

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA-BEJAIA



Faculté : Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Physico-Chimique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée

Mémoire de fin de cycle

Pour l'obtention du diplôme de **MASTER**

THEME

**Contribution à l'investigation phytochimique des extraits de
Centaurea calcitrapa (Asteraceae) et leurs effets protecteurs contre
les ERO impliquées dans la génotoxicité.**

Soutenue le : 09/07/2025

Présenté par : **Mlle** BOUAIDAT Katia & **Mlle** KHAERBOUCHE Wissam

Devant les jurys :

| | | |
|-----------------------------------|------------|---------------|
| Mme BAHLOUL-CHERAFT N. | MCB | Présidente |
| Mme BENMESSAOUD-KARTOUT Y. | MCA | Examinatrice |
| Mme AYOUNI K. | MCB | Encadrante |
| Mme KARA-KENDI S. | MCB | CO-Encadrante |

Année universitaire : 2024/2025

Dédicace

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours universitaire :

À mes chers parents M'hand et Nora pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices et leur présence constante à chaque étape de ma vie.

À mes grands-parents, dont les prières et l'affection m'accompagnent toujours.

À mes frères Salim et Nadjim, pour leur soutien précieux.

À mon cousin Yacine, et à tous mes cousins et toute ma famille, pour leur présence à mes côtés.

À toutes mes cousines, avec une pensée spéciale pour Ryma, Nina et Tassadit, pour leurs mots réconfortants et leur confiance en moi.

À mes amies, de A à Z, pour les souvenirs partagés, les encouragements et les moments de répit dans les moments les plus durs.

Un immense merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

À ma binôme Wissem, pour la collaboration, l'entraide et la patience partagées tout au long de ce travail.

Et enfin, à toute la promotion de Génétique Fondamentale et Appliquée

BOUAIDAT.K

Dédicace

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de mes études :

À mon père, qui a consacré sa vie à m'offrir tout le confort dont j'avais besoin pour avancer dans mes études.

À ma mère, pour son dévouement à assurer mon éducation et pour tous ses précieux conseils.

À mes chères sœurs, Siham et Kamelia, ainsi qu'à tous mes cousins et cousines qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours, avec une pensée toute particulière pour ma cousine Hakima, pour son soutien constant et tous ses précieux conseils.

*À mes très chères amies, qui ne m'ont jamais laissée tomber depuis notre rencontre : Celia, Fatima et Lina...
Merci infiniment.*

À toutes les personnes qui ont participé à ce travail, et à toute la promotion de Génétique fondamentale et appliquée.

À ma copine de chambre, et à tous les miens.

Kherbouche W.

Remerciements

Nous exprimons notre profonde gratitude à Allah le Tout-Puissant pour nous avoir accordé le courage et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à nos parents, qui nous ont inculqué la patience, la politesse et le sens du sacrifice, et qui ont toujours été là pour nous. Leurs enseignements et leur soutien inconditionnel ont été d'une importance capitale.

Nous tenons à présenter nos plus sincères remerciements à notre encadrante, Mlle Ayouni Karima, pour son orientation, ses conseils avisés et sa direction précieuse tout au long de ce travail.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire. Leur soutien et leur collaboration ont été d'une valeur inestimable.

Nous souhaitons également exprimer notre profond respect et notre gratitude envers les membres du jury, notamment Mme BAHLOUL-CHERAFT N et Mme BENMESSAOUD-KARTOUT Y, pour avoir accepté d'évaluer ce travail avec attention.

Nous remercions chaleureusement les ingénieurs des laboratoires du département BPC, Lydia, Meriem et Habiba, ainsi que tous les membres du laboratoire de génétique, et tout particulièrement les doctorants Nabil et Lamia, pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils tout au long de notre travail. Leur accompagnement a été d'un grand soutien.

Nous n'oublions pas de remercier chaleureusement tous les enseignants que nous avons rencontrés tout au long de notre parcours éducatif, que ce soit à l'école primaire, au collège, au lycée ou à l'université. Leurs enseignements ont contribué à notre formation et à notre développement intellectuel.

Nous adressons également nos remerciements à toute la promotion de génétique fondamentale et appliquée, avec qui nous avons partagé des moments inoubliables, faits de soutien, d'entraide et de belles expériences.

Enfin, nous n'oublions pas de remercier notre famille pour sa patience, son travail acharné et sa confiance en nous tout au long de ce parcours d'études. Cette réussite est aussi pour vous.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de la plante *Centaurea calcitrapa* 3

I.1.1. Taxonomie, classification et distribution géographique..... 3

I.1.2. Composition chimique et métabolites secondaires 4

I.1.3. Activités biologiques des extraits de *Centaurea calcitrapa*..... 5

I.1.3.1. Propriétés antioxydantes..... 5

I.1.3.2. Effets anti-inflammatoires 5

I.1.3.3. Potentiel antimutagène et protecteur contre la génotoxicité 5

I.1.4. Stress oxydatif et espèces réactives de l'oxygène (ERO) 6

I.1.5. Toxicité des extraits de *Centaurea calcitrapa*..... 6

I.1.5.1. Toxicité générale (études *in vivo* et *in vitro*) 6

I.1.5.2. Évaluation de la génotoxicité..... 7

I.1.5.3. Limites et précautions d'utilisation 7

I.1.6. La génotoxicité et son évaluation dans ce cadre 7

I.1.6.1. Définition et mécanismes moléculaires..... 7

I.1.6.2. Types de tests utilisés pour l'évaluation..... 8

I.1.6.3. Produits chimiques génotoxiques couramment utilisés..... 8

| | |
|--|---|
| I.1.7. Approches expérimentales d'évaluations de l'activité antioxydante | 8 |
|--|---|

ChapitreII: Matériel et méthodes

| | |
|---|-----------|
| II.1. Extraction des métabolites d'intérêt..... | 10 |
| II.1.1. Récolte du matériel végétal..... | 10 |
| II.1.2. Extraction..... | 11 |
| II.1.3. Dosage des métabolites secondaires | 12 |
| II.1.3.1. Polyphénols totaux..... | 12 |
| II.1.3.2. Flavonoïdes totaux..... | 12 |
| II.1.3.3. Tanins condensés | 13 |
| II.1.3.4. Tanins hydrolysables..... | 13 |
| II.2. Évaluation de l'activités antioxydants..... | 14 |
| II.2.1. Méthode de DPPH..... | 14 |
| II.2.2. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) | 15 |
| II.2.3. Test Phénanthroline | 16 |
| II.2.4. Test de la phénanthroline en présence de H ₂ O ₂ | 17 |

ChapitreIII: Résultats et discussion

| | |
|--|-----------|
| III.1. Résultats du rendement d'extraction..... | 19 |
| III.2. Résultats des dosages de polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables | 20 |
| III.3. Résultats des activités antioxydantes | 21 |
| III.3.1. Activité scavenging du radical DPPH des extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 21 |
| III.3.2. Activité scavenging du radical DPPH des métabolites phénoliques purs | 23 |

| | |
|--|-----------|
| III.3.3. Activité neutralisante du H ₂ O ₂ par les extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 27 |
| III.3.4. Test phénanthroline et Fe ³⁺ | 28 |
| III.3.5 Test de la phénanthroline et Fe ²⁺ en présence de H ₂ O ₂ | 31 |
| Conclusion et perspectives | 34 |
| Références bibliographiques..... | 35 |
| Annexes | |
| Résumés | |

Liste des tableaux :

| | |
|--|----|
| Tableau I : Classification taxonomique de <i>Centaurea calcitrapa</i> l..... | 3 |
| Tableau II : Rendement des extractions des matrices végétales ; <i>Centaurea calcitrapa</i> (Feuilles et Epines)..... | 19 |
| Tableau III : Résultats des dosages des phénols totaux, flavonoïdes, tannins hydrolysables et tannins condensés des extraits hydroalcooliques des matrices végétales de <i>Centaurea calcitrapa</i> (Feuilles et épines), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10..... | 20 |
| Tableau IV : Concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH par les extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> (Feuilles et épines) et celles des molécules phénoliques testées dans les mêmes conditions expérimentales (Courbes en Annexes), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10. | 24 |
| Tableau V: Les valeurs des concentrations nécessaires des extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> (feuilles et épines) pour atteindre 50% d'activité réductrice (test à la phénanthroline)..... | 28 |
| Tableau VI: Les valeurs des concentrations nécessaires des métabolites phénoliques purs (Acide gallique, quercétine et catéchine) pour atteindre 50% d'activité réductrice (test à la phénanthroline), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10..... | 29 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure01: <i>Centaurea calcitrapa</i> | 4 |
| Figure02: <i>Centaurea calcitrapa</i> | 4 |
| Figure03 : Epines de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 10 |
| Figure04 : Feuilles de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 10 |
| Figure 05 : Extraction par macération des extraits hydroalcooliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> (feuilles et épines)..... | 11 |
| Figure06 : évaporateur rotatif..... | 11 |
| Figure07: Complexe méthalique de la phénanthroline | 17 |
| Figure 08 : Résultats des activités de piégeage du radical DPPH par les extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> (Feuilles et épines)..... | 22 |
| Figure09: Résultats des activités scavenging du radical DPPH par les molécules phénoliques pures testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits étudiés | 24 |
| Figure 10 : Activités neutralisantes du H ₂ O ₂ par les extraits de feuilles et des épines de <i>Centaurea calcitrapa</i> comparées aux standards phénoliques testés dans les mêmes conditions. | 26 |
| Figure 11 : Résultats de l'activité réductrice du Fe ²⁺ des extraits hydroalcooliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> (Feuilles et Epines) évaluée par le test à la phénanthroline. (a) Courbe générale ; (b) Agrandissement sur les faibles concentrations | 27 |
| Figure 12 : Résultats de l'activité réductrice du Fe ³⁺ par les molécules phénoliques pures testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits étudiés évalué par le test à la phénanthroline | 29 |
| Figure 13 : Effet des extraits hydroalcoolique de feuilles et d'épines de <i>Centaurea calcitrapa</i> sur la formation du complexe Fe ²⁺ -phénanthroline en présence de H ₂ O ₂ | 30 |
| Figure 14 : Effet des métabolites phénoliques purs (acide gallique, quercétine, catéchine) sur la formation du complexe Fe ²⁺ -phénanthroline en présence de H ₂ O ₂ | 32 |

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

Eq. GA : Équivalent en acide gallique

Eq. Q : Équivalent en quercétine

Eq. Cat : Équivalent en catéchine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Fe²⁺ / Fe³⁺ : Ion ferreux / Ion ferrique

UA : Unité d'absorbance

A_{0,5} : Concentration nécessaire pour atteindre 50 % d'absorbance maximale

mM : Millimolaire

µg/mL : Microgramme par millilitre

nm : Nanomètre

HCl : Acide chlorhydrique

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

EtOH : Éthanol

RTE : Équivalent de rutine

GAE : Équivalent d'acide gallique

SOD 1 : Superoxyde dismutase 1

SOD 2 : Superoxyde dismutase 2

OCDE : Organisation de Coopération et D'Economique

Introduction

générale

La génotoxicité se définit comme la capacité d'agents chimiques, physiques ou biologiques à endommager le matériel génétique (ADN). Cela peut entraîner des cassures, des mutations ou des aberrations chromosomiques, et contribuer au développement de maladies graves telles que le cancer ou des pathologies héréditaires (**Srinivas et al., 2019**).

Parmi les facteurs de génotoxicité, les radicaux libres, en particulier les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont reconnues comme des agents majeurs de dommages cellulaires. Ces molécules sont générées naturellement (par la respiration mitochondriale) ou via la réaction de Fenton, c'est-à-dire l'interaction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les ions ferreux (Fe^{2+}), produisant des radicaux hydroxyles hautement réactifs ($\bullet OH$) (**Phaniendra et al., 2015**). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN en provoquant des cassures ou des modifications oxydatives (**AbdulSalam et al., 2016**).

De plus, les ERO ne se limitent pas à dégrader l'ADN : ils peuvent aussi induire des altérations des lipides et des protéines, favorisant l'initiation et la progression de diverses pathologies, en particulier les cancers (**Srinivas et al., 2019**).

Face à ces effets délétères, les plantes médicinales constituent une source prometteuse de métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques (phénols simples, flavonoïdes et tanins). Ces molécules agissent comme antioxydants en piégeant les radicaux libres ou en chélatant les ions métalliques, limitant ainsi la formation de ERO via des réactions comme celle de Fenton (**Phaniendra et al., 2015**).

Une plante d'intérêt est *Centaurea calcitrapa* (Asteraceae), connue sous le nom de "purple star-thistle". Elle pousse spontanément en Afrique du Nord, en Méditerranée et en Asie occidentale, et est utilisée traditionnellement pour ses propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (**Özcan et al., 2023**). Des analyses récentes montrent que l'extrait méthanolique de cette plante est particulièrement riche en composés phénoliques (environ 97 mg Équivalent de l'acide gallique/g) et en flavonoïdes (jusqu'à 426 mg Équivalent de rutine/g). Cette richesse se traduit par une forte activité antioxydante, mesurée notamment par le test DPPH ($IC_{50} \approx 2,8 \mu g/mL$) (**El-Darier et al., 2011 ; Özcan et al., 2023**).

Cependant, malgré la documentation de ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, peu d'études ont évalué son potentiel protecteur vis-à-vis des lésions d'ADN induits par les ERO, ce qui constitue une lacune importante dans la littérature (**El-Darier et al., 2011**).

L'objectif

Le présent mémoire s'inscrit dans ce champ exploratoire : il s'attache à quantifier les composés phytochimiques de *C. calcitrapa* (phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables) avant d'en évaluer l'activité antioxydante et protectrice *in vitro*. Cette approche combine des tests classiques pour simuler le stress oxydatif et en examiner les effets protecteurs. C'est ainsi que l'étude vise à mesurer la capacité des extraits à prévenir les dommages causés par les ERO, ouvrant une voie vers des investigations plus approfondies *in vivo* ou sur des modèles cellulaires.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de la plante *Centaurea calcitrapa*

I.1.1. Taxonomie, classification et distribution géographique

Centaurea calcitrapa L., communément appelée « centaurée chausse-trape » ou « purple star-thistle », est connue localement sous le nom de « Merrir » en arabe et « Abuneqqar » en kabyle (Figure 01), est une plante herbacée appartenant à la famille des *Asteraceae* (Tableau I), (INPN, 2003). L'une des plus vastes familles de plantes à fleurs et la plus diversifiée du règne végétal. Elle fait partie du genre *Centaurea*, qui comprend plus de 500 espèces réparties principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (García-Jacas et al., 2006). Elle se distingue par ses feuilles profondément découpées, ses tiges rigides et ses inflorescences pourvues d'épines acérées, qui lui confèrent un aspect distinctif, sa morphologie adaptée aux environnements arides. Cette espèce est largement répandue dans le bassin méditerranéen et en Europe centrale, en Afrique du Nord et en Asie occidentale, où elle pousse dans des sols secs et bien ensoleillés, tels que les bords de route, les champs abandonnés et les sols pauvres (Pignatti, 1982; POWO, 2023), en Algérie ; elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (Quezel et Santa, 1963).

Tableau I : Classification taxonomique de *Centaurea calcitrapa* l. (POWO, 2024)

| Rang taxonomique | Classification |
|------------------|-------------------------------|
| Domaine | Botanique |
| Règne | Plante |
| Classe | Dicotylédones |
| Ordre | Astrales |
| Famille | Astéracées |
| Genre | <i>Centaure</i> L |
| Espèce | <i>Centaurea calcitrapa</i> L |



Figure 01 : *Centaurea calcitrapa* (Tela Botanica, 2024)



Figure 02 : *Centaurea calcitrapa* (INPN-Muséum national d'Histoire naturelle, 2024)

Traditionnellement utilisée en médecine populaire pour ses propriétés anti-inflammatoires, diurétiques, digestives et antimicrobiennes, *Centaurea calcitrapa* est aussi parfois consommée comme plante alimentaire dans certaines régions méditerranéennes (**Banozic et al., 2020**). En raison de sa richesse en composés secondaires, tels que les polyphénols, flavonoïdes et tanins, cette plante suscite un intérêt croissant dans les domaines de la pharmacologie, de la recherche biomédicale et de la phytochimie (**El-Darier et al., 2011 ; Ozcan et al., 2023**). Plusieurs études ont en effet rapporté ses activités antioxydante, anti-inflammatoires et potentiellement antigénotoxique, renforçant son potentiel comme source naturelle de composés bioactifs d'intérêt thérapeutique (**Barros et al., 2011 ; Ahmad et al., 2020**).

I.1.2. Composition chimique et métabolites secondaires

Parmi les principaux constituants identifiés figurent les flavonoïdes (comme la quercétine, la lutéoline), les acides phénoliques, les composés sesquiterpéniques, ainsi que les lactones sesquiterpéniques, connus pour leurs effets anti-inflammatoires, antioxydants, cytotoxiques et potentiellement antitumoraux (**El-Darier et al., 2011; Moghannem et al., 2016 ; Bektas et al., 2020 ;**). Il existe également des huiles essentielles, des tanins, des stérols et des triterpènes, qui contribuent à l'ensemble de ses activités biologiques (**Özcan et al., 2023; Mekky et al., 2024**). Ces métabolites varient en concentration selon la partie de la plante utilisée (feuilles, tiges, fleurs), la période de récolte, ainsi que les conditions d'extraction (**Janačković et al., 2019**).

Cette variabilité influence la concentration des composés et par conséquent, les activités biologiques mesurées lors des tests *in vitro*. Grâce à cette diversité chimique, *Centaurea*

calcitrapa est aujourd'hui considérée comme une source potentielle de composés thérapeutiques naturels.

I.1.3. Activités biologiques des extraits de *Centaurea calcitrapa*

I.1.3.1. Propriétés antioxydantes

Les extraits de *Centaurea calcitrapa* ont démontré une activité antioxydante significative, principalement attribuée à leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes. L'étude de **Benmansour et al. (2023)** a montré que l'extrait méthanolique de cette plante contient une teneur élevée en acides phénoliques totaux ($97,25 \pm 0,73$ mg Gallic Acid Equivalents (GAE)/g) et en flavonoïdes ($425,93 \pm 1,27$ mg Rutin Equivalents (RTE)/g), des molécules connues pour leur pouvoir antioxydant. Ces extraits présentent également une forte capacité de piégeage de radical libre DPPH, avec une IC_{50} de $2,82 \mu\text{g/mL}$. De plus, une augmentation significative de l'expression des gènes SOD1 et SOD2, impliqués dans la défense contre le stress oxydatif (**Benmansour et al., 2023**).

I.1.3.2. Effets anti-inflammatoires

Bien que peu d'études se soient penchées directement sur l'effet anti-inflammatoire de *C. calcitrapa*, des espèces proches du même genre, telles que *Centaurea urvillei*, *C. cadmea* et *C. ensiformis*, ont montré une inhibition notable de l'activité du facteur de transcription NF- κ B, un régulateur clé des réponses inflammatoires (**Yesil-Celiktas et al., 2007**). Cela laisse supposer que *C. calcitrapa*, qui partage certains métabolites communs avec ces espèces, pourrait également posséder des propriétés anti-inflammatoires similaires.

I.1.3.3. Potentiel antimutagène et protecteur contre la génotoxicité:

Les propriétés antioxydantes de *C. calcitrapa* suggèrent un rôle potentiel dans la prévention des dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif. Une étude *in vitro* a montré que l'extrait éthanolique de cette plante exerce un effet antiprolifératif contre les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, avec une IC_{50} de $65 \mu\text{g/mL}$ (**Asri-Rezaei et al., 2022**). Cette activité cytotoxique est principalement attribuée à la présence de flavonoïdes méthoxylés tels que l'apigénine, l'eupatorine et la jaceosidine, connus pour leur capacité à induire l'apoptose dans les cellules tumorales (**Çitoğlu et al., 2015**). Ces composés pourraient également jouer un rôle dans la protection de l'ADN contre la génotoxicité induite par des agents chimiques, bien que cette hypothèse nécessite davantage de recherches expérimentales ciblées.

I.1.4. Stress oxydatif et espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le stress oxydatif désigne un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité des systèmes antioxydants à les neutraliser. Les ERO, comme le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), le superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont produits naturellement dans les cellules, notamment au niveau des mitochondries. En faible quantité, ils participent à des fonctions physiologiques comme la signalisation cellulaire où ils agissent comme des messagers intracellulaires capables de réguler l'expression de gènes et l'activation de protéines impliquées dans des processus tels que la prolifération, la différenciation ou la réponse immunitaire. Mais à des niveaux élevés, ils peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides, entraînant un stress oxydatif délétère (**Phaniendra et al., 2015 ; Sies, 2017**).

Un excès de ERO est impliqué dans de nombreuses pathologies, comme le cancer, les maladies neurodégénératives ou le diabète (**Valko et al., 2007**). Une des principales sources de ERO en laboratoire est la réaction de Fenton, dans laquelle les ions ferreux (Fe^{2+}) réagissent avec le H_2O_2 pour produire des radicaux hydroxyles, hautement réactifs et toxiques pour l'ADN, ces radicaux attaquent les bases azotés ainsi que le désoxyribose entraînant des modifications oxydatives, des cassures simples et double brin et des lésions complexes de l'ADN compromettant ainsi l'intégrité génomique (**Halliwell & Gutteridge, 2015**).

Les antioxydants naturels, tels que les polyphénols d'origine végétale, peuvent contrer ce phénomène en piégeant les ERO ou en chélatant les ions métalliques comme le fer, limitant ainsi la formation de ces espèces nocives (**Pisoschi & Pop, 2015**).

I.1.5. Toxicité des extraits de *Centaurea calcitrapa*

I.1.5.1. Toxicité générale (études *in vivo* et *in vitro*) :

Les recherches récentes sur la toxicité de *Centaurea calcitrapa* ont permis d'apporter des précisions sur ses effets potentiels. Une étude *in vitro* a révélé que les extraits de feuilles de *Centaurea calcitrapa* présentent une activité cytotoxique modérée contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, suggérant un potentiel intérêt thérapeutique mais soulignant également la nécessité de précautions quant à son usage sans contrôle (**Dimkić et al., 2020**). De plus, les analyses *in vitro* ont démontré une inhibition significative de la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7, ce qui a été attribué à la richesse en composés phénoliques et flavonoïdes de la plante (**Aboul-Soud et al., 2022**). Par ailleurs, les tests de toxicité aiguë *in vivo* sur des

modèles murins ont montré que l'administration orale d'extraits de *Centaurea calcitrapa* à des doses modérées n'entraîne pas de mortalité ni de signes évidents de toxicité, bien que des doses élevées puissent provoquer des effets hépatotoxiques légers (Dimkić et al., 2020). Ces résultats confirment l'importance d'une évaluation approfondie des doses utilisées, en particulier dans le cadre d'applications médicinales ou nutraceutiques.

I.1.5.2. Évaluation de la génotoxicité :

L'évaluation de la génotoxicité des extraits de *Centaurea calcitrapa* repose sur plusieurs tests expérimentaux, qui permettent de détecter les dommages au matériel génétique, comme le test du micronoyau, qui détecte les anomalies chromosomiques en identifiant la présence de micronoyau dans les cellules. Le test de comète, également connu sous le nom de test de migration cellulaire, mesure la fragmentation de l'ADN dans des cellules individuelles (Organisation de Coopération et de Développement Economique [OCDE], 2016). Une étude a montré que l'extrait méthanolique de *C. calcitrapa* n'a pas induit de génotoxicité dans les cellules de mammifères à des concentrations utilisées dans les conditions expérimentales (Abdel-Sattar et al., 2015).

I.1.5.3 Limites et précautions d'utilisation

Bien que *Centaurea calcitrapa* soit utilisée en médecine traditionnelle pour ses effets bénéfiques, les données scientifiques sur sa toxicité restent limitées. Il n'existe pas encore d'évaluation approfondie sur sa toxicité chronique ni sur son potentiel génotoxique chez l'humain, ce qui appelle à la prudence quant à son utilisation à grande échelle ou à long terme (Natarajan & Darroudi, 1991). Par ailleurs, l'absence d'essais cliniques rigoureux rend difficile l'évaluation de sa sécurité, en particulier en formulation concentrée ou sous forme d'extrait. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir une marge de sécurité claire pour cette plante (Møller et al., 2000).

I.1.6. La génotoxicité et son évaluation dans ce cadre

I.1.6.1 Définition et mécanismes moléculaires :

La génotoxicité désigne la capacité d'une substance à endommager l'ADN ou les chromosomes d'une cellule. Ces altérations peuvent entraîner des mutations, des transformations cellulaires ou la cancérogénèse (Fenech, 2000). Les mécanismes moléculaires incluent la formation d'adduits à l'ADN, les cassures simples ou double brin, ainsi que les erreurs de réparation de l'ADN (Touelle et al., 2007).

I.1.6.2 Types de tests utilisés pour l'évaluation

Parmi les tests les plus utilisés figurent :

Le test du micronoyau, qui détecte les altérations chromosomiques se manifestant par la formation de micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en division. Il est simple, rapide et largement validé dans les études *in vitro* et *in vivo* (Fenech, 2000). Le test des comètes (ou Single Cell Gel Electrophoresis), qui permet de détecter les cassures de l'ADN au niveau d'une cellule unique. Les cellules sont incorporées dans un gel, lysées, puis soumises à une électrophorèse ; la migration de l'ADN forme une « comète » si des dommages sont présents (Collins, 2004).

I.1.6.3 Produits chimiques génotoxiques couramment utilisés dans les études expérimentales

Parmi les agents génotoxiques utilisés comme contrôle positif :

Le benzo[a]pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique, est connu pour induire des adduits à l'ADN et des cassures double brin. Il est souvent utilisé pour valider les tests de génotoxicité en laboratoire (Shrivastava *et al.*, 2014).

Le méthylméthane sulfonate (MMS) est un agent alkylant qui provoque des mutations par modification directe des bases de l'ADN. Il est couramment utilisé dans les tests génotoxiques pour induire des lésions précises, notamment des cassures simples brin (Touelle *et al.*, 2007).

I.1.7 Approches expérimentales d'évaluations de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux repose sur des tests *in vitro* simples car faciles à réaliser, sensibles car capables de détecter de faibles quantités d'antioxydants et complémentaires puisqu'ils reposent sur des mécanismes différents donnant une vision plus complète du potentiel antioxydant. Parmi eux, le test au radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est largement utilisé. Il repose sur la capacité des antioxydants à donner un électron ou un atome d'hydrogène au radical stable DPPH•, entraînant une diminution mesurable de l'absorbance à 517 nm (Molyneux, 2004). Ce test permet une estimation rapide du potentiel piègeur de radicaux libres de l'extrait.

Le test au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) quant à lui évalue l'aptitude des antioxydants à neutraliser ce précurseur des radicaux hydroxyles, en mesurant la diminution d'absorbance à

230 nm après incubation (**Ruch et al., 1989**). Cette méthode donne une idée de la capacité des composés à empêcher la formation de ERO via la réaction de Fenton.

D'autres tests impliquent l'utilisation de la 1,10-phénanthroline, un agent complexant du fer. En présence de Fe^{3+} , les antioxydants réduisent les ions en Fe^{2+} , qui peuvent ensuite former un complexe coloré mesuré à 510 nm. Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des extraits (**Yefrida et al., 2018**). Dans un second protocole plus poussé, l'activité protectrice contre les radicaux hydroxyles générés par le système Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) est étudiée en mesurant l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline, permettant d'estimer l'effet antioxydant indirect par chélation ou piégeage (**Mukhopadhyay et al., 2016**).

L'utilisation combinée de ces tests dans une même étude permet une approche complète et comparative de l'activité antioxydante, en ciblant différents mécanismes : don d'électron, piégeage de ERO ou chélation des métaux de transition.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II.1 Extraction des métabolites d'intérêt

II.1.1 Récolte du matériel végétal :

Les parties aériennes de *Centaurea calcitrapa* (feuilles et épines) ont été récoltées à maturité au mois de mai 2024 dans la région d'Ihedadden de Béjaïa, puis elles ont été séparées soigneusement (**figures 02, 03**), puis séchées à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après séchage, ces parties de plante ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisées jusqu'à l'obtention de poudres fines de granulométrie < 125 μ m.



Figure 03 : Epines de *Centaurea Calcitrapa*



Figure 04 : Feuilles de *Centaurea Calcitrapa*

II.1.2 Extraction :

50 g de poudre issue des feuilles/ épines de *Centaurea calcitrapa* ont été soumise à une extraction par macération dans 500mL d'un solvant hydroalcoolique (éthanol 80%, eau 20%). Ce mélange a été agité sur un agitateur magnétique pendant 24 heures à température ambiante (figure 04), puis il a été laissé en décantation pendant 12 heures avant de récupérer le surnageant. La macération a été répétée deux fois.

Les surnageants récupérés ont été réunis et centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes afin d'être sûr que tous les résidus solides sont éliminés. Les extraits liquides clarifiés ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif (figure 05) à 40°C jusqu'à la réduction du volume (évaporation totale de l'éthanol).

Le concentré a été versé dans des boites de Pétri étiquetées (poids vide) et conservé dans une étuve à 40°C afin de séchage complet. La pesée de l'extrait sec a été prise jusqu'à stabilisation de son poids.

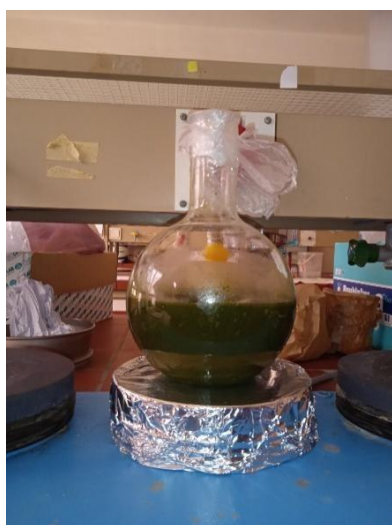


Figure 05 : Extraction par macération des extraits hydroalcooliques de *Centaurea Calcitrapa* (feuilles et épines)



Figure 06 : évaporateur rotatif

Le rendement d'extraction a été déterminé selon la formule décrite par Janackovic *et al.* (2019)

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{poids sec de l'extrait} / \text{Poids sec du matériel végétal}) * 100$$

Cette formule permet de connaître le pourcentage d'extrait récupéré par rapport à la quantité de plante extraite, ce qui est utile pour comparer l'efficacité des méthodes d'extraction.

II.1.3 Dosage des métabolites secondaires :

II.1.3.1 Polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols totaux des extraits de *Centaurea Calcitrapa* a été déterminée par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu, selon la procédure décrite par **Kähkönen et al. (1999)**, avec quelques modifications. Cette méthode repose sur la réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques présents dans l'extrait et le réactif de Folin-Ciocalteu, qui contient des ions phosphomolybdate et phosphotungstate. En présence de ces composés, ces ions sont réduits et produisent un complexe bleu mesurable spectrophotométriquement à 760 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en polyphénols totaux (**Kähkönen et al., 1999**).

Une solution d'extraits a été préparée par dissoudre une quantité de **10 mg** d'extraits sec dans **1mL** de méthanol. Ensuite, **20µL** de cette solution ont été mélangés à **100µL** de réactif de Folin-Ciocalteu (**1N**) et **80µL** de carbonate de sodium à **7,5%** (préparé en dissolvant **7,5g** de poudre de carbonate de sodium Na_2CO_3 dans **100ml** d'eau distillée). Le mélange a été incubé pendant **30 minutes** à l'obscurité, à température ambiante.

L'absorbance a été mesurée à **760 nm** à l'aide d'un lecteur de microplaque (Plate Reader) contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide de concentrations connues d'**acide gallique** comme standard.

II.1.3.2 Flavonoïdes totaux :

La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée selon la méthode colorimétrique à l'aluminium trichlorure (AlCl_3), décrite par **Maksimović et al. (2005)**, avec quelques modifications. Cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à former un complexe stable de couleur jaune avec l'ion aluminium trichlorure (AlCl_3) en milieu acide. Ce complexe présente une absorbance maximale à 415 nm, mesurée par spectrophotométrie. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes totaux présents dans l'échantillon (**Maksimović et al., 2005**).

Une quantité de **10mg** d'extrait sec a été dissoute dans 1mL de méthanol. Ensuite, **120µl** de cette solution ont été mélangés à **60µL** de solution de chlorure d'aluminium AlCl_3 (préparée en dissolvant **133mg** d' AlCl_3 et **400mg** d'acétate de sodium $\text{C}_2\text{H}_2\text{NaO}_2$ dans l'eau distillée, ajustée à **100mL**). Le mélange a été incubé pendant **30 minutes** à température ambiante, à l'abri de la lumière.

L'absorbance a été mesurée à **415nm** à l'aide d'un lecteur de microplaque. Un blanc a été préparé pour chaque concentration d'extrait, en remplaçant le réactif par l'eau distillée, une courbe d'étalonnage a été établie à l'aide de concentrations croissantes de **quercétine** comme standard.

II.1.3.3 Tanins condensés :

Le dosage des tanins condensés a été déterminée selon la méthode colorimétrique à la **vanilline- H_2SO_4** , selon la procédure appliquée par **Dif et al. (2015)**, avec de légères modifications. Cette méthode repose sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en présence d'acide sulfurique concentré (70%), conduisant à la formation d'un complexe coloré brun dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en tanins.

10mg d'extrait sec a été dissoute dans **1mL** de méthanol. Ensuite, **60µL** de cette solution ont été mélangé à **120µL** de réactif (vanilline à **1%** et l'acide sulfurique à **70%** dans le méthanol). Le mélange a été incubé pendant **15 minutes** à température ambiante, à l'abri de la lumière.

L'absorbance a été mesurée à **500nm** à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été établie à l'aide de **catéchine** comme composé standard.

II.1.3.4 Tanins hydrolysables :

La quantification des tanins hydrolysables a été réalisée par la méthode colorimétrique utilisant le réactif chlorhydrique-ferrique (**HCl + FeCl_3**), selon la méthode utilisée par **Dif et al. (2015)**, avec des modifications. Cette méthode repose sur la formation d'un complexe coloré entre les tanins hydrolysables et les ions ferriques (**Fe^{3+}**) en milieu acide. Cette réaction, réalisée en milieu acide, conduit à un changement de couleur mesurable par spectrophotométrie à 660nm. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la teneur en tanins hydrolysables présents dans l'échantillon.

Une quantité de **10 mg** d'extrait sec a été dissoute dans **1mL** de méthanol. Ensuite, **40µL** de cette solution ont été mélangés à **150µL** de réactif ferrique (préparé en mélangeant de

FeCl₃ à **0,01 M** dans de l'eau distillé avec une solution de **HCl** à **0,001M**). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant **15 minutes** à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 660nm à l'aide de l'**acide gallique** comme standard.

II.2. Evaluation de l'activité antioxydante :

II.2.1. Méthode de DPPH :

L'activité antioxydante des extraits de *Centaurea Calcitrapa* a été évaluée par la méthode colorimétrique au radical libre **DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), selon la procédure décrite par **Brand-Williams et al. (1995)**, avec quelques modifications. Cette méthode repose sur la capacité des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le radical DPPH en lui donnant un électron ou un atome d'hydrogène, ce qui entraîne une décoloration visible. Le radical DPPH présente une couleur violette intense en solution méthanolique (**Molyneux, 2004**).

Une solution d'extraits a été préparée par dissoudre une quantité de **10 mg** d'extraits sec dans **1mL** de méthanol. Une solution de **DPPH** à **1mM** a été fraîchement préparée dans du méthanol. Une quantité de **20µL** de la solution d'extrait de différentes concentrations ont été ajoutés à **180µL** de la solution de **DPPH**. Ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant **30 minutes** à température ambiante.

L'absorbance a été mesurée à **517nm** à l'aide d'un lecteur de microplaque contre un témoin en remplaçant l'extrait par du méthanol. L'**acide gallique**, la **Catéchine** et la **Quercétine** sont utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé selon la méthode décrite par **Molyneux (2004)** à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / (A_{\text{témoin}})) * 100$$

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance de la solution DPPH sans extrait (DPPH + solvant)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de la solution DPPH avec extrait

Ce calcul repose sur la diminution de l'intensité colorée du radical DPPH, en présence d'un antioxydant.

II.2.2. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un composé réactif largement utilisé comme inducteur de stress oxydatif dans les études *in vitro* dans divers modèles cellulaires. Il agit en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), aussi des radicaux hydroxyles en présence de **Fer**, capable de provoquer des dommages au matériel génétique.

Dans cette étude, une méthode basée sur la capacité des extraits végétaux à piéger (ou neutraliser) le H₂O₂ a été utilisée. Cette méthode repose sur l'incubation de l'extrait en présence d'une solution H₂O₂, suivie de la mesure de la quantité résiduelle de H₂O₂ par absorbance à **230nm**, qui diminue en fonction de l'activité antioxydante de l'échantillon testé. Cette approche permet d'évaluer la capacité antioxydante de l'extrait en mesurant la diminution de l'absorbance du H₂O₂ à **230nm**, proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène éliminée (**Ruch et al. 1989**).

Une solution mère de H₂O₂ a été préparée en diluant **100µL** de peroxyde d'hydrogène concentré dans **9900µL** d'eau distillée. Ensuite, une dilution de travail a été effectuée en mélangeant **60ml** de cette solution avec **90µL** d'eau distillée pour avoir un volume de **150ml**. Une dilution a été réalisée en mélangeant **790µL** de la solution diluée avec **210µL** d'eau distillée afin d'obtenir une

Pour chaque test, **160µL** de cette solution de H₂O₂ ont été mélangés à **320µL** de solution d'extrait ou de standard de différentes concentrations. Le mélange a ensuite été incubé à température ambiante, et l'absorbance a été mesurée à **230nm** à l'aide d'un spectrophotomètre, la quantité résiduelle de H₂O₂ non piégée, un témoin composé de solution H₂O₂ et d'eau distillée a été utilisé comme référence. Il permet d'estimer la capacité de l'extrait à neutraliser le H₂O₂.

$$\% \text{ de piégeage} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{control}}) * 100$$

A_{control} : Absorbance en absence de d'extrait

A_{échantillon} : Absorbance en présence d'extrait

Ce calcul repose sur la comparaison de l'absorbance du H₂O₂ seul et celle obtenue en présence de l'extrait testé. Une diminution de l'absorbance indique une consommation

partielle ou totale du H₂O₂ par les composés antioxydants, plus le pouvoir antioxydant de l'extrait est élevée, plus cette diminution est importante

II.2.3. Test Phénanthroline :

Ce test repose sur la réduction des ions ferrique (Fe³⁺) en ferreux (Fe²⁺) par un antioxydant, suivie de la formation d'un complexe Fe(phen)₂²⁺ coloré (rouge-orange) avec la **1,10-phénanthroline** (Figure 05). L'intensité de ce complexe, mesurée à **510nm**, est proportionnelle à la quantité de Fe²⁺ formée, et donc à l'activité réductrice (antioxydante) de l'extrait. Une diminution de cette absorbance indique que l'extrait ou le composé test réduit moins de Fe³⁺, révélant une inhibition de la formation du complexe, ce qui traduit son effet antioxydant (Yefrida *et al.*, 2018).

Le test a été réalisé selon la méthode de (Szydłowska-Czerniaka *et al.*, 2008), avec des modifications. Un volume de **10µL** de l'extrait de différentes concentrations est ajouté à **50µL** de chlorure ferrique FeCl₃ **0,2%** (**0,02g** de FeCl₃ dans **10ml** de l'eau distillée), **30µL** de phénanthroline à **0,5%** (**0,05g** de **1,10-Phénanthroline** dans **10ml** de méthanol) et **110µL** de MeOH. Le mélange a été incubé pendant **20 minutes** à **30°C** à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à **510nm**. Un témoin a été préparé parallèlement en remplaçant l'extrait par le solvant. L'acide gallique, la catéchine et la quercétine sont utilisés comme des standards.

Le pourcentage d'inhibition est obtenu en comparant l'absorbance du test à celle d'un témoin sans extrait selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}} * 100$$

A_{témoin} : Absorbance du mélange sans extrait

A_{échantillon} : Absorbance du mélange avec extrait

Cette méthode permet de mesurer la capacité de réduction directe des composés antioxydants via la formation du complexe Fe²⁺-phénanthroline.

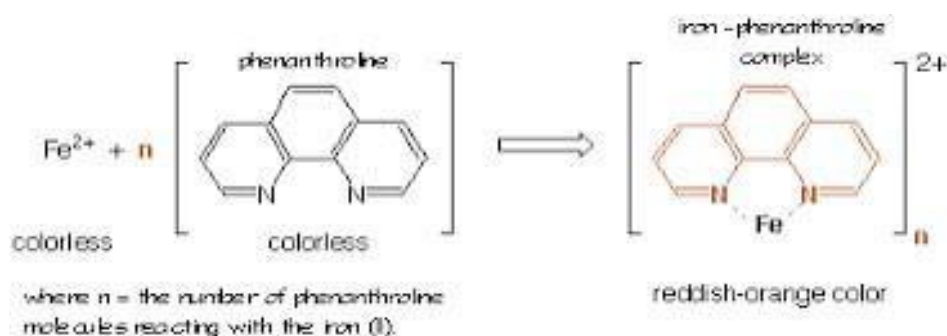


Figure 07 : Complexe métallique de la phénanthroline (Kumar, 2017)

II.2.4. Test de la phénanthroline en présence de H_2O_2 :

Ce test repose sur la formation d'un complexe rouge-orange entre la **1,10-phénanthroline** et le Fe^{2+} (sulfate ferreux), qui absorbe à **510 nm**. Le H_2O_2 ajouté avant la phénanthroline oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} , empêchant ainsi la formation du complexe et provoquant une baisse de l'absorbance. L'ajout d'un antioxydant peut piéger le H_2O_2 protégeant ainsi le Fe^{2+} de l'oxydation et maintenant la coloration. Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir antioxydant est fort (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

Le test a été réalisé selon la méthode utilisée par Mukhopadhyay *et al.* (2016), avec quelques adaptations. Une solution Fe^{2+} (**1mM**) a été préparée en dissolvant 40mg de sulfate ferreux ammoniacal dans **95ml** d'eau distillée, complétée par **5ml** d' H_2SO_4 (**0,01 N**). La solution de **1,10-phénanthroline** (**1mM**) a été préparée à **1mM** dans l'eau distillée, et le H_2O_2 a été diluée à 5mM à partir de la solution mère commerciale de (**50%**).

Pour chaque essai, **1500 μL** de l'extrait ou standard avec différentes concentrations, **250ml** de Fe^{2+} , et **62,5 μL** de H_2O_2 ont été mélangés, puis incubés pendant **5 minutes** à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, **1,5 μL** ml de **1,10-phénanthroline** a été ajoutée suivi d'une incubation supplémentaire de **10 minutes**. L'absorbance a été mesurée à **510 nm**. Un blanc (sans H_2O_2) et un témoin négatif (sans extrait) ont été préparés pour chaque série.

Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du Fe^{2+} par le H_2O_2 a été calculé en comparant l'absorbance de chaque échantillon à celle du témoin et du blanc pour évaluer la capacité antioxydante des extraits.

Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du Fe^{2+} par le H_2O_2 est calculé selon la méthode décrite par **Mukhopadhyay et al. (2016)**.

$$\% \text{ d'inhibition} = ((A_{C+} - A_{\text{échantillon}}) / A_{C+}) * 100$$

$A_{\text{échantillon}}$: est l'absorbance de du mélange contenant l'extrait

A_{C+} : est l'absorbance du contrôle positif (sans extrait)

Cette formule permet d'exprimer l'effet protecteur des extraits contre l'oxydation du Fe^{2+} induite par le peroxyde d'hydrogène.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Résultat de rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction reflète la quantité d'extrait sec obtenue à partir du matériel végétal brut. Dans cette étude, l'extraction par macération de plante (*Centaurea Calcitrapa*) avec un solvant hydro-éthanolique (80% éthanol) a permis d'isoler les composés bioactifs des feuilles et épines de *Centaurea Calcitrapa*. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau II : Rendement des extractions des matrices végétales ; *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et Epines).

| | <i>C. Calcitrapa</i> Feuilles | <i>C. Calcitrapa</i> Epines |
|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Rendement d'extraction (%) | 29,22 | 19,15 |

Ce tableau présente les résultats d'extraction obtenus pour les différentes parties de *Centaurea calcitrapa* à l'aide d'un solvant hydroalcoolique. Il apparaît que les feuilles ont présenté un rendement d'extraction plus élevée (29,22%) comparé aux épines (19,15%), bien que les deux aient été soumises au même protocole d'extraction (macération dans un mélange éthanol/eau).

Le rendement dépend en grande partie de la richesse de la partie végétal en métabolites secondaires polaires (polyphénols, flavonoïdes, tanins..), facilement extraits par des solvants hydroalcooliques. Dans ce cas, les feuilles semblent contenir davantage de composés hydrosolubles, expliquant le rendement supérieur. En comparaison, les épines, plus lignifiées et moins métaboliquement actives, libèrent moins de substances extractibles car leur structure riche en lignine (un polymère qui se trouve au niveau de la paroi des cellules végétales) limite l'accès du solvant et elles renferment naturellement moins de métabolites secondaires (Azwanida, 2015).

Des études antérieures ont rapporté des résultats similaires. Benarfa et al. (2020) ont observé des rendements plus élevés dans les feuilles de *Centaurea africana* par rapport aux tiges ou racines. Dans une autre étude de Bajalan et al. (2017) sur *Centaurea cyanus*, l'extraction hydroalcoolique a donné des rendements de 25 à 30% pour les feuilles, confirmant leur richesse en métabolites secondaires extractibles.

Ainsi, bien que la technique d'extraction soit la même pour les deux parties de la plante, la différence de rendement s'explique par leur composition chimique et structurale. Ces données suggèrent que les feuilles de *Centaurea calcitrapa* représentent une bonne source de composés bioactifs.

III.2. Résultats des dosages de polyphénols, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables

Afin d'évaluer la composition biochimique des extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa*, des dosages quantitatifs des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et tannins hydrolysables ont été réalisés sur les feuilles et les épines (courbes en annexe 1,2,3,4). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau III : Résultats des dosages des phénols totaux, flavonoïdes, tannins hydrolysables et tannins condensés des extraits hydroalcooliques des matrices végétales de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.

| | <i>C.calcitrapa</i> Feuilles | <i>C.calcitrapa</i> Epines |
|---|------------------------------|----------------------------|
| Taux de phénols totaux ($\mu\text{g Eq. GA/mg}$ d'extrait sec) | 2415,00 \pm 564,71 | 752,17 \pm 53,83 |
| Taux de flavonoïdes ($\mu\text{g Eq. Q/mg}$ d'extrait sec) | 5,94 \pm 0,44 | 4.44 \pm 1.02 |
| Taux de tannins hydrolysables ($\mu\text{g Eq. GA/mg}$ d'extrait sec) | 1,13 \pm 0.692 | 1,03 \pm 0,71 |
| Taux de tannins condensés ($\mu\text{g Eq. Cat/mg}$ d'extrait sec) | 31,35 \pm 2.17 | 82,76 \pm 11,92 |

Les résultats des dosages phytochimiques des extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa* montrent une variation notable selon la partie de la plante étudiée. Les feuilles présentent une teneur très élevée en polyphénols totaux (2415,00 \pm 564,71 $\mu\text{g Eq GA/mg}$ d'extrait sec) par rapport aux épines (752,17 \pm 53,83 $\mu\text{g Eq GA/mg}$). Une tendance similaire est observée pour les flavonoïdes, avec un taux plus important dans les feuilles (5,94 \pm 0,44 $\mu\text{g Eq Q/mg}$) que dans les épines (4.44 \pm 1.02 $\mu\text{g Eq Q/mg}$). A l'opposé, les tannins condensés sont plus abondants dans les épines (82,76 \pm 11,92 $\mu\text{g Eq Cat/mg}$) que dans les feuilles (31,35 \pm 2.17

µg Eq Cat/mg). Les teneurs en tannins hydrolysables restent faibles dans les deux extraits (feuilles et épines), avec des valeurs proches.

Ces résultats montrent que les feuilles de *Centaurea calcitrapa* sont plus riches en composés phénoliques totaux et flavonoïdes, ce qui est cohérent avec leur rôle dans la défense contre le stress oxydatif (**Panche et al., 2016**). A l'inverse, la forte concentration en tannins condensés dans les épines peut refléter une différence naturelle dans la répartition des métabolites selon les parties de la plante, comme cela déjà été observé dans d'autres espèces du genre *Centaurea* (**Benarfa et al., 2020**).

Dans l'étude menée par **Benarfa et al. (2020)** sur *Centaurea africana* a également montré une accumulation plus marquée de polyphénols et de flavonoïdes dans les feuilles comparées aux épines, ce qui soutient les résultats obtenus ici.

La faible teneur en tannins hydrolysables dans les deux extraits pourrait être liée à leur instabilité et à leur faible concentration naturelle dans certaines espèces du genre *Centaurea*, comme l'ont noté **Bajalan et al. (2017)**. La prédominance des tannins condensés dans les épines suggère un rôle de barrière chimique renforcée dans ces structures rigides. Ces différences de composition selon la partie végétale confirment l'importance du choix de la matrice pour valoriser les extraits végétaux à visée antioxydante ou pharmacologique.

La richesse des feuilles en polyphénols et flavonoïdes suggère que les feuilles de *Centaurea calcitrapa* pourraient présenter un fort potentiel protecteur contre les altérations génotoxiques induites par le stress oxydatif. Cependant, cette hypothèse doit être confirmée par des tests antioxydants et génotoxiques spécifiques (**Pisoschi et al., 2015**).

III.3. Résultats des activités antioxydantes

III.3.1 Activité scavenging du radical DPPH des extraits *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines) :

L'activité antioxydante des extraits a été estimée par leur capacité à réduire le radical DPPH, mesurée par la diminution de l'absorbance à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour différentes concentrations afin d'établir une courbe dose-effet (courbes en annexes 05). L'intensité de cette inhibition reflète la présence de composés réducteurs capables de neutraliser les radicaux libres (**Molyneux, 2004**).

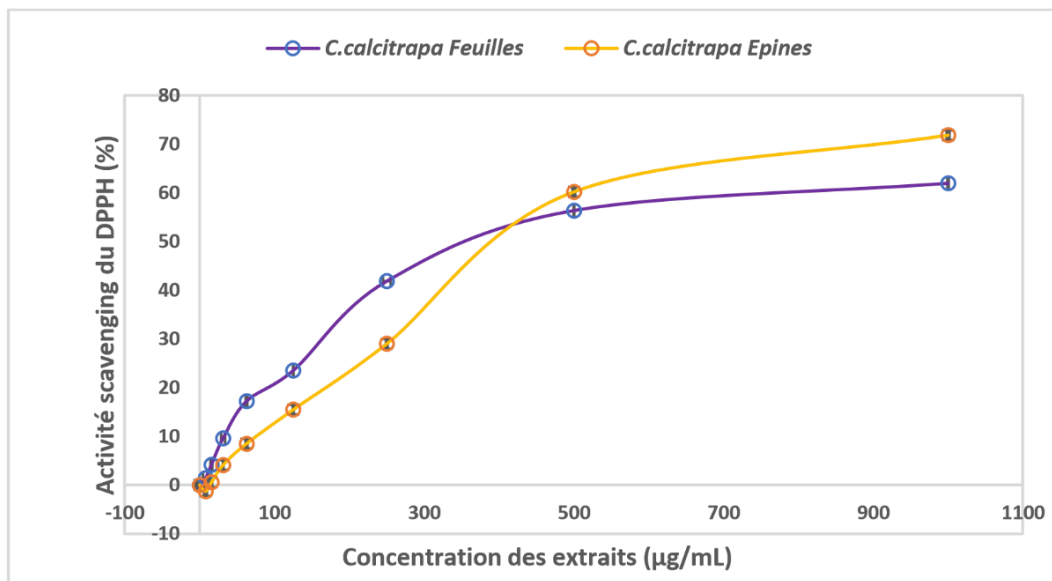


Figure 08 : Résultats des activités de piégeage du radical DPPH par les extraits de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines).

Cette figure illustre l'évolution de l'activité piégeuse du radical DPPH en fonction des concentrations croissantes des extraits de *C. Calcitrapa*. Les résultats obtenus ont montré que le pourcentage d'inhibition du DPPH[•] augmente avec l'augmentation de la concentration des deux extraits, ce qui indique que plus la quantité d'extrait est élevée, plus l'effet antioxydant est important. Cependant, les feuilles présentent une activité scavenging du DPPH plus importante que les épines, notamment aux faibles concentrations, ce qui suggère une richesse en composés antioxydants dans cette partie de la plante.

Ces résultats sont cohérents avec les travaux de **Molyneux (2004)**, qui souligne que la capacité antioxydante dépend fortement de la richesse en composés phénoliques. Une étude similaire menée par **Benarfa et al. (2020)** sur *Centaurea africana* a montré que les extraits des feuilles présentaient une inhibition plus importante de DPPH que ceux des tiges, confirmant l'importance de la matrice végétale dans l'activité antioxydante.

III.3.2 Activité scavenging du radical DPPH des métabolites phénoliques purs (acide gallique, quercétine et catéchine) :

La capacité anti-radicalaire libre des extraits de *Centaurea Calcitrapa* (Feuilles et épines) a été testée par la méthode DPPH en utilisant les antioxydants suivants : L'acide gallique, la quercétine et la catéchine.

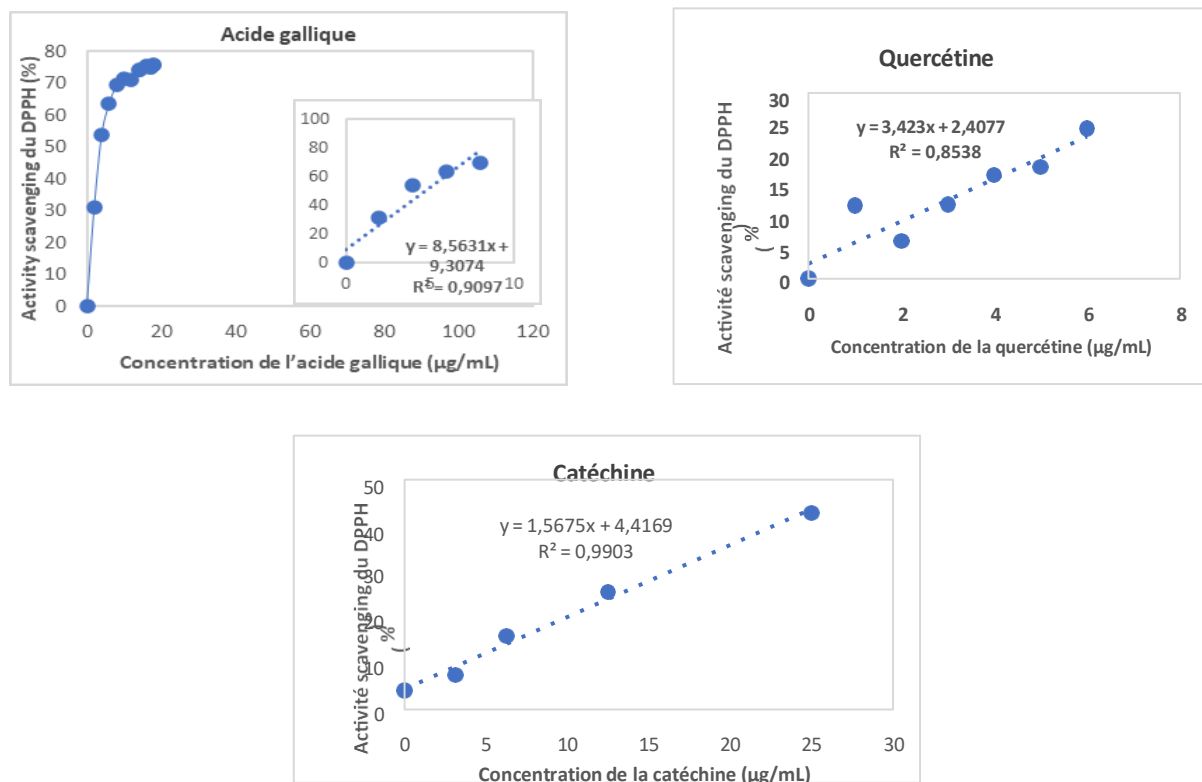


Figure 09 : Résultats des activités scavenging du radical DPPH par les molécules phénoliques pures testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits étudiés.

Les trois courbes représentent l'évolution de l'activité scavenging du DPPH en fonction des concentrations des standards testés : Acide gallique pour les polyphénols et les tannins hydrolysables, quercétine pour les flavonoïdes et catéchine pour les tannins condensés. L'ensemble des courbes montre une tendance croissante, indiquant une corrélation positive entre la concentration et l'activité inhibitrice des radicaux libres.

L'acide gallique se distingue par une activité antioxydante très élevée dès les faibles concentrations (moins de 25 µg/ml), atteignant rapidement des pourcentages d'inhibition élevée, ce qui est confirmé par sa valeur d'IC₅₀ très basse (4,21 µg /ml). Ce comportement traduit une efficacité remarquable dans la neutralisation du DPPH, ce qui est en accord avec des études antérieures qui rapportent l'acide gallique comme un puissant antioxydant (Molyneux, 2004).

La quercétine présente également une activité antioxydante notable, avec une courbe linéaire bien définie et une IC₅₀ de 13,90 µg/ml, indiquant une bonne efficacité, mais inférieure à celle de l'acide gallique. Quant à la catéchine, bien que sa courbe soit aussi linéaire, son IC₅₀ est de 6,24 µg/ml, ce qui reflète une activité antioxydante intermédiaire entre celle de l'acide gallique et celle de la quercétine. Ainsi, l'ordre décroissant d'efficacité antioxydante des composés testés selon l'IC₅₀ est : acide gallique > catéchine > quercétine. Ces résultats confirment que les standards phénoliques étudiés possèdent des propriétés antioxydantes marquées, utiles comme références pour la comparaison des extraits végétaux.

Tableau IV : Concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH par les extraits de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines) et celles des molécules phénoliques testées dans les mêmes conditions expérimentales (Courbes en Annexes), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.

| | | | |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------|
| IC₅₀ (µg/mL) | Extraits hydroalcooliques | | |
| | <i>C. calcitrapa</i> Feuilles | <i>C. calcitrapa</i> Epines | |
| | 290,15 | 415,06 | |
| | Phénols purs | | |
| | Quercétine | Acide gallique | Catéchine |
| | 13,90 | 4,21 | 6,24 |

Les résultats présentes dans le tableau IV montrent que les extraits des feuilles de *Centaurea Calcitrapa* ont une activité antioxydante plus importante par rapport à ceux des épines, comme le montre leur valeur d'IC₅₀ plus faible (290,15µg/ml contre 415,06 µg/ml). Cela signifie qu'une plus faible concentration d'extrait de feuilles est nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH, ce qui reflète une plus grande capacité antioxydante. Par comparaison, les composés phénoliques purs (Acide gallique, quercétine et catéchine) présentent des IC₅₀ beaucoup plus faible, indiquant une activité antioxydante beaucoup plus

élevée par rapport à ceux des extraits, la plus forte étant de l'acide gallique (4,12 µg/ml).

Ce résultat est cohérent avec d'autres études, où les standards phénoliques sont généralement plus actifs du fait de leur structure définie et de leur pureté, cette activité étant liée au nombre de groupements hydroxyles et à la conjugaison des doubles liaisons favorisant la stabilisation des radicaux libres (**Aboul-Soud *et al.*, 2022 ; Benbacer *et al.*, 2022**).

Cette forte capacité antioxydante, en particulier celle observée dans l'extrait de feuilles, pourrait jouer un rôle protecteur contre les dommages génotoxiques induits par le stress oxydatif, en limitant la formation et l'action des espèces réactives de l'oxygène responsables des altérations de l'ADN (**Pisoschi *et al.*, 2015**).

III.3.3 Activité neutralisante du H₂O₂ par les extraits *Centaurea calcitrapa*:

Les résultats du test anti-H₂O₂ est illustré dans les courbes de la figure suivante :

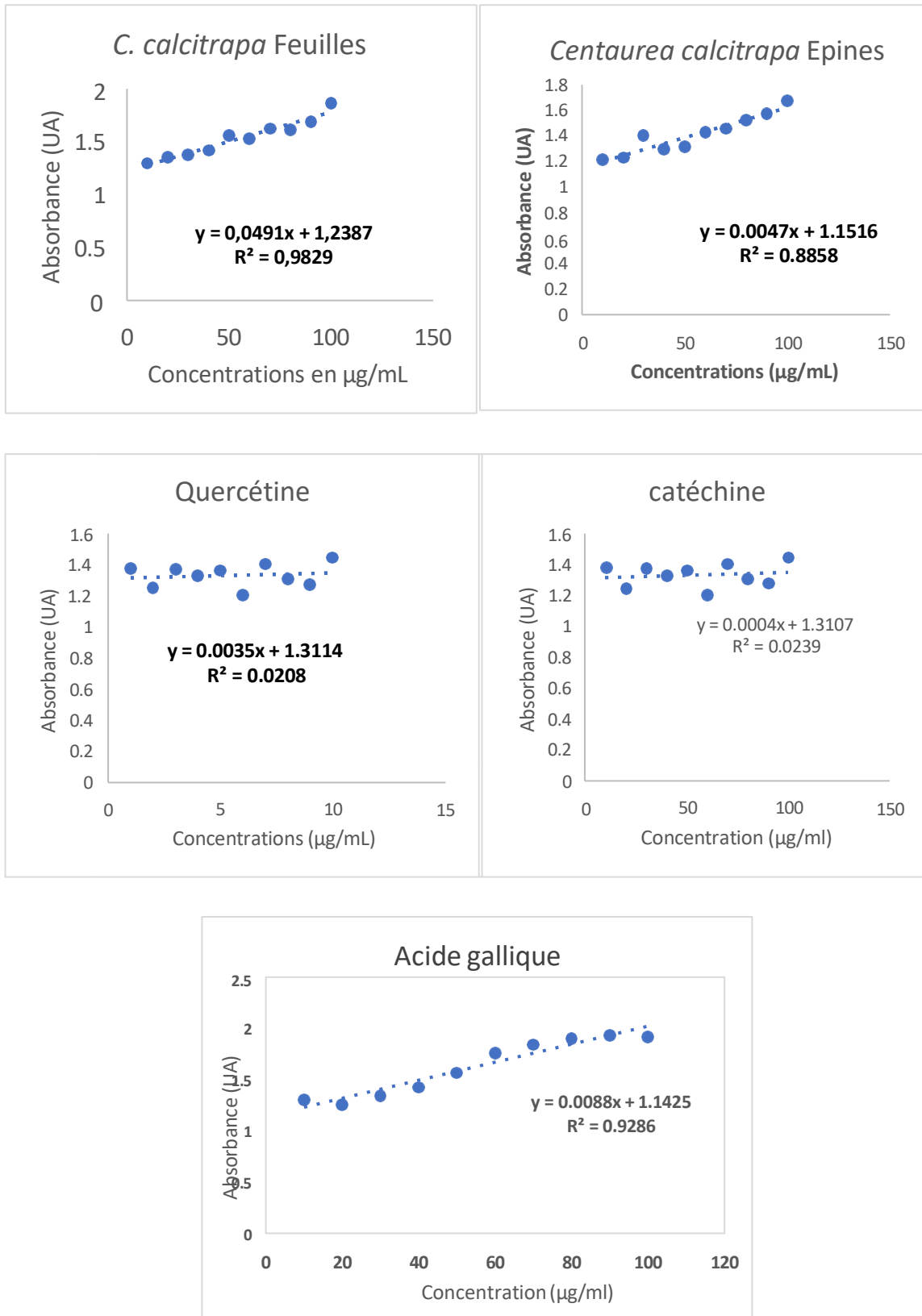


Figure 10 : Activités neutralisantes du H₂O₂ par les extraits de feuilles et des épines de *Centaurea calcitrapa* comparées aux standards phénoliques testés dans les mêmes conditions.

L'activité neutralisante du H_2O_2 par les extraits de *Centaurea calcitrapa* montre une légère progression en fonction de la concentration, mais ne permettent pas de conclure que celles-ci exercent des différences significatives. Néanmoins, nous retenons que le comportement des extraits testés est semblable à celui des standards testés, plus particulièrement celui de l'acide gallique testé aux mêmes concentrations que les extraits étudiés. Cette légère activité antioxydante vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène pourrait tout de même contribuer, dans une moindre mesure, à atténuer les effets génotoxiques liés au stress oxydatif, en limitant partiellement la formation des ERO susceptibles d'endommager l'ADN.

III.3.4 Test phénanthroline et Fe^{3+} :

Dans ce test, la capacité des extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa* à réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} a été évaluée à l'aide de la phénanthroline. La formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline, de couleur rouge-orangée, permet de quantifier l'activité réductrice des extraits. Les résultats obtenus à différentes concentrations sont illustrés dans la figure suivante.

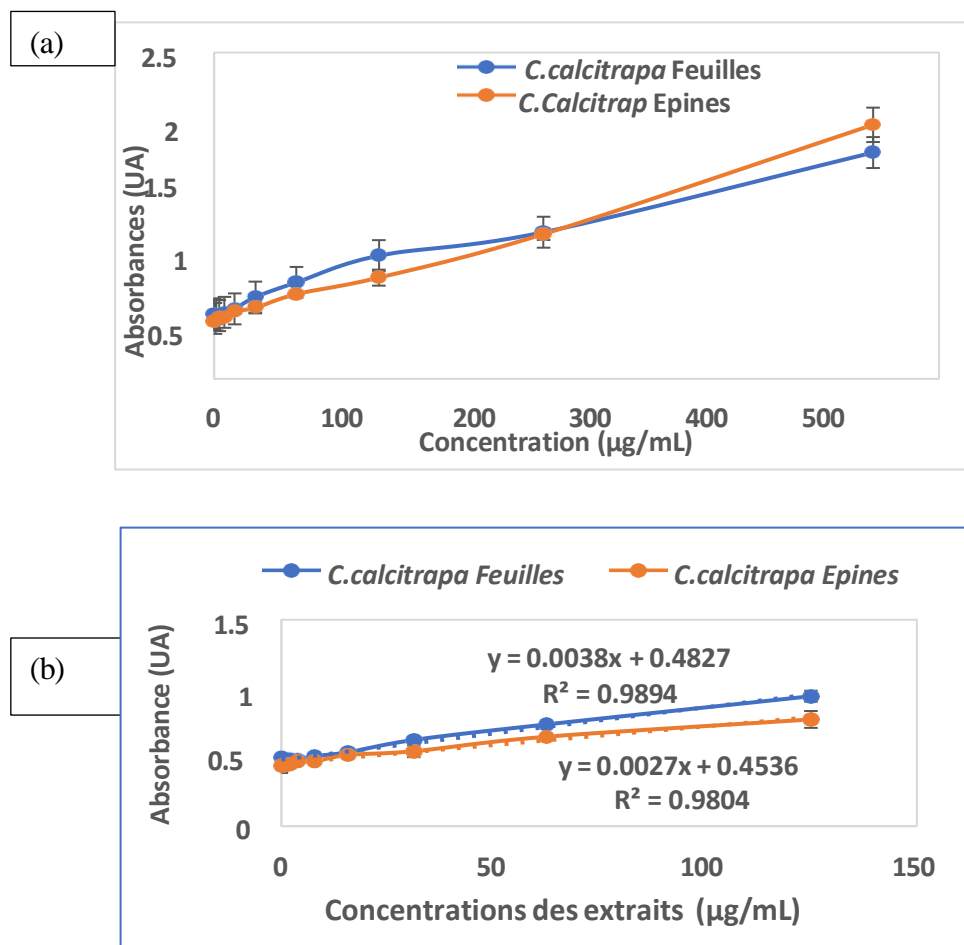


Figure 11 : Résultats de l'activité réductrice du Fe^{2+} des extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et Epines) évaluée par le test à la phénanthroline. (a) Courbe générale ; (b) Agrandissement sur les faibles concentrations.

Les valeurs de $A_{0,5}$ déterminées à partir des courbes ci-dessus sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau V : Les valeurs des concentrations nécessaires des extraits de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines) pour atteindre 50% d'activité réductrice (test à la phénanthroline)

| | <i>C.calcitrapa</i> Feuilles | <i>C.calcitrapa</i> Epines |
|-----------|------------------------------|----------------------------|
| $A_{0,5}$ | 4,55 $\mu\text{g/ml}$ | 17,18 $\mu\text{g/ml}$ |

$A_{0,5}$: Concentration nécessaire pour atteindre 50% d'absorbance maximale

Les courbes (a) et (b) illustrent l'augmentation progressive de l'absorbance en fonction de la concentration des extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa*, indiquant une capacité réductrice dose-dépendante. On observe que les extraits des feuilles présentent une absorbance légèrement plus élevée à chaque concentration, indiquant une meilleure capacité à réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette tendance est confirmée par les valeurs de $A_{0,5}$: 4,55 $\mu\text{g/ml}$ pour les feuilles, ce qui signifie que les feuilles nécessitent une faible concentration pour atteindre 50% d'activité réductrice.

Ces résultats montrent que les feuilles de *C.calcitrapa* possèdent une meilleure activité antioxydante réductrice que les épines, probablement en raison de leur plus grande richesse en composés phénoliques. Ce pouvoir réducteur pourrait s'expliquer par la présence de groupes hydroxyles dans les polyphénols, capables de donner des électrons et de stabiliser les radicaux libres (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008).

Une étude de Yefrida *et al.* (2018) a montré des résultats similaires en testant des extraits végétaux riches en flavonoïdes à l'aide du test de la phénanthroline. Ils ont obtenu une $A_{0,5}$ de 4,80 $\mu\text{g/ml}$, très proche de celle obtenue ici pour les feuilles de *C.calcitrapa*, dans une gamme d'efficacité comparable aux extraits les plus actifs.

Ces résultats confirment que cette plante, notamment ses feuilles, constitue une source prometteuse de composés antioxydants réducteurs et que son activité est comparable, voire supérieure à celle de nombreuses autres espèces médicinales étudiées Yefrida *et al.* (2018).

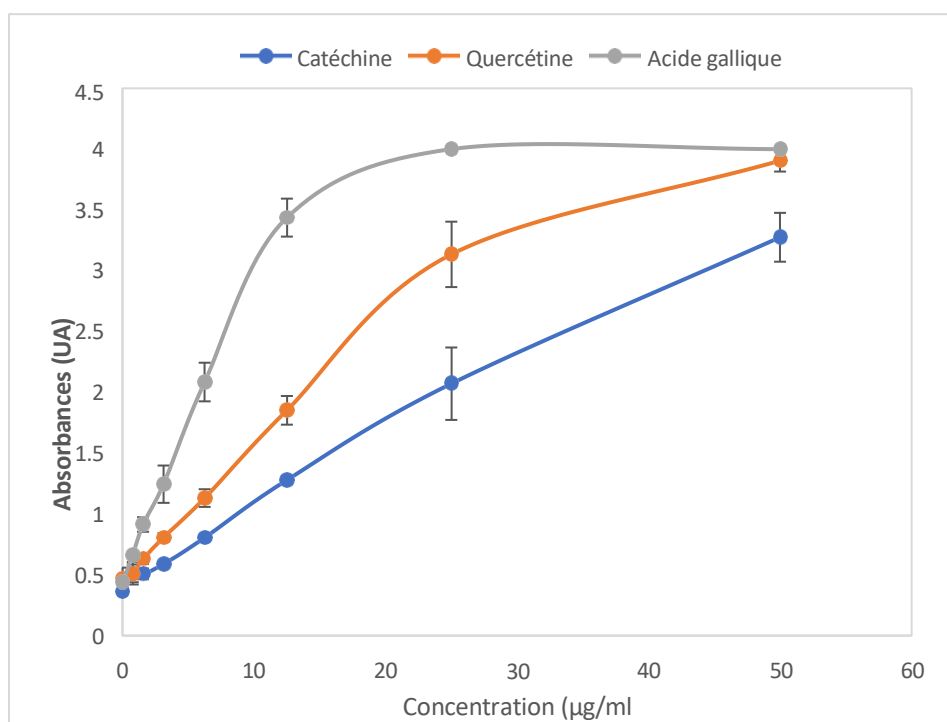


Figure 12 : Résultats de l'activité réductrice de Fe^{3+} par les molécules phénoliques pures testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits étudiés évalué par le test à la phénanthroline.

Les courbes obtenus pour les standards (Acide gallique, quercétine et catéchine) (courbe en annexe 06) ont permis de déterminer les valeurs d' $A_{0,5}$, les résultats dans le tableau VI :

Tableau VI : Les valeurs des concentrations nécessaires des métabolites phénoliques purs (Acide gallique, quercétine et catéchine) pour atteindre 50% d'activité réductrice (test à la phénanthroline), analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.

$A_{0,5}$: Concentration nécessaire pour atteindre 50% d'absorbance maximale

| | Catéchine | Quercétine | Acide gallique |
|-----------|-------------|-------------|----------------|
| $A_{0,5}$ | 29,48 µg/mL | 8,732142857 | 0,125 |

Les courbes illustrées dans la figure montrent l'évolution de l'activité réductrice du Fe^{3+} par les composés phénoliques purs (catéchine, quercétine et acide gallique) en fonction de leurs concentrations. On observe que l'activité antioxydante augmente de manière dose-dépendante pour les trois standards. Toutefois, des différences notables apparaissent selon la molécule testée. L'acide gallique se distingue par une forte activité réductrice dès les faibles concentrations, atteignant 50 % d'activité à seulement 0,125 µg/mL, suivie par la quercétine ($A_{0,5} = 8,57$ µg/mL) et enfin la catéchine ($A_{0,5} = 29,18$ µg/mL).

Ces résultats indiquent que l'acide gallique possède la capacité la plus élevée à réduire les ions ferriques, ce qui reflète son fort pouvoir antioxydant dans ce test. Cette efficacité est probablement liée à sa structure chimique, riche en groupes hydroxyles facilement oxydables (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008).

En résumé, bien que les extraits de *Centaurea calcitrapa*, en particulier ceux issus des feuilles, aient montré une activité antioxydante notable dans le test à la phénanthroline, leurs effets restent inférieurs à ceux des standards utilisés (acide gallique, quercétine et catéchine). Cette différence s'explique par la nature complexe des extraits, qui contiennent des mélanges de métabolites en proportions variables, contrairement aux standards qui sont des composés purs et hautement actifs. Toutefois, les extraits de feuilles se distinguent par une meilleure efficacité, probablement liée à leur richesse en polyphénols, confirmant leur potentiel antioxydant intéressant (Barros *et al.*, 2011 ; Özcan *et al.*, 2023). Cette activité réductrice est essentielle dans le contexte de la génotoxicité, car elle permet de limiter les réactions de Fenton incontrôlables responsables de la production excessive de radicaux hydroxyles (Qiang *et al.*, 2003).

III.3.5 Test de la phénanthroline et Fe^{2+} en présence de H_2O_2 .

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de *C. calcitrapa*, un test basé sur la réaction de Fenton a été utilisé, en mesurant leur capacité à préserver le Fe^{2+} de l'oxydation par le H_2O_2 , ce qui permet la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline, analysés et représentés graphiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.

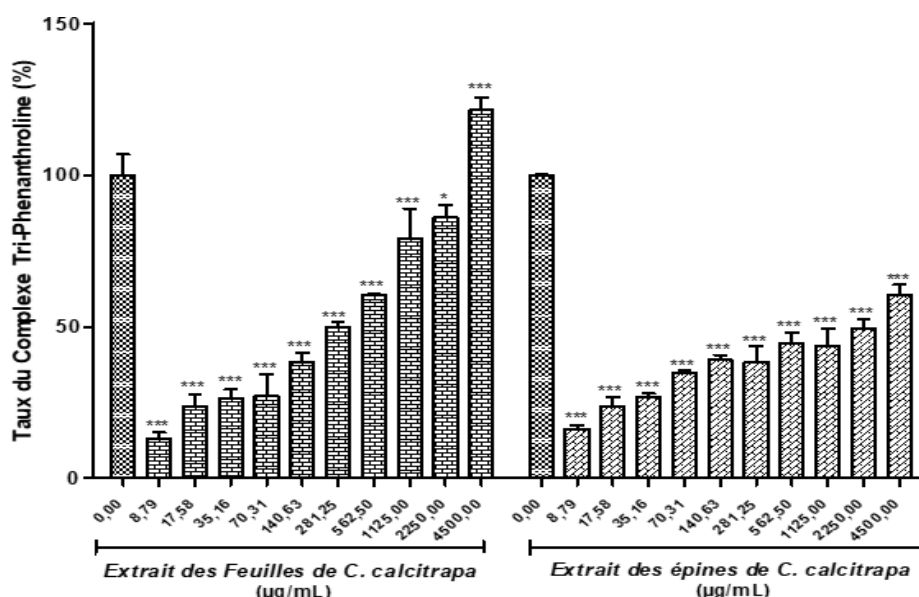


Figure 13 : Effet des extraits hydroalcoolique de feuilles et d'épines de *Centaurea calcitrapa* sur la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline en présence de H_2O_2 .

La courbe montre que les deux extraits hydroalcooliques de *Centaurea calcitrapa* (feuilles et épines) ont une capacité à protéger le fer ferreux (Fe^{2+}) contre l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en maintenant la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline, ce qui reflète une activité antioxydante potentielle.

Dans le contrôle positif ($0\mu\text{g/ml}$ d'extrait), le taux de complexation est d'environ 100%, ce qui montre que tout le Fe^{2+} est resté disponible pour réagir avec la phénanthroline, sans protection antioxydante. En effet, lorsque les extraits sont ajoutés, on observe une augmentation progressive de l'absorbance avec l'augmentation des concentrations, traduisant une meilleure préservation de Fe^{2+} . A faible concentration ($8,79\mu\text{g/ml}$), les deux extraits (feuilles et épines) entraînent une baisse de l'absorbance, indiquant une protection limitée. En revanche à des concentrations plus élevées, notamment à partir de $140,63\mu\text{g/ml}$, l'absorbance augmente visiblement, atteignant un niveau proche de celui du contrôle pour l'extrait de feuilles à $4500\mu\text{g/ml}$, ce qui a marqué une activité plus importante par rapport à celle des épines. Cela signifie que les composés présents dans les extraits (feuilles et épines) protègent le Fe^{2+} de l'oxydation par le H_2O_2 , probablement en neutralisant les radicaux hydroxyles ou en réduisant Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Les résultats montrent que les extraits ne se comportent pas comme des inhibiteurs classiques de la réaction de Fenton. Au contraire, ils stabilisent le Fe^{2+} , empêchant sa conversion en Fe^{3+} , malgré la présence du H_2O_2 . Cela peut être dû à :

Une activité réductrice, qui permet de régénérer Fe^{2+} à partir de Fe^{3+} ; une action antiradicalaire, qui neutralise les radicaux hydroxyles produits ; ou une interférence dans le mécanisme de la réaction de Fenton (Qiang et al., 2003).

Ces observations sont en accord avec les travaux de Mukhopadhyay et al. (2016), qui ont rapporté que certains extraits végétaux riches en flavonoïdes peuvent empêcher l'oxydation de Fe^{2+} en bloquant l'action des radicaux hydroxyles produits par le H_2O_2 . De même, Szydłowska-Czerniak et al. (2008) ont montré que les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes avec des groupes hydroxyles, ont une affinité pour les ions métalliques, leur permettant de limiter la formation de ERO.

Le fait que l'extrait des feuilles soit plus efficace que celui des épines est cohérent avec leur teneur plus élevée en antioxydants phénoliques, ce qui confirme que la richesse en métabolites secondaires est liée à l'activité antioxydante.

Ce test confirme que les extraits de *Centaurea calcitrapa* ont une capacité à protéger le Fe^{2+} contre l'oxydation en présence de H_2O_2 , ce qui reflète une activité antioxydante efficace, surtout pour les feuilles. Cela soutient l'idée que cette plante pourrait être une

source naturelle d'antioxydants, utile pour prévenir les dommages cellulaires liés au stress oxydatif.

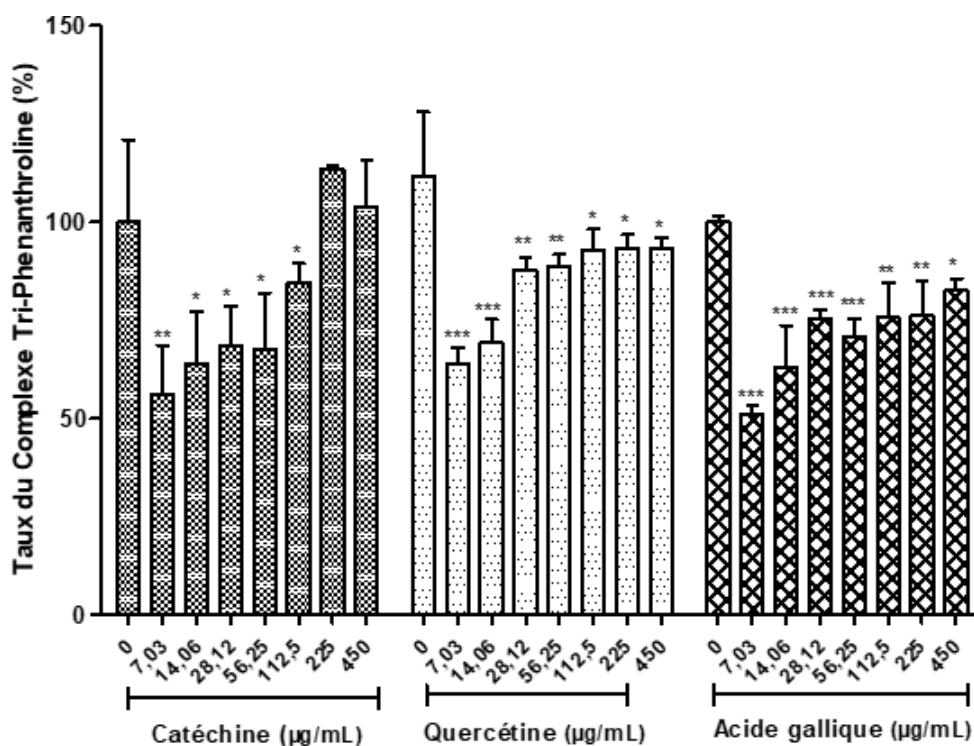


Figure 14 : Effet des métabolites phénoliques purs (acide gallique, quercétine, catéchine) sur la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline en présence de H_2O_2 , analysés et représentés graphiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.

La courbe montre que les trois composés phénoliques testés (catéchine, quercétine, acide gallique) présentent des effets différents sur la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline en présence de H_2O_2 .

La catéchine : À faible concentration (7,03 à 28,12 $\mu\text{g/mL}$), l'absorbance est modérée, avec un taux autour de 60 %, ce qui indique une protection partielle du Fe^{2+} . À partir de 56,25 $\mu\text{g/mL}$, l'absorbance augmente et atteint presque 100 % à 225 et 450 $\mu\text{g/mL}$, ce qui montre que la catéchine protège efficacement le Fe^{2+} de l'oxydation.

La quercétine : Montre une activité antioxydante plus rapide. Dès 28,12 $\mu\text{g/mL}$, l'absorbance dépasse 60 %, et reste proche de 100 % jusqu'à 450 $\mu\text{g/mL}$. Cela suggère que la quercétine est plus efficace que la catéchine à faible dose.

L'acide gallique : Donne un résultat opposé. Même à 450 µg/mL, l'absorbance reste faible (environ 70 %), et elle est encore plus réduite à 7,03 µg/ml et 28,12µg/ml (près de 50 à 60%), montrant que ce composé favorise l'oxydation du Fe²⁺ ou ne le protège pas efficacement.

Ces résultats montrent que la quercétine est le composé le plus efficace pour protéger le Fe²⁺, suivie de la catéchine, tandis que l'acide gallique montre une faible capacité protectrice dans ce test. Ces résultats confirment que la structure chimique joue un rôle important dans l'activité antioxydante.

En comparant les deux courbes (extraits de *Centaurea calcitrapa* et composés phénoliques purs), on observe que les extraits (notamment les feuilles) montrent une activité protectrice croissante avec la concentration, atteignant des taux de complexation proches et supérieure de 100 % à forte dose (2250–4500 µg/mL). Cette activité est comparable à celle de la quercétine, qui agit dès de faibles concentrations ($\geq 56,25$ µg/mL), mais plus modérée que celle de la catéchine, qui est active à doses plus élevées. En revanche, l'acide gallique présente une protection plus faible.

Ces résultats suggèrent que l'efficacité des extraits est liée à leur teneur en flavonoïdes comme la quercétine, expliquant pourquoi les feuilles sont plus actives que les épines. La comparaison confirme donc que les composés phénoliques présents dans la plante notamment les flavonoïdes, sont responsables de l'effet antioxydant observé, lequel pourrait contribuer à diminuer les lésions oxydatives de l'ADN et ainsi atténuer la génotoxicité induite par les ERO.

Conclusion et perspectives

Ce travail a porté sur l'analyse phytochimique comparative et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits hydroalcooliques de feuilles et d'épines de *Centaurea calcitrapa*, avec une attention particulière portée à leur effet protecteur contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), connues pour leur rôle dans l'activité génotoxique.

L'étude phytochimique a montré que les feuilles sont plus riches en composés phénoliques totaux et flavonoïdes, tandis que les épines présentent une teneur plus élevée en tanins condensés. Ces différences de composition ont influencé l'activité antioxydante mesurée à travers quatre tests complémentaires :

Le test **DPPH** a révélé une meilleure capacité des feuilles à neutraliser les radicaux libres, traduisant une activité antiradicalaire plus marquée que celle des épines. De même, le test **H₂O₂** a révélé de bonnes activités légèrement progressives en fonction des concentrations testées et nous retenons un comportement des extraits semblable à celui de l'acide gallique vis à vis de cette espèce réactive de 'oxygène. On outre, le test **Phénanthroline + Fe³⁺** a montré une activité réductrice plus forte dans les feuilles, indiquant leur aptitude à réduire le fer ferrique. Enfin, le test **Phénanthroline + Fe²⁺ + H₂O₂** a confirmé que l'extrait de feuilles protège plus efficacement le fer ferreux contre l'oxydation induite par le peroxyde d'hydrogène, ce qui reflète sa capacité à limiter la formation de radicaux hydroxyles toxiques.

Globalement, les extraits foliaires se sont révélés plus actifs et plus protecteurs, ce qui peut être lié à la nature chimique de leurs métabolites secondaires. Ces résultats suggèrent que *Centaurea calcitrapa*, en particulier ses feuilles, pourrait être valorisée comme source naturelle d'antioxydants, utiles dans la prévention des effets génotoxiques liés au stress oxydatif.

Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de confirmer les effets protecteurs observés *in vitro* par des tests *in vivo*, puis d'isoler et d'identifier les molécules actives responsables de l'activité antioxydante. Une évaluation de la toxicité des extraits reste également nécessaire avant toute utilisation thérapeutique. Enfin, ces recherches pourraient conduire à des applications pharmaceutiques, cosmétiques ou nutritionnelles, et être élargies à d'autres espèces du genre *Centaurea* afin de valoriser la biodiversité locale.

Références bibliographiques

A

1. Abdel-Sattar, E., & El-Sharif, F. (2015). Genotoxicity and mutagenicity of *Centaurea calcitrapa* in cultured mammalian cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.030>
2. AbdulSalam, S. F., Thowfeik, F. S., & Merino, E. J. (2016). Excessive Reactive Oxygen Species and Exotic DNA Lesions as an Exploitable Liability. *Biochemistry*, 55(38), 5341–5352. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00733>
3. Aboul-Soud, M. A. M., Alsharif, K. F., Kamel, M., Shati, A. A., Almalki, A. H., Al-Khalawi, A., ... & Mousa, A. M. (2022). Antioxidant, Anti-Proliferative Activity and Chemical Fingerprinting of *Centaurea calcitrapa* against Breast Cancer Cells and Molecular Docking of Caspase-3. *Antioxidants*, 11(8), 1514. <https://doi.org/10.3390/antiox11081514>
4. Ahmad, R. et al. (2020). Biological and phytochemical investigations of the genus *Centaurea*: A review. *Plants*, 9(9), 1203. <https://doi.org/10.3390/plants9091203>
5. Asri-Rezaei, S., et al. (2022). Biological activities of methanolic extract of *Centaurea calcitrapa*: An in vitro evaluation on cancer cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 2745129. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9405406/>
6. Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H.K., Atmani, D., Verpoorte, R., & Choi, Y.H. (2016). Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 88,65–77. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.001>.
7. Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(Suppl 1), 1–6.

B

8. Bajalan, I., et al. (2017). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from leaves and flowers of *Centaurea cyanus*. *Scientific Reports*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01486-z>

9. Banožić, M. et al. (2020). Wild edible plants traditionally used in the Mediterranean region. *Foods*, 9(10), 1296. <https://doi.org/10.3390/foods9101296>
10. Barbehenn, R. V., & Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
11. Barros, L. et al. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of *Centaurea* species. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1554–1559. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.016>
12. Bektas, T. et al. (2020). Chemical composition and biological activities of *Centaurea calcitrapa* extracts. *Natural Product Research*, 34(24), 3517–3521. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1584491>
13. Benarfa, A., et al. (2020). Évaluation phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Centaurea africana*. *Journal Algérien des Régions Arides*, 14(1), 23–32.
14. Benbacer, L., Elbouzidi, A., & Boumendjel, M. (2022). Antioxidant activity and phenolic content of plant extracts: Correlation and comparative evaluation using DPPH assay. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(3), 85–92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120309>
15. Benmansour, A., et al. (2023). Phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antidiabetic activities of *Centaurea calcitrapa* extracts. *Journal of Functional Foods*, Volume 108, 105951. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39063653/>
16. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

C

17. Çitoğlu, G. S., Acıkara, Ö. B., & Yeşilada, E. (2015). Methoxylated flavonoids from *Centaurea calcitrapa* subsp. *calcitrapa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(3), 569–570. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10600-015-1404-7>

18. Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

D

19. Dif M.M., Benchiha H., Mehdadi Z., Benali-Toumi F., Benyahia M., Bouterfas K. (2015). Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0976-5>
20. Dimkić, I., Ristivojević, P., Vukojević, J., Milenković, M., Radojević, I., Stević, T., ... & Stanković, S. (2020). New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01120-5>
21. Dorta, E., et al. (2014). Antioxidant capacity and correlation with phenolic compounds and vitamin C content in fresh and processed guava (*Psidium guajava*). *Food Research International*, 55, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.032>

E

22. El-Darier, S. M., Pekmez, M., Bona, M., Aras-Perk, A., & Arda, N. (2011). Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Three *Centaurea* Species. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(2), 31–36. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.2.7>

F

23. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

G

24. García-Jacas, N., Uysal, T., Romashchenko, K., Suárez-Santiago, V. N., Ertuğrul, K., & Susanna, A. (2006). *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. *Annals of Botany*, 98(4), 741–753. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl162>

H

25. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press. Livre de référence internationale (extraits disponibles sur Google Books)

J

26. Janačković, P., Rajčević, N., Gavrilović, M., Novaković, J., Giweli, A., Stešević, D., & Marin, P. D. (2019). Essential oil composition of five *Artemisia* (Compositae) species in regards to chemophenetics. *Biochemical Systematics and Ecology*, 87, 103960. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.103960>

K

27. Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962. https://doi.org/10.1021/jf990146l**
28. Kumar, R. (2017). Synthesis and characterization of a new photoluminescent aluminum complex: bis(8-hydroxyquinoline) (1,10-phenanthroline) aluminum, Al(Phen)₂. *Journal of Nano- and Electronic Physics*, 9(5), 05048-1–05048-3.

M

29. Maksimović, Z., Malencić, Đ., & Kovačević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.006>

30. Mekky, A. E., et al. (2024). Phytochemical Analysis of *Centaurea calcitrapa* L. Aerial Flowering Parts Serial Solvent Extracts and Its Antibacterial and Antioxidant Activities. *Life*, 14(7), 900. <https://www.mdpi.com/2075-1729/14/7/900>
31. Moghannem SAM, El-Sherbiny GEM & Sharaf MH (2016). Antibacterial activity of medicinal plant (*Centaurea calcitrapa*) against multi-drug resistant bacteria (MDRB). *The Asia Journal of Applied Microbiology*, 3(1): 12–25. DOI : 10.18488/journal.33/2016.3.1/[33.1.12.25](https://doi.org/10.18488/journal.33/2016.3.1/33.1.12.25)
32. Møller, P., et al. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring of occupational exposure to DNA-damaging agents and radiation. *Mutation Research*, 468(1), 121–135. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00057-6)
33. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.

N

34. Natarajan, A. T., & Darroudi, F. (1991). Use of human lymphocyte cultures for assessment of individual sensitivity to environmental mutagens/carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 250(1–2), 71–82.

O

35. Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE). (2016). Essai n° 474: Test du Micronoyau sur Érythrocytes de Mammifères. Paris : OECD Publishing. https://www.oecd.org/fr/publications/essai-n-474-test-du-micronoyau-sur-erythrocytes-de-mammiferes_9789264264779-fr.html
36. Özcan, M. M., Kose, E. O., & Kapucu, A. (2023). Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of *Centaurea calcitrapa* Extracts. *Life*, 14(7), 900. <https://doi.org/10.3390/life14070900>

P

37. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
38. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals : properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
39. Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna
40. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
41. POWO (2023). *Centaurea calcitrapa* L. Plants of the World Online. Royal Botanic Gardens, Kew. <https://powo.science.kew.org>

Q

42. Qiang, Z. M., Chang, J. H., & Huang, C. P. (2003). Electrochemical regeneration of Fe²⁺ in Fenton oxidation processes. *Water Research*, 37(6), 1308–1319. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00461-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00461-X)
43. Quezel, P., & Santa, S (1963). *Nouvelle Flore D'Algerie Et Des Régions Désertiques méridionales ; France ; Paris éd du CNRS ; 1-2.*

R

44. Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003–1008.

S

45. Saad, B., Boumendjel, A., & Berrahmoune, M. (2022). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*. *Phytochemistry Letters*, 9(2), 145-156. <https://pg.univ-batna2.dz>
46. Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., & Flora, S. J. S. (2014). Protective effect of combined administration of 2-mercaptoethane sulfonate and succimers against arsenic-induced oxidative stress in male rats. *Toxicology Reports*, 1, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.003>
47. Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
48. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
49. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
50. Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>.

T

51. Toueille, M., El-Andaloussi, N., Frit, P., & Salles, B. (2007). The human Rad51 paralog XRCC3 participates in early stages of homologous recombination repair. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4399–4411. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm440>

V

52. Valko, M. et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

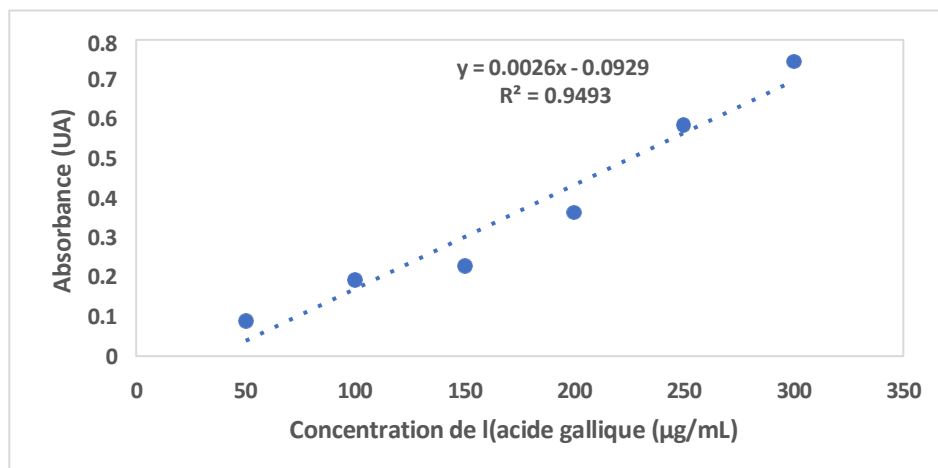
Y

53. Yefrida, Y., Syukri, D., & Taslim, T. (2018). Total Phenolic, Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of *Myrmecodia pendans* Using UV-Vis Spectrophotometer. *International Journal of ChemTech Research*, 11(2), 1–7
54. Yesil-Celiktas, O., Sevimli-Gur, C. & Bedir, E. (2007). Inhibitory effects of *Centaurea* species on inflammatory mediators: NF- κ B, COX-1, and COX-2. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 271–277. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17245684/>

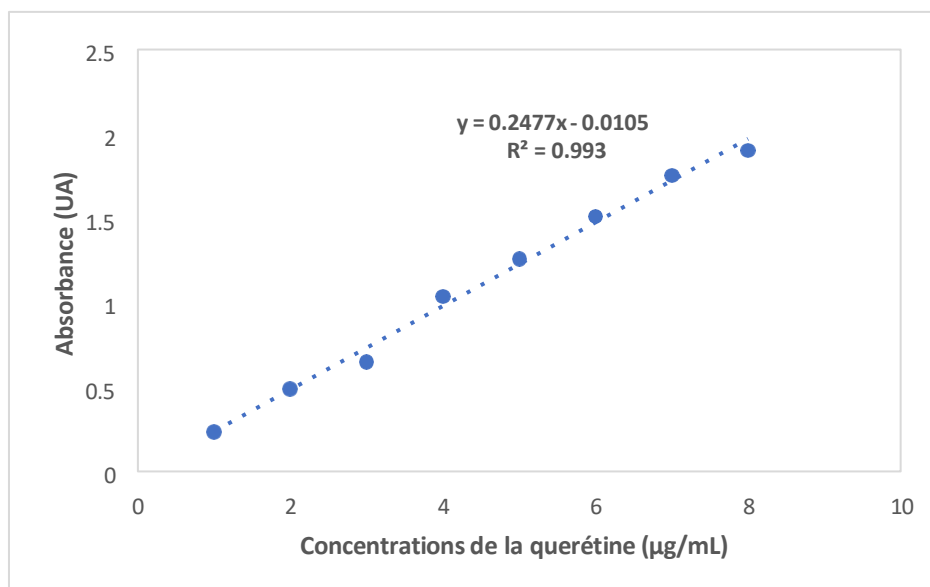
Annexes

Annexes :

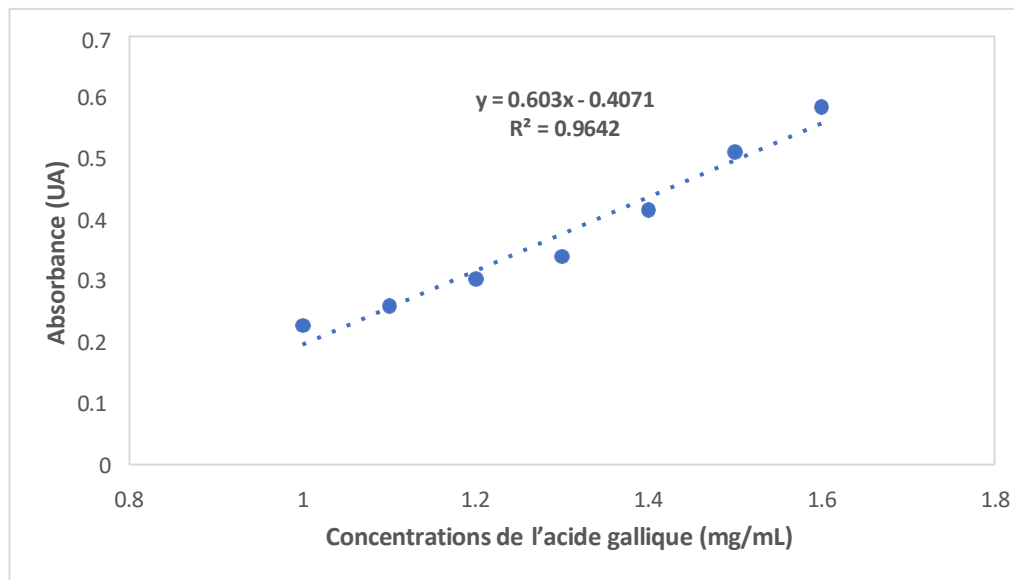
Annexes 01 : Courbe d'étalonnage du dosage des phénols totaux réalisée par des concentrations croissantes de l'acide gallique.



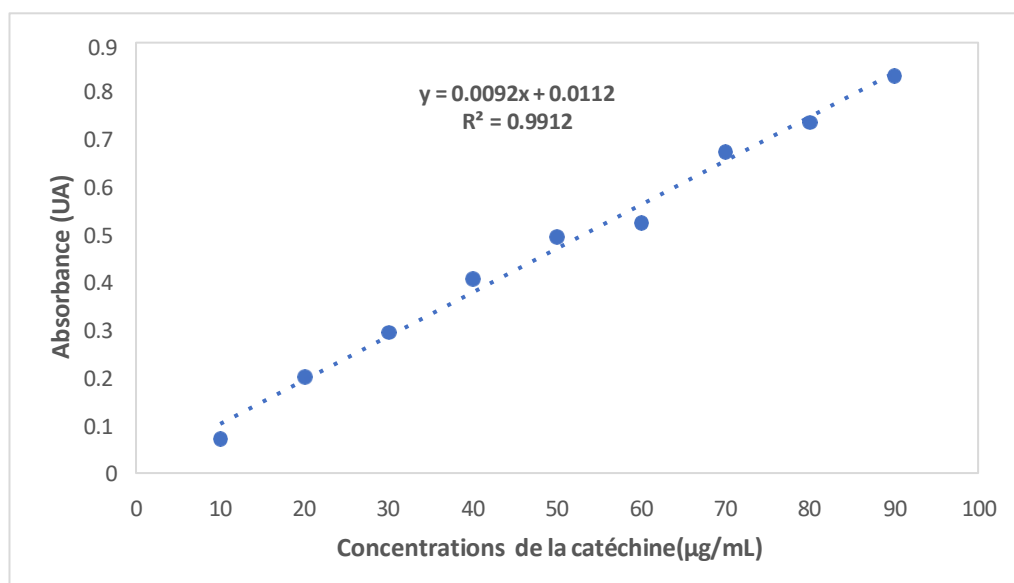
Annexe 02 : Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes réalisée par des concentrations croissantes de la quercétine.



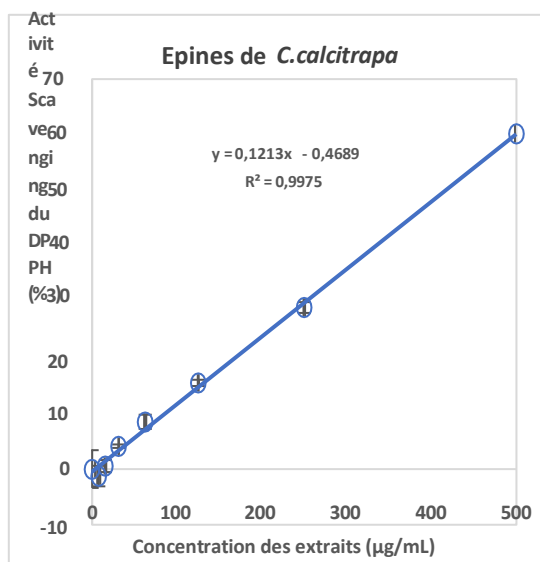
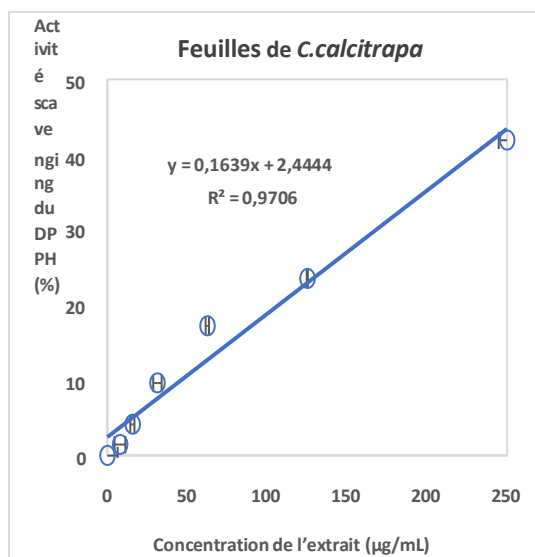
Annexe 03 : Courbe d'étalonnage du dosage des tannins hydrolysables réalisée par des concentrations croissantes de l'acide gallique.



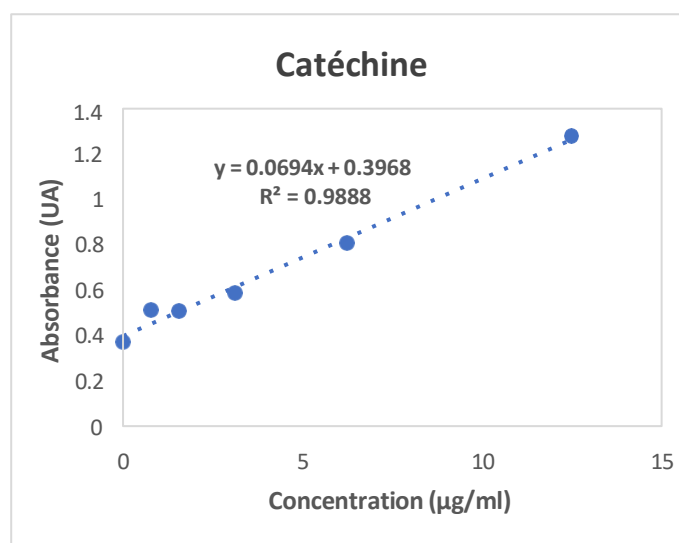
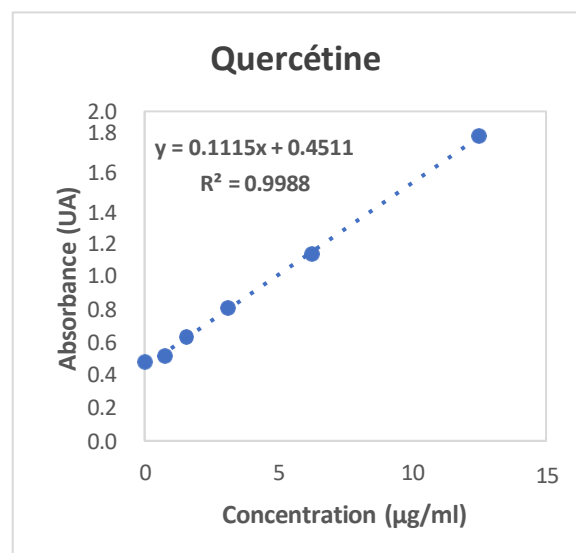
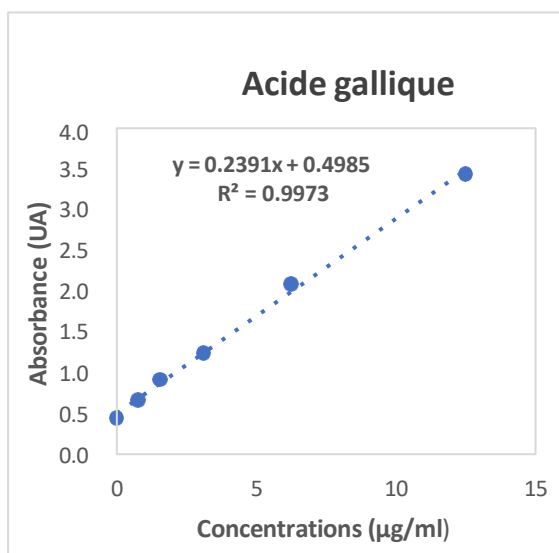
Annexe 04 : Courbe d'étalonnage du dosage des tannins condensés réalisée par des concentrations croissantes de la catéchine.



Annexes 05 : Courbes des résultats des activités scavenging du radical DPPH par les extraits de *Centaurea calcitrapa* (Feuilles et épines).



Annexe 06: Courbes des résultats de l'activité réductrice du Fe^{3+} par les molécules phénoliques pures testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits étudiés évalué par le test à la phénanthroline



Résumé :

Ce mémoire porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits hydroalcooliques des feuilles et des épines de *Centaurea calcitrapa*. L'objectif principal est d'évaluer leur potentiel protecteur contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), connues pour leur rôle dans la génotoxicité.

Des analyses ont été menées pour quantifier les métabolites secondaires (phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables). Quatre tests antioxydants in vitro ont été utilisés : le test DPPH, le test de piégeage du H₂O₂, le test à la phénanthroline + Fe³⁺ et celui à la phénanthroline + Fe²⁺ + H₂O₂. Les extraits de feuilles ont montré une activité antioxydante supérieure à celle des épines, en lien avec leur teneur plus élevée en composés phénoliques.

Ces résultats suggèrent que *Centaurea calcitrapa*, en particulier ses feuilles, est une source prometteuse de composés antioxydants naturels pouvant limiter les dommages génotoxiques liés au stress oxydatif.

Mots clés : *Centaurea calcitrapa*, Antioxydants, Phytochimie, espèces réactives de l'oxygène (ERO), Génotoxicité.

Abstract:

This work focuses on the phytochemical investigation and antioxidant activity evaluation of hydroalcoholic extracts from leaves and spines of *Centaurea calcitrapa*. The main objective is to assess their protective potential against reactive oxygen species (ROS), which are known to cause genotoxic effects.

The content of secondary metabolites (total phenols, flavonoids, hydrolyzable and condensed tannins) was quantified. Four in vitro antioxidant tests were applied: the DPPH radical scavenging assay, hydrogen peroxide scavenging test, Fe³⁺ reduction test with phenanthroline, and the Fenton reaction- based test (Fe²⁺ + H₂O₂ + phenanthroline). Leaf extracts exhibited stronger antioxidant activity than spines, which correlates with their higher phenolic compound content.

These findings suggest that *Centaurea calcitrapa*, especially its leaves, is a promising natural source of antioxidant compounds that may help reduce genotoxic damage caused by oxidative stress.

Key words: *Centaurea calcitrapa* , Antioxidants , Phytochemical investigation , Reactive oxygen species (ROS) , Genotoxicity.

الملخص:

نبات وأشواك لأوراق الهيدروكحولية للمستخلصات للأكسدة المضاد النشاط وتقييم الفيتوكيميائية الدراسة على العمل هذا يتركز

في بدورها المعروفة، (ERO) للأوكسجين التفاعلية الأنواع ضد الوقائية قدرتها تقييم إلى البحث هذا يهدف. *Centaurea calcitrapa*. الجينية السمية أحداث

(tanins) والتانينات (flavonoïdes) والفلافونويدات، (phénols totaux) الكلية الفينولات مثل الثانوية المستقلبات محتوى تحديد تم، DPPH اختبار: وهي، للأكسدة المضاد النشاط لتقييم (in vitro) المختبر في اختبارات أربعة تطبيق تم كما. للتحلل والقليلة المكثفة بنوعها فينتون تفاعل واختبار، (phenanthroline) فينانترولين باستخدام Fe³⁺ اختزال واختبار، (H₂O₂) الهيدروجين بيروكسيد اصطياد واختبار. (فينانثرولين + H₂O₂ + Fe²⁺)

المركبات من الأعلى محتواها إلى ذلك ويُعزى، الأشواك مستخلصات من أقوى للأكسدة مضادًا نشاطًا الأوراق مستخلصات أظهرت قد للأكسدة مضادة لمركبات واعدًا طبيعيًا مصدرًا يُعد، أوراقه وخاصة، *Centaurea calcitrapa* نبات أن إلى النتائج هذه تشير. الفينولية. التأكسدي الإجهاد عن الناتجة الجينية الأضرار تقليل في تساهم
المفتاحية الكلمات

الجينية السمية، (ERO) للأوكسجين التفاعلية الأنواع، الفيتوكيميائية الدراسة، الأكسدة مضادات، *Centaurea calcitrapa*.