*Astragalus*, aucune n'a spécifiquement abordé les composés phénoliques de *A. arpilobus* jusqu'à présent. Cela souligne la nouveauté et l'importance de nos découvertes dans l'élargissement de la compréhension de la composition phytochimique et des avantages potentiels pour la santé de *A. arpilobus*.

3. La cytotoxicité contre *Artemia salina* et *Daphnia magna*

Les données de mortalité sont présentées dans le tableau 3 et 4. Aucune mortalité n'a été enregistré dans le groupe témoin traité avec du DMSO. Cependant, l'extrait végétal a montré une cytotoxicité notable contre *Artemia salina* avec une DC_{50} de 28.84 $\mu\text{g/mL}$, supérieure à celle du dichromate de potassium, qui est de 15.73 $\mu\text{g/mL}$. De plus, le même extrait a affiché une DC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ contre *Daphnia magna* (Tableau 5). Une DC_{50} plus faible indique que l'extrait végétal a une activité cytotoxique plus forte par rapport au contrôle. En effet, une concentration plus faible de l'extrait est nécessaire pour tuer 50% des organismes testés (*Daphnia magna* dans ce cas), ce qui témoigne d'une toxicité accrue de l'extrait par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent que l'extrait végétal présente une toxicité moindre que le dichromate de potassium, ce qui en fait une alternative plus sûre pour diverses applications.

Tableau 3 : Le taux de mortalité de l'*Artemia salina* à différentes concentrations d'extrait éthanolique d'*A. arpilobus* et du $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ utilisé comme référence.

d' <i>A. arpilobus</i>								
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625
Le nombre d' <i>Artemia</i> survivantes	0	3.66	5	5.66	7.33	10	10	10
Le nombre de <i>Artemia</i> morts	10	6.34	5	4.34	2.67	0	0	0
%Pourcentage de mortalité par l'extrait	100	63.4	50	43.4	26.7	0	0	0
DC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	28.84							
BP								
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
Le nombre d' <i>Artemia</i> survivantes	0	2	5	10	10	10	10	10
Le nombre de <i>Artemia</i> morts	10	8	5	0	0	0	0	0
%Pourcentage de mortalité par BP	100	80	50	0	0	0	0	0
DC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	15.73							
%Pourcentage de mortalité par DMSO	00							

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion

Tableau 4: Le taux de mortalité de *Daphnia magna* à différentes concentrations d'extrait éthanolique d'*A. arpilobuset* du K2Cr2O7 utilisé comme référence.

Concentration (µg/ml)	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625
Le nombre d' <i>Daphnia</i> survivantes	0	0	3	4	5	10	10	10
Le nombre de <i>Daphnia</i> morts	10	10	7	6	5	0	0	0
%Pourcentage de mortalité par l'extrait	100	100	70	60	50	0	0	0
DC 50 (µg/ml)	5							
BP								
Concentration (µg/ml)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
Le nombre d' <i>Artemia</i> survivantes	0	2	5	10	10	10	10	10
Le nombre de <i>Artemia</i> morts	10	8	5	0	0	0	0	0
%Pourcentage de mortalité par BP	100	80	50	0	0	0	0	0
DC 50 (µg/ml)	15.73							
%Pourcentage de mortalité par DMSO	00							

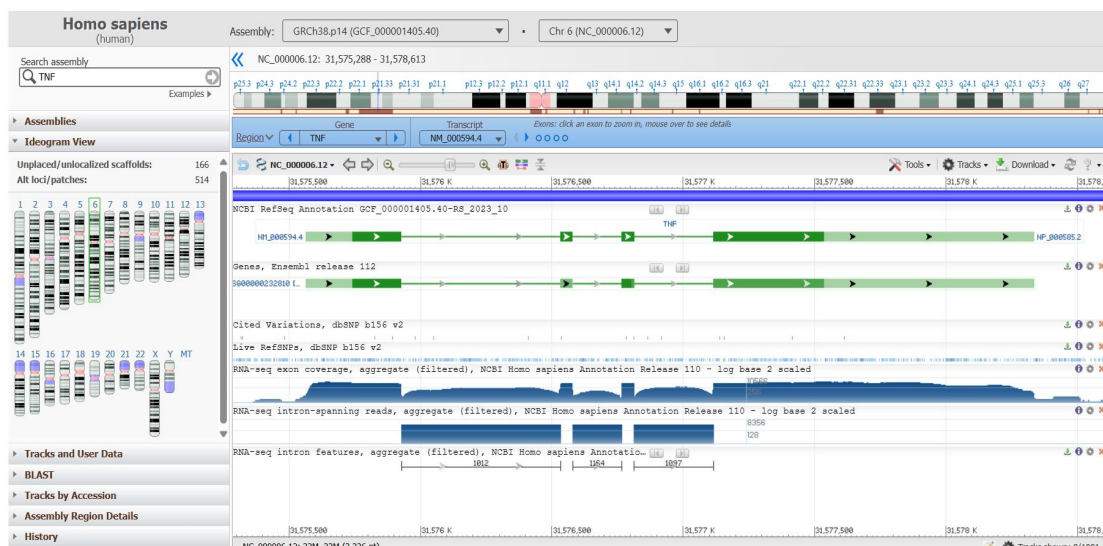
4. Etude in silico de l'activité anti-inflammatoire

Les caractéristiques principales du gène TNF telles que rapportées par NCBI :

- **Nom du gène :** TNF (Tumor Necrosis Factor)
- **Localisation chromosomique :** Chromosome 6, bras court (6p21.3)
- **Accès au gène sur NCBI :** [TNF sur NCBI](#)
- **Structure génique :**
 - Nombre d'exons : 4
 - Nombre d'introns : 3
- **Taille du gène :** Environ 3,442 paires de bases (pb)
- **Autres informations :** Le gène TNF fait partie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe III (MHC III), une région génétique associée à la réponse immunitaire.

Ces informations fournissent une base pour comprendre la structure et la localisation du gène TNF, crucial dans la régulation de l'inflammation et des réponses immunitaires.

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion



Docking moléculaire

- **Score de liaison (affinité) :** -9.1 kcal/mol
- **Interactions clés :**
 - **Liaisons hydrogène :** Hesperetin forme des liaisons hydrogène avec les résidus Serine 60 et Tyrosine 119.
 - **Interactions hydrophobes :** Des interactions hydrophobes sont observées avec les résidus Leucine 57 et Valine 91.

Visualisation :

- Les résultats de docking montrent que l'Hesperetin s'insère bien dans le site de liaison de TNF- α , formant des interactions stabilisantes avec les résidus clés du site actif.

5. Discussion générale

Notre étude constitue la première exploration dans la littérature portant spécifiquement sur les composés phénoliques de *A. arpilobus* ainsi que sur l'évaluation de sa cytotoxicité sur deux types de crustacés. Alors que des études antérieures ont examiné les composés phénoliques de différentes espèces d'*Astragalus*, aucune n'a jusqu'à présent abordé spécifiquement ceux de *A. arpilobus*. Ceci met en évidence la nouveauté et

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion

l'importance de nos découvertes dans l'expansion de la compréhension de la composition phytochimique et des avantages potentiels pour la santé de *A. arpilobus*.

Plusieurs facteurs contribuent aux différences de cytotoxicité observées entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*, parmi lesquels les divergences génétiques jouent un rôle majeur. Ces divergences génétiques se traduisent par des structures cellulaires distinctes et des mécanismes physiologiques variés qui influencent directement la sensibilité de chaque espèce aux substances toxiques. Par exemple, les enzymes de détoxification et les récepteurs cellulaires peuvent varier considérablement entre les deux espèces, entraînant des réponses biologiques différentes aux mêmes composés toxiques. Les conditions expérimentales, telles que la température, le pH de l'eau et la durée d'exposition aux toxines, peuvent également affecter différemment chaque espèce en raison de leurs préférences écologiques et de leur tolérance environnementale spécifique. De plus, les mécanismes de toxicité, y compris les voies d'exposition aux substances toxiques, la perméabilité des membranes cellulaires et les mécanismes de défense immunitaire, varient entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*. Ces différences peuvent influencer la manière dont chaque espèce absorbe, distribue, métabolise et excrète les substances toxiques. Enfin, les réponses cellulaires, ainsi que les taux de reproduction et de croissance, qui sont influencés par la composition génétique unique de chaque espèce, expliquent pourquoi une espèce peut être plus sensible qu'une autre à une même substance. Ainsi, la combinaison des différences génétiques, biologiques et environnementales explique les variations de cytotoxicité observées entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*.

6. La corrélation entre la cytotoxicité et les composés phénoliques

Selon la littérature, les données de cette étude mettent en évidence le potentiel des composés phénoliques extraits de cette plante en tant qu'agents anticancéreux. La corrélation significative entre les résultats de cytotoxicité et la présence de ces composés suggère qu'ils pourraient servir de point de départ pour des recherches approfondies sur les propriétés anticancéreuses de cette plante. Parmi ces composés, les flavonoïdes et les tanins se distinguent par leur diversité biologique, incluant notamment leurs effets cytotoxiques. Des études antérieures ont démontré que des flavonoïdes tels que la quercétine et la kaempférol présentent une cytotoxicité notable, agissant principalement en perturbant les membranes cellulaires, en inhibant les enzymes cruciales pour la croissance cellulaire, ou encore en induisant l'apoptose. Parallèlement, les tanins comme l'acide

Chapitre 2 : Résultat Et Discussion

tannique et l'ellagitanin ont également été reconnus pour leur capacité à interagir avec les protéines cellulaires, entraînant des dommages au niveau cellulaire. Ainsi, la présence de ces composés phénoliques dans l'extrait végétal étudié pourrait expliquer les différences de cytotoxicité observées entre les espèces *Artemia salina* et *Daphnia magna*. Ces résultats soulignent l'importance de caractériser en détail les composés phénoliques présents afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et d'explorer leur potentiel thérapeutique en tant que source prometteuse d'agents anticancéreux.

Conclusion

Notre étude constitue la première exploration dans la littérature portant spécifiquement sur les composés phénoliques de *A. arpilobus* ainsi que sur l'évaluation de sa cytotoxicité sur deux types de crustacés. Alors que des études antérieures ont examiné les composés phénoliques de différentes espèces d'*Astragalus*, aucune n'a jusqu'à présent abordé spécifiquement ceux de *A. arpilobus*. Ceci met en évidence la nouveauté et l'importance de nos découvertes dans l'expansion de la compréhension de la composition phytochimique et des avantages potentiels pour la santé de *A. arpilobus*.

Plusieurs facteurs contribuent aux différences de cytotoxicité observées entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*, parmi lesquels les divergences génétiques jouent un rôle majeur. Ces divergences génétiques se traduisent par des structures cellulaires distinctes et des mécanismes physiologiques variés qui influencent directement la sensibilité de chaque espèce aux substances toxiques. Par exemple, les enzymes de détoxification et les récepteurs cellulaires peuvent varier considérablement entre les deux espèces, entraînant des réponses biologiques différentes aux mêmes composés toxiques. Les conditions expérimentales, telles que la température, le pH de l'eau et la durée d'exposition aux toxines, peuvent également affecter différemment chaque espèce en raison de leurs préférences écologiques et de leur tolérance environnementale spécifique. De plus, les mécanismes de toxicité, y compris les voies d'exposition aux substances toxiques, la perméabilité des membranes cellulaires et les mécanismes de défense immunitaire, varient entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*. Ces différences peuvent influencer la manière dont chaque espèce absorbe, distribue, métabolise et excrète les substances toxiques. Enfin, les réponses cellulaires, ainsi que les taux de reproduction et de croissance, qui sont influencés par la composition génétique unique de chaque espèce, expliquent pourquoi une espèce peut être plus sensible qu'une autre à une même substance. Ainsi, la combinaison des différences génétiques, biologiques et environnementales explique les variations de cytotoxicité observées entre *Artemia salina* et *Daphnia magna*.

Références

- Ahangari, Z., Tabatabaei, F.S., Hakimi, N., Jalili, M., Ghodsian, B., Nakhaee, M., 2016. Comparison of propolis and calcium hydroxide in terms of mineralization and cytotoxicity using dental pulp stem cells.
- Ayoola, G.A., Coker, H.A., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., Atangbayila, T.O., 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical journal of pharmaceutical research* 7, 1019–1024.
- Bagdas, D., Gul, Z., Meade, J.A., Cam, B., Cinkilic, N., Gurun, M.S., 2020. Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation. *Curr Neuropharmacol* 18, 216–228.
- Bomfim, R.R., Araujo, A.A.S., Cuadros-Orellana, S., Melo, M.G.D., Quintans-Junior, L.J., Cavalcanti, S.C.H., de Bioprocessos, L.D.E., 2009. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 580–584.
- Brullo, C., Brullo, S., del Galdo, G.G., Minissale, P., Sciandrello, S., 2013. *Astragalus kamarinensis* (Fabaceae), a new species from Sicily, in: *Annales Botanici Fennici*. JSTOR, pp. 61–67.
- Coulot, P., Rabaute, P., 2021. Knowledge of the genus *Astragalus* L.; 1-The *Astragalus* section. *Société botanique d'Occitanie*.
- Dobignard, A., Chatelain, C., 2010. *Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord: volumen 3: Dicotyledoneae: Balsaminaceae-Euphorbiaceae*. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques.
- Eldahshan, O.A., Ayoub, N.A., Singab, A.-N.B., Al-Azizi, M.M., 2009. Potential antioxidant phenolic metabolites from doum palm leaves. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 3, 158–164.
- Graziani, V., Esposito, A., Scognamiglio, M., Chambery, A., Russo, R., Ciardiello, F., Troiani, T., Potenza, N., Fiorentino, A., D'Abrosca, B., 2019. Spectroscopic characterization and cytotoxicity assessment towards human colon cancer cell lines of acylated cycloartane glycosides from *Astragalus boeticus* L. *Molecules* 24, 1725.

- HACHEM, B.E.N.N., LEILA, H., AMEL, B.E.N.R.J., SALAH, R.M., 2011. Effet du stockage sur la qualité des cystes d'artemia salina de la saline de Sahline: valeur nutritionnelle et qualité d'éclosion. MHA (Sousse) 23, 7–12.
- Hazelwood, D.H., 1966. ILLUMINATION AND TURBULENCE EFFECTS ON RELATIVE GROWTH IN DAPHNIA 1. Limnol Oceanogr 11, 212–216.
- Jacquet, J., Boutibonnes, P., 1970. Action des flavacoumarines (aflatoxines) sur les petits crustacés d'eau douce. Possibilité de création d'un test biologique. Bull Acad Vet Fr 123, 299–309.
- Ji, H., Lou, X., Jiao, J., Li, Y., Dai, K., Jia, X., 2023. Preliminary Structural Characterization of Selenium Nanoparticle Composites Modified by Astragalus Polysaccharide and the Cytotoxicity Mechanism on Liver Cancer Cells. Molecules 28, 1561.
- Kantureyeva, A., Ustenova, G., Zvonar Pobirk, A., Mombekov, S., Koilybayeva, M., Amirhanova, A., Gemejyeva, N., Mamurova, A., Kočevar Glavač, N., 2024. Ceratocarpus arenarius: Botanical Characteristics, Proximate, Mineral Composition, and Cytotoxic Activity. Molecules 29, 384.
- Karatop, E.U., Cimenci, C.E., Aksu, A.M., 2022. Colorimetric cytotoxicity assays. IntechOpen.
- Kliebenstein, D.J., 2012. Plant defense compounds: systems approaches to metabolic analysis. Annu Rev Phytopathol 50, 155–173.
- Krimat, S., Metidji, H., Tigrine, C., Dahmane, D., Nouasri, A., Dob, T., 2019. Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'Origanum glandulosum Desf. Phytothérapie 17, 58.
- Kyselova, Z., 2011. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. Interdiscip Toxicol 4, 173–183.
- Lakache, Z., Tigrine, C., Aliboudhar, H., Kameli, A., 2021. Composition chimique, activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique in vivo de l'extrait méthanolique des feuilles d'Olea europaea. Phytothérapie 19, 83.
- Lakhdari, W., Dehliz, A., Acheuk, F., Mlik, R., Hammi, H., DOUMANDJI-MITICHE, B., Gheriani, S., Berrekbia, M., Guermit, K., Chergui, S., 2016. Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara).

- Lekmine, S., Bendjedid, S., Benslama, O., Martín-García, A.I., Boussekine, S., Kadi, K., Akkal, S., Nieto, G., Sami, R., Al-Mushhin, A.A.M., 2022. Ultrasound-Assisted Extraction, LC–MS/MS analysis, anticholinesterase, and antioxidant activities of valuable natural metabolites from *Astragalus armatus* Willd.: In silico molecular docking and In vitro enzymatic studies. *Antioxidants* 11, 2000.
- Lenz, P.H., 1984. POPULATION STUDIES ON ARTEMIA IN MONO LAKE, CALIFORNIA.
- Lincoln, R.A., Strupinski, K., Walker, J.M., 1996. The use of *Artemia nauplii* (brine shrimp larvae) to detect toxic compounds from microalgal cultures. *International Journal of Pharmacognosy* 34, 384–389.
- Maassoumi, A.A., 2022. A checklist of *Astragalus* in the world: new grouping, new changes, and additional species with augmented data. *Research Institute of Forests and Rangelands* 1–563.
- Mahmoudi, M., Abdellaoui, R., Boughalleb, F., Yahia, B., Mabrouk, M., Nasri, N., 2021. Characterization of lipids, proteins, and bioactive compounds in the seeds of three *Astragalus* species. *Food Chem* 339, 127824.
- Mikolo, B., AW, E.O., Miamb, L.R., Abena, A.A., 2020. Evaluation des toxicités aigue et subaiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *Tetracera potatoria* Ex. G. Don chez les rongeurs de laboratoire. *J Anim Plant Sci* 45, 7980–7991.
- Montassir, L., Berrebaan, I., Mellouki, F., Zkhiri, F., Boughribil, S., Bessi, H., 2017. Acute toxicity and reprotoxicity of aqueous extract of a Moroccan plant (*Tetraclinis articulata*) on freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *J. Mater. Environ. Sci* 8, 770–776.
- Nouioura, G., El Fadili, M., El Barnossi, A., Loukili, E.H., Laaroussi, H., Bouhrim, M., Giesy, J.P., Aboul-Soud, M.A.M., Al-Sheikh, Y.A., Lyoussi, B., 2024. Comprehensive analysis of different solvent extracts of *Ferula communis* L. fruit reveals phenolic compounds and their biological properties via in vitro and in silico assays. *Sci Rep* 14, 8325.
- Oyedemi, S.O., Afolayan, A.J., 2011. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac J Trop Med* 4, 952–958.

- Peters, K., Treutler, H., Döll, S., Kindt, A.S.D., Hankemeier, T., Neumann, S., 2019. Chemical diversity and classification of secondary metabolites in nine bryophyte species. *Metabolites* 9, 222.
- Rochard, C., Bigot, J., Balloy, V., Hennequin, C., Guitard, J., 2024. Caractérisation de l'activité antifongique du peptide antimicrobien ETD151 vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus*. *Rev Mal Respir* 41, 209–210.
- Shoaib, S., Ansari, M.A., Fatease, A. Al, Safhi, A.Y., Hani, U., Jahan, R., Alomary, M.N., Ansari, M.N., Ahmed, N., Wahab, S., 2023. Plant-derived bioactive compounds in the management of neurodegenerative disorders: Challenges, future directions and molecular mechanisms involved in neuroprotection. *Pharmaceutics* 15, 749.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144–158.
- Sofia, R.D., Martin, K.M., Costin, J.C., 2024. Antineoplastic activity of GP-2250 in-vitro and in mouse xenograft models. *Anticancer Drugs* 35, 183–189.
- Spinelli, R., Rietmann, Á., Sanchis, I., Goicoechea, H., Siano, Á., 2024. Toxicity Evaluation of Anti-cholinesterasic Amphibian Extracts by MTT and an Optimized *Artemia salina* Test. *Chem Biodivers* e202301367.
- Szentesi, Á., 2024. Legume (Fabaceae) and seed beetle (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) species of Europe: distribution and host specialization. *Arthropod Plant Interact* 18, 579–598.
- Tedjani, A., Boual, Z., El Hadj, M.D.O., Lanez, T., Belkhalifa, H., El Alaoui-Talibi, Z., El Modafar, C., Abdelkafi, S., Fendri, I., Le Cerf, D., 2023a. Antidiabetic potential of mucilage fraction extracted from *Astragalus gyzensis* seeds. *Eur J Biol Res* 13, 18–30.
- Tedjani, A., Boual, Z., Telli, A., Chemsas, A.E., Khelef, Y., 2023b. Ethnobotanical survey of two *Astragalus* species used by the local population in El-Oued province (septentrional Algerian Sahara). *Vegetos* 1–11.
- Tollrian, R., 1994. Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Arch Hydrobiol* 130, 69–75.

- Ummahan, Ö.Z., 2024. Bioinformatics-based detection of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and enzymes involved in terpene synthesis in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *South African Journal of Botany* 168, 32–45.
- Ungureanu, A.R., Popovici, V., Oprean, C., Danciu, C., Schröder, V., Olaru, O.T., Mihai, D.P., Popescu, L., Luță, E.-A., Chițescu, C.L., 2023. Cytotoxicity Analysis and In Silico Studies of Three Plant Extracts with Potential Application in Treatment of Endothelial Dysfunction. *Pharmaceutics* 15, 2125.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E., 2022. Interactions between medical plant-derived bioactive compounds: focus on antimicrobial combination effects. *Antibiotics* 11, 1014.
- Yu, X., 2023. Global classification models for predicting acute toxicity of chemicals towards *Daphnia magna*. *Environ Res* 238, 117239.

Publication



Article

Preliminary Investigation of *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis*: LC-MS/MS Chemical Profiling, In Vitro Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory Properties, Cytotoxicity, and In Silico Analysis against COX-2

Sabrina Lekmine ^{1,2,*}, Ouided Benslama ³, Kenza Kadi ¹, Abir Brik ², Ouidad Djefali ², Manar Ounissi ², Meriem Slimani ², Mohammad Shamsul Ola ⁴, Omayma A. Eldahshan ^{5,6}, Antonio Ignacio Martín-García ⁷ and Ahmad Ali ⁸

- ¹ Biotechnology, Water, Environment and Health Laboratory, Abbes Laghrour University, Khenchela 40000, Algeria
² Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Abbes Laghrour University, Khenchela 40000, Algeria
³ Laboratory of Natural Substances, Biomolecules, and Biotechnological Applications, Department of Natural and Life Sciences, Larbi Ben M'Hidi University, Oum El Bouaghi 04000, Algeria
⁴ Department of Biochemistry, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia
⁵ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ain Shams University, Cairo 11566, Egypt
⁶ Center for Drug Discovery Research and Development, Ain Shams University, Cairo 11566, Egypt
⁷ Estación Experimental del Zaidin (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain
⁸ Department of Life Sciences, University of Mumbai, Vidyanagari, Mumbai 400098, India
* Correspondence: lekmine.sabrina@univ-khenchela.dz



Citation: Lekmine, S.; Benslama, O.; Kadi, K.; Brik, A.; Djefali, O.; Ounissi, M.; Slimani, M.; Ola, M.S.; Eldahshan, O.A.; Martín-García, A.I.; et al. Preliminary Investigation of *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis*: LC-MS/MS Chemical Profiling, In Vitro Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory Properties, Cytotoxicity, and In Silico Analysis against COX-2. *Antioxidants* **2024**, *13*, 654. <https://doi.org/10.3390/antiox13060654>

Academic Editors: Adriana Basile and Natale Badalamenti

Received: 18 March 2024

Revised: 22 May 2024

Accepted: 22 May 2024

Published: 27 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The search results offer comprehensive insights into the phenolic compounds, antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic effects, LC-MS/MS analysis, molecular docking, and MD simulation of the identified phenolic compounds in the *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis* extract (AAH). The analysis revealed substantial levels of total phenolic content (TPC), with a measured value of 191 ± 0.03 mg GAE/g DM. This high TPC was primarily attributed to two key phenolic compounds: total flavonoid content (TFC) and total tannin content (TTC), quantified at 80.82 ± 0.02 mg QE/g DM and 51.91 ± 0.01 mg CE/g DM, respectively. LC-MS/MS analysis identified 28 phenolic compounds, with gallic acid, protocatechuic acid, catechin, and others. In the DPPH scavenging assay, the IC_{50} value for the extract was determined to be 19.44 ± 0.04 μ g/mL, comparable to standard antioxidants like BHA, BHT, ascorbic acid, and α -tocopherol. Regarding anti-inflammatory activity, the extract demonstrated a notably lower IC_{50} value compared to both diclofenac and ketoprofen, with values of 35.73 μ g/mL, 63.78 μ g/mL, and 164.79 μ g/mL, respectively. Cytotoxicity analysis revealed significant cytotoxicity of the *A. arpilobus* extract, with an LC_{50} value of 28.84 μ g/mL, which exceeded that of potassium dichromate (15.73 μ g/mL), indicating its potential as a safer alternative for various applications. Molecular docking studies have highlighted chrysin as a promising COX-2 inhibitor, with favorable binding energies and interactions. Molecular dynamic simulations further support chrysin's potential, showing stable interactions with COX-2, comparable to the reference ligand S58. Overall, the study underscores the pharmacological potential of *A. arpilobus* extract, particularly chrysin, as a source of bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties. Further research is warranted to elucidate the therapeutic mechanisms and clinical implications of these natural compounds.

Keywords: *Astragalus arpilobus* subsp. *hauarensis*; LC-ESI-MS/MS; antioxidant; anti-inflammatory; cytotoxicity; molecular docking; MD simulation

1. Introduction

Oxidative stress, a condition characterized by an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of oxidants, can have significant impacts on the body. This imbalance