

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. Mira De Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie Physico-Chimique  
Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée



Réf : .....

Mémoire de fin de cycle  
En vue l'obtention du diplôme  
MASTER

*Thème*

Génotoxicité/antigénotoxicité *in vitro*  
des composés phénoliques

Présenté par :

**Chekmam Yasmine**

**Benatsou Feta**

Soutenu le : 27 Juin 2023 à 10h30

Devant le jury composé de :

<b>Mme. Benmessaoud Yasmine</b>	<b>Présidente</b>	<b>(M.C.B., UAMB)</b>
<b>Mme. Bahloul Cheraft Nassima</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>(M.C.B., UAMB)</b>
<b>Mme. Ayouni Karima</b>	<b>Promotrice</b>	<b>(M.C.B., UAMB)</b>

**Année universitaire : 2022/2023**

# Remerciements

Avant tout, on tient à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

On tient particulièrement à remercier **Madame Ayouni K.** pour nous avoir fait l'honneur d'être notre promotrice, de nous avoir fait confiance, nous avoir encouragées et conseillées tout en nous laissant une grande liberté, pour son soutien et sa grande générosité.

On tient à remercier également **Mme. Benmasaoud Y.** de nous avoir fait l'honneur de juger ce travail et de présider le jury.  
On tient à remercier aussi **Mme. Bahloul N.** d'avoir accepté de donner de son temps pour examiner ce travail.

On tient également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnées durant ce cursus universitaire.

On tient particulièrement à remercier le laboratoire de Biologie Physico-Chimique de l'Université de Bejaïa.  
Merci à tous nos collègues du laboratoire, et les ingénieurs qui n'ont cessé de nous encourager et aider ainsi que pour les bons moments passés ensemble.

Merci à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce modeste travail.



**Merci à tous**

## DÉDICACE



*Au nom d'ALLAH, le tout Miséricordieux le très Miséricordieux*

*Je remercie Allah Le tout puissant, clément et Miséricordieux de m'avoir motivé à réaliser Ce modeste travail,*

*Ensuite je remercie infiniment mes parents qui m'ont encouragée et aidée à arriver à ce Stade de formation.*

*Je dédie ce modeste travail à ma mère Fatiha, qui a sacrifié sa vie afin de réussir dans le Parcours de l'enseignement, celle qui est restée toujours à mes côtés dans les moments rudes de ma vie.*

*Je dédie ce modeste travail à mon père Lahlou, qui m'a accompagnée durant les moments les plus pénibles de ce long parcours de mon éducation.*

*À mon très cher frère Saad*

*À mes sœurs Tassadit, Faiza, Tafath, Thiziri, Lahena*

*À tous mes amis*

*À toute la promotion Master II Génétique Fondamentale et Appliquée 2023.*

*À tous ceux qui ont, contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire*

*Feta*

## **DÉDICACE**

*En premier lieu je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A la mémoire de mon chère grand père celui qui était un exemple de force et de courage, celui qui à planter le vouloir de la réussite en moi. Mon grand exemple dans la vie, que son âme repose en paix*

*A mes chers parents*

*Mon Père qui est toujours derrière moi à me soutenir, me pousser toujours vers l'avant, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.*

*Ma mère, celle qui a toujours rangé mes échantillons dans un coin, sans elle je ne vais probablement pas soutenir, Merci maman.*

*A mes deux chers frères, Saïd et Hocine.*

*A tout membre de ma famille: ma chère grand-mère, mes tantes, mes oncles qui m'ont toujours encouragée et qui ont souhaité voir ma réussite.*

*A toute personne qui m'a aidée pour réussir mon travail.*

*A tous les enseignants qui m'ont suivie le long de mon parcours éducatif.*

**YASMINE**

# Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste des figures et tableaux

Introduction.....1

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. La génotoxicité /anti-génotoxicité.....2

I.2. Les oxydants et les effets du stress oxydatif sur l'ADN.....3

I.3. Les antioxydants.....5

I.3.1. Définition et types d'antioxydants.....5

I.3.2. Les composés phénoliques comme antioxydants.....5

I.4. Rôles et activités biologiques des composés phénoliques.....6

I.4.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....7

I.4.2. La classification des composés phénolique.....8

I.5. Mécanismes d'actions antioxydant des composés phénoliques.....11

I.6. Tests d'évaluation de la génotoxicité/antigénotoxicité.....13

## Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.....15

II.1.2. Produits chimiques.....15

II.1.3. Produit verreries.....15

II.2.Méthodes.....16

II.2.1. teste de dégradation du désoxyribose( TBARS).....16

II.2.2.Teste de capacité réductrice ferrique d'antioxydant (FRAP).....18

## Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats des tests de dégradation du désoxyribose.....19

III.1.1. Essai de dégradation du désoxyribose (HRS).....19

II.1.2.. Etude de pouvoir génotoxique /anti génotoxique des composés phénoliques à différentes concentrations par le test de dégradation du désoxyribos.....20

## **Table des matières**

<b>II.1.1. Résultats du test de capacité antioxydant par réduction du fer (FRAP).....</b>	<b>25</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>31</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>32</b>

**EROs** : Les espèces réactives de oxygène.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde

**·OH** : Le radical hydroxyle

**ADN**: Acide désoxyribonucléique.

**DMSO**: Diméthyle sulfoxyde.

**MDA** : Malondialdéhyde

**TBARS** : le dosage des substances réactives à l'acide Thiobarbiturique .

**FRAP** : test de capacité réductrice ferrique d'antioxydantes .

**CAT** : Catalase.

## LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Production de EROs à partir de molécules d'oxygènes	04
2	Les radicaux libres et leurs effets sur l'ADN	04
3	Structure du phénol	07
4	Structure chimique des classes de flavonoïdes	10
5	Structure chimique de tanins hydrolysables	11
6	Sites de chélation de métal (Men+) pour les flavonoïdes	12
7	Propriétés réductrices des polyphénols	12
8	Eléments essentiels pour l'activité antioxydant des flavonoïdes	13
9	Effet de piégeage des radicaux hydroxyles dans les quatre mélanges réactionnels.	19
10	Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentration de l'acide caféique dans milieu réactionnel.	20
11	Evaluation des taux des MDAs formés à différentes concentrations de l'acide gallique dans milieu réactionnel	21
12	Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentration de la quercétine dans milieu réactionnel	22
13	Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentrations de la rutine dans les milieux réactionnels	23
14	Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentrations de l'acide tannique dans les milieux réactionnels	24
15	Les résultats du test FRAP illustrant le pouvoir réducteur des composés	25

## LISTE DES TABLAUX

N°	Titre	Page
I	Réactivité avec l'ADN des espèces impliquées dans le stress Oxydatif.	04
II	Activité biologiques des quelques composés phénoliques dans l'organisme.	06
III	Classification des composés phénoliques.	09
IV	Composition des mélanges réactionnels.	17



# *Introduction*

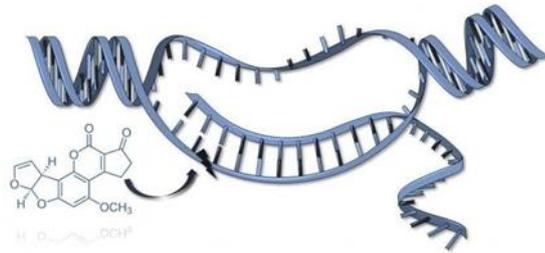
La molécule d'ADN est une macromolécule sous forme de deux chaînes complémentaires enroulées l'une autour de l'autre afin de former une structure hélicoïdale à double brins. Il a été assumé que cette macromolécule doit être extraordinairement stable afin de maintenir le degré élevé de fidélité lors de la transmission de traits héréditaires (**Plumejeaud, 2016**).

Les organismes sont constamment exposés aux divers facteurs qui peuvent causer des dommages, pas seulement au niveau cellulaire mais aussi au niveau de l'ADN. Ces facteurs peuvent être soit des substances chimiques, des radiations, des poussières, des toxines biologiques, etc., qui peut affecter l'ADN directement ou indirectement, entraînant des effets génotoxiques. Les dommages à l'ADN induits par de tels mutagènes constituent la première étape du processus de cancérogenèse entraînant l'accumulation de, lésion et de mutations (**Klaunig J et al.,2010**) .

Les habitudes alimentaires jouent un rôle important dans le développement de l'espèce vivante. L'alimentation contient une grande variété des composants naturels, tels que des composés phénoliques, des fibres, des flavonoïdes, des isoflavones et des stérols, qui en plus d'enrichir notre alimentation agissent comme un médicament naturel (**Balsano et Alisi, 2009**). Au cours des 30 dernières années, les recherches se sont principalement concentrées sur : la détermination du profil des composés phénoliques à partir de diverses matières végétales détermination de leurs activités biologiques, en particulier l'activité antioxydant et plus récemment de l'activité anti tumorale Cependant, les recherches récentes s'attachent de plus en plus à faire la lumière sur les mécanismes d'action (**Josipa et al., 2020 ; Garcia-Lazaro 2020**).

"La génération actuelle n'est que la gardienne du génome humain des générations futures" - une déclaration faite par Malling et Valcovic, décrit précisément l'objectif ultime des toxicologues génétiques. La toxicologie génétique est l'étude des effets néfastes sur le processus de l'hérédité. (**Gopala et al.,2000**).

Ce travail vise à évaluer l'activité génotoxique ainsi que l'activité antioxydant de composés phénoliques appartenant à différentes familles, en effectuant deux tests *in vitro* : test de dégradation du désoxyribose (TBARS), un composé majeur du squelette carboné de la molécule d'ADN, et le test FRAP.



# *Chapitre I*

## *Synthèse bibliographique*

### I.1. Génotoxicité /anti-génotoxicité

Les événements mutationnels sont les principaux déclencheurs de modifications génétiques et épigénétiques comme la réticulation de l'ADN, les ruptures d'ADN monocaténaire et bicaténaire, la formation d'adduits d'ADN, les bases incompatibles, la modification de l'histone, la méthylation de l'ADN et les altérations des microARN. Par contre, les mécanismes de réparation de l'ADN sont dédiés à la protection de l'ADN pour assurer la stabilité génétique (**Smita et al., 2022**).

La génotoxicité fait référence aux substances qui ont des effets destructeurs sur le matériel génétique d'une cellule, comme l'ADN et l'ARN, ce qui compromet l'intégrité cellulaire. Les substances ayant des propriétés génotoxiques sont appelées génotoxines. Quant à la toxicologie génétique, c'est une branche de la science qui étudie les dommages causés à l'ADN et aux chromosomes de la cellule par des agents ou des substances potentiellement dangereuses (**Sharmistha et al., 2021**). L'interaction avec ces substances toxiques peut entraîner de nombreuses anomalies chromosomiques, telles que des ruptures de chromatides, des ruptures d'isochromatides, des lacunes, des fragments chromosomiques, des échanges et des fusions de chromatides sœurs, ainsi que des altérations de la structure de l'ADN. Ces altérations de l'ADN peuvent avoir des conséquences, telles que la prédisposition à des maladies et une augmentation de la morbidité et de la mortalité liées à l'ADN (**Arpita et al. 2022**).

La génotoxicité se réfère donc à toutes les modifications physiques et/ou fonctionnelles du génome. Il existe deux types de génotoxicité : La génotoxicité directe qui implique une interaction entre le contaminant et l'ADN soit via les sites nucléophiles soit directement en modifiant les liaisons existantes. La génotoxicité indirecte où le toxique affecte des composants cellulaires associés à l'ADN comme par exemple des enzymes liées à la réparation et la réplication de l'ADN (**Pannetier, 2018**).

De façon parallèle, les génotoxiques sont définis comme des molécules qui présentent un effet toxique sur le génome, en particulier une capacité d'altérer le matériel génétique. Ces altérations peuvent être soit directes en induisant une modification dans l'ADN (Mutation génique) ou dans les chromosomes (mutations chromosomiques), soit indirectes comme la modification de la structure des nucléotides avant son incorporation dans l'ADN ou l'inhibition des enzymes de synthèse ou de réparation (l'ADN polymérase, ligases, topo isomérase, etc.) (Mutation génomiques) (**Umbuzeiro et al., 2016**).

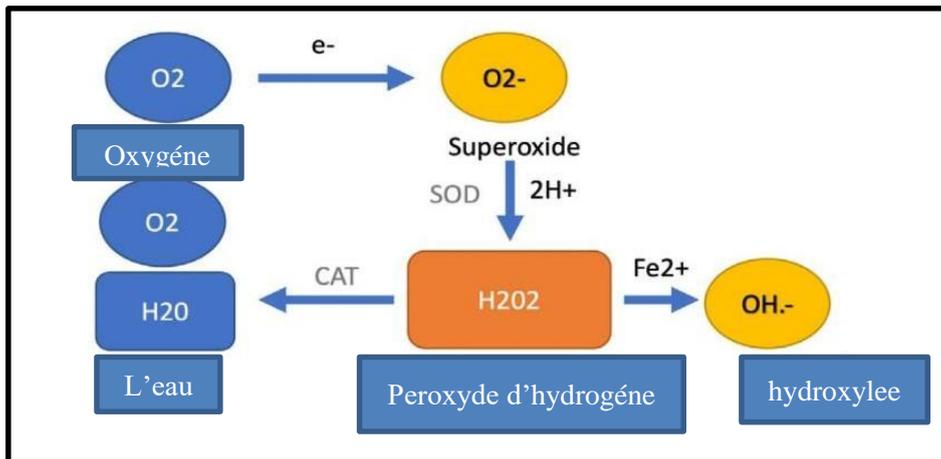
Les altérations résultant de divers facteurs génotoxiques comme le stress induit par les agents environnementaux et les toxines, l'exposition aux rayonnements ionisants, les erreurs de

réplication de l'ADN et divers métabolites endogènes et exogènes entravent ainsi l'acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire. Les mutagènes qui causent ces dommages variables peuvent être de nature physique, biologique et chimique (Temko *et al.*, 2018). La capacité d'un agent de modifier directement ou indirectement la composition génétique d'une cellule peut se manifester par divers mécanismes à savoir la lésion du squelette d'ADN simple ou double brins et l'altération des bases (Thymine, Cytosine, Adénine, Guanine) (Roberto *et al.*, 2016).

### I.2. Les oxydants et les effets du stress oxydatif sur l'ADN

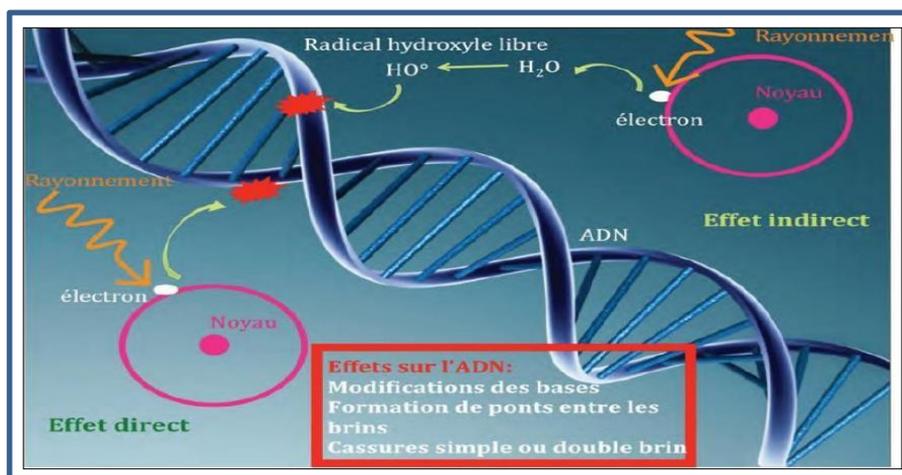
Certaines recherches scientifiques ont mis en évidence l'existence des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que de maladies liées au stress oxydant comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer). Ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante commune qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller, c'est l'oxydation. Quand la cellule utilise de l'oxygène, il se passe, un grand nombre de réactions d'oxydation. Le résultat est la production d'énergie, mais aussi de différents sous-produits appelés espèces réactives de l'oxygène « ERO » (figure 1) (Pokorny *et al.*, 2001). On définit à la fois les radicaux oxygénés de courte durée, y compris le superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et les molécules qui peuvent produire des radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique, molécule, partie d'une molécule à simple atome capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires, cela lui confère une grande réactivité, (Goudable et Faveir, 1997). Les radicaux libres peuvent être produit d'origine exogène (UV, radiation ionisantes, xénobiotiques, ozone, etc.) ou par des processus cellulaires normaux: la respiration mitochondriale. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable (Halliwell, 1999).

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités de défense antioxydant de l'organisme. Produits de façon continue et élevée, les EROs sont à l'origine d'un stress oxydant avec modifications irréversibles des biomolécules à savoir les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Baudin, 2020).



**Figure 1:** Production de EROs à partir de molécules d'oxygène (Xavier, 2021)

Les dommages oxydatifs de ces espèces réactives de l'oxygène à l'ADN (Figure 2), récapitulés en **Tableau I**, peuvent être les plus dangereux pour la cellule car ils affectent le cycle cellulaire et conduisent à des mutations et à la cancérogenèse (Hontaas, 2014).



**Figure 2:** Les radicaux libres et leurs effets sur l'ADN (Hontaas, 2014).

**Tableau I:** Réactivité avec l'ADN des espèces impliquées dans le stress oxydatif (Aust A et al., 1999)

Espèce réactive	Réaction avec l'ADN
O <sub>2</sub> •-, •OH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - O <sub>2</sub> et HO <sub>2</sub> • RO• et ROO• O <sub>3</sub> ONOO <sup>-</sup> Radicaux cationiques purines et pyrimidines Ions de type ferryl (fer(IV))	-Oxyde la guanine. -Modifie les bases azotées. -Oxyde les sucres - L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle(OH•) à 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG), qui a finalement conduit à GC → TA traversions lors de la réplication de l'ADN suite - forte oxydation et nitration - Espèces de résidus de méthionine et de tyrosine dans les protéines et oxyde l'ADN pour former nitroguanine

### I.3. Les antioxydants

#### I.3.1. Définition et types d'antioxydants

L'organisme est équipé pour lutter contre ces EROs par un énorme système de défense constitué de système antioxydant enzymatique. Cependant, ce système de défense est parfois dépassé, surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet des radicaux libres endogènes et exogènes. De ce fait, il fait appel aux plantes qui possèdent en plus un système non enzymatique de régénération comme l'acide ascorbique (vitamine C), les polyphénols ou les caroténoïdes, ce sont des composés antioxydants exclusivement végétaux (**Le Cren, 2004**).

Les antioxydants peuvent être définis comme étant des substances qui, présentes à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat par la libération d'un ou plusieurs électrons. Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques) (**Pokorny et al., 2001**). Il y'a de plus en plus un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (**Le Cren, 2004**). De plus, ils sont moins bien absorbés par notre corps que ceux de sources naturelles. Ce qui est le cas par exemple de la vitamine E (**Pelli et al., 2003**).

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces pour l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente (**Avissar et al., 1989**). La répartition variée de ces isoformes permet d'agir directement au niveau de la production des anions superoxydes et ainsi d'éviter une accumulation de ces radicaux libres, qui pourraient entraîner des stress oxydants trop importants (**Guillouty, 2016**).

La deuxième ligne de défense complémentaire consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents. Ce sont des molécules exogènes apportées par l'alimentation comme par exemple les vitamines, les minéraux et les polyphénols (**Pokorny et al., 2001; Le Cren, 2004**).

#### I.3.2. Les composés phénoliques comme antioxydants

Les plantes produisent naturellement une variété de produits de différentes natures chimiques, indispensables pour leurs pour la croissance et leur développement, appelés métabolites primaires,

mais aussi des métabolites dits secondaires. Ces derniers sont de petites molécules organiques provenant de métabolites primaires pendant l'embolie des plantes. Ces métabolites secondaires sont intéressants en raison de leur diversité structurale et leur puissance en tant que candidats médicaments et antioxydants. Ces métabolites sont certainement plus complexes dans la composition structurale et les chaînes latérales par rapport aux métabolites primaires, dont les composés phénoliques (Tawij, 2022)

### I.4. Rôles et activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques suscitent beaucoup d'intérêt en raison de leurs bienfaits pour la santé humaine. De nombreux tests *in vivo* et *in vitro* ont été développés pour l'évaluation de leurs bénéfices et leur interaction possible avec de nombreuses macromolécules et aussi vis-à-vis de leurs propriété antioxydants. Chez les végétaux, Les composés phénoliques sont abondamment répandus et jouent un rôle important dans le métabolisme et les processus physiologiques des plantes (Kumar *et al.*, 2019 ). Les composés phénoliques affectent différents types de processus (physiologiques), qui sont liés au développement et à l'extension des plantes, tels que la germination des graines, la division de la cellule et la synthèse des pigments photosynthétiques (Sharma *et al.*, 2019a). Chez l'Homme, les composés phénoliques ont également, entre autres, des propriétés cardio-protectrices anticancéreuses, antidiabétiques, et des effets neuro-protecteurs (Josipa *et al.*, 2020). La recherche scientifique de nouveaux principes actifs, a déjà permis d'expliquer certaines utilisations traditionnelles des plantes (Tableau II)

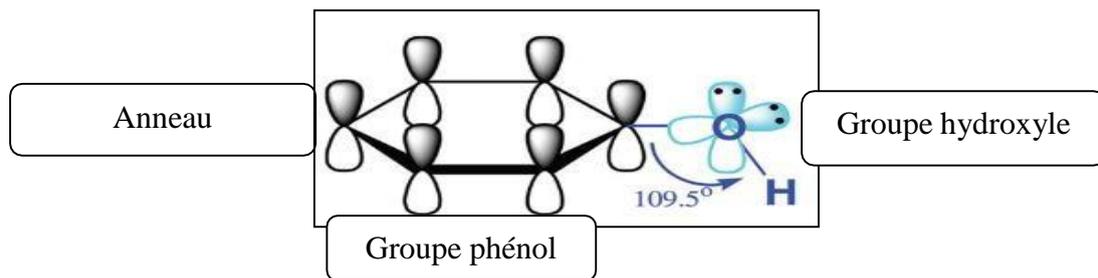
**Tableau II:** Activités biologiques des quelques composés phénoliques dans l'organisme

Composé phénoliques	Activité biologique	Références
Acides phénoliques	Antiparasitaires, antifongiques, antioxydants, antibactériennes, antiulcéreuses,	Flores <i>et al.</i> , 2009 Kim <i>et al.</i> , 2010
Coumarine	Analgésiques, anti-inflammatoires Protectrices vasculaires, antiparasitaires, antiœdémateuses, anti-tumoral, Soins des hémorroïdes et des varices.	Ito <i>et al.</i> , 2005 Smyth <i>et al.</i> , 2009
Flavonoïde	Anti tumorales, anti carcinogènes, antiparasitaires, antivirales, antibactériennes, antioxydants, antiinflammatoires, antiallergique, anti thrombotique, antiatherogéniques, hypotenseurs, analgésiques, diurétiques	Friedman <i>et al.</i> , 2006 Cushnie <i>et al.</i> , 2007; Batovska <i>et al.</i> , 2009
Anthocyanes	Protectrices capillaire-veineux, antioxydant	Bruneton <i>et al.</i> , 2009
Tanins condensés	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, anti tumorales, antifongiques, anti-inflammatoires	Masquelier <i>et al.</i> , 1979 Zhou <i>et al.</i> 2011
Tanins galliques	Antioxydants, antimicrobiens, antiviraux, antiinflammatoire, hypoglycémians.	Okamura <i>et al.</i> , 1993 Kubata <i>et al.</i> , 2005
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	Kim <i>et al.</i> , 2009

## I. Synthèse bibliographique

Les composés phénoliques constituent l'un des plus grands groupes de composés naturels et possèdent un large éventail d'activités biologiques (antioxydant, anti-inflammatoire, anti-allergène, antivirale, anticancéreuse, antimicrobienne, antimutagène et cardio protectrice, etc.) liées à leur diversité structurale.

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires les plus largement distribués produits par la voie de l'acide shikimique dans les plantes pendant leur croissance ou en réponse à des conditions de stress environnementales (par exemple, infections microbiennes, blessures ou rayonnement UV). Leur teneur dans la plante dépend de la variété végétale, des conditions de croissance, de maturation, de récolte, ainsi que des conditions de transformation et de stockage. Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyles (**figure 3**) (Josipa *et al.*, 2022), ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (Altameme *et al.*, 2015; Prajitha et Thoppil, 2016). Les composés phénoliques alimentaires sont consommés quotidiennement à partir de diverses sources, telles que les légumes, les fruits et les boissons. Ils sont responsables de différentes propriétés des aliments telles que la saveur, l'odeur, la couleur et l'astringence (Josipa *et al.* 2020).



**Figure 3:** Structure du phénol (Oluwaseun R A *et al.* 2021)

### I.4.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un groupe important des métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir de la voie de l'acide shikimique (Macheix *et al.* 2005). Malgré l'exceptionnelle diversité des structures des composés phénoliques, il n'existe que deux voies principales de leur biosynthèse (Babenko *et al.* 2019).

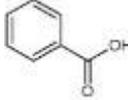
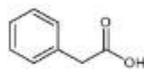
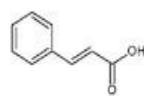
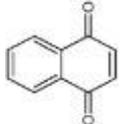
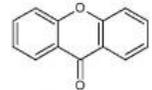
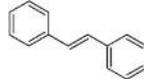
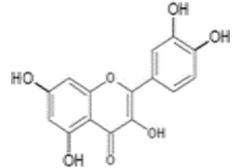
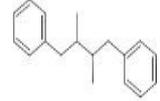
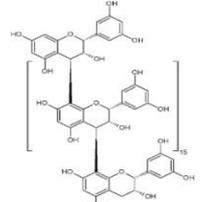
▪ **La voie du shikimate** est un pont qui relie le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire chez les plantes qui peut transformer plus de 20 % du carbone fixe en composés aromatiques, qui sont les précurseurs de la synthèse des phénols (**Jingrong et al., 2023**). C'est la voie la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes, occupe une place centrale dans le métabolisme cellulaire (**Bruneton, 2009**). Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (**Dewick, 1995**).

▪ **La voie de l'acide malonique** Grâce à cette voie les plantes à fleurs synthétisent des flavonoïdes, dans lesquels l'anneau phényle paranoïde est formé par la voie shikimique, et l'autre anneau est produit par la voie acétate. Les composés de départ utilisés sont coumarine-CoA et trois molécules de malonyl CoA, dont la condensation conduit à la formation d'une chalcone. (**Babenko, 2019**). La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes poly cétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Richter, 1993**).

### I.4.2. La classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent avoir des structures simples, comme les acides phénoliques, ou hautement polymérisées dans le cas des tanins condensés (**Lin et al., 2016**) peuvent être répartis selon la nature, le nombre et l'arrangement des atomes de carbone et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. Selon Harborne, les composés phénoliques végétaux sont principalement classés (**Tableau III**) dans les groupes suivants :

**Tableau III:** Classification des composés phénoliques (Tsimogiannis *et al.*, 2019)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Principales sources alimentaires
C6	Phénol simple	Catéchol		Gaultheria <i>Bergenia crassifolia</i>
C6-C1	Acides phénol	Acide gallique		Epices Fraise
C6-C2	Acétophénone	Gallacetophénone		Miel Nectar
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide <i>p</i> -coumarique		Pomme de terre, Pomme, Agrumes
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone		Noix
C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine		arachides
C6-C2-C6	Stilbenoids	Resvératrol		Vin Raisin
C6-C3-C6	flavonoïdes,	Quercitine		L'oignon rouge
(C6-C3)2	Lignans	Pinorésinol		Lin
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Tannins	Acide tannique		Raisin rouge, Kaki

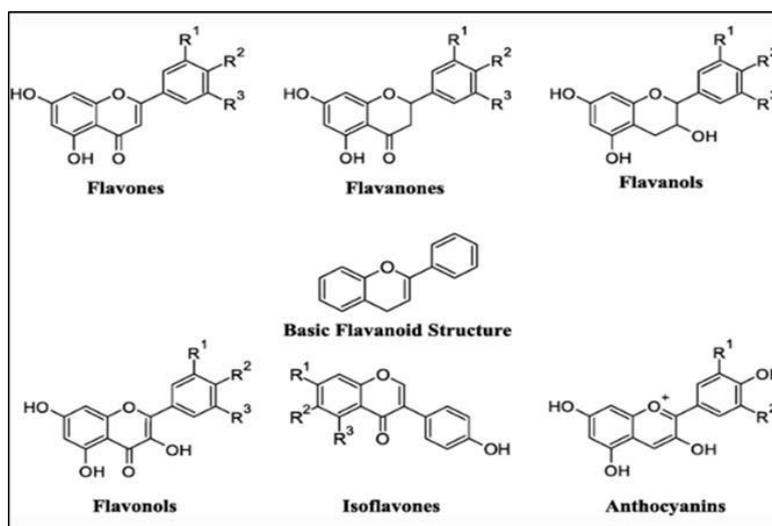
### ▪ Les acides phénoliques

représentent la classe la plus simple de composés phénoliques : leur base, leur structure contient un anneau phénolique et un acide carboxylique, et, selon leur squelette de carbone, ils sont divisés

en deux groupes : les acides hydroxybenzoïques (C6 à C1) qui sont dérivés de l'acide benzoïque et des acides hydroxycinnamiques (C6 à C3) qui sont dérivés de l'acide cinnamique, dont les acides caféique et férulique, qui sont les plus courants et sont présents dans les légumes, les fruits et les grains. Ces composés ont plusieurs activités biologiques importantes, ils sont considérés des antioxydants en raison du don d'un atome d'hydrogène et un électron aux radicaux libres, provoquant la rupture de la réaction en chaîne de l'oxydation. Cet effet dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles (**Albuquerque *et al.*, 2021**)

### ▪ Les flavonoïdes C6-C3-C6

seraient le type de phénol le plus fréquent dans la nature. Plus de 2 000 de ces composés ont été identifiés, dont plus de 500 retrouvés à l'état libre (**Mir *et al.*, 2020**). Un cycle chromane avec un cycle aromatique en positions 2, 3 ou 4 constitue le squelette structural des flavonoïdes. Les flavonoïdes ont été séparés en différents groupes en fonction du degré d'oxydation de l'anneau central (anneau C) (**Figure 4**). Les flavones et flavonols sont les plus répandus. Les flavones et leurs composés apparentés sont souvent jaunes (latin *flavus*=jaune) (**Sharma *et al.*, 2019 ; Rakesh Mutha *et al.*, 2021**).



**Figure 4:** Structure chimique des classes de flavonoïdes (**Mir *et al.*, 2020**).

### ▪ Les tanins (C15) n

Les composés phénoliques sont également connus sous le nom de polyphénols et comprennent les tanins, classés comme hydrolysables ou condensés avec une structure complexe (**Figure 5**) (**Luciana, 2023**). Les tanins hydrolysables sont des métabolites végétaux secondaires qui sont considérés comme des combinaisons phénoliques. Les tanins hydrolysables ont suscité l'intérêt ces dernières années en raison de leur activité biologique (**Kumar Das *et al.*, 2020**).

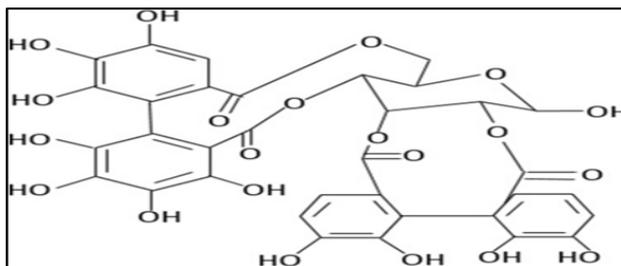


Figure 5 : Structure chimique de tanins hydrolysables (Amarowicz *et al.*, 2018).

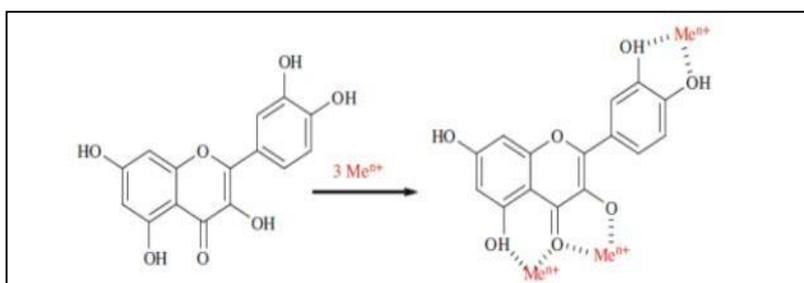
### I.5. Mécanismes d'actions antioxydant des composés phénoliques

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes d'activité antioxydant (Halliwell, 1994). L'activité antioxydant des composés phénoliques augmente avec le degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyle (Macheix *et al.*, 2005).

- **L'inhibition enzymatique** : Les polyphénols ont la capacité d'inhiber de nombreuses enzymes. Des études ont établi des liens entre la structure chimique des flavonoïdes tels que l'apigénine et la quercétine et leur capacité à inhiber la formation de superoxyde en inhibant la xanthine oxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur). Les résultats de ces études sont les suivants : Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols ne sont pas des inhibiteurs de la xanthine oxydase. L'absence du groupe hydroxyle en position C3 entraîne une légère augmentation de l'activité inhibitrice. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inhibitrices inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine. Les flavonoïdes possédant un cycle B de type catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) sont de bons piègeurs du superoxyde (Tarik med Chaouche, 2014).

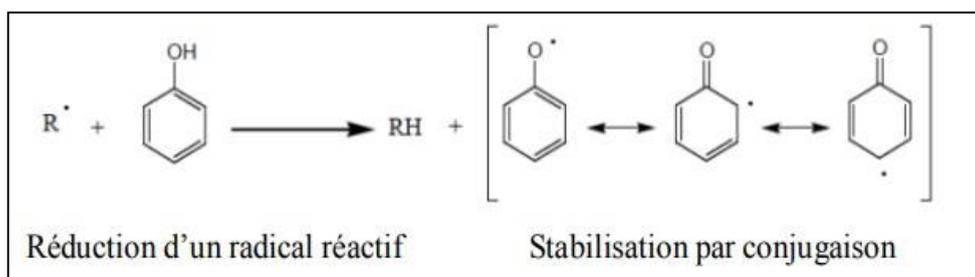
- **La chélation des ions métalliques** implique la liaison de certains ions, tels que le fer et le cuivre, qui sont essentiels à de nombreuses fonctions physiologiques. Ces ions jouent un rôle important dans la composition des hémoprotéines et des cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant. Par exemple, les ions fer sont nécessaires à la biosynthèse de la catalase, tandis que les ions cuivre favorisent la formation de la superoxyde dismutase. Cependant, en présence des ions  $Fe^{+2}$  et  $Cu^{+2}$  en tant que catalyseurs, l'autoxydation favorise la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Certains polyphénols présents dans les plantes et les aliments sont considérés comme de bons agents de chélation des ions métalliques. La chélation des ions métalliques par les polyphénols entraîne généralement un déplacement bathochrome de leur bande d'absorption dans la région UV-Visible (Hider *et al.*, 2001).

- Des études menées par **Van Acker et al. (1996)** sur la chélation des ions métalliques par certains flavonoïdes ont identifié les sites clés pour cette chélation. Il s'agit des groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, des groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, ainsi que des groupes 4-oxo et 5-hydroxy. Ainsi, la quercétine, qui possède tous ces substituants, est particulièrement efficace en tant que complexant métallique (**Figure 6**).



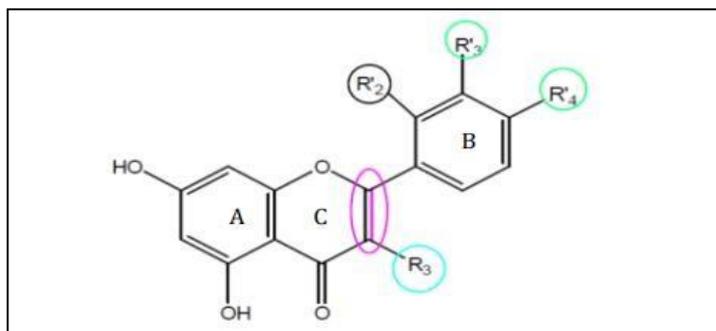
**Figure 6** : Sites de chélation de métal ( $Me^{n+}$ ) pour les flavonoïdes (**Van Acker et al. 1996**)

- Piégeage des radicaux libres** : Les antioxydants de type phénolique, réagissent selon le mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin par un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées (**Figure 7**).



**Figure 7** : Propriétés réductrices des polyphénols (**Sherwin, 1976**).

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols, notamment les flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (**figure 8**). Les critères sont: la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo, la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3, un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique), et enfin, l'effet de la glycosylation qui diminue l'activité des flavones et flavanones (**Chaouche Med T., 2014**).



**Figure 8** : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Sherwin, 1976).

### I.6. Tests d'évaluation de la génotoxicité/antigénotoxicité

Afin de révéler et préserver l'ADN des différentes agressions par les substances potentiellement génotoxiques, une panoplie de tests ont été élaborés pour l'évaluation et la détection précoce des effets délétères de substances qui peuvent porter préjudice à l'intégrité de cette molécule. Il existe des tests *in vivo* et *in vitro* qui permettent de détecter l'effet génotoxique, les mécanismes et les interactions impliquées dans sa génotoxicité, on cite les plus couramment utilisés :

- **Test d'aberration chromosomique** : La recherche des aberrations chromosomiques (AC) est l'un des plus anciens tests de génotoxicité. La technique consiste à rechercher les anomalies au niveau du caryotype, tels que les modifications du nombre de chromosome (aneuploïdie) ainsi que des anomalies de structure des chromosomes (délétions, translocations, inversions...). Cette technique peut être utilement complétée par de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), qui permet de déterminer plus précisément les régions et séquences chromosomiques impactées (Darne *et al.*, 2021).

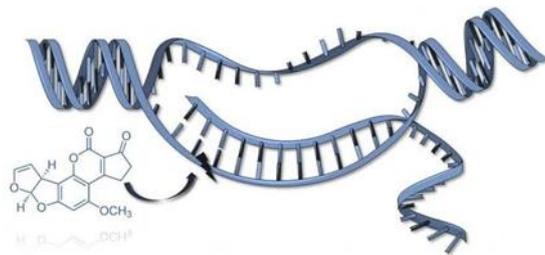
- **Test de Ames** : Le test de mutation inverse bactérienne, également appelé test de salmonelle, est le test de génotoxicité le plus couramment utilisé pour évaluer la mutagénicité et l'antimutagénicité de molécules ; il s'agit d'un élément principal des données d'évaluation de la sécurité chimique requises par les organismes de réglementation du monde entier (Madia *et al.*, 2020). Ce test mesure les dégâts génétiques sur une seule base dans l'ADN (Krishna *et al.*, 2019). Les souches utilisées dans le test comportent une mutation précédemment induite dans l'un des gènes de l'opéron histidine qui rend les bactéries incapables de synthétiser l'acide aminé histidine (bactéries auxotrophes vis-à-vis de l'histidine), et par conséquent, elles sont incapables de se développer dans un environnement sélectif où l'histidine n'est pas présente (Mortelmans et Zeiger, 2000).

- L'exposition à un agent mutagène provoque de nouvelles mutations dites réverses dans cette même région de l'ADN restituant le phénotype sauvage. Ces souches nouvellement mutées sont donc capables de synthétiser l'histidine (**Dégremont et Cachot, 2009; Jin, 2016**).

- **Test des micronoyaux** : Le test des micronoyaux est une méthode d'évaluation de la fréquence des érythrocytes micronucléés parmi les érythrocytes normaux. Ces MN peuvent être formées par deux mécanismes : ruptures chromosomique ou perturbation de l'appareil mitotique. Ils ne représentent pas seulement des pertes chromosomiques, mais également le résultat de l'amplification de l'ADN. Donc le but du test de micronoyau est de détecter des produits qui induisent une fragmentation chromosomique ou une perte chromosomique au cours de la division cellulaire qui ne sont pas intégrés dans le noyau de la cellule fille (**Berthelot et al., 2013**).

- **Test de comètes** : Le test de comète est une microtechnique électrophorétique, permettant la visualisation directe des dommages à l'ADN, cette technique utilisée de plus en plus dans la détection de la génotoxicité dans les essais *in vitro*, basée sur le principe que l'ADN fragmenté qui migre plus rapidement que l'ADN intact sous électrophorèse à travers une matrice d'agarose. Donc l'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose, auxquelles on applique un détergent pour perturber les membranes et éliminer les histones, puis soumises à une électrophorèse. En présence de ruptures de brins, l'ADN migre vers l'anode formant une image ressemblant à la queue d'une comète, lorsqu'il est coloré avec un colorant fluorescent et vu sous microscopie à fluorescence. Donc le test des comètes est utilisé dans les études de surveillance humaine en tant que bio-marqueur de l'exposition à des agents causant des dommages à l'ADN.

D'autres parts, des tests *in vitro* sont également mis en œuvre afin de révéler les dommages qui peuvent être infligés à l'ADN à l'échelle moléculaire, à savoir et les modifications des bases azotés par les réactions de nitrosylation et les lésions sur le squelette carboné par le test de dégradation du désoxyribose, C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail expérimental de cette étude ayant pour objectif l'évaluation de la génotoxicité et/ou l'antigénotoxicité à travers la dégradation ou la protection du désoxyribose par différents types de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes et tannins) dans différents milieux réactionnels (**Cordelli et al., 2021**).



## *Chapitre II*

# *Matériels et méthodes*

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Produits chimiques

- Acétate de potassium ( $C_2H_3KO_2$ )
- Acide acétique ( $C_3COOH$ )
- Acide ascorbique ( $C_6H_8O_6$ )
- Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ )
- Acide gallique ( $C_7H_6O_5$ )
- Acide thiobarbiturique (TBA)
- Acide trichloracétique (TCA)
- Chlorure d'hydrogène (HCl)
- Chlorure ferrique ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )
- Chlorure ferrique ( $FeCl_3$ )
- Désoxyribose ( $C_5H_{10}O_4$ )
- Diméthylsulfoxyde ( $C_2H_6OS$ , DMSO)
- Eau distillée obtenue par un distillateur GFL 2104
- Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
- Phosphate disodique ( $Na_2HPO_4$ )
- Phosphate monopotassique ( $KH_2PO_4$ )
- Quercétine ( $C_{15}H_{10}O_7$ )
- TPTZ: 2, 3,5-Triphenyltetrazolium chloride.

#### II.1.2. Matériel et verreries

- La balance électronique AS 220/C/2 (Précision).
- Plaques agitrices (VELP Scientifica AM4).
- Bain Marie
- Spectrophotomètre
- Micropipettes
- pH-mètre
- Microplaques 96 puits
- Lecteur microplaque.
- Becher, éprouvette, erlenmeyer, Barreaux magnétiques, tubes en verre, cuve, eppendorfs, spatules, pissette, béchers.

### II.2. Méthodes

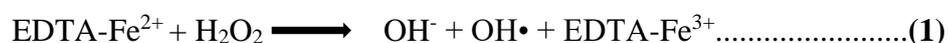
L'évaluation des effets génotoxiques/antigénotoxiques *in vitro* de quelques composés phénoliques (acide gallique, acide caféique), deux flavonoïde (rutine, quercétine) et un extrait de tannins hydrolysable, a été menée dans cette présente étude principalement par un test de dégradation du désoxyribose dans différents milieux réactionnels et complété par un test d'évaluation de la capacité réductrice du fer (FRAP).

#### II.2.1. Test de dégradation du désoxyribose (TBARS)

Le test de dégradation du désoxyribose a été mené par la méthode de **Halliwell (1987)** adoptée dans **Suaib Luqman et al. (2012)**. Elle est basée sur la génération du radical hydroxyle en présence et en absence des différentes substances phénoliques dans les divers milieux réactionnels et évaluer leurs impacts sur la dégradation et/ou la protection du désoxyribose révélé par la détection des Malondialdéhydes (MDAs) produits. Cinq substances phénoliques purs, ont été explorées dans cette étude pour leur pouvoir de dégradation ou de protection du désoxyribose dans différents mélanges réactionnels, en fonction de leurs concentrations.

Ce test consiste à évaluer donc la capacité, de chaque substance phénolique testée à piéger les groupements hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ) formés par la réaction de Fenton en mesurant la génération de radical  $\text{OH}$  et son effet sur l'oxydation et la dégradation de la molécule biologique, telle que le désoxyribose de l'ADN.

Dans cette technique le système implique l'auto-oxydation de complexe ( $\text{EDTA-Fe}^{2+}$ ) dans un milieu aqueux pour former  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , selon la réaction **(1)**, qui est rapidement dismuté en  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $\text{pH}=7.4$ , puis se dernier va interagir avec le  $\text{Fe}^{2+}$  pour former les radicaux  $\cdot\text{OH}$ ,

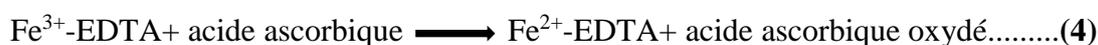


Les  $\text{OH}\cdot$  générés, qui ne sont pas piégés, attaquent et dégradent le désoxyribose en clivant son cycle furanique cyclique pour générer les MDAs (Réaction **2**) qui sont révélés par l'acide thiobarbiturique ((Réaction **3**).



## II. Matériel et Méthodes

La dégradation du désoxyribose peut être augmentée en présence d'un agent réducteur, tels que l'acide ascorbique, comme illustré dans la réaction (4). De plus, une l'addition d'une quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplémentaire à la réaction peut aussi accélérer le taux de dégradation du desoxyribose.



L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles par les composés phénoliques est menée dans cette étude, en mesurant leurs capacités à prévenir la dégradation oxydative du désoxyribose, selon un test développé par **Lopes et al. (1999)**.

Une prise d'essai de 150µl de solutions de composés phénoliques est mise en présence d'un mélange réactionnel contenant: 150µl d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 10mM), 250µl de désoxyribose (10mM), 150µl de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 150µl de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM) et 150µl de l'acide ascorbique, puis incubée à 37°C pendant 60 min. Les substances phénoliques ont été solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et dilués avec de l'eau distillée, afin d'obtenir les concentrations finales de 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml de réactions. Ce test a été mené dans différents milieux réactionnels **A**, **B**, **C** et **D** dont la composition est précisée dans le **tableau III**.

**Tableau III** : Composition des mélanges réactionnels **A**, **B**, **C** et **D** pour générer la formation des chromogènes rose .

Mélange réactionnel	Composition
<b>A</b>	250 µl Désoxyribose (3,75 mM), 150 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM), 150 µl FeCl <sub>3</sub> (100 µM), 150 µl EDTA (100 µM), 150 µl acide ascorbique (100 µM)
<b>B</b> (A Sans l'EDTA)	250 µl Désoxyribose (3,75 mM) 150 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM) 150 µl FeCl <sub>3</sub> (100 µM) 150 µl acide ascorbique (100 µM)
<b>C</b> (A Sans l'acide ascorbique)	250 µl Désoxyribose (3,75 mM) 150 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM), 150 µl FeCl <sub>3</sub> (100 µM), 150 µl EDTA (100 µM),
<b>D</b> (A Sans l'EDTA et l'acide ascorbique)	250 µl Désoxyribose (3,75 mM) 150 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)

	150 µl FeCl <sub>3</sub> (100 µM)
--	-----------------------------------

Dans chaque milieu, la réaction consiste à générer les radicaux hydroxyles qui vont agresser le désoxyribose. Elle est arrêtée à la fin de l'incubation par l'addition de 150µl d'acide trichloroacétique (TCA à 4%), puis la détection des MDAs par l'ajout de 150µl d'acide thiobarbutirique (TBA à 2%), suivi d'un chauffage dans un bain Marie bouillant pendant 15min. Après refroidissement de l'échantillon, l'absorbance du chromogène rose formé est mesurée par un spectrophotomètre à 532 nm. Toutes les déterminations ont été effectuées en trois répétitions. La quantité des MDAs produites a été estimée par la conversion des absorbances en concentrations relatives des MDAs (µMole MDAs/ml), par le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 1.56 \cdot 10^{-5} \text{ cm.nmol}^{-1}$ .

### II.2.2. Test de capacité réductrice ferrique d'antioxydants (FRAP)

FRAP (ferrique reducing antioxydant power) est un test colorimétrique qui permet de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le fer du complexe incolore ( $\text{Fe}^{3+}\text{TPTZ}$ ) en ( $\text{Fe}^{2+}\text{TPTZ}$ ). Ce test est basé sur la réduction directe du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) coloré en bleu qui est déterminée par la détection spectrophotométrique à une longueur d'onde de 490 nm (**Maksimovič *et al.*, 2009**).

Cette manipulation a été réalisée sur microplaque de 96 puits suivant la méthode décrite par **Vercruysse *et al.* (2009)** en ajoutant 20µl de chaque solution des composés phénoliques (acide caféique, acide gallique, la rutine, la quercétine et l'extrait de tannins) à plusieurs concentrations testés (10µg/ml, 25 µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 250µg/ml, 500 µg/ml), avec 180µl de la solution FRAP. Cette dernière a été préparée en mélangeant 10ml d'un tampon acétate (300mM pH ajusté à 3,6 en ajoutant l'acide acétique), 1ml de chlorures ferriques hexahydratées (20mM dans l'eau distillée) et 1ml de TPTZ (10mM dans 40mM HCl). L'absorbance a été mesurés après 10 min à 490 nm. Les substances phénoliques ont été testées à différentes concentrations allant de 10 µg/ml à 500µg/ml. Les résultats ont été exprimés en µg eq FeSO<sub>4</sub>/ml.

### Analyse statistique

Les résultats obtenus sont la moyenne  $\pm$  SEM (n=6), les résultats ont été traités par une analyse One-way ANOVA à l'aide du logiciel GRAPHPAD version 5. La valeur  $P \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.



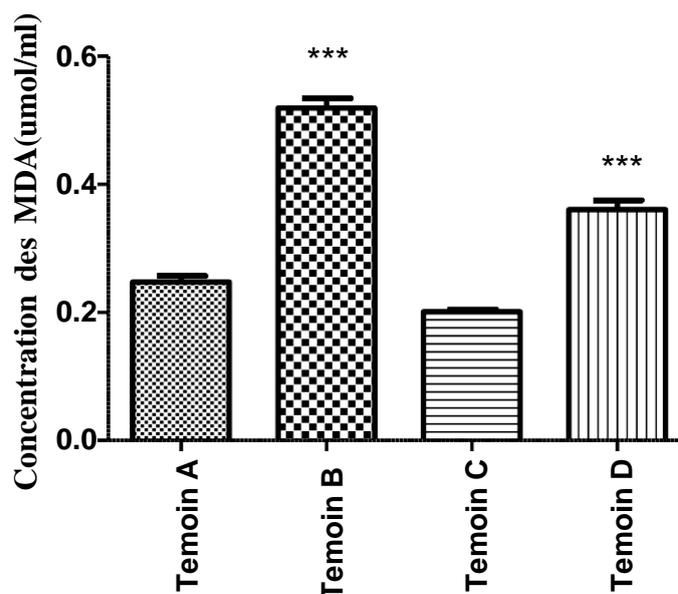
## *Chapitre III*

# *Résultats et discussions*

#### III.1. Résultats des tests de dégradation du désoxyribose

##### III.1.1. Essai de dégradation du désoxyribose (HRS)

Le test de désoxyribose mené dans cette étude a pour but de suivre la dégradation de désoxyribose dans un milieu réactionnel, selon la procédure décrite précédemment. Différentes concentrations de l'échantillon (100, 250 ,500 $\mu$ g/ml) ont été mélangées avec 850  $\mu$ l de chaque mélange réactionnel (A, B, C et D). Les résultats des tests sont représentés ci-dessous :



**Figure 09** : Effet de piégeage des radicaux hydroxyle dans les quatre mélanges réactionnels. Témoins (A) : En présence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Témoins (B) En absence d'EDTA . Témoins (C) en absence d'acide ascorbique. (D) en absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  Ecartype. Les résultats sont considérés significatifs à \* $P < 0.05$ .

D'après l'histogramme ci-dessus on constate que le taux de la formation des MDA dépend de la présence ou l'absence d'EDTA dans le milieu, car l'inhibition de la dégradation du désoxyribose dépendante du fer en l'absence d'EDTA dépend non seulement de la capacité d'un piègeur à réagir avec le radical  $\bullet$ OH mais également de sa capacité à former des complexes avec le fer.

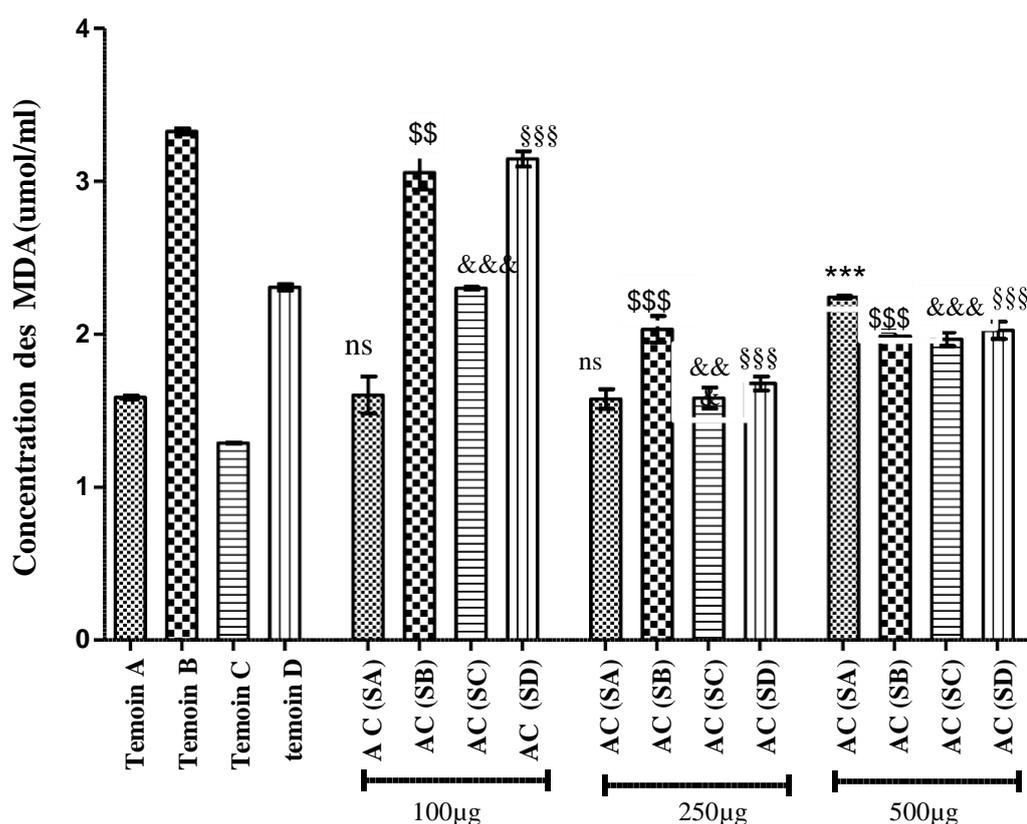
L'expérience a été réalisée dans quatre conditions pour dériver deux différences distinctes, à savoir le rôle sur le piégeage des hydroxyles et le rôle de la chélation des métaux. Ces conditions sont appelées « essai non spécifique au site », où l'EDTA est ajouté et l'autre est « essai spécifique au site », où l'EDTA n'est pas ajouté. Dans le premier cas, l'EDTA forme un complexe avec  $Fe^{3+}$  et des radicaux hydroxyles sont générés en solution, alors que dans le second, l'EDTA n'est pas disponible, par conséquent,  $Fe^{3+}$  peut se lier directement à la molécule du désoxyribose et produire

lui-même des radicaux hydroxyles. Ce qui fait qu'en l'absence d'EDTA la concentration des MDAs est significativement augmentée pour atteindre un seuil de 3,3  $\mu\text{mol/ml}$ , l'ajout de tout composé qui peut réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  stimulera d'avantage le rejet de  $\cdot\text{OH}$  et l'oxydation subséquente du désoxyribose (Graft *et al.*, 2016).

#### III.1.1. Etude de pouvoir génotoxique /anti génotoxique des composés phénoliques à différentes concentrations par le test de dégradation du désoxyribose

L'estimation de la dégradation du désoxyribose a été exprimé par le taux des MDAs produits dans les différents mélanges réactionnels A, B, C, et D, en présence de différentes concentrations de cinq composés phénoliques dont : L'acide caféique, l'acide gallique, la quercétine, la rutine et l'acide tannique. Les résultats en présence de concentrations croissantes de ces substances sont illustrés dans les histogrammes des figures 9, 10, 11, 12 et 13, respectivement.

##### A) L'acide caféique

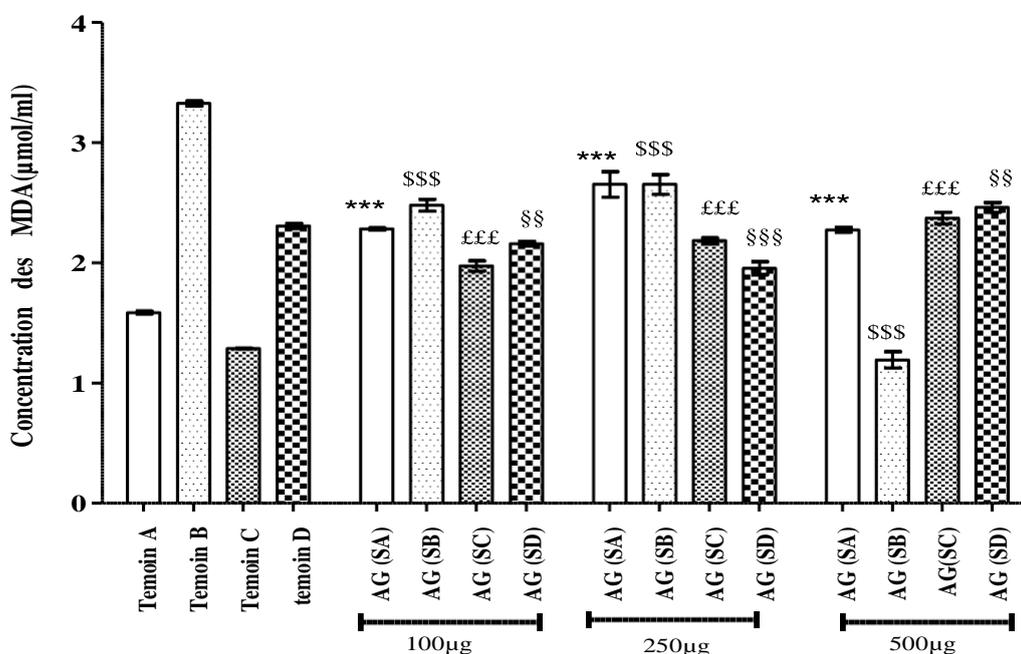


**Figure 10** : Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentration de l'acide caféique(AC) dans milieu réactionnel, A : présence de tous les composés,B : Absence d'EDTA, C : Absence de l'acide ascorbique, D : Absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecartype. (n=3). Les résultats sont considérés significatifs à \*P<0.05,  $^{\$}$ P<0.05,  $^{\$}$ P<0.05,  $^{\$}$ P<0.05 comparés aux témoins A, B, C et D, respectivement.

D'après ces histogrammes on observe une augmentation des taux des MDAs en fonction de la concentration de la substance phénolique pour atteindre un seuil de 3µmol/ml en absence d'EDTA, et de l'acide ascorbique à une concentration de 100 µg/ml de l'acide caféique. On constate que la différence entre les taux des MDAs libérés augmente de façon dépendante de la présence et l'absence de l'EDTA et de l'Acide ascorbique. En effet, ces taux augmentent de façon importante en absence d'EDTA en raison de la réduction de l'activité anti-oxydante du composé phénolique.

Dans le système A, l'acide caféique a augmenté le taux des MDAs à une concentration de 500µg/ml, on suppose qu'il a joué un rôle d'un peroxydant. Dans le système B, ce même composé a réduit le taux des MDAs d'une façon significative (\*P<0,05) en absence d'EDTA. Ceci est confirmé dans le système C (absence d'acide ascorbique), où le taux de MDAs a diminué et qui a augmenté par l'ajout de l'acide caféique à toutes les concentrations. Ce qui suggère que l'acide caféique a joué un rôle d'agent réducteur comparable à l'acide ascorbique. Cet effet de l'acide caféique s'est accentué dans le système D (absence d'EDTA et de l'acide ascorbique) à une concentration 100µg/ml, un effet qui a diminué à de plus fortes concentrations (250µg et 500µg), probablement lié à un encombrement réactionnel dans le milieu.

#### B) L'acide gallique



**Figure 11** : Evaluation des taux des MDAs formés à différentes concentrations de l'acide gallique (AG) milieu réactionnel, A : présence de tous les composés, B : Absence d'EDTA, C : Absence de l'acide ascorbique, D : Absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la

### III. Résultats et discussion

moyenne±Ecartype (n=3). Les résultats sont considérés significatifs à \*P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05, <sup>‡</sup>P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05 comparés aux témoins A, B, C et D, respectivement.

D'après les histogrammes, on constate que le taux des MDAs formés aux concentrations de 100, 250, 500 µg /ml augmentent significativement dans la solution A et C en présence et en absence de l'acide ascorbique. En effet, l'acide gallique a entraîné une activité génotoxique à une concentration de 100 µg/m et cela est expliqué par le fait que l'acide gallique a réduit l'activité antioxydante d'acide ascorbique dans la solution A.

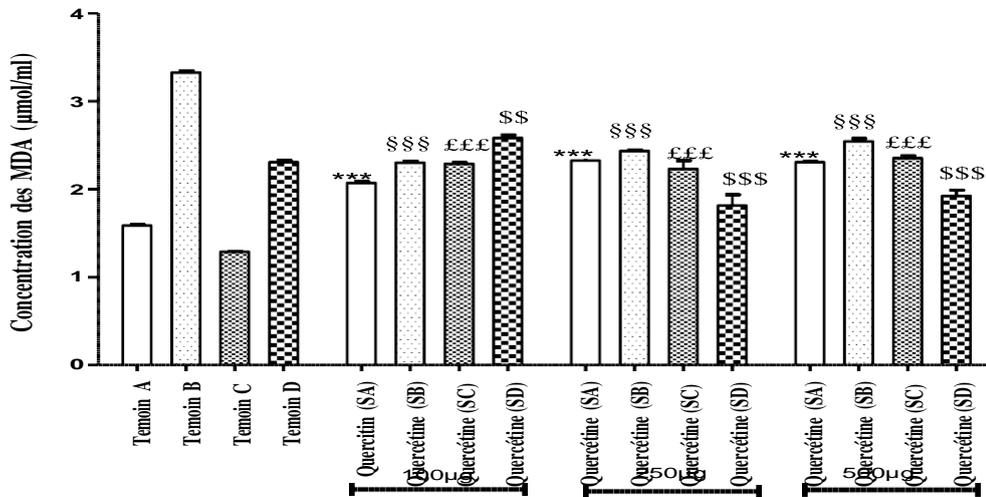
D'autre part, le taux des MDAs diminue significativement en absence d'EDTA, ce qui est expliqué par le fait que l'acide gallique a entraîné une diminution d'activité génotoxique. Donc le comportement de l'acide gallique dépend du composant présent dans le milieu réactionnel. Dans le système A (présence de tous les composés), le taux des MDAs a augmenté significativement par l'ajout de l'acide gallique à des concentrations de 100, 250, 500µg/mL. Ce qui suggère que l'acide gallique a un rôle prooxydant mais différent de l'acide caféique. Dans le système B, ce même composé phénolique a réduit le taux des MDAs par toutes concentrations testées, ce qui suggère que l'acide gallique en absence d'EDTA exerce un effet antioxydant. Par contre dans le système C, en absence de l'acide ascorbique, le taux des MDAs augmente significativement à de différentes concentrations (100, 250 ,500µg/ml), un effet qui est diminué à une concentration de 500 µg/mL, probablement lié à un encombrement interactionnel dans le milieu. Dans le système D en absence d'EDTA et de l'acide ascorbique l'oxydation du désoxyribose reste presque la même pour toutes les concentrations.

L'acide gallique présente à très faibles concentrations des pourcentages d'inhibition Faible.

A une concentration de 100µg/ml les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre de 40% et un pourcentage de 54% à une concentration de 250 µg /mL .

D'après les valeurs obtenues, on à remarquer que l'acide gallique à des concentrations élevées présente un IC50 de 203 µg/mL .

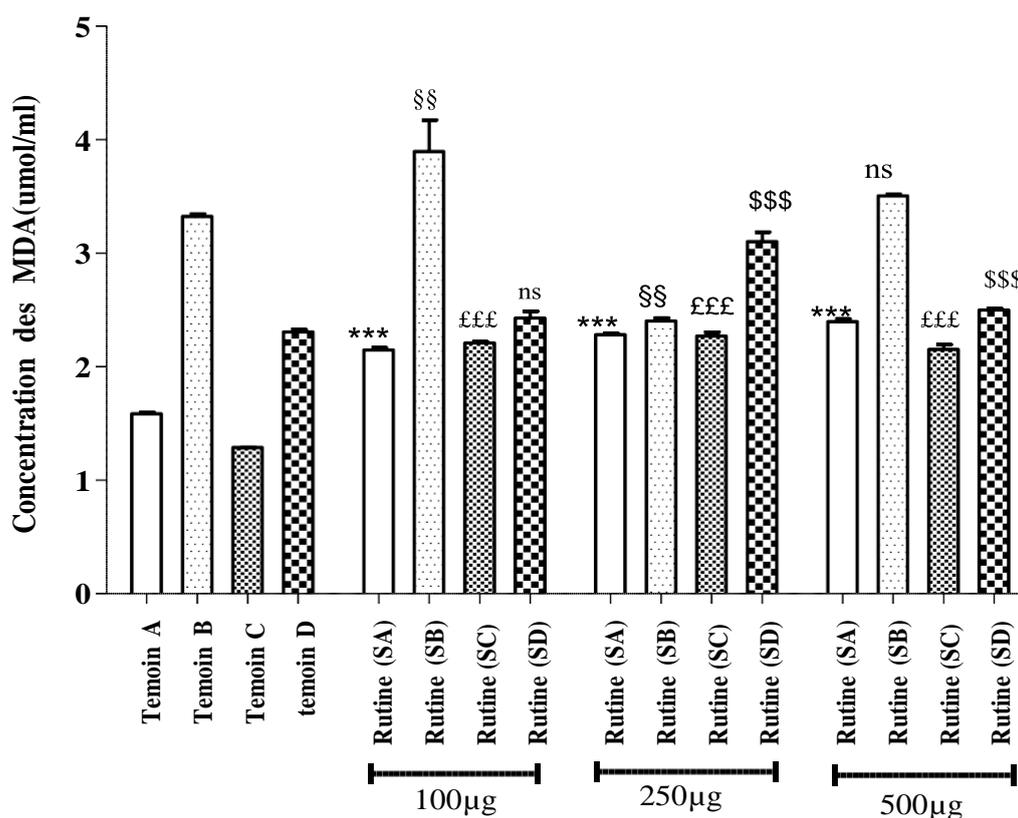
C) La quercétine :



**Figure 12** : Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentration de la quercétine dans milieu réactionnel, A : présence de tous les composés, B : Absence d'EDTA, C : Absence de l'acide ascorbique, D : Absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecartype. (n=3). Les résultats sont considérés significatifs à \* $P < 0.05$ , \$ $P < 0.05$ , £ $P < 0.05$ , § $P < 0.05$  comparés aux témoins A, B, C et D, respectivement.

Le taux des MDAs formés diminue d'une façon significative en absence de l'EDTA a toutes les concentrations ce qui est expliqué par le pouvoir antioxydant de la quercétine. Par contre on constate qu'ils augmentent significativement en absence de l'acide ascorbique à des concentrations de 250µg et 500µg. En effet, dans le témoin A et C l'ajout de la quercétine a accentué le taux des MDAs significativement, ce qui laisse déduire la quercétine a joué un rôle d'un peroxydant à ces concentrations. Contrairement au témoin B ou on remarque clairement la diminution de la teneur des MDAs à toutes les concentrations suggérant une forte activité antioxydante. Par ailleurs, dans le mélange réactionnel D, le taux des MDAs en présence de la même substance marque une augmentation significative, ce qui implique la prooxydation à la concentration 100µg et une diminution aux concentrations de 250µg et 500µg laissant suggérer que cette diminution revient au pouvoir antioxydant de la quercétine. Les résultats montrent que la quercétine est généralement un antioxydant plus puissant que son dérivé rhamnosyl glucoside (rutine).

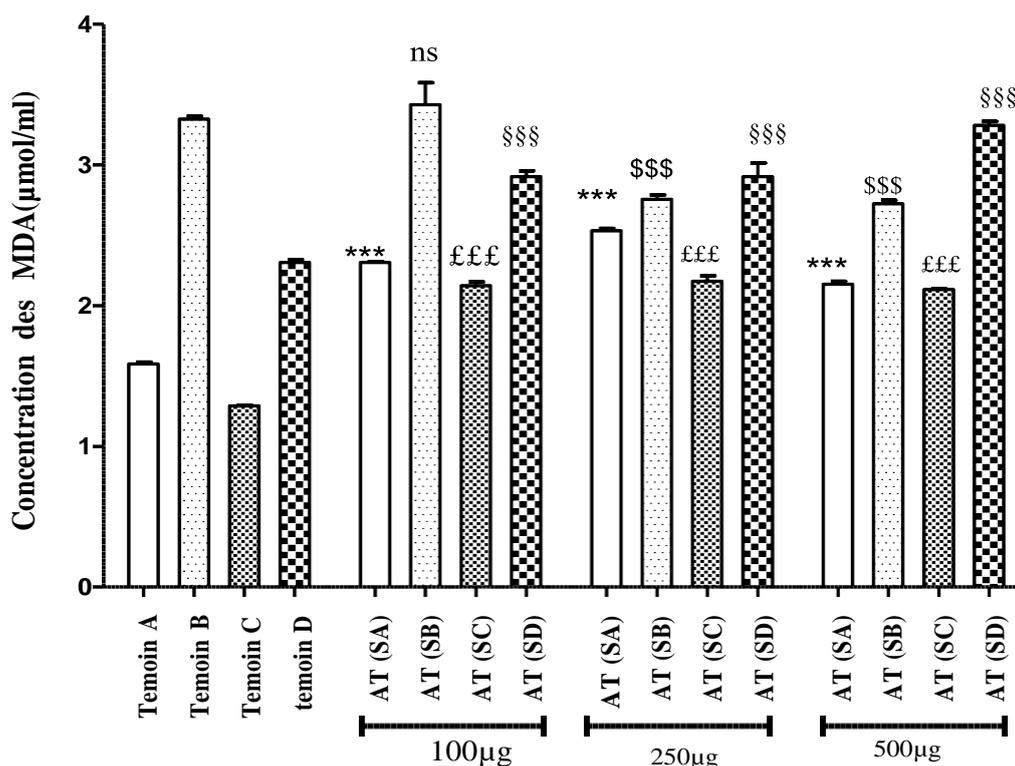
#### d) La rutine



**Figure 13 :** Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentrations de la rutine dans les milieux réactionnels, A : présence de tous les composés, B : Absence d'EDTA, C : Absence de l'acide ascorbique, D : Absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecartype. (n=3). Les résultats sont considérés significatifs à \*P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05, <sup>£</sup>P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05 comparés aux témoins A, B, C et D, respectivement.

Les histogrammes montrent qu'en absence de l'EDTA et de l'acide ascorbique le taux des MDASs augmente significativement, ce qui explique l'activité génotoxique de la rutine, ce taux diminue en absence de l'EDTA à une concentration de 250µg/ml donc la rutine inhibe la dégradation du désoxyribose à cette concentration. Dans la réaction A, le taux des MDA en présence de tous les composés et l'addition des différentes concentrations de la rutine reste stable dans tous les mélanges réactionnels, ce qui peut être expliqué par la dualité des effets antioxydant et prooxydant de la rutine.

#### e) L'acide tannique

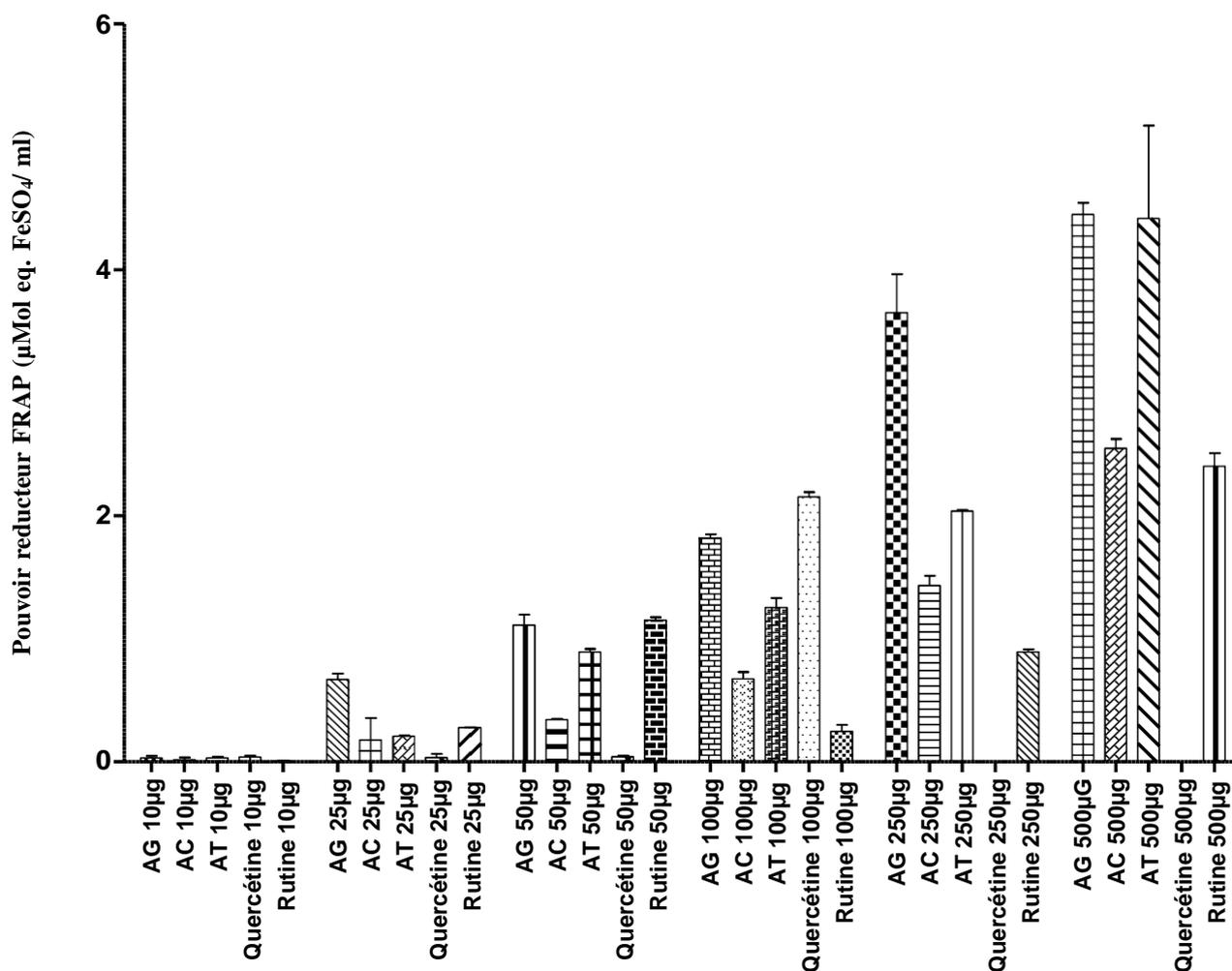


**Figure 14 :** Evaluation des taux des MDA formés à différentes concentrations de l'acide tannique (AT) dans les milieux réactionnels, A : présence de tous les composés, B : Absence d'EDTA, C : Absence de l'acide ascorbique, D : Absence d'EDTA et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecartype. (n=3). Les résultats sont considérés significatifs à \*P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05, <sup>£</sup>P<0.05, <sup>§</sup>P<0.05 comparés aux témoins A, B, C et D, respectivement

D'après les observations dans les différents mélanges réactionnels, à savoir l'augmentation des teneurs des MDAs induite par toutes les concentrations de l'acide tannique dans les systèmes A, C et D suggère un comportement de la molécule comme pro-oxydant, favorisant la dégradation du désoxyribose de ces milieux réactionnels. Dans le système B, en absence de l'EDTA le taux des MDAs produits est stable aux concentrations de 100µg et réduite à 250µg et 250µg, suggérant une saturation et un encombrement interactionnel dans le mélange réactionnel.

#### III.1.1. Résultats du test de capacité antioxydant par réduction du fer (FRAP)

C'est une analyse de l'activité anti-oxydante rapide basée sur la capacité des composés phénoliques à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ , les résultats sont présentés dans la figure suivante :



**Figure 15:** Les résultats du test FRAP illustrant le pouvoir réducteur des composés phénoliques AG : acide gallique, AC : Acide caféïque, AT : Acide tannique, Quercétine, Rutine) en fonction des concentrations. Toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne  $\pm$ SD (n=3). \*P <0 .05.

La figure ci-dessus représente le pouvoir réducteur des substances phénoliques ; résultant du test FRAP. Les résultats montrent une très faible activité à 10µg/mL. A partir de 25µg/ml, le pouvoir réducteur commence à se manifester par de faibles réductions du  $Fe^{3+}$ -TPTZ en un  $Fe^{2+}$ -TPTZ, pour s'accroître et s'exprimer par de plus significatifs pouvoirs réducteurs pour l'acide gallique et l'acide tannique aux concentrations de 100µg/ml 250µg/ml 500µg/ml. L'acide caféique et la rutine présentent une activité réductrice stable à différentes concentrations, ce qui témoigne d'une concentration excessive de la substance phénolique dans le milieu réactionnel.

#### III.2. Discussion

Les composés phénoliques sont importants dans le mécanisme de signalisation et de défense chez les plantes, les hommes et les animaux. Ils combattent le stress abiotique et le stress causé par les organismes pathogènes et les prédateurs. Ils se trouvent comme des précurseurs de composés de plus grande complexité ou de l'intervention dans les processus de la régulation et du contrôle de la croissance des plantes. Comme ils ont la capacité d'agir comme donneur d'hydrogène ou de chélater les ions métalliques comme le fer le cuivre, en inhibant l'oxydation (**Santos- sanchez, 2019**).

Ce travail consistait à évaluer *in vitro*, l'activité génotoxique et anti-génotoxique des composés phénoliques en utilisant un test basé sur la dégradation du désoxyribose et le pouvoir antioxydant de ces composés. La méthode la plus couramment utilisée comme mesure du stress oxydatif pour déterminer la MDA est la méthode spectrophotométrique basée sur la formation du complexe MDA-thiobarbiturique (MDA-TBA) fluorescent rose absorbant à 532 nm, qui se produit après la réaction de la MDA avec l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) à faible pH et à haute température (**Reitznerová et al., 2017 ; Mas, 2021**).

L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et extincteurs d'oxygène singulet. De plus, ils ont un potentiel de chélation des métaux. La présence de structures cycliques conjuguées et de groupes hydroxyles leur permettent de piéger activement les radicaux libres (**Samak et al., 2009**).

**Cheng et al. (2003)** ont choisi un groupe de composés phénoliques pour examiner leurs interactions avec le fer et leur impact sur la formation des radicaux hydroxyles dans un système de réaction de Fenton. Lorsque le désoxyribose était exposé aux radicaux hydroxyle générés par le réactif de Fenton il a subi une oxydation. La dégradation oxydative peut être détectée en chauffant les produits avec de l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) dans des conditions acides, ce qui

entraîne la formation d'un chromogène rose, une espèce réactive de l'acide thiobarbutirique TBARS. Lorsque les composés phénoliques, entrent en compétition avec le désoxyribose pour réagir avec les radicaux hydroxyles, ils réduisent significativement la formation du chromogène.

Dans notre étude, l'effet génotoxique et anti génotoxique de l'acide caféique dépendra pas seulement de la dose mais plutôt de la présence et l'absence des composant du milieu réactionnel. Alors que dans une autre étude **Genaro (2015)**, ils ont caractérisé l'effet antioxydant de l'acide caféique en augmentant la molécule cible du radical hydroxyle, ils ont constaté que l'acide caféique a empêché l'oxydation du désoxyribose dans toutes les conditions expérimentales. De plus, l'augmentation de la concentration du désoxyribose n'a pas influencé l'effet de l'acide caféique relatif, car dans toutes les conditions, le pourcentage d'inhibition est resté inchangé.

Ces tests de compétition suggèrent que l'action inhibitrice sur la dégradation du désoxyribose ou la capacité de ces molécules (dont l'acide caféique) à chélater les ions du fer est proportionnelle à la concentration du métal dans le milieu réactionnel. Ainsi, plus la concentration de métal dans le milieu est élevée, plus la capacité de l'acide caféique et d'autres antioxydants chélateurs du fer à former un complexe de fer et à empêcher l'oxydation de la cible médiée par les radicaux hydroxyles est faible, cela indique que leur potentiel antioxydant. De plus il a été rapporté que la capacité chélatrice du fer de l'acide férulique et de l'acide caféique a été mesurée *in vitro*, puis les résultats ont montré que la capacité de chélation du fer était de 61 et 58 % pour l'acide caféique (800 µg/ml) (**Aalikhani et al., 2022**).

Le changement des énergies libres lors de la réaction d'oxydation, où le peroxyde d'hydrogène réagit directement avec le centre métallique pour produire le radical hydroxyle, confirme que le fer(II) complexé par acide caféique est moins actif envers le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que lorsqu'il est dissous de manière pure (**Mazzone, 2019**).

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peut être impliqué dans l'activité mutagène du café instantané. Alors que les grains de café vert n'ont pas une capacité significative de produire du peroxyde d'hydrogène, il est suggéré que les molécules phénoliques formées pendant la décomposition de l'acide chlorogénique dans le café torréfié pourraient être responsables de sa génération. Les molécules phénoliques, en particulier à des valeurs de pH supérieures à la neutralité, peuvent déprotonner et réagir avec l'oxygène pour produire des anions superoxydes, qui conduisent ensuite à la formation de peroxyde d'hydrogène. Plusieurs composés phénoliques présents dans le café torréfié, comme l'acide caféique, le catéchol, l'hydroquinone, l'acide pyrogallol et l'acide chlorogénique, ont démontré leur capacité à favoriser la dégradation du désoxyribose, en

particulier à des valeurs de pH supérieures à la neutralité, en présence de  $\text{Fe}^{3+}$  et d'EDTA. Cette activité de dégradation est probablement accélérée par le peroxyde d'hydrogène (**Duarte et al., 1999**).

L'acide gallique de sa part, a réduit les taux des MDAs significativement ( $***P < 0.05$  en absence de l'EDTA, ce qui est expliqué par le fait que l'acide gallique a entraîné une diminution d'activité génotoxique. Donc l'activité exhibée par l'acide gallique (géo/antigénotoxique) dépend de la composition du le milieu réactionnel. Des études réalisées par **Gow et al. (2002)** ont déduit que l'activité de l'acide ascorbique et l'acide gallique peuvent être attribuées au  $\text{Fe}^{3+}$  qui a été réduit au  $\text{Fe}^{2+}$  par l'acide ascorbique et l'acide gallique, ce qui a stimulé la formation des  $\cdot\text{OH}$ , cependant à une concentration plus élevée de l'acide ascorbique et l'acide gallique, ils peuvent récupérer sensiblement le  $\cdot\text{OH}$  et réduire les dommages oxydatifs du désoxyribose.

Des études réalisées par **Yen et al, (2002)** ont observé que l'acide gallique a montré un effet prononcé dans le test de dégradation du désoxyribose non spécifique au site par rapport au test spécifique au site, indiquant que les substances agissent mieux : c'est à dire plus piègeur de radicaux OH que les agent chélateurs. Il a été rapporté dans la même étude que les plantes riches en acide gallique sont connues pour avoir des propriétés antioxydantes, et la présente étude soutien également le potentiel de piégeage des radicaux libres de l'acide gallique.

Deux flavonoides ont été étudiés dans cette étude à savoir la quercétine et son dérivé glycosylé, la rutine. La quercétine appartient à la classe des flavonoides, et la sous classe des flavonols. Des études ont montré que la dégradation du désoxyribose par la quercétine pourrait produire soit en présence de  $\text{Fe}^{3+}/\text{EDTA}$  ou  $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ , ou bien le  $\text{Fe}^{3+}$  seul sans agent chélateur, Le plus grand effet de la quercétine sur la dégradation du désoxyribose s'effectue en présence de  $\text{Fe}^{3+}$  et l'EDTA. Ce qui est accordé dans cette étude où la quercétine en absence de l'EDTA a montré une diminution de la dégradation du désoxyribose, ce qui est exprimé par le taux significativement faible de la formation des MDAs (**Gaspar et al., 1994**). Plusieurs flavonoïdes, tels que la morin, la quercétine, et la myricétine ont été signalés pour accélérer la génération de radicaux hydroxyle et pour stimuler la dégradation du désoxyribose en présence de  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Laughton et al., 1989**). Dans plusieurs études, il a été conclu que les flavonoïdes végétaux qui présentent une activité antioxydante *in vitro* fonctionnent également comme antioxydants *in vivo* (**Getha et al., 2004**).

Dans la présente étude, nous avons également exploré le potentiel génotoxique/antigénotoxique d'une molécule de la classe des tannins, l'acide tannique. Des études ont montré que l'efficacité antioxydant de l'acide tannique diminuait à mesure que la concentration de Fer EDTA dans les

solutions augmentait, Ces résultats indiquent également un mécanisme de chélation du fer pour l'action antioxydante de l'acide tannique : plus la quantité initiale de Fer EDTA est élevée, la capacité d'une quantité à la même concentration chélater le fer est proportionnelle à inhiber la dégradation de désoxyribose est faible et à inhiber la dégradation du désoxyribose. Plusieurs études ont affirmé que les groupes phénoliques dans ces composés sont d'excellents nucléophiles (**Cheng et al., 2003**).

Par ailleurs, la capacité générale de chélation des composés phénoliques est probablement liée à la nature fortement nucléophile de leurs cycles aromatiques, plutôt qu'à des groupes chélateurs spécifiques présents dans la molécule. Cependant, la capacité de chélation puissante de certains composés phénoliques peut être attribuée à la présence de groupe pyrogallol, catéchol ou 3-hydroxy-4-carbonyl dans leur structure. Une étude menée par **Van Acker et al. (1996)** a également démontré, en utilisant un système de dosage différent, que les flavonoïdes contenant un groupe catéchol dans leur cycle B sont les bons chélateurs de  $Fe^{2+}$ , en compétition avec l'EDTA.

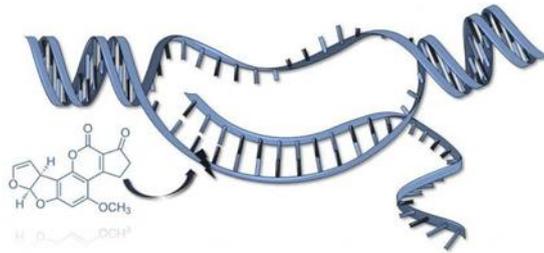
Les groupes catéchol et pyrogallol, le groupe carboxyle des acides phénoliques et le groupe acrylique des acides cinnamiques sont importants pour l'activité réductrice de  $Fe^{3+}$ . La capacité  $Fe^{3+}$ -réductrice des acides cinnamiques peut résider dans le fait que la conjugaison du groupe acrylique avec le cycle aromatique facilite l'oxydation en l'*o*-quinone correspondante. Les flavonols et les flavolanes, sont polyhydroxylés, se lient étroitement  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$  et réduiront le  $Fe^{3+}$ . En effet, les composés phénoliques peuvent être ajoutés à la liste des réducteurs. Par conséquent les dommages au désoxyribose sont, en fait, diminués en raison de la chélation du  $Fe^{2+}$  par les composés phénoliques (**Moran et al., 1997**).

Les antioxydants endogène ou exogène sont capables de neutraliser les radicaux libres. Les propriétés antioxydants des composés phénoliques sont liées à leur capacité de transférer un hydrogène ou un électron, ainsi qu'à chélates des ions métalliques et inhiber l'activité des oxydases (**Bartosz et al., 1995**).

D'après l'étude menée par **Rice et al. (1997)**, il a été constaté qu'il y a un lien entre la structure et l'activité antioxydant des composés phénoliques qui ont permis de déterminer des relations générales. Il a été démontré que l'activité d'un composé est influencée par la présence du groupe hydroxyle libre et leur positionnement mutuel. Concernant la réaction de la quercétine avec le radical libre, sa forte activité antiradicalaire a été attribuée à la présence de 1,2-dihydroxybenzène (catéchol) dans le noyau B (**Burda et Oleszek, 2001; Goupy et al., 2003**). Cette conclusion a été soutenue par une étude comparant l'activité anti radicalaire de la quercétine et de ses dérivés

glycoside C(3)-OH et C(4)-OH. Lors de la réaction avec le radical la quercétine libère deux atomes d'hydrogène et se transforme en une quinone intermédiaire. La présence d'un groupe hydroxyle au carbone C-3 de la quercétine permet la régénération de l'ion catéchol par l'addition d'un proton provenant de la solution.

Les flavonoïdes présentent une relation entre leur structure et leur potentiel prooxydant. Il existe une corrélation entre la présence de doubles liaisons et de groupements phénoliques *ortho*-di/trihydroxylés sur l'anneau B et ce potentiel prooxydant. En particulier, les flavonoïdes qui possèdent des groupements *ortho*-di/trihydroxylés sur le phénol de l'anneau B montrent une activité prooxydante significative. En revanche, les flavonoïdes qui ont des groupements *ortho*-di/triméthoxylés sur le phénol de l'anneau B n'ont pas une activité prooxydante significative par rapport à leurs homologues qui ont des groupements *ortho*-di/trihydroxylés sur le phénol de l'anneau B (Eghbaliferiz et Iranshahi, 2016).



***Conclusion***

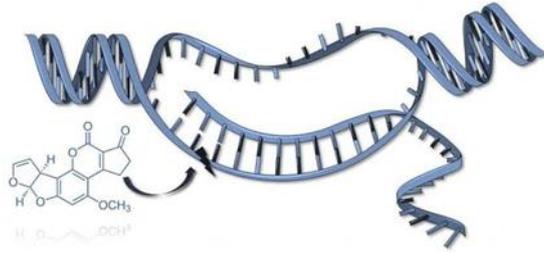
Le matériel génétique est une macromolécule qui peut être protégée ou bien endommagée par plusieurs facteurs environnementaux, produits chimiques et stress oxydatif. L'objectif de cette étude est basé principalement sur la valorisation de l'activité génotoxique /anti génotoxique des composés phénoliques en tant que alternatifs naturels. La mise en évidence et l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits et de leurs fractions, ont été réalisées par deux tests, couramment utilisés dans ce domaine. Le premier qui utilise la dégradation de désoxyribose et le FRAP a été le deuxième en utilisant 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-1, 3, 5-s-triazine (TPTZ).

Les composés phénoliques sont des composés dotés de plusieurs activités biologiques. Cette intérêt vient d'une part que les composés phénoliques ont une activité anti oxydante, mais d'autre part ils engendrent des effets toxique sur le métabolisme, cela est due à leurs capacité de chélation des ions.

L'évaluation de l'activité génotoxique/ antigénotoxique et du pouvoir réducteur ont présenté des résultats significatifs. Les flavonoïdes ont montré généralement de l'activité antigénotoxique et les acides phénoliques ont plutôt marqué une activité génotoxique notamment à de fortes concentrations. Le pouvoir réducteur des ions de Fer sont souvent liée à leur capacité anti oxydante.

Les résultats de comparaison des tests indiquent que chaque composé phénolique a des propriétés prooxydante et antioxydante en fonction de sa concentration, mais aussi en stimulant son activité par la présence et/ou l'absence des composés des milieux réactionnels.

En perspectives, il serait donc intéressant d'approfondir cette étude, qui n'est qu'un premier pas dans la recherche et la compréhension de la dualité de comportement des composés phénoliques, d'une part en tant qu'antioxydant protecteur des biomolécules, tels que l'ADN dans cette étude, et d'autre part comme prooxydant avec un pouvoir génotoxique. Il serait donc intéressant de tester l'effet de ces mêmes substances phénoliques sur les autres constituants du matériel génétique tels que les bases azotées.



## *Références bibliographiques*

### A

**Aalikhani M, Khalili M, Jahanshahi M.** natural iron chelators' ferulic acid and caffeic acid rescue mice's brains from side effects of iron overload. *Frontiers in Neurology* (2022) ;13 : 951725.

**Albuquerque,Bianca R,Heleno,Sandrina A,Oliverreira M,Beatriz P.** Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function* (2021);12:14-29.

**Andrade J, Roberto G., Janini S., George KB.** Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie* (2006),88 :1287-1296.

**Araldi,Rodrigo P,Demelo,Thatiana C,Mendes,Thais B.** Utilisation des tests de comète et de micronoyau pour les études de génotoxicité : une revue. *Biomédecine & Pharmacothérapie* (2016) ;72 :74-82.

**Arpita Bardoloi et Amar Deep Soren .** Génotoxicité induite par les plantes médicinales. *Bulletin du Centre National de la Recherche.* (2022). Volume 46 : 119.

**Aust A,Eveleigh J.** Mechanism of DNA oxydation .*Proceedings of the society for experimentalk biology and medicine* 1999 ;222(3) :246-252

### B

**Babenko L M. Smi rnov O E. Romanenko K O. Trun ova O K. Kosakivska V . Kholodny M, G.** Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv. (2019),33(13).

**Balsano C.Alisi A.** Effets antioxydants des composés bioactifs naturels.*Conception pharmaceutique actuelle.* (2009). 15(26): 3063 – 3073.

**Bartosz G., Druga T.**The Second Face of Oxygen. *PWN, Warszawa* 1995, 179–203 (in Polish).

**Batovska D.Parushev S. Stamboliyska B. Tsvetkova I.Ninova M.Najdenski H.** Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacteria *Pharmaceutical and Clinical Research .*(2009),5(3): 1- 3.

**Berthelot-Ricou A.Perrin J.Orsière T.Aye M.Roustan A. Botta A. Courbiere B.** Genotoxicity risk assessment and oocytes: Basis of genetic toxicology and application in

## Références bibliographiques

reproductive science. Gynecologie, Obstetrique and Fertilité. (2013). 41(9), 544-547.

**Brendler S,Susanne,Hartmann,Andreas,Pfuhler S.** Le test *in vivo* des comètes:Utilization et statut dans les tests de génotoxicité. Mutagenèse 2005 ;20 :245-254.

## Références bibliographiques

**Bruneton J.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique et documentation, 4ème Edition. Paris. (2009).

### C

**Chaouche Med T.** Etude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Analyse par HPLC-SM les extraits les plus actifs. Thèse de doctorat en biologie .université Abou Baker Belkaid de Tlemcen Algérie. (2014).

**Cheng Z, Yuanzong L, Chang W.** Kinetic desoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* 2003 ;478 ::129-137.

**Choudhuri S .Kaur T. Jain S. Sharma C. Asthana S.** A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-biological Interactions.* (2021).

**Cordelli E ,Bignami M ,Pacchieretti F.** Comet assay : a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology research* (2021).10:68-78.

**Cushnie T P T. Hamilton V E. Chapman D G. Taylor P W. Agneau A J.** Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with plants from Iran. *African Journal of Biotechnology.*(2007).7(18): 3188-3192.

**Czub J. Adamus T. Banas D. Braziewicz J. Choinski J. Dyczewski J. Jaskóla A. Korman A. Szeflinski Z. Wójcik A.** « The Warsaw cyclotron facility with a horizontal beam for radiological studies ». (2009).

### D

**Da silvaa S,L.Honoroi K,M.Marangoni S .Toyama M.** The influence of electronic .Steric and hydrophobic proprieties of flavonoide compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *journal of moléculaire structure* .(2004).684 :1-7.

**Darne C. Guichard Y. Seidel C.** Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions a des agents cancérogènes. *Références en santé au travail.* (2021) :124

**Dégremont C. Cachot J.** La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques ? Fascicule Seine-Aval (2009).2.2 :36.

## Références bibliographiques

**Dhamraa W A. Aman Shah AM. Furqan S. Al-Shimary W. Aziz Al Saadi A. Al Zarzour R, Asif M. Chern EO. Abdul Majid A M S.** L'extrait éthanolique à 50% d'*Orthosiphon stamineus* module la génotoxicité et la clastogénicité induites par la mitomycine . (2018).41(1):82-88.

**Dimassi S. Tillaa M D. Sanlaville A.** anomalie chromosomique .Service de génétique. (2017) Volume 30 . P : 249-270

**Duarte M,Laires A ,Gaspar J.** Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1999;442:43-54.

### E

**Eghbaliferiz S, Iranshahi M.** Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy Research* 2016.

### F

**Fentanes L. Giuliani V .Hugo A. Oliveira R. Castanho S K.** Aspects biologiques et pharmacologiques des tanins et applications biotechnologiques potentielles. (2023). Volume 414.

**Flores N .Jiménez IA. Giménez A. Ruiz G. Gutiérrez D.** Bourdy G.Bazzocchi IL. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry*. (2009). 70(5): 621-627.

**Friedman M. Henika PR. Levin CE.Mandrell RE. Kozukue N.** Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. (2006). 69(2): 354-361.

### G

**Genaro M,Thiago C,Mauricio,Angelo Q,Rettori D .** Activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation—A chemical approach. *PLoS One* 2015 ;10 : e0129963.

**Getha S,Kedlaya R,Vasudevan D .** Inhibition of lipid peroxydation by botanical extract of *Ocimum sanctum* ;in vitro and in vivo studies. *Life science* 2004;76:21-28.

## Références bibliographiques

**Gopala K. Makoto H.** In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis .(2000).Volume 455, Issues 1–2, 20 November Pages 155-166.

**Goujon E.** Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II. (2015). P : 50.

**GowC,Pin-Der D,HuiLing T.** Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid.FOOD chemistry 2002;79:303-313.

**Graft J,Jeffrey,Nowak,Dariusz .** Effect of Selected Plant Phenolics on Fe<sup>2+</sup>-EDTA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> System Mediated Deoxyribose Oxidation: Molecular Structure-Derived Relationships of Anti- and Pro-Oxidant Actions.Molecules 2016;22:59.

**Gopala Krishna .Makoto Hayashi .** In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation,Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, ,2000, volum 455,Pages 155-166.

## H

**Halliwell B. Gutteridge JMC. Okezie I.** The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals,Analytical Biochemistry, (1987) .Volume 165, ,Pages 215-219

**Hayashi,Makoto.** Le test du micronoyau,test de génotoxicité in vivo le plus utilisé. Gènes et environnement 2016 ;38 :1-18.

**Hider RC. Liu ZD. Khodr HH.** Metal chelation of polyphenols. Methods in Enzymology, (2001) 335:190-203.

**Hontaas A.** Prise en charge des patients cancéreux à l’officine. Thèse de doctorat. Université Toulouse III PAUL SABATIER. (2014). P46-48.

## J

**Jadot, G.** Antioxydant et vieillissement. Ed, John Libbey Eurotext (1994) : 34.

**Jin J.** Modifications of Ames Test for Assessing the Mutagenicity of Traditional Chinese Medicines. Journal of Clinical Toxicology, (2016).6(2), 2–4.

**Jingrong C.ORCIDE NW. Junyue Z .Yan Z. Rong Xu .Fanghao F .Casserole T .Yuan YO. Zhixiong G.** Agriculture and Forestry University Haixia Institute of Science and Technology, Agronomie (2023) ,13 (3), 895.

### K

**Kim JH. Campbell BC. Mahoney N. Chan KL.Molyneux RJ. Balajee A.** Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Fungal Biology*. (2010). 114(10): 817-824.

**Kim JY. Lim H J.Lee DY. Kim DH. Jeon R.Ryu JH.** In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . (2009). 19(3): 937-940.

**Klaunig J,Kamendulis L,Hocevar B. Oxidative damage in carcinogenesis.** *Toxicologic pathology* 2010 ;38(1) :96-109.

**Krishna G. Krishna P. Goel A.** Alternative Animal Toxicity Testing and Biomarkers. *Biomarkers in Toxicology, Toxicity testing models and biomarkers* (2019) .p:143-161.

**Kubata BK. Nagamune K. Murakami N .Merkel P. Kabututua Z. Martin SK. Kalulug TM. Mustakuk H. Hoshida M. Ohnishi-kameyama M. Kinoshita T.Duszenko M. Uradea Y.** Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology*, (2005) 35(1): 91-103.

**Kumar D, A.Islam M N. Faruk M O. Ashaduzzaman M. Dungani R.** Review on tannins: extraction processes, applications and possibilities. (2020). *J. Bot.* 135,58–70.

### L

**Laughton M,Halliwell B,Evans P,Hoult J.** Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem, Pharmacol* 1989;38:895-2865.

**Linjawi SA.** Evaluation the protective effect of *Artemisia judaica* extract against doxorubicin induced genetic toxicity and histopathology in male. *Advances in Environmental Biology* (2016). 10, 250-8.

### M

**Macheix J. Fleuriet A. Jay-Allemand C .**les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; presses polytechniques et universitaires Romandes. (2005).

**Madia F. Kirkland D., Morita T.White P. Asturiol D.Corvi R.** Eurlecvam Genotoxicity and

## Références bibliographiques

Carcinogenicity Database of Substances Eliciting Negative Results in the Ames test:

Construction of the Database. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis . (2020) 854-855, 503199.

**Mas B, Esciva C; Dromant C.** Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde Human plasma reference values in health and disease. Archives of Biochemistry and Biophysics (2021);709:108-941.

**Materska M.** Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity- review. Polish journal of food and nutrition sciences .(2008). 58:4.

**Mazzone G.** On the inhibition of hydroxyl radical formation by hydroxycinnamic acids: the case of caffeic acid as a promising chelating ligand of a ferrous ion. The Journal of Physical Chemistry 2019.123 :9560-9566.

**Mir P A. Dar. M.A. Bader G N.** Pharmacognostical standardization, phytochemical investigation, and anthelmintic activity of *Arisaema propinquum* Schott rhizomes. Pharmacogn. (2020). Res. 12 (2), 181–185.

**Moran J, Klaukas R, Grayer R .**Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. Free Radical Biologie and Medicine (1997). 22:861-870.

**Mortelmans K .Zeiger E.** The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutation Research. (2000) .455, 29–60

## O

**Okamura H. Mimura A. Yakou Y. Niwano M .Takahara Y.** Antioxidant activity of tannins and flavonoïdes in *Eucalyptus rostrata*. Phytochemistry. (1993) 33(3): 557-561.

**Olszowy, Malgorzata.** What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants. Plant Physiology and Biochemistry (2019) ;144 :135-143.

## P

**Pannetier P.** Outils alternatifs à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la toxicité des contaminants de l'environnement: lignées cellulaires et tests embryon-larvaires chez un poisson modèle le Médaka japonais, *Oryzias latipes*. Université de Bordeaux. (2018). p : 76.

## Références bibliographiques

**Pelli K, Lyly M.** Les antioxydants dans l'alimentation. Edition INRA. (2003)

**Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M.** Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited. (2001).

### R

**Rakesh .Anilkumar U.Tatiya S .Surana J .**Futur Journal des sciences pharmaceutiques. (2021).volume 7, Numéro d'article : 25

**Reitznerova A,Sulekova M,Nagy J .** Lipid peroxidation process in meat and meat products: a comparison study of malondialdehyde determination between modified 2-thiobarbituric acid spectrophotométrique methods and reverse

**RiceE, Miller J, Paganga G.**Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, (1997), 2, 4, 152–159.

**Roberto M M. Jamal C M., Malaspina O. Marin M.**Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and molecular biology*. (2016). 39(2): 257-269

### S

**Samak,Geetha S,Revathi P,Manjunatha S.** Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. *Food chemistry* (2009) ;115 :631-634.

**Santos S, Francenia S,Villanueva C. .** Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*.(2019);10:1-29.

**Santosh K,Minhajul A,Ashish K. Singh et Saurav Das .**Rôle des composés phénoliques dans les mécanismes de défense des plantes.(2020) .

**Sharma K. Mahato N.Lee Y, R.** Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. (2019). 35, 265–284.

### T

## Références bibliographiques

**Temko D, Tomlinson IPM, Severini S** .Les effets des processus mutationnels et de la sélection sur les mutations du conducteur à travers les types de cancer. (2018) . 9:1–10.

**Twaij B, Md Nazmul H**. Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. International Journal of Plant Biology 2022;13: 4-14..

### U

**Umbuzeiro G D A. Heringa M. Zeiger E**. In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. In In vitro Environmental Toxicology- Concepts, Application and Assessment. (2016). pp. 59-80.

### V

**Van Acker SA. Van Den Berg DJ .Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJ, Bast A,).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Médecine. (1996).20(3): 331-342.

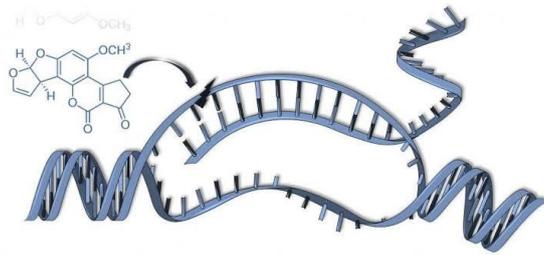
**Volkova N. Meier B. Víctor G H**.Undefined Mutational signatures are jointly shaped by DNA damage and repaire. nature.com.(2020).

### Y

**Yen G,DuhP,Tsai H**. and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food chemistry (2002);79:307-313.

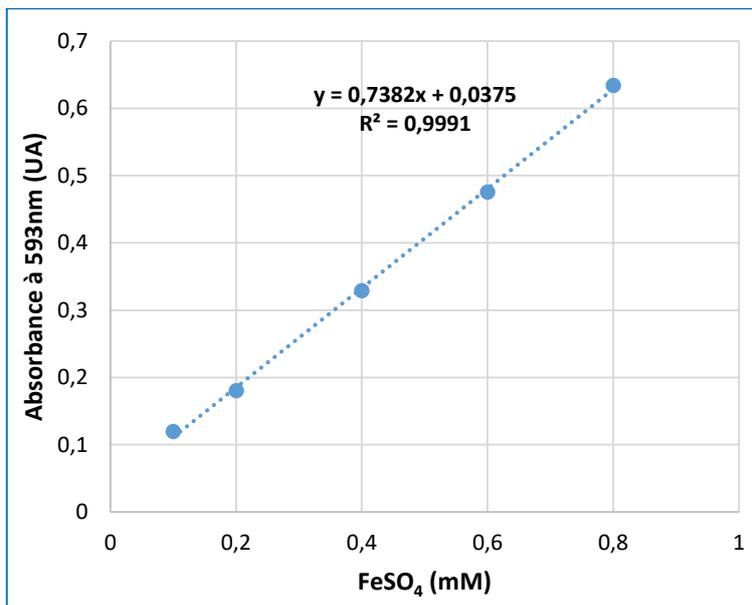
### Z

**Zhou H-C. Lin Y-M. Wei S-D. Tam NF-y**. Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. Food Chemistry. (2011).129(4): 1710-1720



# *Annexes*

**Annexe :** Courbe d'étalonnage de FeSO<sub>4</sub> pour dosage de l'activité FRAP



## Résumé :

Les composés phénoliques sont des composés actifs de plantes (Métabolites secondaire) intéressants en raison de leur diversité structurale et leur puissance en tant que candidats médicaments et antioxydants. Dans cette présente étude, on s'est intéressé d'une part à l'évaluation génotoxique/antigénotoxique de cinq composés phénoliques ,in vitro en effectuant deux tests :le test de dégradation de désoxyribose dans différents milieux réactionnels. D'autre part à l'évaluation de leur la capacité réductrice des ions ferriques .Les résultats obtenus indiquent que l'effet génotoxique et antigénotoxique dépend de la présence et l'absence des composant des milieux réactionnel donc EDTA et l'acide ascorbique. Le taux de la formation des MDAs diminue significativement à  $P < 0,05$  en présence de la quercétine pour atteindre un seuil de  $2 \mu\text{mol/ml}$  en présence de l'acide ascorbique et d'EDTA (Activitéantigénotoxique).Le taux de la formation des MDAs augmente significativement en présence de l'acide tannique à  $P < 0,05$  pour atteindre un seuil de  $3,3 \mu\text{mol/ml}$  même en absence de l'acide ascorbique et d'EDTA. (Activité génotoxique).

**Mot clés:**Composés phénolique,désoxyribose, génotoxique, antigénotoxique, pouvoir réducteur .

## Abstract :

Phenolic compounds are plant active compounds (secondary metabolites) of interest due to their structural diversity and potency as drug candidates and antioxidants. In this present study, we were interested on the one hand in the genotoxic / antigenotoxic evaluation of five phenolic compounds, in vitro by carrying out two tests : the deoxyribose degradation test in different reaction media. On the other hand to the evaluation of their reducing capacity of ferric ions. The results obtained indicate that the genotoxic and antigenotoxic effect depends on the presence and absence of the components of the reaction media, therefore EDTA and ascorbic acid. The rate of MDA formation decreases significantly at  $P < 0.05$  in the presence of quercetin to reach a threshold of  $2 \mu\text{mol/ml}$  in the presence of ascorbic acid and EDTA (Antigenotoxic Activity). The rate of formation of MDAs increases significantly in presence of tannic acid to  $P < 0.05$  to reach a threshold of  $3.3 \mu\text{mol/ml}$  even in the absence of ascorbic acid and EDTA. (Genotoxic activity).

**Key words :** Phenolic compounds, deoxyribose, genotoxic, antigenotoxic, reducing power

## ملخص

المركبات الفينولية هي مركبات نباتية نشيطة (مستقبلات ثانوية) ذات أهمية بسبب تنوعها الهيكلي و قوتها كأدوية مضادات أكسدة في هذه الدراسة الحالية كنا مهتمين من ناحية بالتقييم السام الجينات / السمية المستندية لخمسة مركبات فينولية في المختبر من خلال إجراء اختبارين: اختبار تحلل سكر الريبوز المنقوص الأكسجين في وسائط تفاعل مختلفة. من ناحية أخرى لتقييم قدرتها لتقليل أيونات الحديد

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن التأثير الجيني والسمية المستضدات يعتمد على وجود و غياب مكونات وسائط la، في وجود  $P > 0.05$  بشكل ملحوظ عن MDA و حمض الأس كوربيك. ينخفض معدل تكون EDTA التفاعل اي (النشاط السمي المستضد) / EDTA للوصول إلى عتبة 2 ميكرو مول / ما في وجود حمض الأسكوربيك و quercétine

لوصول إلى عتبة 3.3 ميكرو مول / مل  $P > 0.05$  عند Tannique بشكل كبير في وجود حمض MDA يزيد معدل تكون (نشاط السمية الجينية) في حالة غياب حمض الأس كوربيك و ATDE

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، الريبوز المنقوص الأكسجين، السمية الجينية، السمية للمستضد تقليل الطاقة.