

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**Du diplôme de Master Académique**

Présenté par :

**ATTALLAH Turkia**

**AZZI Nadjat**

**HADJAB Madjda**

**Intitulé**

**Activité antioxydante des extraits aqueux et  
méthanolique d'*Asperula hirsuta***

Soutenu devant le jury composé de :

Mr. KHERBACHE Abdallah

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Encadrant

Mr. FREIDJA Mohamed Lamine

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Président

Mr. HARRAR Abdenassar

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examineur

Année universitaire : 2021 /2022

# *Remerciements*

*Avant toute chose, nous remercions ALLAH tout puissant pour nous avoir donné la force et la patience et de nous avoir gardé en bonne santé pour mener ce travail à terme*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à notre promoteur Mr. KHERBACHE Abdallah pour avoir accepté de nous encadrer. Nous ne vous remercierons jamais assez pour votre patience, votre soutien et vos précieux conseils.*

*Merci pour la confiance que vous nous avez faite.*

*Nous adressons nos profonds remerciements à Mr. FREIDJA Mohamed Lamine d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à remercier Mr. HARRAR Abdenassar de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail, et aussi qui nous a inlassablement accompagnés durant tout le travail avec son soutien et ses valeureux conseils comme un chef de promotion.*

*Nous remercions également tous qui ont participé à la réalisation de ce modeste travail de près ou de loin et surtout aux membres du laboratoire de Biochimie et Microbiologie en particulier : Mr. SGHERI Kamel, Mlle. Halima, Mme. Meriem et Mme. Ilham.*

*Nous adressons nos remerciements à toute la promotion de la Biochimie Appliquée et Nos chères collègues.*

# *Dédicaces*

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Je dédie ce travail à :*

*A mes très chers parents : Kamel et Fahíma, aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent. Puisse ALLAH, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue Vie ;*

*A mes grands (es) parents ; Amara, Ibrahim, Djamíla et Turkía ;*

*A Toute la famille ATTALLAH et OUDINA ;*

*A mes chers frères et sœur : Alaa díne, Haíthem et Tesním*

*A mes oncles et tantes chacun son nom et surtout ma tante Asma ;*

*A mes cousines et cousins ;*

*A mes chères « Nadjat et Madjda » qui ont partagées avec moi les moments difficiles de ce travail et ses familles ;*

*A toute ma famille, proche ou éloignée ; Spécialement à mes fidèles amies : Souhíla, Imane et surtout Leyla, Imane, Asma pour son soutien ; A mes collègues Dounía, Amína, Amna, Mebarka, Sabah et à toute la promotion de Biochimie Appliquée.*

*Turkía*

# Dédicaces

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Je dédie ce travail à :*

*A mes très chers parents : **Moussa** et **Noura**, aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent. Puisse Allah, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue Vie ;*

*A mes grands (es) parents ; **Soulaïman**, **Amer**, **Sakheria** et **Fatima** ;*

*A mes chers frères et soeurs : **Fouzïa**, **Fares** et sa femme **Roufaïda**, **Farouk**, **Kamel**, **Chaïma** et **Asma** qui m'ont soutenu par leurs conseils et encouragements ;*

*A Toute la famille **AZZI** et **MEGHICHE** ;*

*A mes oncles et mes tantes ;*

*A mes cousines et cousins ;*

*A mes chères « **Madjda** et **Turkia** » qui a partagé avec moi les moments difficile de ce travail et ses familles ;*

*A toute ma famille, proche ou éloignée ; Spécialement à mes fidèles amies : **Nour**, **Nadia**, **Sara**, **Sara**, **Meriem** et surtout **Aya**, **Leyla**, **Imane**, **Asma** et **Dalila**, pour son soutien ; A mes collègues **Dounia**, **Amina**, **Amna**, **Mebarka**, **Sabah** et à toute la promotion de Biochimie Appliquée.*

**Nadjat**

# Dédicaces

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents : **Ahmed** et **Fatima**, aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent. Puisse Allah, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue Vie ;

A mes grands (es) parents ; **Boulanwar Mohamed, Mohamed, Amria** et **Lwiza** ;

A mes chers frères et soeurs : **Hamza, Bissal, Mohamed, Oussama, Wahid** et sa femme **Nada** et sa fille **Katkout Chahida, Sofiane, Khadija, Lyliia** et ses filles et fils : **Manar, Manel, Abdou, Mamo** qui m'ont soutenu par leurs conseils et encouragements ;

A Toute la famille **HADJAB** et **ALI KAFSI** ;

A mes oncles et mes tantes ; A mes cousines et cousins ;

A mes chères « **Nadjat** et **Turkia** » qui a partagé avec moi les moments difficile de ce travail et ses familles ;

A toute ma famille, proche ou éloignée ; Spécialement à mes fidèles amies : **Rania, Nadia, Nour, Ibtissam, Nour El imane, Samira, Randa** et surtout **Ilham, Marwa, Leyla, Imane**, et **Safa** pour son soutien ; A mes collègues **Dounia, Amina, Amna, Mebarka, Sabah, Gijou** et **Hakou** et à toute la promotion de Biochimie Appliquée.

**Madjda**

## **Abstract**

The present study aims to evaluate the antioxidant effect of aqueous (Aq.E) and methanolic (Met.E) extracts of *Asperula hirsuta*. Total polyphenols and flavonoids contents of both extracts were determined using Folin-Ciocalteu reagent and the trichloride of aluminum, respectively. The results showed that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of  $137.06 \pm 10.52$   $\mu\text{g}$  GAE/mg of extract and  $15.81 \pm 0.48$   $\mu\text{g}$  QE/mg of extract, respectively. The antioxidant activity of the two extracts was evaluated using total antioxidant capacity and linoleic acid peroxidation tests. The results showed that the Aq.E and the Met.E possess an important antioxidant capacity ( $125.84 \pm 7.12$   $\mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid/mg of Aq.E and  $169.01 \pm 13.25$   $\mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid/mg of the Met.E). Moreover, both extracts inhibited the peroxydation of the linoleic acid with 84 %. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of aerial part of *Asperula hirsuta* have a good antioxidant property, which can be used in food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** *Asperula hirsuta*, Oxidative stress, Antioxidant, Polyphenols, Plant extracts.

## الملخص

تهدف هذه الدراسة الى تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta*. تم تقدير المحتوى الكمي للمركبات متعددة الفينول والفلافونويدات لكلا المستخلصين باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu و  $AlCl_3$  على الترتيب. أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي غني بهذه المركبات وقدر ذلك ب  $10.52 \pm 137.06$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $00.48 \pm 15.81$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص. تم تقييم القدرة المضاد للأكسدة باستعمال كل من اختبار TAC وأكسدة حمض اللينوليك. أظهرت النتائج أن كل من مستخلص المائي والميثانولي يمتلكان قدرة كبيرة مضادة للأكسدة تقدر ب  $7.12 \pm 125.84$  ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ من مستخلص المائي و  $13.25 \pm 169.01$  ميكروغرام من حمض الاسكوربيك/مغ من مستخلص الميثانولي. كما ان لكلا المستخلصين فعالية معتبرة لتثبيط أكسدة حمض اللينوليك بقيمة 84%. من خلال النتائج يمكن استخلاص ان كل من المستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta* يمتازان بخصائص مضادة للأكسدة، ما يدعم استعمالها في مجال الصناعات الغذائية والصيدلانية.

**الكلمات المفتاحية:** *Asperula hirsuta*، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، متعددة الفينول، المستخلصات النباتية.

## Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux (E.Aq) et l'extrait méthanolique (E.Met) de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux extraits ont été déterminées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de  $137,06 \pm 10,52 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $15,81 \pm 0,48 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de TAC et de la peroxydation de l'acide linoléique. Les résultats montrent que l'E.Aq et l'E.Met possèdent une capacité antioxydante importante ( $125,84 \pm 7,12 \mu\text{g EVC} / \text{mg}$  d'E.Aq et  $169,01 \pm 13,25 \mu\text{g EVC} / \text{mg}$  d'E.Met). Par ailleurs les deux extraits ont inhibé la peroxydation de l'acide linoléique avec 84 %. En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* possèdent une activité antioxydante importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

**Mots clés :** *Asperula hirsuta*, Stress oxydatif, Antioxydant, Polyphénols, Extraits de plantes.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AGPI** : Acide gras polyinsaturée

**AU** : Acide urique

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

**TAC** : Capacité antioxydante totale

**CAT** : Catalase

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSG** : Glutathion oxydé

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**RNS** : Espèces réactives de l'azote

**ROS** : Espèces réactives oxygénées

**SOD** : Superoxyde dismutase

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène.....	5
<b>Figure 2.</b> Réaction de la peroxydation lipidique. ....	6
<b>Figure 3.</b> Classification des antioxydants selon les sources et leur nature.....	8
<b>Figure 4.</b> Aspect morphologique d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	12
<b>Figure 5.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	16
<b>Figure 6.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	16
<b>Figure 7.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. ....	17
<b>Figure 8.</b> Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	21
<b>Figure 9.</b> Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	22

## LISTES DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Différentes maladies qui affectées par le stress oxydatif. ....	7
<b>Tableau 2.</b> Grande famille des polyphénols. ....	11
<b>Tableau 3.</b> Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Asperula hisurta</i> . ....	20
<b>Tableau 4.</b> Capacité antioxydante total des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Asperula hisurta</i> . .....	21

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. STRESS OXYDATIF.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. RADICAUX LIBRES.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. FORMES DES RADICAUX LIBRES .....</b>	<b>3</b>
I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène .....	3
I.2.2. Espèces réactives de l'azote .....	3
<b>I.3. SOURCES DES RADICAUX LIBRES.....</b>	<b>4</b>
<b>I.4. OXYDATION DES MACROMOLECULES .....</b>	<b>4</b>
I.4.1. Peroxydation lipidique .....	4
I.4.2. Oxydation de l'ADN.....	5
I.4.3. Oxydation des protéines .....	5
I.4.4. Oxydation des glucides .....	6
<b>I.5. EFFET PATHOLOGIQUE DE STRESS OXYDATIF .....</b>	<b>7</b>
<b>II. ANTIOXYDANTS.....</b>	<b>7</b>
<b>II.1. ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES .....</b>	<b>7</b>
II.1.1. Superoxydes dismutases (SOD) .....	7
II.1.2. Catalase (CAT).....	8
II.1.3. Glutathion peroxydase (GPx).....	8
II.1.4. Glutathion Réductase (GR) .....	8
II.1.5. Peroxyrédoxine (Prx) .....	8
<b>II.2. ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES .....</b>	<b>9</b>
II.2.1. Glutathion (GSH) .....	9
II.2.2. Acide urique .....	9
II.2.3. Bilirubine.....	9

II.2.4. Ubiquinones .....	9
II.2.5. Caroténoïdes .....	9
II.2.6. Oligoéléments.....	10
II.2.7. Vitamine C et E .....	10
II.2.8. Polyphénols .....	10
<b>III. LA PLANTE <i>ASPERULA HIRSUTA</i> (DESF.) .....</b>	<b>10</b>
<b>III.1. DESCRIPTION ET CLASSIFICATION BOTANIQUE .....</b>	<b>10</b>
<b>III.2. PHYTOCHIMIE .....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>III.3. USAGE TRADITIONNEL ET PROPRIETES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>12</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>14</b>
<b>I. MATERIELS .....</b>	<b>14</b>
<b>I.1. MATERIEL VEGETAL.....</b>	<b>14</b>
<b>I.2. PRODUITS ET REACTIFS .....</b>	<b>14</b>
<b>II. METHODES.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1. PREPARATION DE L'EXTRAIT AQUEUX.....</b>	<b>14</b>
<b>II.2. PREPARATION DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE.....</b>	<b>14</b>
<b>II.3. DOSAGE DES POLYPHENOLS .....</b>	<b>15</b>
<b>II.4. DOSAGE DES FLAVONOÏDES .....</b>	<b>15</b>
<b>II.5. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS D'<i>ASPERULA HIRSUTA</i> .....</b>	<b>17</b>
II.5.1. Capacité antioxydante totale .....	17
II.5.2. Peroxydation de l'acide linoléique .....	18
<b>II.6. ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>18</b>
<b>I. RESULTATS .....</b>	<b>20</b>
<b>I.1. PREPARATION DES EXTRAITS D'<i>ASPERULA HIRSUTA</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>I.2. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX ET DES FLAVONOÏDES.....</b>	<b>20</b>

<b>I.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS D'ASPERULA HIRSUTA.....</b>	<b>20</b>
I.3.1. Capacité antioxydante totale (TAC).....	20
I.3.2. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique .....	21
<b>II. DISCUSSION.....</b>	<b>23</b>
<b>II.1. EXTRACTION ET DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX ET DES FLAVONOÏDES.....</b>	<b>23</b>
<b>II.2. ACTIVITES ANTIOXYDANTES .....</b>	<b>25</b>
II.2.1. Capacité antioxydante totale.....	25
II.2.2. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique .....	26
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>28</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>30</b>

# **INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION**

Pendant fort longtemps, les plantes médicinales furent le principal recours de l'homme pour la fabrication de remèdes pharmaceutiques et agroalimentaires. En effet, les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans le système de soins traditionnels et dans les différentes industries : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. Les extraits méthanoliques et aqueux issus des plantes médicinales constituent également un axe important dans cette voie de recherche. Quant à leur possible effet contre certaines maladies, les métabolites secondaires antioxydants comme les polyphénols et les flavonoïdes par leurs potentiels thérapeutiques constituent ces dernières années un axe de recherche prometteur et très varié.

Le stress oxydant qui est généré par le déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les antioxydants, au profit des premiers est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que : l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et le vieillissement. La supplémentation par les antioxydants devient une nécessité. Mais l'utilisation des antioxydants de synthèse présente des effets indésirables sur la santé humaine.

L'Algérie possède une flore riche mais peu valorisée du point de vue de ses potentiels chimiques sensoriels ou biologiques, qu'ils ont utilisés beaucoup plus dans la médecine traditionnelle, car ils sont riches en antioxydants. Le concept de cette recherche est d'évaluer l'activité antioxydante de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta* dont les objectifs sont :

- Préparation des extraits aqueux et méthanoliques d'*Asperula hirsuta*.
- Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta* par deux tests : la capacité antioxydante totale (TAC) et l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un phénomène physiopathologique désigne un déséquilibre de la balance entre les systèmes producteurs des radicaux libres et les systèmes de défense antioxydants, cet état est caractérisé par une réduction de la capacité des systèmes endogènes à lutter contre l'attaque oxydante dirigée vers des biomolécules cibles avec des modifications irréversibles de lipides, de protéines et d'acides nucléiques, conduisant à l'apparition des diverses pathologies humaines (Zbadi *et al.*, 2018 ; Baudin, 2020).

### I.1. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme étant une molécule qui possède un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) sur leur orbitale externe, cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, tentant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité (Ahmadinejad *et al.*, 2017). Les radicaux libres sont générés en réponse à des stimuli endogènes et exogènes. À des concentrations physiologiques, les radicaux libres agissent comme des molécules de signalisation médiant la croissance, la migration et la différenciation des cellules, tandis qu'à des concentrations plus élevées, elles induisent la mort cellulaire, l'apoptose et la sénescence (vieillescence) (Ziech *et al.*, 2010).

### I.2. Formes des radicaux libres

#### I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont un terme collectif qui comprend à la fois les radicaux oxygénés, tels que les radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ), hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), peroxyde ( $RO_2$ ) et hydroperoxyde ( $HO_2$ ), et certains oxydants non radicaux, tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) et l'ozone ( $O_3$ ), qui peuvent être facilement convertis en radicaux. Les ROS sont également produits au cours du métabolisme normal et sont impliqués dans nombreux phénomènes biologiques. À l'état normal, la production des ROS reste faible et n'intéresse qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration (Panth *et al.*, 2016 ; Ahmadinejad *et al.*, 2017).

#### I.2.2. Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote (RNS) comprennent des radicaux libres comme l'oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ), ainsi que des non-radicaux comme le peroxyde nitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ), l'oxyde nitreux ( $HNO_2$ ) et les peroxyde nitrates d'alkyle ( $RONOO$ ). Le monoxyde d'azote

(NO<sup>•</sup>) est issu de l'oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide amine L-Arginine (Johansen *et al.*, 2005).

### **I.3. Sources des radicaux libres**

La formation des radicaux libres dans l'organisme due à des multiples facteurs environnementaux et biologiques, donc le stress oxydatif peut être divisé en mécanismes exogènes et endogènes (**figure 1**). Parmi les facteurs environnementaux, on a : l'exposition aux rayons ultraviolets du soleil, aux rayons X et gamma, aux radiations, au tabagisme, à la pollution, à l'ozone et à certains médicaments, produits chimiques (solvants, métaux...) ou pesticides. La production biologique des ROS est résultante des réactions métaboliques où les espèces d'oxygène sont des donneurs/accepteurs intermédiaires d'électrons. La production de radicaux libres est un processus naturel qui peut se produire avec ou sans l'aide d'enzymes. Les radicaux libres sont formés au niveau de divers organites cellulaires : les mitochondries, les microsomes, le cytosol à travers plusieurs systèmes enzymatiques tels que la xanthine oxydase, la monoamine oxydases, la NAD(P)H oxydase, la cyclooxygénase et le lipooxygénase (Wang *et al.*, 2011 ; Ahmadinejad *et al.*, 2017).

### **I.4. Oxydation des macromolécules**

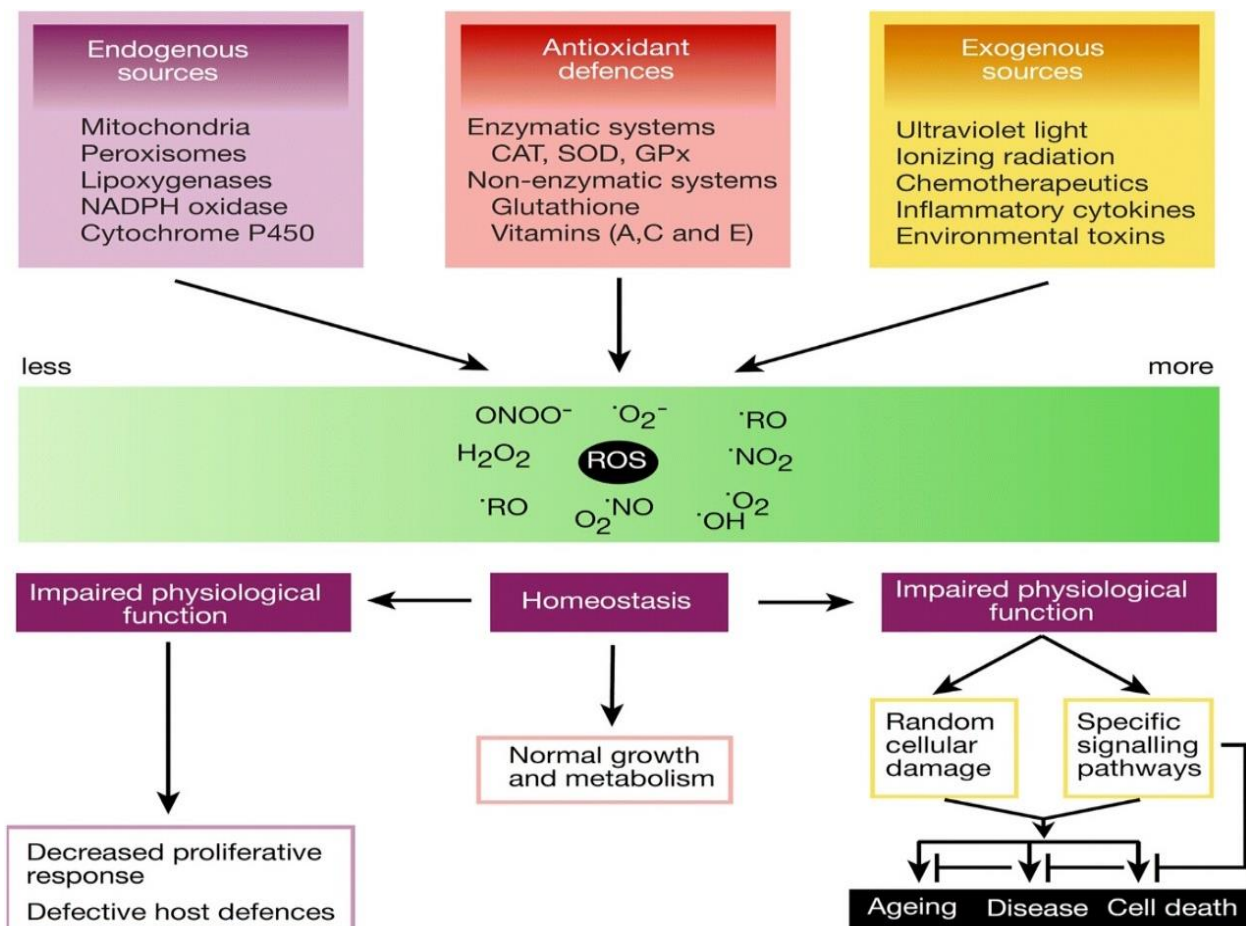
Les dommages cellulaires de l'oxydation sont souvent représentés par des modifications de diverses macromolécules, dont les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques.

#### **I.4.1. Peroxydation lipidique**

Les membranes plasmiques sont largement composées d'acide gras polyinsaturé (AGPI), qui sont exceptionnellement sensibles aux dommages oxydatifs en raison de la présence de plus de deux doubles liaisons carbone-carbone. L'oxydation des lipides est une réaction en chaîne de radicaux libres, qui peut être divisés en 3 phases : initiation, propagation et termination (**figure 2**), leurs les principaux produits primaires sont les hydroperoxydes lipidiques (LOOH). Parmi les nombreux aldéhydes différents qui peuvent apparaître comme produits secondaires au cours de la peroxydation des lipides, il existe des structures telles que le malondialdéhyde (MDA), le propanal, l'hexanal et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) est le plus toxique (Ayala *et al.*, 2014). L'oxydation affecte les principales caractéristiques structurelles et fonctionnelles de la membrane, y compris la fluidité, ainsi que l'activité des protéines transmembranaires et enzymatiques, cette dernière cause des dommages à l'ADN et aux protéines par l'oxydation de radicaux peroxydes ou alkoxydes lipidiques (Tvrdá *et al.*, 2017).

### I.4.2. Oxydation de l'ADN

Des niveaux élevés de ROS également ciblé ADN nucléaire et mitochondrial par des métabolites réactifs ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$  et  $\text{NO}^\bullet$ ). Il a été rapporté qu' $\text{OH}^\bullet$  est le plus réactif ce qu'implique des dommages à tous les composants de la molécule d'ADN, endommageant à la fois les bases puriques et pyrimidiques ainsi que le squelette de désoxyribose, des mutations, des délétions ou des translocations, et la réticulation avec des protéines, des ruptures de brins. Les lésions de l'ADN entraînent divers effets physiologiques, tels qu'une réduction de la synthèse des protéines, ainsi que l'arrêt ou l'induction de la transcription, des erreurs de réplication. Ces affections fréquemment l'origine mutagenèse, carcinogenèse (Gill et Tuteja, 2010). Le marqueur le plus couramment utilisé pour tenir compte de l'oxydation de l'ADN est la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OH-G) (Birben *et al.*, 2012).

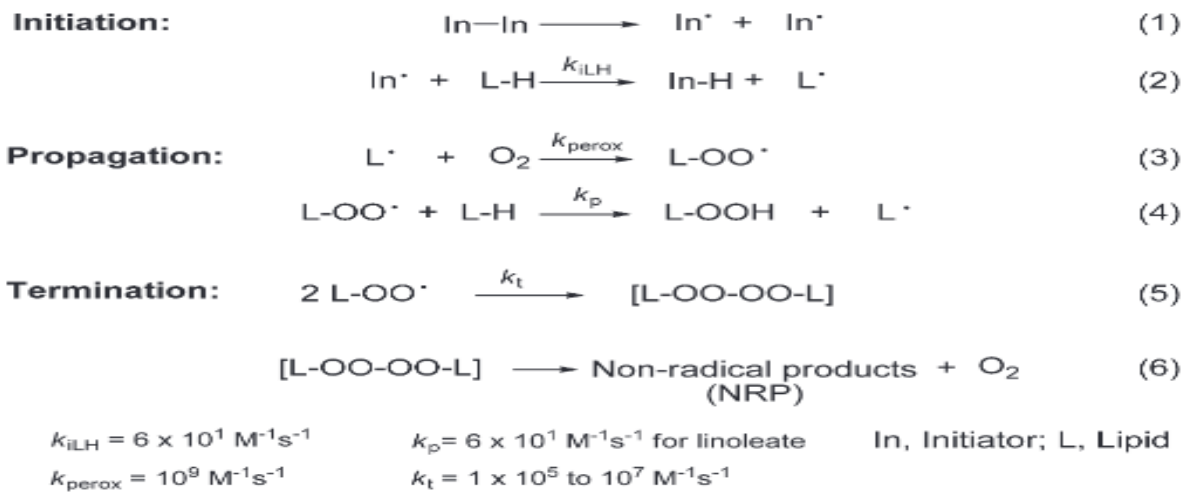


**Figure 1.** Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène (Krumova et Cosa, 2016).

### I.4.3. Oxydation des protéines

Les protéines sont des cibles critiques pour l'oxydation en raison de leur abondance et de leurs constantes de vitesse élevées pour les interactions avec divers ROS intracellulaire et

extracellulaire (Tvrdá *et al.*, 2017). L'oxydation peut être attaquée les liaisons peptidiques qui provoque la modification directe de l'activité des protéines à lieu par nitrosylation, carboxylation, la formation de liaisons disulfure et la glutathionylation, et la modification indirecte à lieu par conjugaison avec les produits de dégradation de la peroxydation des acides gras. Par ailleurs, l'extrême génération de ROS et de charge électrique modifiée augmente la sensibilité des protéines à la protéolyse (Hakeem *et al.*, 2014). Les protéines oxydées deviennent également très hydrophobes, soit par élimination des groupements amines ionisables, ou par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Alors elles vont façonner des amas anormaux dans ou autour des cellules (Favier, 2003). La carbonylation des protéines est un marqueur largement utilisé de l'oxydation des protéines résultent d'un certain nombre d'acides aminés protéiques (Pisoschi et Pop, 2015).



**Figure 2.** Réaction de la peroxydation lipidique (Yin *et al.*, 2011).

#### I.4.4. Oxydation des glucides

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycane du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH<sup>•</sup>, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

## I.5. Effet pathologique de stress oxydatif

Le stress oxydatif est un phénomène associé à de nombreuses maladies. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant, car selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs pathogènes ou des anomalies génétiques spécifiques et individuelles (**tableau 1**) (Favier A, 2006).

**Tableau 1.** Les différentes maladies qui affectées par le stress oxydatif (Favier A, 2006).

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agranulomatose septique</li> <li>• Psoriasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancers</li> <li>• Autoimmunité</li> <li>• Cataracte</li> <li>• Dégénérescence maculaire</li> <li>• Sclérose latérale amyotrophique</li> <li>• Photo-veillissement cutané</li> <li>• Photosensibilisation</li> <li>• Irradiation</li> <li>• Intoxications : CCl<sub>4</sub>, Cd, Fe, alcool,</li> <li>• Hémochromatose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladie d'Alzheimer</li> <li>• Stérilités masculines</li> <li>• Maladies virales : EBV, HVB</li> <li>• Rhumatismes</li> <li>• Athérome</li> <li>• Asthme</li> <li>• Insuffisance respiratoire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabète</li> <li>• Insuffisance rénale</li> <li>• Mucoviscidose</li> <li>• Sida</li> <li>• Choc septique</li> <li>• Infarctus du myocarde</li> <li>• Ischémies/reperfusion</li> <li>• Parkinson</li> <li>• Brûlures</li> <li>• Thalassémie</li> <li>• Greffes d'organes</li> </ul> Traitements : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticancéreux</li> <li>• PUVA thérapie</li> <li>• Oxygène hyperbare</li> </ul>

## II. Antioxydants

Les antioxydants sont définis comme des molécules qui éliminent, piègent et inhibent la formation de ROS ou s'opposent à leurs actions. Ils peuvent protéger les cellules contre les ROS par trois mécanismes : la prévention, l'élimination et le traitement et donc, minimiser tout dommage oxydatif potentiel (Tvrdá *et al.*, 2017).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants par divers mécanismes des défenses enzymatiques et non enzymatiques qui se présentent à faible concentration (**figure 3**).

### II.1. Antioxydants enzymatiques

#### II.1.1. Superoxydes dismutases (SOD)

Elles sont classées en trois groupes ; le cuivre et le zinc (Cu,Zn-SODs), le manganèse (Mn-SODs) ou le fer (Fe-SODs), qui sont principalement localisées dans le cytosol, les mitochondries et interviennent dans la première ligne de système de défense contre les espèces réactives de l'oxygène. Elles catalysent la dismutation du radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) en oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) et en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ighodaro et Akinloye, 2018).

### II.1.2. Catalase (CAT)

C'est une enzyme dont la fonction principale est de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et en oxygène moléculaire. Se trouve ainsi dans les hématies et les peroxysomes, le cytosol de nombreux tissus et cellules, complétant ainsi la réaction de détoxification engagée par le SOD (Gebicka et Krych-Madej, 2019).

### II.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

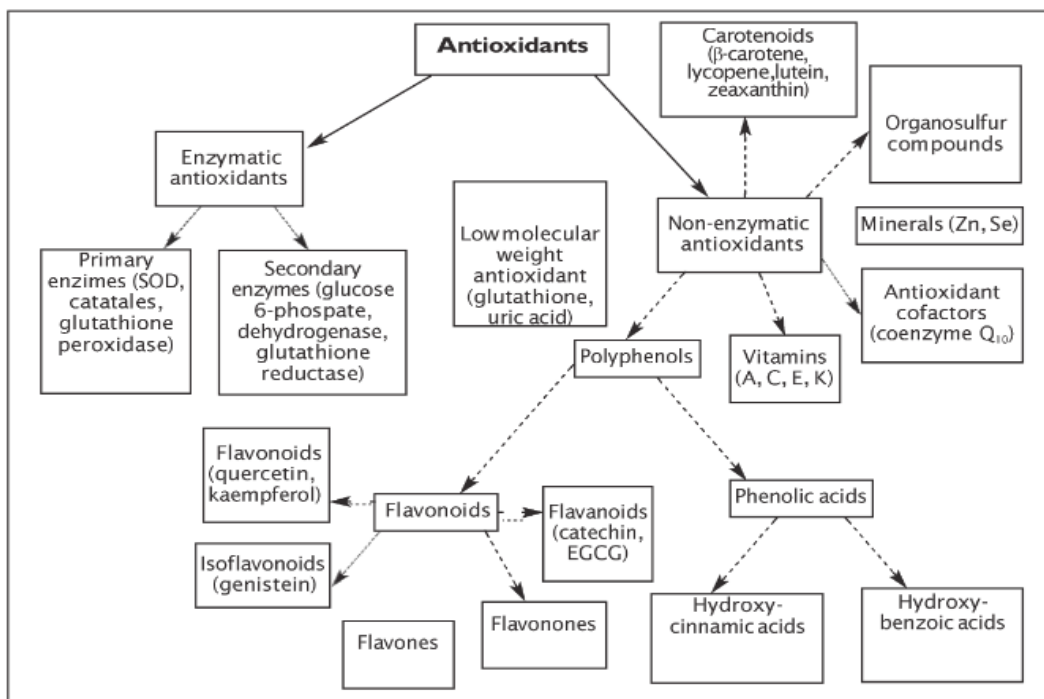
Elles se trouvent dans le cytosol et les mitochondries. Elles catalysent la réduction de peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques, qui agissent en synergie avec le GSH pour éliminer efficacement le  $H_2O_2$  intracellulaire (Tvrdá *et al.*, 2017).

### II.1.4. Glutathion Réductase (GR)

Elle est présentée dans le cytosol et les mitochondries, la GR joue un rôle central dans la défense de la cellule contre les métabolites réactifs de l'oxygène en maintenant le potentiel cellulaire de GSH réduit en catalysant la réduction de GSSG en GSH avec l'oxydation de NADPH qui l'accompagne (Gill *et al.*, 2013).

### II.1.5. Peroxyrédoxine (Prx)

Il est localisé dans les mitochondries et les peroxysomes, il existe 6 isoformes de Prx qui contribuent également au contrôle redox cellulaire par leur capacité à éliminer les hydroperoxydes organiques et  $H_2O_2$  et ainsi que protéger l'ADN contre les dommages de l'oxydation (Circu et Aw, 2010).



**Figure 3.** Classification des antioxydants selon les sources et leur nature (Mehta et Gowder, 2015).

## **II.2. Antioxydants non enzymatiques**

Elles sont divisées en deux principaux groupes soit endogènes (Glutathion (GSH), acide urique, bilirubine, ubiquinones) ou exogènes, apportés alimentaires (vitamine C, E, A, les oligo-éléments, les polyphénols).

### **II.2.1. Glutathion (GSH)**

Le GSH est un tripeptide (L $\gamma$ glutamyl-L-cystéinyl-glycine), qui présent dans toutes les cellules aérobies, il est capable de piéger les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et ainsi ils peuvent servir de donneur d'électrons (cofacteur) pour les enzymes antioxydantes telles que les glutathions peroxydases et les glutathions S-transférases (Couto *et al.*, 2016).

### **II.2.2. Acide urique**

L'acide urique est le produit terminal issu du métabolisme des bases puriques (l'adénine et la guanine) des acides nucléiques. Au pH physiologique, l'acide urique dans le corps existe principalement sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux OH $\cdot$ , ROO $\cdot$ , NOO $\cdot$  (Keenan, 2020).

### **II.2.3. Bilirubine**

C'est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine grâce à l'enzyme hème oxygénase. Il est un piègeur le radicale superoxyde (O $_2^{\cdot}$ ) et les radicaux peroxydes et également, elle protège la vitamine A et l'acide linoléique. La bilirubine est importante dans le cerveau, il se lie à l'albumine et empêche sa pénétration dans les tissus riches en lipides (Vasavda *et al.*, 2019).

### **II.2.4. Ubiquinones**

L'ubiquinone (coenzyme Q) est un composant de la chaîne respiratoire mitochondriale, sous sa forme réduite, il joue un rôle d'un antioxydant puissant, protégeant les phospholipides de la peroxydation (Mehta et Gowder, 2015).

### **II.2.5. Caroténoïdes**

Elle est synthétisée par les plantes et les micro-organismes et présentée dans les tissus membranaires, elles peuvent être classées en deux groupes différents : les carotènes et les Xanthophylles, l'action de se composer sont liés à leur chaîne polyénique qui réagit avec les radicaux libres (Bernstein *et al.*, 2016).

### **II.2.6. Oligoéléments**

Les oligo-éléments sont apportés par l'alimentation ou la nutrition artificielle. Parmi ces oligo-éléments (Cu, Zn, Mn et Se) jouent un rôle des coenzymes qu'ils intervenant dans nombreuses activités biologiques telles que de l'oxydation donc, on peut citer le zinc qui agit comme une cofacture pour la SOD et des métallothionéine, et ainsi contribuant à l'élimination des radicaux superoxyde et les radicaux hydroxyles (Berger et Roussel, 2017).

### **II.2.7. Vitamine C et E**

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble largement ré pondue dans les fruits, il existe sous forme oxydée (l'acide déhydroascorbique), qui se permet la libération d'électrons et explique son intervention dans divers mécanismes d'oxydoréduction, et une capture des radicaux libres oxygénés par ailleurs, elle préserve la vitamine E tissulaire de l'oxydation (Smirnoff, 2018).

La vitamine E ( $\alpha$  tocophérol) est une vitamine liposoluble protège le potentiel cellulaire contre les effets délétères des radicaux libres par l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaire (Chauhan *et al.*, 2013).

### **II.2.8. Polyphénols**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires variés (**tableau 2**) qui présentent une activité antioxydante et que l'on trouve dans les tissus végétaux. Les polyphénols contiennent un cycle aromatique avec des substituants -OH ou OCH<sub>3</sub> qui agissent en synergie, ce qui contribue à leurs fonctions métaboliques, y compris l'activité antioxydante, ainsi qu'ils ont une propriété inhibitrice des nombreuses enzymes telles que les oxygénases, et aussi la chélation des métaux (Hakeem *et al.*, 2014).

## **III. LA PLANTE *ASPERULA HIRSUTA* (DESF.)**

### **III.1. Description et classification botanique**

*Asperula* est un genre important de la famille des Rubiaceae, il comprend 185 espèces et 232 taxons dans le monde entier. Plusieurs études ont montré que l'*A. hirsuta* est une plante sauvage, elle est diffusée dans nombreuses régions méditerranées telles que ; nord d'Afrique (Algérie, Maroc, Tunisie...), en Turquie (41 espèces), en Grèce (38 espèces) et en Australie (21 espèces) (Quezel *et al.*, 1962 ; Şahin *et al.*, 2021).

**Tableau 2.** Grande famille des polyphénols (Defraigne et Pincemail, 2008).

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy- acide	Acide vanillique Acide gallique	Vanille Feuilles de thé
Acides hydro- cinnamiques	Acide caféique Acide férulique Acide chlorogénique Resvératrol (stilbène)	Café Riz, blé, asperges Pelure de pomme de terre, pomme, artichaut, raisin, vin
Flavanoïdes - flavonols - flavones - flavanones - flavones-3-ols - isoflavones	Quercétine, kaempférol luéoline, apigénine naringénine Catéchine, épicatechine génistéine, daidzéine cyanidine	Oignon, brocoli Céleri Agrumes Raisin, thé vert, chocolat, soja Fruits rouges, raisin
Tannins hydrosolubles Ou non	Polyphénols de haut ou non poids moléculaire	
Lignines	Lignane	Bois

*Asperula hirsuta* (*A. hirsuta*) est une herbe annuelle ou vivace à aspect de *Galium*, elle est caractérisée par un tube plus moins long à 4 lobes, et leurs feuilles sont moyennes aux moins verticillées par 6, rétrécies acuminées au sommet, à marges fortement révolutes. Fleurs en cymes terminales denses ramifiées, tétramères, à corolle hypocrateriforme, de couleur blanche ou rose, à 8-15 fleurs longues de 1 cm, à limbe à 4 divisions étalées obtuses. Fruits sont secs à 2 carpelles et glabres. En Algérie, elle est localisée principalement dans le Tell et toutes les régions montagneuses (Quezel *et al.*, 1962).

La taxonomie d'*Asperula hirsuta* selon la flore d'Algérie est la suivante :

<b>Règne :</b> Plantae	<b>Sous-classe :</b> Asteridae
<b>Sous-règne :</b> Tracheobionta	<b>Ordre :</b> Rubiales
<b>Division :</b> Magnoliophyta	<b>Famille :</b> Rubiaceae
<b>Classe :</b> Magnoliopsida	<b>Genre :</b> <i>Asperula</i>
<b>Espèce :</b> <i>Asperula hirsuta</i> (desf.)	

### III.2. Phytochimie

À ce jour, l'espèce *Asperula hirsuta* n'a fait l'objet d'aucune étude chimique et phytochimique. C'est pour ça, plusieurs investigations ont annoncé sur le genre d'*Asperula* pour déterminer sa composition phytochimique. Donc le genre d'*Asperula* contient des glycosides iridoïdes, des glycosides de flavone et des dérivés d'acides phénoliques, et aussi des triterpènes. En plus, le genre *Asperula* possède les principales classes des métabolites secondaires comme les coumarines glucosides et les anthraquinones (Kırmızıbekmez *et al.*, 2016 ; Özgen *et al.*, 2018). Il y a des études montrent que les huiles essentielles du genre de la famille Rubiacée possèdent les constituants dominants suivants : le linalol, le bornéol, le géraniol et le  $\alpha$ -terpinéol (Il'ina *et al.*, 2012).

### III.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques

Certaines espèces d'*Asperula* sont utilisées comme diurétiques, toniques, antidiarrhéiques ainsi que pour réduire la pression artérielle et l'inflammation dans plusieurs médecines traditionnelles (Kırmızıbekmez *et al.*, 2016). Ils sont aussi utilisés dans le traitement des états d'angoisse, des céphalées, de l'insomnie, des palpitations, des troubles menstruels d'origine neurotonique, des troubles digestifs d'origine neuro-végétative et comme source d'agents antimicrobiens (Goetz et Le Jeune, 2011).

L'évaluation des activités biologiques d'*A. hirsuta* n'était pas encore étudiée ou effectuée, donc d'après la recherche sur les espèces du genre d'*Asperula*, on a trouvé des nombreux d'études littéraires, qu'ils ont déterminé plusieurs activités biologiques comme : l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, antifongique, antihypoxique et cicatrisante, mais essentiellement comme antioxydants (Goetz et Le Jeune, 2011 ; Yurchenko et Kovaleva, 2013).



**Figure 4.** Aspect morphologique d'*Asperula hirsuta*.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I. Matériels**

#### **I.1. Matériel végétal**

La plante *Asperula hirsuta* (*A. hirsuta*) a été récoltée en juin 2019 de la région de Beni Ourtilane, au Nord-Ouest de Sétif. L'identification a été faite par Dr. Djamel Sarri, Faculté des Sciences, Université de M'Sila. La partie aérienne de la plante a été séchée à l'ombre et à température ambiante puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

#### **I.2. Produits et réactifs**

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : Acide ascorbique, acide gallique, acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ), chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), chlorure ferreux ( $FeCl_2$ ), molybdate d'ammonium ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ ), phosphate de sodium ( $Na_3PO_4$ ), quercétine, réactif de Folin-Ciocalteu, thiocyanate de potassium (KCN), Tween 20, acide linoléique et 2,6 di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) proviennent de Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Panreac (Espagne). Les solvants sont de grade analytique et obtenus auprès de Riedel-de Haén (France).

## **II. Méthodes**

#### **II.1. Préparation de l'extrait aqueux**

L'extrait aqueux d'*A. hirsuta* est préparé selon la méthode de Kasmi *et al.* (2017), Hounnimassou *et al.* (2017) avec quelque modification, 50g de poudre de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta* a été mise à bouillir dans 500 ml d'eau distillée pendant 20 minutes. Après filtration, l'extrait récupéré est soumis à une centrifugation. À la fin, la solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brun foncé qui est conservée à  $-32^\circ C$  jusqu'à son utilisation.

#### **II.2. Préparation de l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique d'*A. hirsuta* est préparé selon la méthode de Bougandoura et Bendimerad (2013), Krimat *et al.* (2017). Brièvement, 50 g de poudre de la partie aérienne a été mise à macérer dans 500 ml de méthanol/eau (7:3, V/V) sous agitation magnétique pendant 24 heures, à l'ombre et à la température ambiante. L'extrait a ensuite été filtré et soumis à une évaporation du méthanol sous pression réduite à  $45^\circ C$  dans un rotavapeur (BÜCHI). En fin, le séchage de solution obtenue pour acquérir une poudre de couleur brun foncé qui est conservée à  $-32^\circ C$  jusqu'à leur utilisation.

### II.3. Dosage des polyphénols

#### Principe

Les teneurs phénoliques totaux ont été estimés à partir d'une méthode spectrophotométrique qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) décrite par Tariba Lovaković *et al.* (2018). Le test FC repose sur le transfert d'électrons en milieu alcalin des composés phénoliques aux complexes d'acide phosphomolybdique / phosphotungstique pour former des complexes  $((\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-})$  qui donne une couleur bleue, il est proportionnel à la présence de polyphénols et possède une absorption aux 750 à 765nm (Ainsworth et Gillespie, 2007).

#### Méthode de dosage

Un volume de 100  $\mu\text{L}$  des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 500  $\mu\text{L}$  de FCR (10%). Après 4 min, ajouter 400  $\mu\text{l}$  de carbonates de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7,5 %. Laisser réagir et incuber le mélange à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante, puis lire à 765nm. Un blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par l'eau distillée. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (**figure 5**) établie avec l'acide gallique (0 - 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

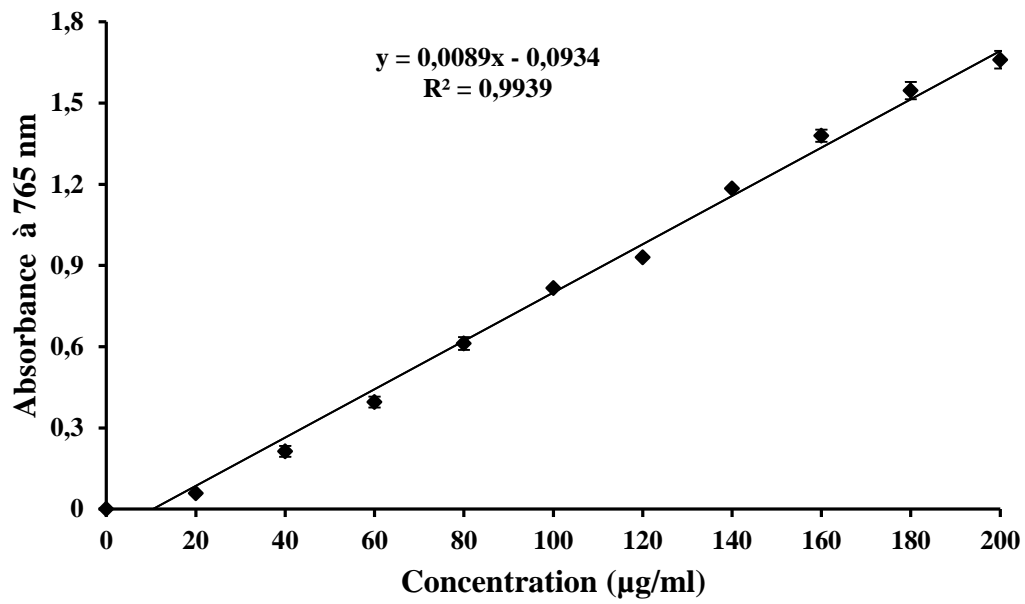
### II.4. Dosage des flavonoïdes

#### Principe

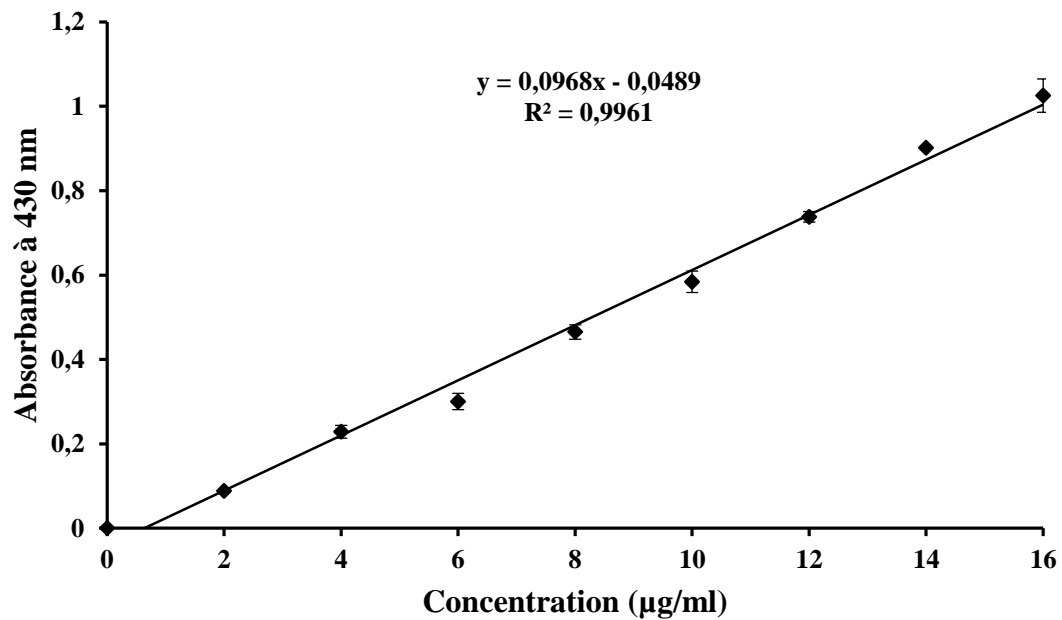
Quantification des flavonoïdes par une approche basée sur la formation complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $\text{Al}^{+3}$ , du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) avec les atomes d'oxygène carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Donc, La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ali-Rachedi *et al.*, 2018).

#### Méthode de dosage

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Bahorun *et al.*, 1996) avec quelques modifications. Un millilitre de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon ou standard contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir et incuber à l'obscurité à la température ambiante pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) (**figure 6**).



**Figure 5.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).



**Figure 6.** Courbe d'étalonnage de la quercétine. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

## II.5. Activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta*

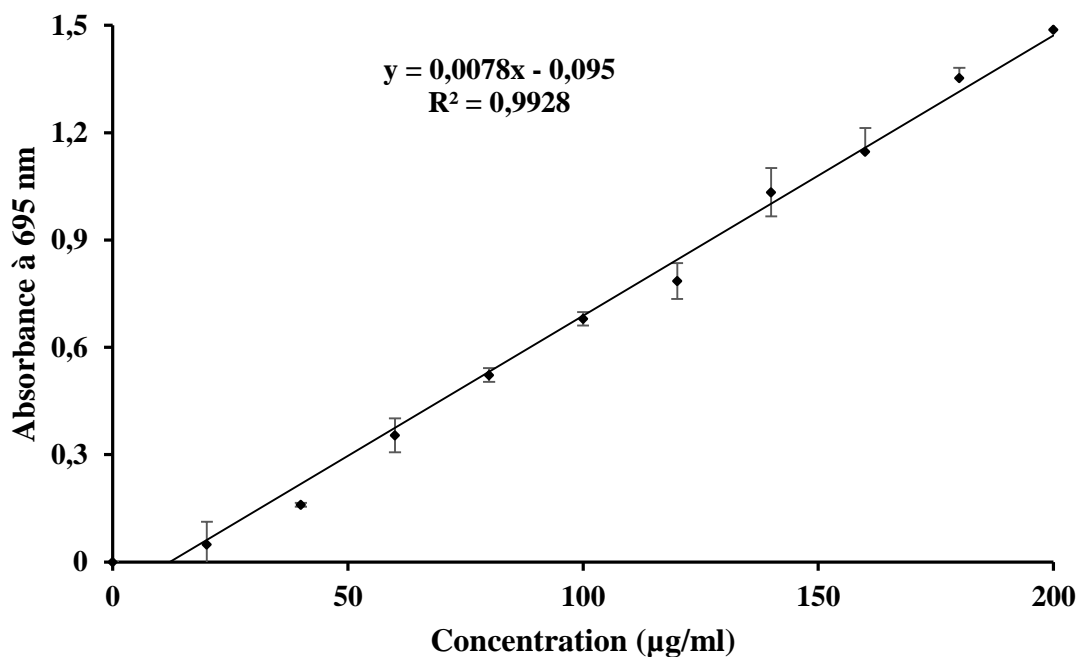
### II.5.1. Capacité antioxydante totale

#### Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{Mo}^{6+}$  à molybdène ( $\text{Mo}^{5+}$ ) en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V) à un pH acide. On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant (Yaici *et al.*, 2019).

#### Méthode de dosage

La méthode consiste à introduire dans un tube 100 $\mu\text{l}$  de chaque extrait à différentes concentrations mélangées à 900 $\mu\text{l}$  d'un réactif composé de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,6 M), du phosphate de sodium  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite incubé à 95°C pendant 1 heure et 30 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre le blanc qui est constitué de 100  $\mu\text{l}$  de d'eau distillée mélangé avec 900  $\mu\text{l}$  du réactif. La capacité antioxydante totale est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (**figure 7**) établie avec l'acide ascorbique (0 - 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique (Vc) par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EVC} / \text{mg}$  d'extrait).



**Figure 7.** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

## **II.5.2. Peroxydation de l'acide linoléique**

### **Principe**

L'activité antioxydante totale des extraits de la plante *Aspirula hirsta* est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique (FTC). Cette méthode est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique qui génère la formation des peroxydes qui s'oxyde  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ . Ces derniers ions forment un complexe avec le thiocyanate mesuré à une absorbance maximale de 500 nm (Cheurfa et Allem, 2015).

### **Méthode**

Une émulsion d'acide linoléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide linoléique, 0,028 g de Tween 20 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH 7.0). Le milieu réactionnel contient 600  $\mu$ l de solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une concentration bien définie (50  $\mu$ g/ml) et 600  $\mu$ l de l'émulsion d'acide linoléique. Le contrôle contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extraits ou antioxydant standard) qui est remplacé par un volume égal de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heure pendant 96 heures, en mélangeant 2ml d'éthanol, 40  $\mu$ l KCN, 40  $\mu$ l d'échantillon et 40  $\mu$ l de  $FeCl_2$ . Après 3min, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc d'éthanol. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de la peroxydation (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

**Ac** : Absorbance du contrôle.

**At** : Absorbance du test.

## **II.6. Analyses statistiques**

Les résultats des différents tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel Graphpad Prism version 9,2. La signification des différences entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

**RESULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. RESULTATS

#### I.1. Préparation des extraits d'*Asperula hirsuta*

Pour la préparation de l'extrait méthanolique on utilise la méthode de macération pour obtenir une poudre brun foncé avec un rendement de 20,07 %. Alors que, pour l'obtention de l'extrait aqueux on exploite la méthode de décoction afin d'obtenir une poudre brun foncé avec le même rendement (20,98 %).

#### I.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques montrent que l'extrait méthanolique d'*A. hirsuta* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux (tableau 3).

**Tableau 3.** Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hisurta*.

Extrait	E.Met	E.Aq
<b>Polyphénols</b> ( $\mu\text{g}$ d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait)	137,06 $\pm$ 10,52	104,50 $\pm$ 14,60
<b>Flavonoïdes</b> ( $\mu\text{g}$ d'équivalent de quercétine / mg d'extrait)	15,81 $\pm$ 0,48	9,92 $\pm$ 0,50

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

#### I.3. Activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta*

##### I.3.1. Capacité antioxydante totale (TAC)

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique possède une capacité antioxydante meilleure que celle de l'extrait aqueux. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4.** Capacité antioxydante total des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hisurta*.

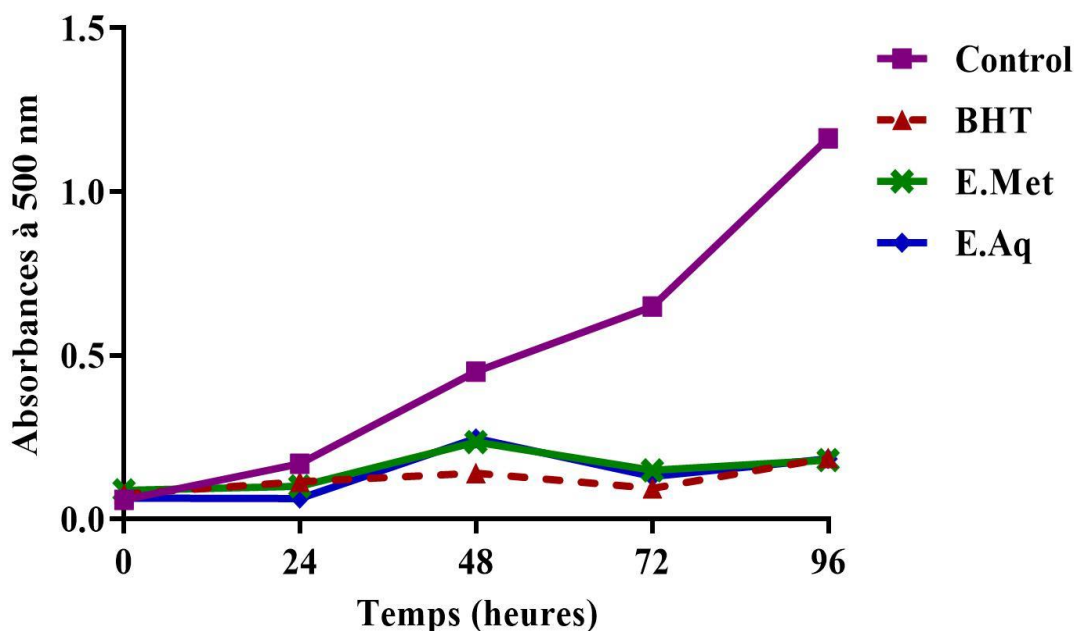
Extrait	E.Aq	E.Met
TAC ( $\mu\text{g}$ d'équivalent d'acide ascorbique / mg d'extrait)	125,84 $\pm$ 7,12	169,01 $\pm$ 13,25

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

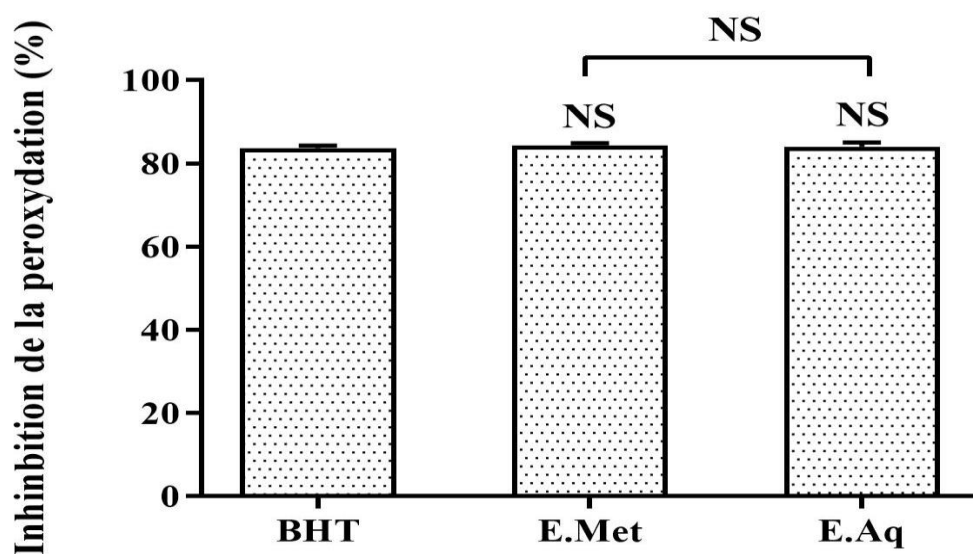
### I.3.2. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique

La **figure 8** montre la cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits d'*Asperula hirsuta* et du BHT. Les absorbances observées sont stables tout au long des 96 heures d'incubation, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.

Les extraits aqueux et méthanolique possèdent des effets inhibiteurs d'environ 84 % à concentration 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Ces valeurs sont statistiquement similaires à celle du BHT qui exerce un effet inhibiteur de 84 % à la même concentration (**figure 9**).



**Figure 8.** Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.



**Figure 9.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) d'*Asperula hirsuta* et du BHT au temps 96 h et à une concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SD ; NS : non significatif.

## **II. DISCUSSION**

L'industrie pharmaceutique et alimentaire s'intéresse de plus en plus aux antioxydants naturels et aux composés bioactifs dérivés des plantes tels que les polyphénols et les flavonoïdes pour remplacer les composés synthétiques car ils possèdent des effets bénéfiques sur la santé ,grâce à leurs groupements hydroxyles ils maintient l'hémostase plus efficacement contre les maladies liées au stress oxydatif tel que ; l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, vieillissement, et aussi les maladies hépatiques, car pleins des études sont mentionnés que les métabolites secondaires des plantes protègent l'hémostase du foie (Li *et al.*, 2015 ; Petropoulos *et al.*, 2020). Objectif de notre étude est l'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits d'*Asperula hirsuta* pour évaluer leurs activité antioxydant.

### **II.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes**

La composition chimique d'un produit végétal est déterminée par une analyse chimique qualitative utilisant différents solvants d'extraction. Le choix de la méthode et du solvant utilisés pour l'extraction est une étape particulièrement importante pour obtenir une concentration optimale de composés naturels dans l'extrait et le solvant idéal doit avoir une faible toxicité, une faible inflammabilité, un faible risque d'explosion, et doit également être économique et respectueux de l'environnement (Jones et Kinghorn, 2005). Le rendement de l'extraction chimique et activité antioxydant dépendent de plusieurs paramètres tels que type d'extraction, la nature de solvant utilisé, la stabilité des composés d'extrait, la température et le temps du processus d'extraction (Tanase *et al.*, 2019). Le solvant le plus efficace pour extraire les polyphénols est le méthanol, suivi l'éthanol et enfin l'eau. L'extraction au méthanol donne une large gamme de composés phénoliques, y compris : les flavonoïdes donc pour une meilleure obtention de l'activité antioxydante (Rhazi *et al.*, 2019). D'autre part, les substances phytochimiques, peut être influencée par divers facteurs tels que les variétés, les conditions climatiques et les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage (Fadili *et al.*, 2015). Dans ce travail, on utilise le méthanol et l'eau pour l'obtention des extraits avec des concentrations importantes à partir de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*. L'utilisation du mélange hydroalcoolique a pour objectif d'extraire les composé polaires, moyennes et de faibles polarités, et pour augmenter la perméabilité des parois cellulaires pour faciliter l'extraction d'un plus grand nombre de composés (Seidel, 2012). L'étude de Prasedya *et al.* (2021), montre que l'extraction des composés phytochimiques de plantes à partir des particules de plus petite taille augmente la surface de contact de l'échantillon et du solvant utilisé pour l'extraction ce qui donne un meilleur rendement d'extraction.

Avant l'extraction, il faut réduire le taux de l'eau dans le matériel végétal étudié pour le but de dévalorisation suivante de l'activité de l'eau de l'extrait, la croissance microbienne, la déshydratation à l'ombre de la plante en vue d'empêcher la dégradation enzymatique (par ex, hydrolyse des glycosides) des molécules bioactives (Kémajou *et al.*, 2012). Afin d'éviter l'oxydation des composants bioactives contre les radiations ultraviolettes, l'extrait doit être conservé dans des flacons sombres (Jones et Kinghorn, 2005). La température inférieure à 30°C est recommandée afin d'éviter la perte/dégradation des composés thermolabiles (Seidel, 2012).

De plus, la décoction a un effet positif amendant l'extraction que la macération à cause de la température alors que la différence entre les deux méthodes due au temps de l'extraction qui peut être long à la macération (24h) par rapport à la décoction qui prend un temps réduit (30 min) (Bohui *et al.*, 2018). D'après les résultats, on trouve que le rendement de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux d'*Asperula hirsuta* sont proches. Selon Su *et al.* (2006), le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température, c'est la raison pour laquelle la décoction a été effectuée pendant un temps réduit. De plus, Minareci *et al.* (2011) ont trouvé un rendement varie entre 6.08 - 9.41 % de cinq espèces endémiques du genre *Asperula* originaire de Turquie à partir des extraits méthanoliques.

Les tests de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium ont été choisie pour doser les polyphénols et les flavonoïdes respectivement pour plusieurs raisons : ce sont des méthodes qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité des réactifs de Folin et de AlCl<sub>3</sub> (Khadhr *et al.*, 2017). Les résultats obtenus montrent que les composés polyphénoliques sont abondants dans la partie aérienne de genre d'*Asperula* de la famille rubiacée selon (Özgen *et al.*, 2018).

L'extrait méthanolique obtenu est plus riche en composés phénoliques que l'extrait aqueux à cause de l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène des phytoconstituants dans les solutions aqueuses avec l'augmentation de leurs ionisations dans telles solutions. La solubilité des polyphénols dépend de plusieurs paramètres tel que le nombre de groupements hydroxyles, le poids moléculaire et la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (Mahmoudi *et al.*, 2013). Il y a des études qui montrent que la différence de polarité des solvants d'extraction peut causer une grande variation dans le niveau de composés bioactifs dans l'extrait, ce qui indique que l'efficacité d'extraction favorise les solvants hautement polaires parce que le matériel végétal contient des niveaux élevés de composés polaires comme flavonoïdes glycosylés et les aglycones plus polaires sont extraits avec des alcools ou des mélanges alcool-eau, qu'ils sont solubles dans des solvants à haute polarité comme l'eau et le méthanol (Truong *et al.*, 2019). Ensemble, ces résultats suggèrent que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des composés

bioactifs de la partie aérienne de la plante *Asperula hirsuta*. Les solvants d'extraction ont un effet sur le rendement d'extraction et la teneur en composés bioactifs, affectant ainsi de manière significative l'activité biologique de l'extrait d'*Asperula hirsuta* (Truong *et al.*, 2019). Selon Sharifi-Rad *et al.* (2016), les extraits d'*Asperula* de la famille Rubiaceae présentant des niveaux plus élevés de polyphénols et de flavonoïdes. Enfin, l'étude de Minareci *et al.* (2011) a montré que les taux de flavonoïdes variant de 1,69 à 2,90 % d'extrait de cinq espèces du genre *Asperula*.

## **II.2. Activités antioxydantes**

Le criblage des propriétés antioxydantes des composés dérivés des plantes nécessite des méthodes appropriées, qui abordent le mécanisme d'action de l'activité antioxydant (Gulcin, 2020). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, des méthodes *in vitro* (test de TAC, test de l'inhibition de la peroxydation lipidique) ont été réalisées pour évaluer l'effet antioxydant des extraits méthanolique et aqueux d'*A. hirsuta*.

### **II.2.1. Capacité antioxydante totale**

Les polyphénols sont les métabolites secondaires phytochimiques les plus courants. Ces composés ont fait l'objet d'une attention considérable, notamment en raison de leurs activités antioxydantes. Il est probable que cette activité soit due à leurs potentiels redox, participant à la neutralisation des radicaux libres ainsi qu'à la décomposition des peroxydes grâce à leurs groupements hydroxyles (El Ouadi *et al.*, 2021). La méthode du phosphomolybdate est communément employées, simple rapide et indépendante pour évaluer la capacité antioxydant totale (Dutta *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique d'*Asperula hirsuta* contient un taux polyphénolique élevé comparativement à l'extrait aqueux donc ce explique qu'il y a une relation entre le teneur des composés phénoliques et le pouvoir d'antioxydant totale de l'extrait (Ceylan *et al.*, 2015). D'après les sources exogènes telles que les plantes médicinales qu'ils sont les principales sources de composés phénoliques dans l'alimentation. Il y a des études ultérieures qu'ils ont démontrées que le genre d'*Asperula* riche par les composants phénoliques et ses dérivés (irridoides, coumarins, triterpenes, flavons glycosidés...) qui sont avérés très bénéfiques pour la santé humaine, contrairement aux antioxydants synthétiques tels que le butylated hydroxyanisole (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), qu'ils ont affecté la qualité nutritionnelle des aliments (Zujko et Witkowska, 2011). Ensuite, d'autre recherches ont montré que la famille des Rubiacées possède une activité réductrice, cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres (Caceres *et al.*, 2020). De plus, Bokhari *et al.* (2013) ont montré que l'extrait méthanolique et aqueux de *Galium aparine* (Rubiaceées) ont exercé un pouvoir réducteur très important.

### **II.2.2. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique**

L'oxydation des lipides peut réduire la qualité et la valeur nutritionnelle des aliments. En outre, elle est également associée au vieillissement, à la détérioration des membranes, aux maladies cardiaques. Notamment, la peroxydation des lipides membranaires, conduisant à l'accumulation de peroxydes lipidiques (Gulçin *et al.*, 2010).

Plusieurs recherches montrent que les antioxydants inhibent les composés organiques volatils et les hydroperoxydes de diènes conjugués issus de l'oxydation de l'acide linoléique. Ils protègent donc les cellules contre l'oxydation des composants lipidiques des membranes cellulaires. Les hydroperoxydes formés par l'acide linoléique ont été neutralisés par les antioxydants présents dans les extraits de plantes (Ceylan *et al.*, 2015). L'activité antioxydante de l'extrait a été mesurée en fonction du taux de l'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanolique et aqueux d'*Asperula hirsuta* possèdent une excellente activité inhibitrice de la peroxydation lipidique comparable à celle du BHT utilisé comme antioxydant de référence. Cette activité est due à la présence des composés phénoliques dans nos extraits. En effet, Sandhar *et al.* (2011) ont rapporté que les flavonoïdes peuvent inhiber la peroxydation lipidique en un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes comme ils peuvent interrompre une chaîne de réactions radicalaires par la propriété de donation d'hydrogène. Il a été démontré aussi, que la structure et la propriété lipophile des polyphénols sont des facteurs favorisant la propriété anti-oxydante, probablement en facilitant l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014). De plus, les travaux de Özgen *et al.* (2018) ont montré que l'extrait méthanolique d'*Asperula taurina* subsp *caucasica* possède un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVE

### CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Ce travail s'inscrit dans le cadre de recherche de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique, nous nous sommes intéressés à valoriser les vertus de plante médicinale : *Asperula hirsuta* par une caractérisation phytochimique et l'évaluation de leurs propriétés antioxydantes.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et les flavonoïdes contenus dans ces deux extraits par les deux méthodes : Folin-ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement a révélé la présence des quantités importantes de ces composés dans les extraits d'*Asperula hirsuta*.

Pour mieux évaluer l'activité antioxydante *in vitro*, on a utilisé les deux tests suivants : la capacité antioxydante totale (TAC) et l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique. D'après les résultats, on a trouvé que l'*Asperula hirsuta* possède une forte activité antioxydante comparativement aux antioxydants synthétiques utilisés (BHT et l'acide ascorbique).

Les résultats obtenus restent préliminaires, mais ils nécessitent d'autres études *in vitro* complémentaires approfondies pour l'identification et la caractérisation des composés actifs responsables des différentes activités biologiques de cette plante par des méthodes plus performantes serait indispensable.

Ces études doivent être focalisées sur l'évaluation des effets de ses composés *in vivo* pour obtenir une meilleure vue approfondie et plus prometteuse sur les activités antioxydantes des extraits de cette plante, afin d'établir une relation entre la structure d'activité et comprendre les divers mécanismes d'action, dans le but de valoriser et exploiter la plante dans le domaine de pharmaceutique.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Ahmadinejad F, Geir Møller S, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhorji G, Jami M-S.** Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*. **2017**;6(3):51.

**Ainsworth EA, Gillespie KM.** Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*. **2007**;2(4):875-7.

**Ali-Rachedi F, Meraghni S, Touaibia N, Mesbah S.** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*. **2018**.

**Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Piné R, Rodríguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, et al.** Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L.(Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis*. **2014**;25(5):389-98.

**Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **2014**;2014.

**Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, et al.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*. **1996**;46(11):1086-9.

**Baudin B.** Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*. **2020**;2020 (522):22-30.

**Berger MM, Roussel A-M.** Complémentation ou supplémentation en oligo-éléments: qui, pourquoi, comment? *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **2017**;31(2):93-102.

**Bernstein PS, Li B, Vachali PP, Gorusupudi A, Shyam R, Henriksen BS, et al.** Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in retinal and eye research*. **2016**; 50:34-66.

**Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*. **2012**;5(1):9-19.

**Bohui G, Adima AA, Niamké FB, N'Guessan JD.** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoides totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. **2018**;46:50-8.

**Bokhari J, Khan MR, Shabbir M, Rashid U, Jan S, Zai JA.** Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. **2013**;102:24-9.

**Bougandoura N, Bendimerad N.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. Nepeta (L.) Briq. Nature & Technology. **2013**(9):14.

**Cáceres A, Pinales-Tóbar SA, Medina MMR, Marroquín MN, Cruz S.** Alternative use of coffee beans and leaves from seven regions of Guatemala for its antioxidant activity and chemical composition. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients. **2020**;7(1):5-.

**Ceylan Y, Usta K, Usta A, Maltas E, Yildiz S.** Evaluation of antioxidant activity, phytochemicals and ESR analysis of *Lavandula stoechas*. Acta Phys Pol A. **2015**;128(2):483-7.

**Circu ML, Aw TY.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine. **2010**;48(6):749-62.

**Chauhan DS, Tomar A, Tiwari M, Singh VP, Tomar S, Tripathi S, et al.** Research Article Endogenous and exogenous antioxidants status in seminal plasma of skeletal fluorotic patients. **2013**

**Cheurfa M, Allem R.** Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'. *Aloysia triphylla*. **2015**.

**Couto N, Wood J, Barber J.** The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. Free radical biology and medicine. **2016**;95:27-42.

**Defraigne J-O, Pincemail J.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. Revue médicale de Liège. **2008**;63.

**Dutta AK, Gope PS, Banik S, Makhnoon S, Siddiquee MA, Kabir Y.** Antioxidant properties of ten high yielding rice varieties of Bangladesh. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. **2012**;2(1):S99-S103.

**El Ouadi Y, Bouyanzer A, Çetinkaya S, Bendaif H.** Fractionation, dosage and rating of the antioxidant activity of the aqueous extract of *Melissa Officinalis* from northeastern Morocco. Moroccan Journal of Chemistry. **2021**;9(1):9-1 (2021) 069-074.

**Fadili K, Amalich S, N'dedianhoua SK, Bouachrine M, Mahjoubi M, El Hilali F, et al.** Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides* [Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*]. International journal of innovation and Scientific Recherche. **2015**;17(1):24-33.

**Favier A.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. **2003**;108:115.

**Favier A**, editor Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales pharmaceutiques françaises*; **2006**: Elsevier

**Gebicka L, Krych-Madej J.** The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of inorganic biochemistry*. **2019**;197:110699.

**Gill SS, Tuteja N.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*. **2010**;48(12):909-30.

**Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, et al.** Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*. **2013**;70:204-12.

**Goetz P, Le Jeune R.** *Asperula odorata* L., Aspérule (partie aérienne de). *Phytothérapie*. **2011**;9(3):185-8.

**Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY.** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*. **2010**;3(1):43-53

**Gulcin İ.** Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*. **2020**;94(3):651-715.

**Hakeem KRRRUTI.** *Plant signaling : understanding the molecular crosstalk*. New Delhi: Springer; **2014**.

**Houngnimassou HMA, Attindehou S, Salifou S, Koumodji KD, Salifou S.** Effets strongylicides in vitro de l'extrait aqueux de feuilles de *Ficus exasperata* Valh. 1805 (Moraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. **2017**;11(3):1012-20.

**Ighodaro O, Akinloye O.** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*. **2018**;54(4):287-93.

**Il'ina T, Kovaleva A, Goryachaya O, Vinogradov B.** Essential oil of *Galium salicifolium* flowers and herb. *Chemistry of Natural Compounds*. **2012**;48(1):151-2.

**Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A.** Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*. **2005**;4(1):1-11.

**Jones WP, Kinghorn AD.** Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, editors. *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press; **2005**. p. 323-51.

**Katerina Krumova and Gonzalo Cosa**, Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species, in Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, **2016**(1), 1-21.

**Kasmi M, Aourach M, El Boukari M, Barrijal S, Essalmani H**. Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. Comptes Rendus Biologies. **2017**;340(8):386-93.**Keenan RT**, editor The biology of urate. Seminars in Arthritis and Rheumatism; **2020**: Elsevier

**Kémajou A, Mba L, Bagda AA**. Effet du séchage sur les principes actifs des plantes médicinales: cas des alcaloïdes totaux des écorces de *Alstonia boonei* Wild, plante antipaludéenne. Nature & Technology. **2012**(7):62.

**Khadhr M, Bousta D, Hajaji HE, Lachkar M, Barkai H, Ibsouda-Koraichi S, et al**. Phytochemical screening, total phenolics and biological activities of Tunisian *Peganum harmala* seed extracts. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. **2017**;9(2):32-9.

**Kırmızıbekmez H, Tiftik K, Kúsz N, Orban-Gyapai O, Zomborszki ZP, Hohmann J**. Three new iridoid glycosides from the aerial parts of *Asperula involucrata*. Chemistry & Biodiversity. **2017**;14(3):e1600288.

**Krimat S, Metidji H, Tigrine C, Dahmane D, Nouasri A, Dob T**. Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie. **2017**:1-8.

**Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, et al**. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. International journal of molecular sciences. **2015**;16(11):26087-124

**Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N**. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Nature & Technology. **2013**(9):35.

**Mehta SK, Gowder SJT**. Members of antioxidant machinery and their functions. Basic principles and clinical significance of oxidative stress. **2015**;11:59-85.

**Minareci E, Ergönül B, Kayalar H, Kalyoncu F**. Chemical compositions and antioxidant activities of five endemic *Asperula taxa*. Archives of Biological Sciences. **2011**;63(3):537-43.

**ÖZGEN U, ŞENER SÖ, Badem M, Seçinti H, HATİPOĞLU SD, Gören AC, et al**. Evaluation of hplc, phytochemical, anticholinesterase and antioxidant profiles of the aerial parts of *asperula taurina* subsp. *caucasica*. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University. **2018**;42(1):1-13

**Panth N, Paudel KR, Parajuli K**. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. Advances in medicine. **2016**;2016.

**Petropoulos SA, Di Gioia F, Polyzos N, Tzortzakis N**. Natural Antioxidants, Health Effects and Bioactive Properties of Wild *Allium Species*. Curr Pharm Des. **2020**;26(16):1816-37.

**Pisoschi AM, Pop A.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. **2015**;97:55-74.

**Prasedya E, Frediansyah A, Martyasari N, Ilhami B, Abidin A, Padmi H, et al.** Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract. *Scientific Reports*. **2021**;11(1):1-9.

**Quezel PSS.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Editions du Centre National de la recherche scientifique; **1962**.

**Rhazi N, Hannache H, Oumam M, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A, et al.** Green extraction process of tannins obtained from Moroccan *Acacia mollissima* barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Arabian Journal of Chemistry*. **2019**;12(8):2668-84.

**Sahin B, Sagiroglu M, Baser B.** A new *Asperula L.*(Rubiaceae) species from gypsum steppes of Cankiri province in Turkey. **2021**.

**Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P.** A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica scientia*. **2011**;1(1):25-41.

**Seidel V.** Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Natural products isolation*. **2012**:27-41.

**Sharifi-Rad M, Iriti M, Sharifi-Rad M, Gibbons S, Sharifi-Rad J.** Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of Rubiaceae, Fabaceae and Poaceae plants: A search for new sources of useful alternative antibacterials against MRSA infections. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **2016**;62(9):39-45.

**Smirnoff N.** Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. **2018**;122:116-29.

**Su X, Duan J, Jiang Y, Shi J, Kakuda Y.** Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**;19(4):348-53.

**Tanase C, Coșarcă S, Muntean D-L.** A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules*. **2019**;24(6):1182.

**Tariba Lovaković B, Lazarus M, Brčić Karačonji I, Jurica K, Živković Semren T, Lušić D, et al.** Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J Trace Elem Med Biol*. **2018**;45:85-92.

**Truong D-H, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH, Nguyen HC.** Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of food quality*. **2019**;2019.

**Tvrđá E, Massanyi P, Lukáč N.** Physiological and pathological roles of free radicals in male reproduction. *Spermatozoa-Facts and Perspectives*: IntechOpen; **2017**.

**Vasavda C, Kothari R, Malla AP, Tokhunts R, Lin A, Ji M, et al.** Bilirubin links heme metabolism to neuroprotection by scavenging superoxide. *Cell chemical biology*. **2019**;26(10):1450-60. e7.

**Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marccone MF.** How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*. **2011**;44(1):14-22.

**Yaici K, Dahamna S, Moualek I, Belhadj H, Houali K.** Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea* L.(Ericaceae) dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien. *Phytothérapie*. **2019**.

**Yin H, Xu L, Porter NA.** Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*. **2011**;111(10):5944-72.

**Yurchenko N, Kovaleva A.** Amino-acid composition of *Asperula odorata* herb. *Chemistry of Natural Compounds*. **2013**;49(2):401-2.

**Zbadi R, Mohti H, Moussaoui F.** Stress oxydatif: évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine thérapeutique*. **2018**;24(2):134-41.

**Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, et al.** The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-biological interactions*. **2010**;188(2):334-9.

**Zujko ME, Witkowska AM.** Antioxidant potential and polyphenol content of selected food. *International Journal of Food Properties*. **2011**;14(2):300-8.

## Abstract

The present study aims to evaluate the antioxidant effect of aqueous (Aq.E) and methanolic (Met.E) extracts of *Asperula hirsuta*. Total polyphenols and flavonoids contents of both extracts were determined using Folin-Ciocalteu reagent and the trichloride of aluminum, respectively. The results showed that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of  $137.06 \pm 10.52 \mu\text{g GAE/mg}$  of extract and  $15.81 \pm 0.48 \mu\text{g QE/mg}$  of extract, respectively. The antioxidant activity of the two extracts was evaluated using total antioxidant capacity and linoleic acid peroxidation tests. The results showed that the Aq.E and the Met.E possess an important antioxidant capacity ( $125.84 \pm 7.12 \mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid/mg of Aq.E and  $169.01 \pm 13.25 \mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid/mg of the Met.E). Moreover, both extracts inhibited the peroxydation of the linoleic acid with 84 %. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of aerial part of *Asperula hirsuta* have a good antioxidant property, which can be used in food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** *Asperula hirsuta*, Oxidative stress, Antioxidant, Polyphenols, Plant extracts.

## الملخص

تهدف هذه الدراسة الى تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta*. تم تقدير المحتوى الكمي للمركبات متعددة الفينول والفلافونويدات لكلا المستخلصين باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu و  $\text{AlCl}_3$  على الترتيب. أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي غني بهذه المركبات وقدر ذلك ب  $137.06 \pm 10.52$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $15.81 \pm 0.48$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص. تم تقييم القدرة المضاد للأكسدة باستعمال كل من اختبار TAC وأكسدة حمض اللينوليك. أظهرت النتائج أن كل من مستخلص المائي والميثانولي يمتلكان قدرة كبيرة مضادة للأكسدة تقدر ب  $125.84 \pm 7.12$  ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ من مستخلص المائي و  $169.01 \pm 13.25$  ميكروغرام من حمض الاسكوربيك/مغ من مستخلص الميثانولي. كما ان لكلا المستخلصين فعالية معتبرة لتثبيط أكسدة حمض اللينوليك بقيمة 84%. من خلال النتائج يمكن استخلاص ان كل من المستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta* يمتازان بخصائص مضادة للأكسدة، ما يدعم استعمالها في مجال الصناعات الغذائية والصيدلانية.

**الكلمات المفتاحية:** *Asperula hirsuta*، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، متعددة الفينول، المستخلصات النباتية.

## Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux (E.Aq) et l'extrait méthanolique (E.Met) de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux extraits ont été déterminées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de  $137.06 \pm 10.52 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $15.81 \pm 0.48 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de TAC et de la peroxydation de l'acide linoléique. Les résultats montrent que l'E.Aq et l'E.Met possèdent une capacité antioxydante importante ( $125.84 \pm 7.12 \mu\text{g EVc / mg}$  d'E.Aq et  $169.01 \pm 13.25 \mu\text{g EVc / mg}$  d'E.Met). Par ailleurs les deux extraits ont inhibé la peroxydation de l'acide linoléique avec 84 %. En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* possèdent une activité antioxydante importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

**Mots clés :** *Asperula hirsuta*, Stress oxydatif, Antioxydant, Polyphénols, Extraits de plantes.