

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 ET BIOCHIMIE

N° :



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par : CHICHI BOUCHRA
CHERGUI NISRIN

Intitulé

**Etude de l'activité antioxydante des extraits des
graines de *Piper cubeba***

Soutenu devant le jury composé de :

Mr. Abdenassar Harrar	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. Abderrahim Benslama	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur
Dr. Abdallah Rahali	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2020 /2021

DEDICACE

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de

Ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes chers parents

A ma famille

A mes amis

A vous

Bouchra et Nisrin

REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout
Puissant, de nous avoir donné la force et la patience
Pour achever ce travail.*

*Nous remercions les personnes qui ont contribué à la
Réalisation de ce mémoire de proche ou de loin*

Au terme de ce travail nous Nous adressons le grand remerciement à notre

Promoteur Mr. Mr. HARRAR,

ABDENASSAR qui a proposé le thème de ce mémoire

Et nous remercions tous les enseignants et

Enseignantes de nous avoir accompagnés durant cette

Recherche, Orientations, ses encouragements et pour

Ses précieux conseils merci beaucoup

Sans oublier tous mes gentils enseignants et enseignantes

De l'année 2020/2021

Nous tenons à remercier les membres de jury Dr. Abderrahim Benslama

et Dr. Abdallah Rahali d'avoir accepté d'examiner notre travail

Le remerciement passe aussi à tous nos amis de classe

Master 2, Biochimie appliquée pour leur soutien moral.

En fin, merci à tous.

Sommaire

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Partie I

Piper cubeba

1. Propriétés biologiques	2
1.2. Généralités	2
1.3. Classification	2
1.4. Description botanique	2
1.5. Caractéristiques microscopiques du fruit	4
1.6. Nomenclature.....	5
1.7. Répartition géographique	5
2. Utilisations Médicinales	5
3. Utilisation Culinaire	5
4. Importance Économique.....	5
5. Composition Chimique	6
6. Activités pharmacologiques	7
7. Applications Dans la Sécurité Industrielle et Alimentaire	7
7.1 Propriétés nutritionnelles	7
7.2. Activité insecticide	7
7.3. Les aliments conservateurs	8
7.4. Propriétés cosmétiques	8

Stress oxydant

1.	Stress oxydant	9
1.1.	Généralité.....	9
1.2.	Définition.....	9
1.3.	Origine de stress oxydant	9
1.4.	Radicaux libres	10
1.5.	Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA)	10
1.6.	Mécanisme de production des radicaux dans l'organisme	11
1.6.1.	Source endogène	11
1.6.2.	Source exogène	12
1.7.	Conséquence de stress oxydant	12
1.8.	Effets sur les lipides.....	12
1.9.	Oxydation de l'ADN	12
1.10.	Oxydation des protéines.....	13
2.	Les antioxydants	14
2.1.	Définition.....	14
2.2.	Les antioxydants enzymatiques	15
2.3.	Les antioxydants non enzymatiques :.....	15
2.4.	Les antioxydants exogènes	15
2.5.	Mécanismes d'action des antioxydants	16
2.6.	Technique d'évaluation	16
2.7.	Implications pathologiques du stress oxydatif.....	17

Partie II : Expérimentale

Matériel et méthodes

1.	Matériel	18
1.1.	Matériel végétal	18
1.2.	Appareillage.....	18

1.3. Réactifs	18
2. Méthodes d'analyses	18
2.1. Préparation des extraits.....	18
2.1.1. Extrait aqueux.....	18
2.1.2. Extrait méthanolique.....	19
2.2. Analyse chimique	19
2.2.1. Détermination du rendement des extraits	19
2.2.2. Dosage des polyphénols	19
2.2.3. Dosage des flavonoïdes	20
2.2.4. Dosage des flavones et flavonols.....	20
2.2.5. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	21
2.2.6. Test de la réduction du fer (FRAP)	22
2.3. Analyse statistique	23

Résultats et discussion

1. Résultats et discussion	24
1.1. Extraction et rendement.....	24
1.2. Composition chimique.....	25
1.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	25
1.2.2. Teneur en flavonoïdes.....	25
1.3.2. Test de la réduction du fer (FRAP) :.....	31
Conclusion.....	34
Références bibliographiques	35

ملخص

تعرف التوابل والأعشاب على انها مصادر طبيعية لمضادات الأكسدة، وبالتالي فهي تلعب دورًا مهمًا في الوقاية الكيميائية من الأمراض والشيخوخة. *Piper cubeba* هي واحدة منها ، والتي اشتهرت بخصائصها الكيميائية المتوسطة منذ عقود. ترتبط الأنشطة البيولوجية المختلفة بالمستخلصات والمركبات النباتية. في هذه الدراسة، أجرينا نشاطًا مضادًا للأكسدة على أساس استخلاص جزئي لنبات *P. cubeba*.

تم الحصول على المستخلصات عن طريق نقع بذور النبات في الميثانول وبواسطة التنقيع في الماء المقطر. تم تحديد محتوى البوليفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu كما تم تحديد إجمالي مركبات الفلافونويد والفلافونول بواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم.

تم إجراء النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات بطريقتين: DPPH و FRAP.

بلغ محصول المستخلص المائي والميثانولي لـ *P. cubeba* من 18.5% و 6.4% على التوالي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ثراء المستخلص الميثانولي بالبوليفينول ، والتي يبلغ محتواها 13.33 ± 235.9 ميكروغرام / ملغ من المستخلص. بينما في المستخلص المائي هو 3.66 ± 185.3 ميكروغرام / ملغ من المستخلص. محتوى الفلافونويد في الميثانولي في حدود 0.82 ± 47.27 ؛ 1.30 ± 35.44 ميكروغرام من المستخلص.

توضح طرق النشاط المضاد للأكسدة أن جميع مستخلصات النبات المدروسة تظهر خصائص مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة. قيم IC بما في ذلك الجزء المائي والجزء الميثانولي هي 89.26 ± 8.82 ؛ $IC = 1.51 \pm 63.56$ مجم / مل على التوالي. في حين أن الشاهد BHT قيمته تساوي 0.25 ± 21.36 (مجم / مل).

تؤكد نتائج اختبار DPPH أن المستخلص الميثانولي هو الأكثر نشاطًا، مع IC_{50} بترتيب 0.93 ± 148.62 مجم / مل و EAq هو 2.12 ± 155.93 (مجم / مل). بالنسبة لحمض الأسكوربيك الذي يقدر بهذه القيمة (3.73 ± 70.77) .

كلمات مفتاحية:

Piper cubeba, متعدد الفينول, نشاط مضاد للأكسدة

Abstract

Spices and herbs are recognized as sources of natural antioxidants, and therefore play an important role in the chemoprevention of disease and aging.

Piper cubeba is one of them, which has been known for its medi-chemical properties for decades.

Various biological activities are associated with its extract and phytochemicals. In this study, we performed antioxidant activity based on *P. cubeba* fractions.

The extracts are obtained by maceration of the seeds of the plant in methanol and by a decoction in distilled water. The polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method. Total flavonoids and flavonols are determined by aluminum trichloride.

The antioxidant activity of the extracts was done by two methods. DPPH free radical scavenging and iron reduction (FRAP).

The yield of EAq and Met of *P. cubeba* was 18.5%; 6.4% respectively. The results obtained show the richness of EMet in polyphenols, the content of which is $235.9 \pm 13.33 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ of extract. Whereas in the EAq is $185.3 \pm 3.66 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ of extract. The content of flavonoids in EAq and Met is in the order of 47.27 ± 0.82 ; $35.44 \pm 1.30 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$ extract.

Antioxidant activity methods show that all extracts of the plant studied exhibit antioxidant properties at different levels. The IC₅₀ values including the aqueous fraction and the methanolic fraction are IC₅₀ = (89.26 ± 8.82 ; $63.56 \pm 1.51 \text{ mg} / \text{ml}$) respectively. While that of witness BHT (Butylhydroxytoluene): ($21.36 \pm 0.25 \text{ mg} / \text{ml}$).

The evaluation of the scavenging power of the extracts with respect to DPPH confirms that the methanolic extract is the most active, with an IC₅₀ of the order of $148.62 \pm 0.93 \text{ mg} / \text{ml}$ and for the EAq is ($155.93 \pm 2.12 \text{ mg} / \text{ml}$), with respect to ascorbic acid which is estimated by this value (70.77 ± 3.73).

Key word: phenolic content, *Piper cubeba*, antioxidant activity

Résumé

Les épices et les herbes sont reconnues comme des sources d'antioxydants naturels et jouent donc un rôle important dans la chimioprévention des maladies et du vieillissement. *Piper cubeba* est l'un d'entre eux et connu pour ses médi-propriétés chimiques depuis des décennies. Diverses activités biologiques sont associées à son extrait et phytoconstitués. Dans cette étude, nous avons effectué l'activité antioxydante basée sur les fractions de *Piper cubeba*.

Les extraits sont obtenus par une macération des graines de la plante dans le méthanol et par une décoction dans l'eau distillée. La teneur en polyphénols a été déterminée, par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les flavonoïdes totaux et les flavonols sont déterminée par le trichlorure d'aluminium. L'activité anti oxydante des extraits a été faite par deux méthodes. Le piégeage de radical libre DPPH et la réduction du fer (FRAP).

Le rendement de l'EAq et l'EMet de *P. cubeba* étaient 18.5% ; 6.4% respectivement. Les résultats obtenus montrent la richesse de l'EMet en polyphénols dont la teneur est $235.9 \pm 13.33 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$. Tandis que dans l'EAq est $185.3 \pm 3.66 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$. La teneur en flavonoïdes dans l'EAq et l'EMet est de l'ordre de 47.27 ± 0.82 ; $35.44 \pm 1.30 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits de la plante étudiée présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. Les valeurs des IC50 dont la fraction aqueuse et la fraction méthanolique sont $\text{IC}_{50} = (89.26 \pm 8.82$; $63.56 \pm 1.51 \text{ mg/ ml})$ respectivement. Alors que celle du témoin BHT(Butylhydroxytoluene) est de : $(21.36 \pm 0.25\text{mg/ ml})$.

L'évaluation du pouvoir piégeur des extraits vis-à-vis le DPPH confirme que l'extrait méthanolique est le plus actif, avec un IC_{50} de l'ordre de $148.62 \pm 0.93 \text{ mg/ml}$ et pour l'EAq est $(155.93 \pm 2.12\text{mg/ml})$, par rapport au acide ascorbique qui est estimé par cette valeur (70.77 ± 3.73) .

Mots clés : *Piper cubeba*, Polyphénols, activité antioxydante

Liste des abréviations

BHT : Butylhydroxytoluène.

EC50 : Concentration efficace 50%.

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAG : équivalent en acide gallique

EAg : Extrait aqueux

EMet : Extrait méthanolique

EQ : Equivalent en quercétine

ERO : Espèces réactifs de l'oxygène.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

I %: Pourcentage d'inhibition

IC50 : Concentration inhibitrice 50 %.

M/M : Masse par masse

R (%) : Rendement

R2 : Coefficient de corrélation

Liste des figures

Figure 1: Feuilles de <i>Piper cubeba</i> (A), fleurs (B) et fruits (C).....	3
Figure 2: <i>Piper cubeba</i>	Error! Bookmark not defined.
Figure 3: Structure chimique de quelque lignanes de <i>Piper cubeba</i>	Error! Bookmark not defined.
Figure 4: Principales espèces réactives oxygénées.	Error! Bookmark not defined.
Figure 5 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire..	Error! Bookmark not defined.
Figure 6: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 7: Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 8 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant AH	Error! Bookmark not defined.
Figure 9: Schéma sur la réaction de test FRAP, Fe ²⁺ : Ions ferreux, Fe ³⁺ : Ions ferriques	Error! Bookmark not defined.
Figure 10 : Histogramme du rendement de l'extraction	Error! Bookmark not defined.
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	Error! Bookmark not defined.
Figure 12 : Histogramme de la teneur en polyphénols des deux extraits.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	Error! Bookmark not defined.
Figure 14 : Histogramme de la teneur en flavonoïdes des deux extraits.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols	Error! Bookmark not defined.
Figure 16 : Histogramme de la teneur en flavones et flavonols des deux extraits.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 17 : Variation du pourcentage d'inhibition du DPPH ..	Error! Bookmark not defined.
Figure 18 : Histogramme des IC ₅₀ des deux extraits de <i>P. cubeba</i> et du BHT	Error! Bookmark not defined.
Figure 19 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>P. cubeba</i> et de l'acide ascorbique.	Error! Bookmark not defined.

Figure 20 : Histogramme des EC50 des extraits et de l'acide ascorbique **Error! Bookmark not defined.**

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau II : Résultats et rendement d'extraction des deux extraits **Error! Bookmark not defined.**

Tableau III : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des deux extraits..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau IV : Pouvoir antiradicalaire des extraits de *P. cubeba* vis-à-vis le radical DPPH.
..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau V : Pouvoir antioxydant total des deux extraits et d'acide ascorbique..... 33

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales étaient connues depuis longtemps et utilisées pour améliorer et guérir la santé de l'homme, aujourd'hui elles sont exploitées à tous les niveaux, beaucoup plus au niveau thérapeutique (Aref et Heded, 2015).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. Beaucoup des plantes médicinales contiennent un large spectre des substances phytochimiques qui sont des sources des antioxydants naturels tel que les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, et les composées poly phénoliques (Bahorun ,1997).

Le stress oxydatif, défini comme le déséquilibre entre processus biochimiques conduisant à la production de réactifs les espèces oxygénées (ROS) et la cascade antioxydante cellulaire, provoque des dommages moléculaires qui peuvent conduire à une défaillance critique de fonctions biologiques et finalement la mort cellulaire (Sayre *et al.*, 2001).

Les antioxydants suppriment la formation et neutralisent la ROS .Ils peuvent produire leur effet via différents mécanismes, ils peuvent éliminer ou réduire les radicaux libres, neutraliser les ROS ou leur précurseur par piégeage, en inhibant la voie enzymatique nécessaire à la génération de ROS, etc. (Zahin *et al.*, 2018).

Le *Piper cubeba* de la famille des *Piperaceae* est une espèce végétale utilisée dans la médecine traditionnelle, possédants diverses propriétés biologiques. Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Piper cubeba* ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des métabolites et dérivés tels que les polyphénols, flavones, lignanes (Ann et Rukayadi, 2019).

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité antioxydante des extraits de *Piper cubeba* connue en Algérie sous le nom de kababa et Habb-ul-Uruus. Dans ce présent travail nous avons fixé les objectifs suivants : Le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et le dosage des flavones et flavonols, ainsi que la préparation des extraits bruts pour la détermination de l'activité antiradicalaire de cette plante par la technique de piégeage du radical DPPH^{*} et le pouvoir réducteur des ions ferriques.

Partie I : Synthèse
bibliographique

1. Propriétés biologiques

1.1. Généralités

Le poivre à queue ou *Piper cubeba*, également connu sous le nom de Kankol est une plante cultivée pour son huile essentielle et ses baies de la famille des *Piperaceae* (Nahak et Sahu, 2010) ; elle compte plus de 700 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales du monde (Nirmala Nithya et Sai Nandhini, 2019). Cette plante a été utilisées en médecine traditionnelle et en préparation culinaire (Chitnis *et al.*, 2007).

1.2. Classification

En dessous une classification scientifique de *Piper cubeba* selon (Okafor, 2015).

Kingdom: *Plantae*

Unranked: Angiosperm

Unranked: Mangolids

Order: Piperales

Family: *Piperaceae*

Genus: *Piper*

Species: *Piper cubeba*

1.3. Description botanique

Piper cubeba, Linn. (Kabab Chini) de la famille des *Piperaceae* ressemblant à une liane (Chatterjee et Pakrashi, 1991), c'est une plante vivace (Fig. 1), à tiges et des branches grimpantes portant une couleur grise cendrée enracinées aux articulations. Pubescentes et glabrescent, et la plante mesure environ 5-15 m de haut, feuilles ovales-oblongues avec une base arrondie ; plusieurs nervures et un pédicule épais. La face inférieure de ces feuilles lisses et pointues est densément pourvue de minuscules glandes en creux. Elles sont entières, marginées, coriaces et peuvent atteindre 15 cm de long et 6 cm de large, fleurs unisexuées, petites, disposées densément sur le pédoncule, sans périanthe. Elles sont disposées en épis écailleux lisses mesurent environ 4 cm de long et possèdent 2 ou 3 étamines. Celles qui sont femelles sont souvent courbés et constitués d'environ 50 fleurs individuelles dont la plupart sont constituées d'un ovaire oblong composé de 4 carpelles fusionnés avec 4 stigmates sessiles. L'infructescence mesure 4-5 cm de long. La floraison a lieu pendant la saison des pluies. On peut savoir qu'elle est mature quand la base de l'ovaire se transforme en une tige cylindrique. Les fruits sont pédonculés, plus ou moins

apiculés et sub-globuleux d'un diamètre de 6-8 mm. La partie supérieure du fruit cubique est globulaire, d'un diamètre de 3-6 mm de diamètre et recouverte d'un péricarpe brun grisâtre réticulé qui se prolonge à la base en un pédoncule droit. Ils possèdent une odeur épicée, aromatique et un goût un peu amer et âcre. De la paroi du fruit qui se brise sort une seule graine sous-globuleuse lisse et de couleur brun foncé. D'une largeur de 3-4 mm, qui contient un minuscule embryon, dans une petite cavité à l'apex (Ahmad *et al.*, 2012).



Figure 1: Feuilles de *Piper cubeba* (A), fleurs (B) et fruits (C) (Abdul-Jalil et Nasser, 2020).



Figure 2: *Piper cubeba* (Köhler's Medicinal Plants, 1887).

1.4. Caractéristiques microscopiques du fruit

Le péricarpe est constitué d'un épiderme sous lequel se trouve une rangée interrompue de petites parois épaisses cellules. Au sein de celui-ci, le parenchyme est composé de cellules contenant de l'amidon et de l'huile, dans ce dernier, des faisceaux de cristaux en forme d'aiguilles de Cubebin peuvent être observés, enfin la couche la plus interne du péricarpe est formé de plusieurs rangées de cellules étendues tangentiellement contenant de l'huile essentielle. La noix est jaune et cassante. La graine, lorsqu'elle est présente, contient des cristaux de Cubebin. La section transversale du fruit montre une couche externe d'épiderme, recouverte à l'extérieur d'épais cuticule, flèche de 2 à 5 petites cellules écrasées, brunes et à paroi épaisse en dessous, mésocarpe composé de grandes cellules parenchymateuses à paroi mince, de cellules à huile et de faisceau vasculaire, endocarpe de multi scléréides stratifiés fortement lignifiés avec lumière étroite, testa et tegman composés de cellules allongées, cellules tegmen, cellules hyalines et noyaux de couleur grisâtre (Qazi *et al.*, 2017).

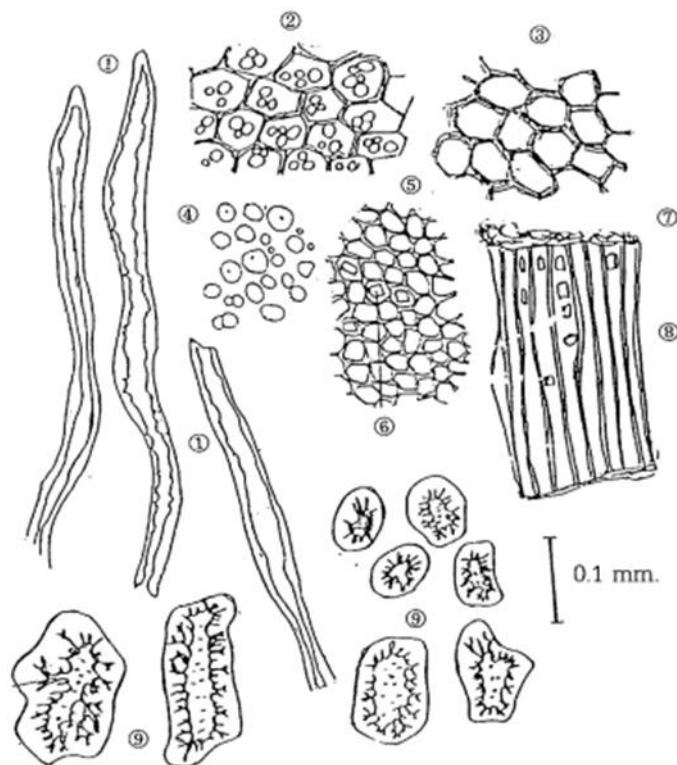


Figure 3 : Description du tissu en poudre : Cubeb (*Piper cubeba*) (Qazi *et al.*, 2017), 1. Fibre lignifiée, 2. Péricarpe, 3. Péricarpe à paroi mince, 4. Grains d'amidon, 5. Spermodermes en vue de surface, 6. Petits prismes d'oxalate de calcium, 7. Spermodermes en coupe 8. Paroi brun jaunâtre.

1.5. Nomenclature

En dessous des désignations de *Piper cubeba* en plusieurs langues, En Arabe : Kabaaba, Kababah, (Khan et Asma, 2002) "Habb-ul-Uruus». En chinois : Biji, Bicheng qie Czech. En Anglais : Jawa peppercorn, Jawanese Pepper. En français : Cubèbe, Poivre à queue, Poivre de Java, Poivrier Cubèbe, Quibebes En Hindi : Kabab-chini, Sital chini. En indonésien : Cabé jawa, Kamukus. En japonais : Kubeba, Kubebu. En Coréen : Chaba huchu, Jaba huchu, Kubepu Kyubebu (Lim, 2012).

1.6. Répartition géographique

Le Kabab Chini est originaire de Java sous le nom de de " Java Peepers ", Sumatra, le sud de Bornéo et d'autres îles de l'océan Indien. Dans certains pays africains, le poivre cubèbe est exporté. Il est sophistiqué dans certaines des îles des Antilles. Le cubèbe peut être cultivé simplement en le plantant au pied des arbres lugubres dans les plantations de café et de noix. Les fruits sont récoltés à maturité mais encore verts et séchés au soleil lorsqu'ils deviennent noirs et ridés (Alam *et al.*, 2013).

2. Utilisations Médicinales

Ils sont des épices et possèdent diverses propriétés médicinales (AlSaid *et al.*, 2015). En médecine traditionnelle, elles sont utilisées comme stimulants, apéritifs, stomachiques et expectorants. Le fruit du cubeba est également utilisé pour soulager les douleurs gastriques, l'entérite, la diarrhée et comme agent anti-inflammatoire. En outre, le fruit du cubeba est connu pour sa capacité à réduire la douleur et l'inflammation chez les animaux de laboratoire, ce qui est attribué à l'activité antioxydant de certains produits chimiques isolés (Choi et Jae-Kwan, 2003).

3. Utilisation Culinaire

Cette épice rare est traditionnellement utilisée dans la cuisine indonésienne et nord-africaine. Chez la cuisine marocaine, la *Piper cubeba* est fait partie du mélange d'épices marocain Ras el-Hanout la saveur mentholée du poivre cubèbe est souvent utilisée dans la cuisine pour le riz, les légumes, les fruits de mer, le poisson, l'agneau et ainsi sa fraîcheur citronnée est appliquée pour faire les desserts comme les glaces, les sorbets (Ganz, 2016).

4. Importance Économique

D'un point de vue économique, *Piper cubeba* est important en tant que source de poivre (les baies séchées) pour les pays en voie de développement. Source de poivre (les baies séchées)

pour le marché mondial des épices, des parfums, des conservateurs, les boissons alcoolisées, les cosmétiques, colorants, propriétés nutritionnelles et aussi comme plantes de jardin (Al-Iraqi et Abdullah, 2012).

5. Composition Chimique

Les composés bioactifs des espèces de Piper ont joué un rôle important comme agents thérapeutiques dans la découverte de médicaments (Barh *et al.*, 2013). Les espèces de Piper sont caractérisées par la production de composés phytochimiques typiques (Fig. 3) tels que les acides benzoïques, les amides et les chromènes, ainsi que des terpènes, des phénylpropanoïdes, des lignanes, d'autres composés phénoliques et une série d'alcaloïdes (Jensen *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 1993). La pipérine est un alcaloïde abondant dans la barrière de cette espèce (Yaffe *et al.*, 2013). L'huile de *Piper cubeba* est composée essentiellement de sabinène, le β -élémane et le cubébol. (Bos *et al.*, 2007). Les fruits séchés en poudre de *P. cubeba* contiennent de l'huile essentielle monoterpènes, sabinène, α -thuyène, β -élémane, carène, 1, 4-cinéol et 1, 8-cinéol ; sesquiterpènes : β -caryophyllène, copaène, α - et β -cubébène, d-cadinène, cubébol et germacène ; et quelques lignanes dont la lignine dibenzylbutyrolactone « cubébine » (Parmar *et al.*, 1997 ; Alam *et al.*, 2013). Un profil de lignine de *P. cubeba* d'Indonésie a reconnu la présence de 13 lignanes dans les fruits, 15 dans les feuilles et seulement cinq dans la tige. Vingt-quatre lignanes ont été signalés jusqu'à présent chez *Piper cubeba*. (Prabhu *et al.*, 1985 ; Badheka *et al.*, 1986 ; Badheka *et al.*, 1987 ; Koul *et al.*, 1996 ; Usia *et al.*, 2005).

Les structures chimiques des lignanes sont très diversifiées et comprennent des lignanes de type furanofurane qui se trouve dans le genre Piper comme la cubébine, l'hinokinine, la yatéine, l'isoyatéine, et des néolignanes à la structure curieuse, comme la kadsurine A et la pipérénone (Prabhu et Newand, 1985 ; Pradeep, 2021). Les autres constituants chimiques de l'huile essentielle de Piper comprennent l'allo, l'aromadendrène, l' α -muurolène, l' α -phellandrène, l' α -pipène, l' α -terpinène, l' α -terpinéol, l'asrone, le β -pinène, le β -bisabolène, le bicyclosiquiphellandrène, la calamine, la Césarone, l'acide cubébique, le cubébol, le cubébinolide, l'épicubébol, le g-humulène, le g-terpinène, gomme, ledol, limonène, myrcène, linalol, nerolidol, ocimène, résinoïdes, sabinol et safrole (Prabhu et Newand, 1985 ; Alam *et al.*, 2013, Prabhu et Newand) ont isolés quelques lignanes de *Piper cubeba*, et des néolignanes ont été isolés (Badheka *et al.*, 1986, Badheka *et al.*, 1987).

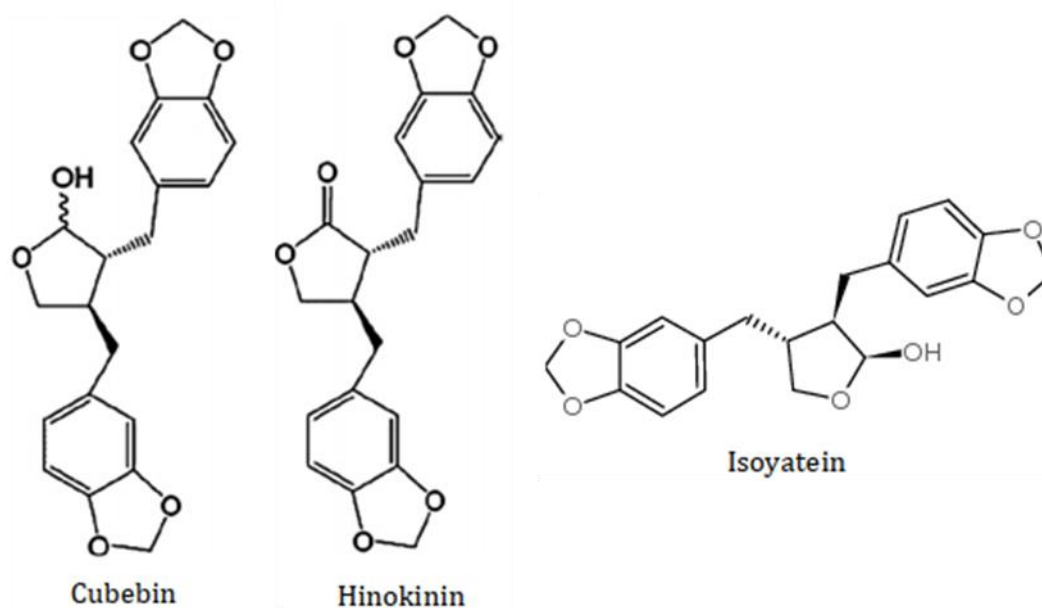


Figure 3 : Structure chimique de quelques lignanes de *Piper cubeba* (Ashok et Shashi Kant, 2018).

6. Activités pharmacologiques

L'extrait de *P. cubeba* a démontré une activité anti-inflammatoire, anti-allergique, antioxydante, antimicrobien, génotoxique, antinéoplasique, molluscide (Rezende, 2012).

7. Applications Dans la Sécurité Industrielle et Alimentaire

7.1. Propriétés nutritionnelles

Les épices comme le *Piper cubeba* ne sont pas seulement consommé pour leur saveur, leur couleur et leur goût, ils sont aussi utilisés pour aider à augmenter l'appétit, stimuler et maintenir une bonne habitude digestive. Ainsi l'élégance des adjuvants alimentaires utilisés en cuisine permet une meilleure alimentation du corps (Singh et Bhatnagar, 2019).

7.2. Activité insecticide

La présence d'insectes dans l'alimentation entraîne à la fois une des contaminations et des dommages économiques importants surtout pendant la période chaude de l'été. Des études expérimentales ont montré que le *Piper cubeba* produit environ 90% d'activité insecticide lorsqu'il est utilisé correctement (Al-Iraqi et Abdulla, 2012).

7.3. Les aliments conservateurs

Les études expérimentales ont proposé des activités antimicrobiennes du *Piper cubeba* en raison de la présence d'huiles essentielles et d'autres métabolites secondaires comme les alcaloïdes et les lignanes (Al-Tememy, 2013).

7.4. Propriétés cosmétiques

Les extraits aqueux de *Piper cubeba* produisent une activité antibactérienne avec pour recommandation de l'ajouter aux matériaux cosmétiques pour inhiber la croissance des bactéries des mains contaminées appliquées sur les contenants de cosmétiques, en plus de leurs avantages de la beauté de la peau (Akrayi, 2012).

STRESS OXYDANT

ET

ACTIVITE ANTIOXYDANT

1. Stress oxydant

1.1. Généralité

Dernièrement, le domaine de la biologie et de la médecine a connu une nouvelle concept qui s'appelle le stress oxydant, et qui signifie un déséquilibre entre la manifestation systémique des espèces d'oxygène réactives et la capacité d'un système biologique à désintoxiquer facilement les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qui en résultent elle est potentiellement impliquée dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative (Moon et Shibamoto, 2009).

1.2. Définition

Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre le système de défense antioxydant et la production des radicaux libres. Ce déséquilibre peut être causé par une nutrition insuffisante en antioxydants, une surproduction endogène ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Collard, 2014).

Ce déséquilibre peut endommager les macromolécules, les cellules, les tissus, les organes et tout le corps. Une fois ces macromolécules endommagées, leurs fonctions de base dans le métabolisme cellulaire changeront, conduisant à la manifestation de nombreuses maladies (Kumar *et al.*, 2017).

1.3. Origine de stress oxydant

Il peut y avoir de nombreuses raisons aux conséquences graves du manque d'antioxydants ou de la production excessive de radicaux libres. Le corps humain peut devoir faire face à une production trop élevée pour être contrôlée, ce qui sera observé dans les intoxications aux métaux lourds, les radiations, l'ischémie / reperfusion après thrombose. La rupture de l'équilibre peut être causée par la malnutrition ou l'insuffisance d'un ou plusieurs antioxydants (tels que des vitamines ou des oligo-éléments) apportés par la quantité limitée de nutriments dans l'alimentation. Une mauvaise adaptabilité peut conduire à des anomalies génétiques, conduisant à des antioxydants enzymatiques mal codés, ou à la synthèse d'antioxydants (comme la γ -glutamine synthétase produisant du glutathion), ou à la régénération d'antioxydants, ou au couplage de la défense avec l'énergie (comme le G6PD),

ou les promoteurs de ces mêmes gènes, des mutations les empêcheront de réagir avec trop de radicaux libres (Favier, 2003).

1.4. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

1.5. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA)

L'oxygène est un élément important dans la survie de l'organisme. Le métabolisme énergétique aérobie dépend de la phosphorylation oxydative au niveau de mitochondrie avec une enzyme multicomposante, au cours de ces réactions les métabolites partiellement réduits et hautement réactifs de l'O₂ peuvent se former des espèces réactives oxygénées. Les principaux ERO physiologiques sont les intermédiaires métaboliques entre l'oxygène et l'eau (radical superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$)), ainsi que le monoxyde d'azote (NO \bullet) et son dérivé : le peroxyde d'azote (ONOO $^-$) (Thannickal et Fanburg, 2000).

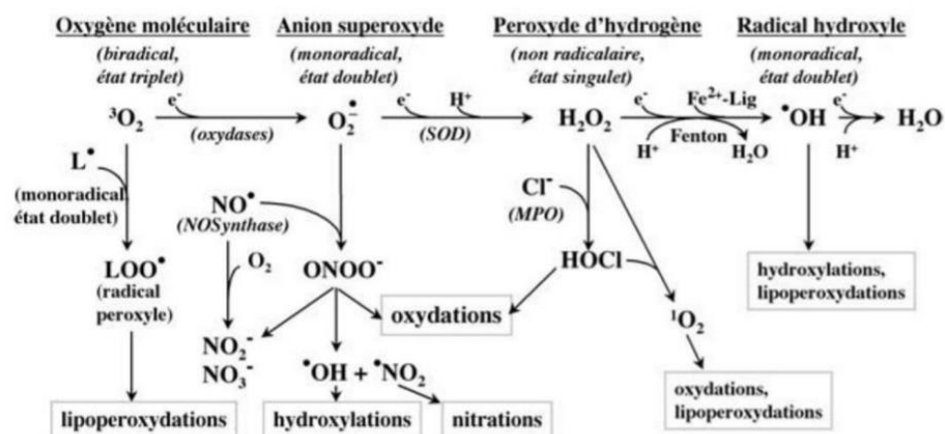


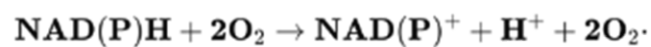
Figure 4 : Principales espèces réactives oxygénées (Debydupont et Lamy, 2002).

1.6. Mécanisme de production des radicaux dans l'organisme

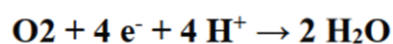
Les espèces réactives de l'oxygène peut former dans l'organisme ou ils sont formés par des facteurs externes, il y a donc deux sources (endogène et exogène) de formation de radicaux libres.

1.6.1. Source endogène

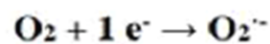
Les ERO sont constitués en grande majorité chez les mammifères de sources d'origine enzymatique, dans lequel la mitochondrie représente l'une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres (Finaud *et al.*, 2006), ils parmi la monoamine oxydase, le cytochrome b5 réductase, complexe I et III, le succinate déshydrogénase, le glycérophosphate déshydrogénase sont la cause de neuf enzymes mitochondriales. Toutefois la production des ROS dépend des tissus et des espèces. (Andreyev *et al.*, 2005). Aussi, ce qui produit une source importante de radicaux libres sont les peroxysomes, les microsomes et les macrophages (Zou Y. *et al.*, 2008). Un système NADPH-oxydase à la capacité de produire des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) (Finaud *et al.*, 2006).



Dans la chaîne respiratoire, 95 à 99% de l'oxygène consommé est réduit en eau H₂O₂ réduction tétravalente cat-électron, catalysée par le cytochrome P450



Le dioxygène préfère recevoir un électron à un temps et le convertit en un ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Suite à ce processus, 2 à 5% de la consommation d'oxygène (VO_2) est converti en $O_2^{\cdot -}$.



Le stress psychologique et l'inflammation (infection, maladies chroniques) sont les causes des facteurs endogénique (Moller *et al.*, 1996). L'obésité provoquant des inflammations chroniques, de l'hyperglycémie, de l'hyperlipidémie et des défenses antioxydants inadéquates favorise la création de radicaux libres.

1.6.2. Source exogène

L'alimentation composé d'antibiotiques, d'alcool, d'aliments riche en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, ainsi que la faible consommation d'antioxydant, est un facteur exogène responsable à l'aggravation et/ou à la diminution de l'élimination des radicaux libres (Hu *et al.*, 2006). De même pour les Le dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique et les polluants tels que fumée de cigarette, pollution atmosphérique (dioxyde de soufre et d'azote (SO₂, NO₂) les hydrocarbures) (Valko *et al.*, 2005). Et les métaux lourds ayant une attirance particulière avec les groupements sulfohydrides car les antioxydants contenant du soufre sont aisément inactivés (Houston, 2007).

1.7. Conséquence de stress oxydant

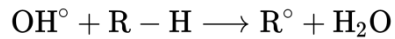
La surproduction des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), ainsi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux en produisant des anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Ré *et al.*, 2005 ; Boots *et al.*, 2008).

1.8. Effets sur les lipides

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ROS sont les acides gras polyinsaturés. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est récupéré d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (Ahsan *et al.*, 2003). A cause de ces radicaux, une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires peut déclencher en conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (Evans, 2000).

1.9. Oxydation de l'ADN

C'est la base de Toute la composition biochimique des êtres vivants est mémorisée au sein de l'ADN qu'il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Cadet, Jean, et al. 2002). Les radicaux hydroxyles (OH[•]) réagissent avec tous les composants moléculaires de l'ADN (Koechlin-Ramonatxo, 2006), en arrachant un atome d'hydrogène d'un substrat organique RH :



En s'additionnant sur les doubles liaisons :



Cinq grandes classes de dommages oxydatifs à médiation hydroxyle peut être généré parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intracaténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Fig. 4) (Cadet *et al.*, 2002).

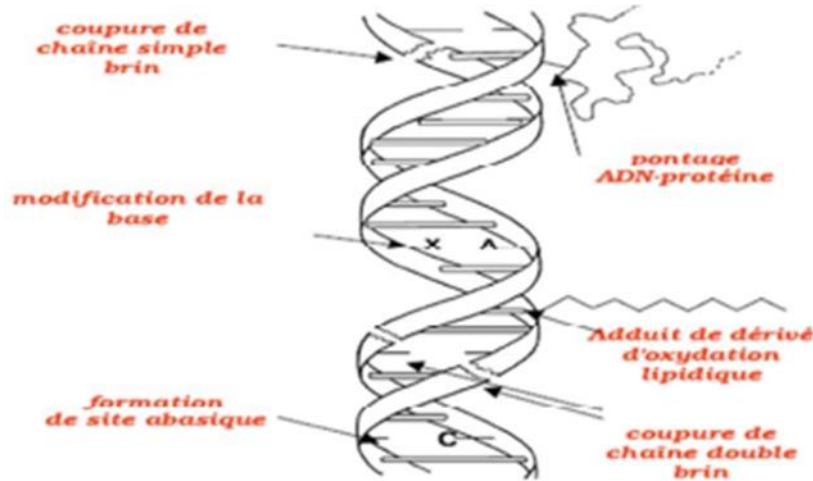


Figure 5 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Cadet *et al.*, 2002).

1.10. Oxydation des protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ROS. Les protéines les plus impactées aux attaques radicalaires sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). Comme les enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les produits de la peroxydation lipidique réagissent avec le groupement sulfhydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques.

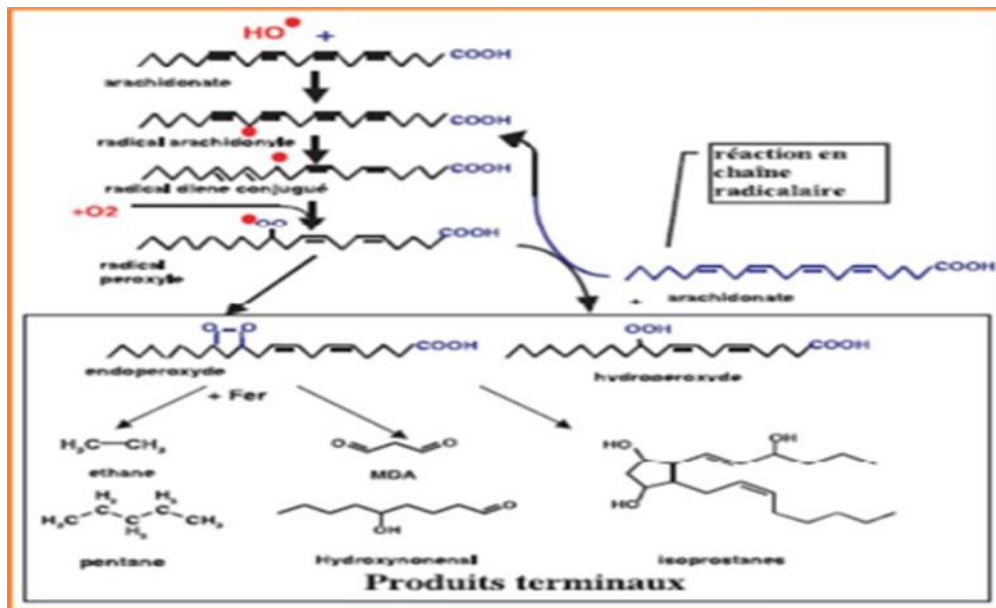


Figure 6 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Cadet *et al.*, 2002).

Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport peut être affecter par le dommage oxydatif des protéines qui peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (Favier, 2003). Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent provoquer un dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérase (PhD, 1999).

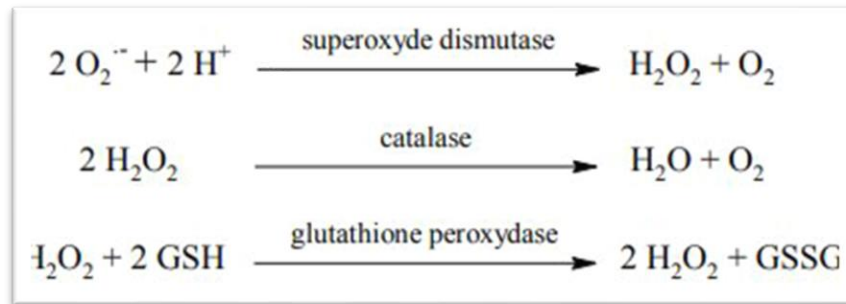
2. Les antioxydants

2.1. Définition

Dans un système biologique, un antioxydant est défini comme toute substance qui, si elle présente une faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, l'oxydation de ce substrat sera retardée ou empêchée d'une manière significative (Helliwell, 1995 ; Helliwell et Gutteridge, 1999). En ce qui concerne les aliments, les antioxydants peuvent être définis comme toutes les substances capables de retarder ou d'empêcher la croissance du rancidité ou toute détérioration de la saveur des aliments due à l'oxydation. Les antioxydants retardent l'apparition des mauvaises odeurs en prolongeant la période d'induction. L'ajout d'antioxydants après cette période a tendance à être inefficace pour retarder le développement de rancidité (Gülçin, 2011).

2.2. Les antioxydants enzymatiques

Il existe différentes méthodes préventives d'antioxydants en raison de la variété des initiateurs d'oxydants disponibles. La désintoxication des ERO est un moyen essentiel de prévenir l'oxydation, principalement transporté par des systèmes antioxydants endogènes enzymatiques. La superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase (Laguerre et al., 2007).



2.3. Les antioxydants non enzymatiques :

Les protéines (transferrine, ferritine) ainsi que les molécules antioxydants (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone), composent les systèmes de défense et permettent la régulation de la production physiologique d'EOA (Espèce oxygénée activée). De plus les systèmes secondaires de défense formés de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases permettent d'empêcher l'accumulation dans les cellules de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et prend part à la destruction de leurs fragments toxiques (Pincemail *et al.*, 2002).

2.4. Les antioxydants exogènes

Pour prévenir la rancidité des aliments. On utilise les antioxydants exogènes comme additif car ils sont reconnus pour leur efficacité, leur coût abordable, ainsi que pour leur disponibilité sur le marché. Néanmoins la sécurité de ces additifs est remise en cause car ils produisent un besoin de recherche comme matières de substitution comme antioxydants de la nourriture (Wang *et al.*, 2003).

La vitamine E, l'acide ascorbique, la B-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques sont plusieurs matières pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo. En réduisant leur perméabilité elles peuvent affermir les membranes et peuvent aussi lier les acides gras libres (Kœchlin, 2006).

Tableau I : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
β-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande

2.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers en recueillant de l'oxygène singulier, en rendant inactif les radicaux par réaction d'addition covalente, en abaissant les radicaux ou les peroxydes ou encore la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

2.6. Technique d'évaluation

Pour évaluer l'activité antioxydant des aliments et des systèmes biologiques, nous pouvons procéder par plusieurs méthodes (S.S *et al.*, 2008). Ces méthodes utilisent soit le transfert d'atome d'hydrogène ou soit la du transfert d'un simple électron. Parmi celles-ci, nous pouvons évoquer, La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène), La méthode d'ABTS (2,2-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC(Capacité antioxydant équivalente de Trolox), La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants), La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), La méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N-diméthylphénylène - diamine), La méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux), La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total).

2.7. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut amener à déclencher de nombreuses pathologies ou à en être associé. Il est source de complication à l'athérosclérose, à l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hypoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen *et al.*, 2000 ; Packer et Weber, 2001). Cependant les maladies résultant au stress oxydant deviennent plus courantes avec l'âge car le vieillissement réduit les défenses antioxydants et accroît la production mitochondriale des radicaux.

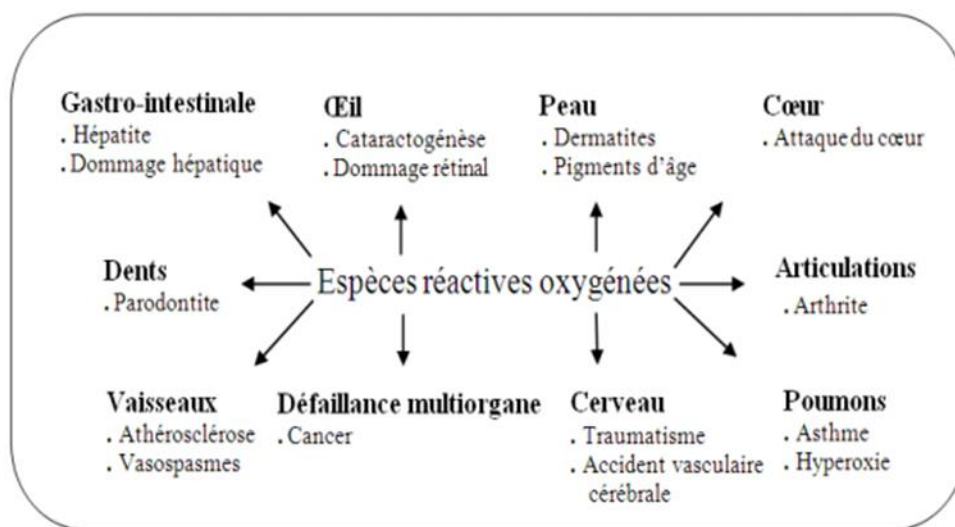


Figure 7 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (Lee *et al.*, 2004).

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Dans la présente étude, les graines de *P. cubeba* guise de matériel ou d'organe végétal. Ils ont été achetés au mois de Mars 2021 sous forme séché, chez un herboriste dans la commune de M'sila, wilaya de M'sila. Les graines ont été prises dans un sac propre et à l'abri de la lumière pour être servi plus tard à l'extraction.

1.2. Appareillage

Balance de précision (Kern), Rotavapeur (Büchi), Spectrophotomètre (type spectronic 20 Genvsis TM), Etuve, Agitateur vortex, Centrifugeuse (SIGMA 1-6), Bain-marie (memmert, type SV 1422), PH mètre.

1.3. Réactifs

Acide gallique, Réactif de Folin-Ciocalteu, Quercétine, BHT, DPPH (Sigma), Carbonate de sodium, Acétate de sodium, Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), TCA acide trichloracétique, Ferricyanure de potassium (K_3Fe), Ethanol, Méthanol, Chlorure de fer ($FeCl_3$), Acide ascorbique, Eau distillée, $NaHPO_4$ et Na_2HPO_4 .

2. Méthodes D'analyses

2.1. Préparation des extraits

Avant de commencer l'extraction, les graines sèches subissent un broyage à l'aide d'un broyeur électrique, jusqu'à obtention d'une poudre fine.

2.1.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux de *P. cubeba* a été obtenu par décoction de 20 g du broyat des graines dans 500 ml d'eau distillée pendant 10 min sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes. Le mélange est filtré grâce au papier Whatman (n°3) déposé sur un buchner. Des aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40 °C pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation ultérieure (Benslama *et al.*, 2017).

2.1.2. Extrait méthanolique

Une quantité de 50g de la poudre des graines de fenouil préalablement broyée, est mise à macérer dans 200 ml de méthanol, à l'ombre et à la température ambiante pendant 24 heures, avec un maximum d'agitation. Ce mélange est filtré à l'aide d'un papier Whatman (n°3) déposé sur un buchner. Le méthanol est éliminé du filtrat à sec et sous vide au Rotavapeur "BÜCHI" à 40 - 50 °C. Le résidu obtenu est caractérisé par une couleur brun foncé, qui est considéré comme étant l'extrait brut, puis les aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40 °C pour sécher. L'extrait sec est conservé au froid à 4 °C (Benslama *et al.*, 2017).

2.2. Analyse chimique

2.2.1. Détermination du rendement des extraits

Le rendement de la plante soumise à l'extraction est le rapport obtenu entre sa masse initiale et sa masse finale résultante, suite à son évaporation. On exprime ce résultat en pourcentage et il se calcule de la manière suivante : $R (\%) = M / M_0 \times 100$.

M désigne la masse à son état final et M_0 la masse de graines de cubeba. Les deux grandeurs s'expriment en gramme.

2.2.2. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

2.2.2.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un assemblage d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et de phosphomolibdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972), Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

2.2.2.2. Protocole

Verser 20 µl de chaque extrait de P. cubeba dans des tubes à essais ; Ajouter 1.58 ml d'eau distillée et 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans de l'H₂O distillée (v/v) dans

chaque tube ; Remuer fermement puis laisser agir 6 min avant de verser 300 µl de carbonate de sodium à 7.5%.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 760 nm, après avoir attendu durant 2 heures l'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, Réaliser l'opération égale pour l'acide gallique à différentes concentrations en introduisant 20 µl de ces dernières dans une succession de tubes et ajout des autres réactifs.

2.2.3. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *P. cubeba* est réalisée par la méthode de Bahorun et al. (1996).

2.2.3.1.Principe

On peut obtenir un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium, avec des flavonoïdes qui possèdent un groupement hydroxyle libre, en position 5. Par désintoxication du fer ou de l'aluminium, les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres. En effet, le métal éjecte deux électrons pour s'attacher à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique.

2.2.3.2.Protocole

Verser 1 ml d'extrait de *P. cubeba* dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2% ; Attendre l'incubation pendant 15 min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genesis TM) à hauteur de 430 nm.

Refaire la même opération pour la quercétine à différentes concentrations, mais cette fois ci en implémentant 1 ml pour chaque concentration dans une chaque tube et en ajoutant 1 ml d'AlCl₃ à 2%.

Le blanc est représenté par l'éthanol ajouter à l'AlCl₃, tous les traitements sont réalisés en triplicata. Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *P. cubeba* sont évalués en se basant sur la courbe d'étalonnage obtenue en se servant de la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche.

2.2.4. Dosage des flavones et flavonols

Pour estimer le taux de flavonols on peut utiliser la méthode celle décrite par (Kosalec et al., 2004).

2.2.4.1. Protocole

Mettre 0.50 ml d'extrait de *P. cubeba* dans un tube à essai ; ajouter 1.5 ml d'éthanol, 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0.1 ml d'acétate de Sodium et 2.8 ml d'eau, laisser incuber 30 min à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genesis TM) à 415 nm. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. La concentration des flavones et flavonols contenus dans les extraits de *P. cubeba* est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard. On utilise pour exprimer les résultats le mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche.

2.2.5. Test de piégeage du radical libre DPPH

2.2.5.1. Principe

Le DPPH(2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à hauteur de 517nm. Le radical DPPH est réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine, en présence de composés anti radicalaire ce qui entraîne l'apparition d'une coloration jaune. À 517 nm, les absorbances relevées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH., qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon (Benslama et Harrar, 2016).

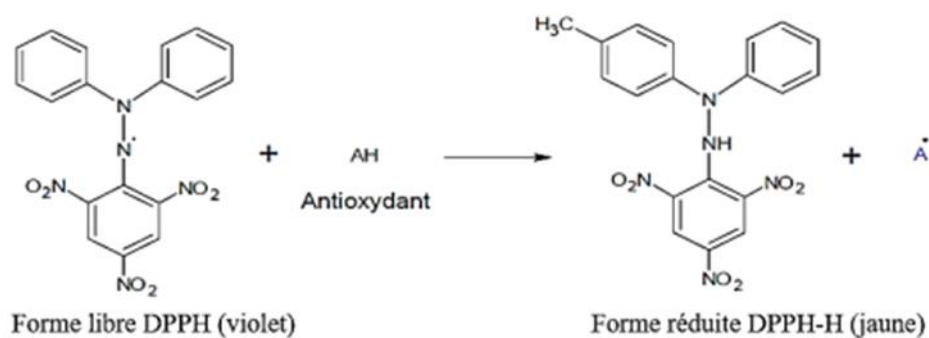


Figure 8 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant AH.

(Grupiv's, 2016).

2.2.5.2. Protocole

La méthode suivante est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Que *et al.*, 2006). Un volume de 500 µl de différentes concentrations de chaque extrait est additionné à 500 µl de la solution éthanolique du DPPH (0.1mM) récemment préparée. Pour

ce qui est du contrôle négatif, celui est préparé en parallèle en combinant 500 μl d'éthanol avec 500 μl de la solution éthanolique de DPPH.

Après avoir attendu dans l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, l'incubation, le relevé des absorbances est effectué à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc qui contient 1 ml d'éthanol.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité antiradicalaire en calculant le pourcentage d'inhibition des radicaux libres (I %) par la formule suivante :

$$I \% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Où : I % : pourcentage d'inhibition

At : Absorbance du test effectué

Ac : Absorbance du contrôle

2.2.6. Test de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode Un volume de 100 μL de (Benslama et Harrar, 2016).

2.2.6.1.Principe

Un extrait à un pouvoir réducteur qui est associé à son pouvoir antiradicalaire. Ce test se base sur la réduction de fer ferrique présent dans le complexe K_3Fe_6 en fer ferreux ce qui, en présence d'un antioxydant capable de donner des électrons, donne une coloration bleu vert (Fig. 9). L'absorbance du milieu réactionnel est évaluée à 700 nm. Une accentuation de l'absorbance correspond à une accélération du pouvoir réducteur des extraits testés

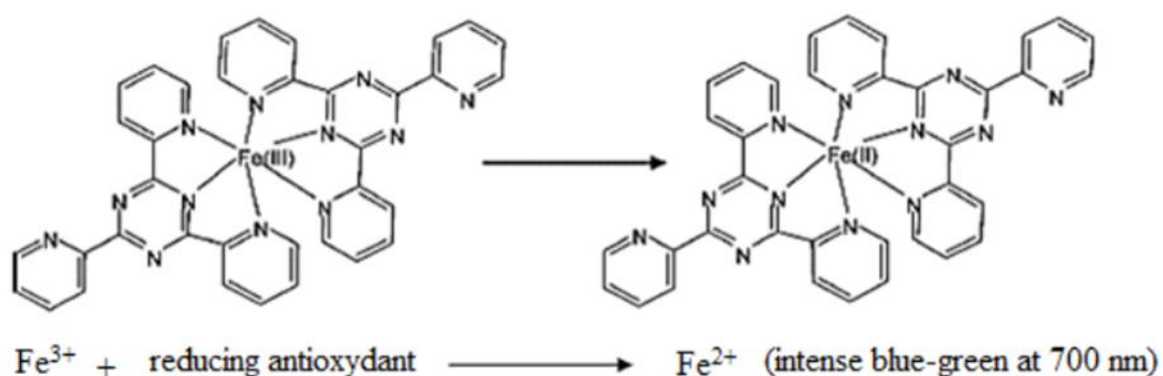


Figure 9 : Schéma sur la réaction de test FRAP, Fe^{2+} : Ions ferreux, Fe^{3+} : Ions ferriques (Huang *et al.*, 2005).

2.2.6.2. Protocole

Un volume de 300 μL d'extrait de *P. cubeba* de diverses concentrations (10-1000 $\mu\text{g/mL}$) a été mélangé avec 300 μL de tampon phosphate (0,2 mM, pH 6,6) et 300 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%). Le mélange a été chauffé à 50°C pendant 20 minutes. Ensuite, 300 μL de TCA (10%) ont été ajoutés et la solution a été centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant (400 μL) a été mélangé avec 400 μL de H_2O et 80 μL de FeCl_3 (0.1%). Après 10 min à température ambiante.

L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Pour chaque échantillon, trois tests ont été effectués. Les résultats sont exprimés en μg acide ascorbique équivalent/mg d'extrait.

2.3. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux ont été exprimés en moyenne \pm SD de trois répétitions ($n = 3$), l'analyse statistique a été effectuée par une analyse de la variance (ANOVA) grâce au logiciel (Graph Pad Prism version 9).

Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification des résultats de l'activité antioxydante des différents extraits sont faites par le test ANOVA, les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($P < 0,05$), ainsi que les droites d'étalonnage sont réalisées par régression linéaire.

Résultats et discussion

1. Résultats et discussion

1.1. Extraction et rendement

Les deux extraits : aqueux et méthanolique ont été obtenu grâce à deux solvants : l'eau et le méthanol qui ont permis l'extraction. Le rendement représente la masse de l'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche et s'exprime en pourcentage. On le détermine par la formule signalée dans la partie matériels et méthodes (Tab. II). En observant les résultats obtenus, nous pouvons en conclure, la richesse de *P. cubeba* en molécules polaires ainsi le fait que le rendement de l'extrait aqueux est supérieur à celui de l'extrait méthanolique (Fig. 10), ceci nous permet donc de dire que les molécules existantes sont fortement polaires. L'extrait aqueux est celui avec le rendement le plus haut qui est de 18,5 %, tandis que l'extrait méthanolique à un rendement de 6.4 %. Il est important de mentionner que les travaux de **Ahirrao et al., 2020** sur la même espèce originaire d'inde, ont obtenu 6,37 % de l'extrait méthanolique pour 50g de matière fraîche, nous pouvons donc en conclure que nos résultats sont similaires.

Tableau II : Résultats et rendement d'extraction des deux extraits.

Extrait	Poids de résidus	Poids de l'extrait sec (aspect, couleur)	Rendement
Aqueux	20g	3.7g (cristallin, brune foncé)	18.5%
Méthanolique	50g	3.2g (poudre fine, brune foncé)	6.4%

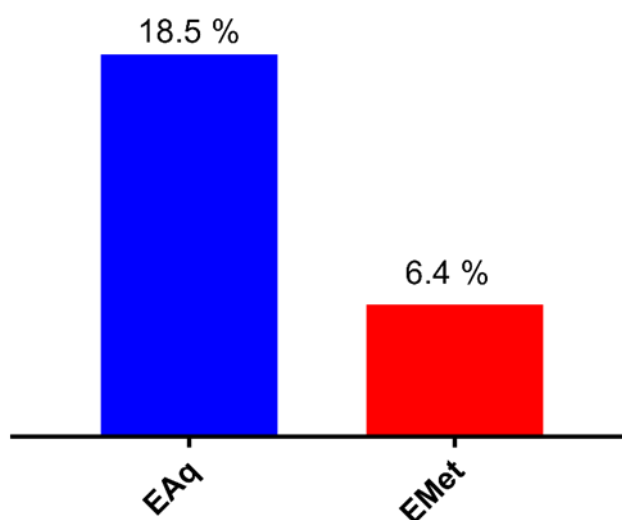


Figure 10 : Histogramme du rendement de l'extraction.

1.2. Composition chimique

1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La méthode de Folin Ciocalteu permet de définir la teneur en polyphénols totaux des deux extraits, en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique servi comme standard. On exprime les teneurs en μg qui est équivalent à de l'acide gallique/mg d'extraits (μg EAG/mg d'extraits) par l'équation de type : $y = 0,001617 x - 0,01159$ sachant que $R^2 = 0,9855$ (Fig. 13).

D'après la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux dans EMet est de $235,9\mu\text{g}$ EAG/mg d'extraits, représente une forte tenue par rapport à l'EAQ qui est de $185,3\mu\text{g}$ EAG/mg d'extraits. La différence des teneurs entre EAQ et l'extrait EMet peut être attribué à l'affinité et la solubilité sélectives des polyphénols entre le méthanol et l'eau, les composés ayant un haut degré d'affinité et une forte solubilité vis-à-vis du méthanol, représentent la fraction la plus élevée.

Ces résultats obtenus sont nettement supérieurs au résultat trouvé par Ahmed *et al.*, 2017, qui a montré que les graines de *P. cubeba* de la Malaisie extrait par trempage dans l'eau et le méthanol durant 72 heures se caractérisent par des teneurs en polyphénols de 91.26 et 22.14 mg EAG/g d'extrait pour EAQ et EMet respectivement.

1.2.2. Teneur en flavonoïdes

1.2.2.1. Teneur en flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium a permis la détermination des teneurs en flavonoïdes totaux des deux extraits en se basant sur la courbe d'étalonnage de la quercétine. La teneur est exprimée en μg qui est l'équivalent de quercétine/mg d'extrait (μg EQ/mg d'extrait). et ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,03493 x + 0,2252$ sachant que $R^2 = 0,9966$.

Les résultats montrent que l'EAQ à un taux plus élevé en flavonoïdes que l'EMet ($47,27\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait pour l'EAQ et $35,44\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait pour l'EMet). Ahmed *et al.*, 2017 ont montré que les graines de *P. cubeba* se caractérisent par des teneurs en flavonoïde de 59.65 et 49.78 mg EAG/g d'extrait pour EAQ et EMet respectivement.

1.2.2.2. Teneurs en flavones et flavonols

La quercétine a été utilisée comme étalon à diverses concentrations, on exprime en milligramme, d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) la teneur en flavones et flavonols. Le taux des flavones et flavonols des quatre extraits ont été obtenus grâce à une courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.02327x + 0,04389$ sachant que $R^2 = 0,9934$. Les teneurs en flavones et flavonols des extraits méthanoliques ont un taux plus élevé comparés aux extraits aqueux 82.83 mg EQ/g et 100.1 mg EQ/g matière fraîche respectivement.

A notre connaissance, les résultats de la détermination des flavonoïdes et des flavonols n'ont pas encore été déterminés pour comparer nos résultats. Mais on peut comparer ces résultats avec une autre plante du même genre de *Piper cubeba*.

Seal et Chaudhuri ,2015 ont travaillé sur le *P. pedicellatum*. Ils ont obtenu 298.03 ± 2.78 mg/g d'extrait de flavones et flavonols. Des études ont montré que plusieurs éléments sont aptes à influencer la teneur en composés phénoliques tels que les facteurs géographiques, climatiques, environnementaux (**Ebrahimi et al., 2008**), génétiques ainsi que le degré de maturation de la plante, la période de récolte et aussi la méthode d'extraction et quantification (**Aganga et Mosase, 2001 ; Pedneault et al., 2001 ; Miliuskas et al., 2004 ; Fiorucci, 2006**).

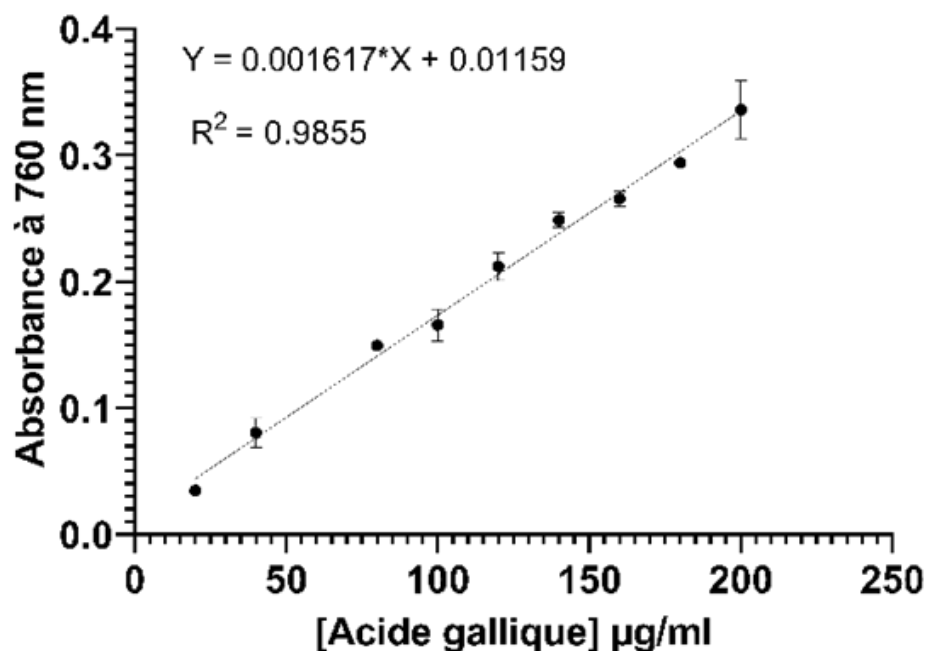


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

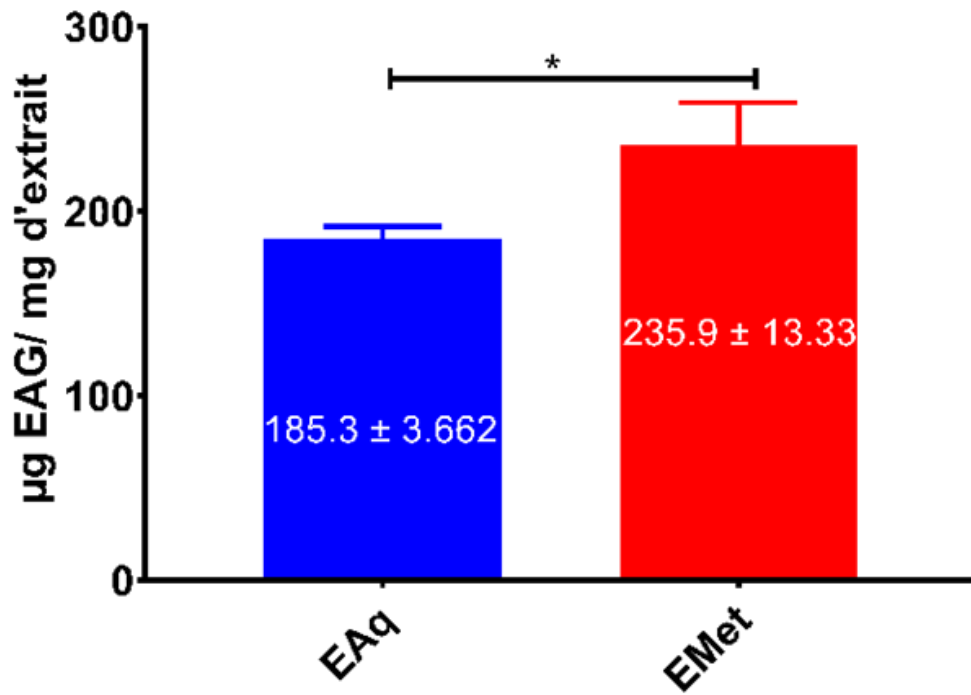


Figure 12 : Histogramme de la teneur en polyphénols des deux extraits.

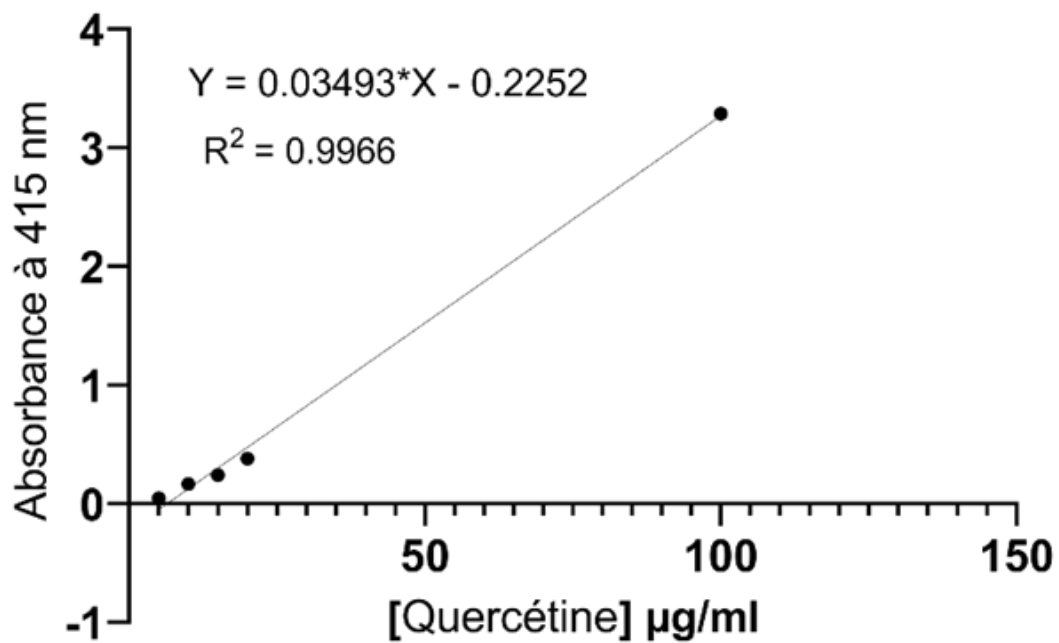


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

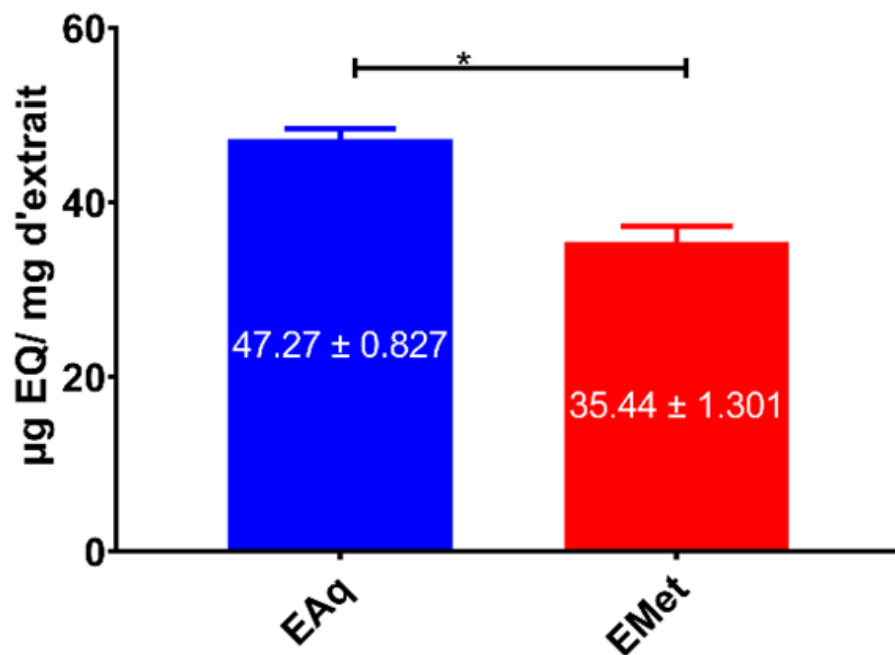


Figure 14 : Histogramme de la teneur en flavonoïdes des deux extraits.

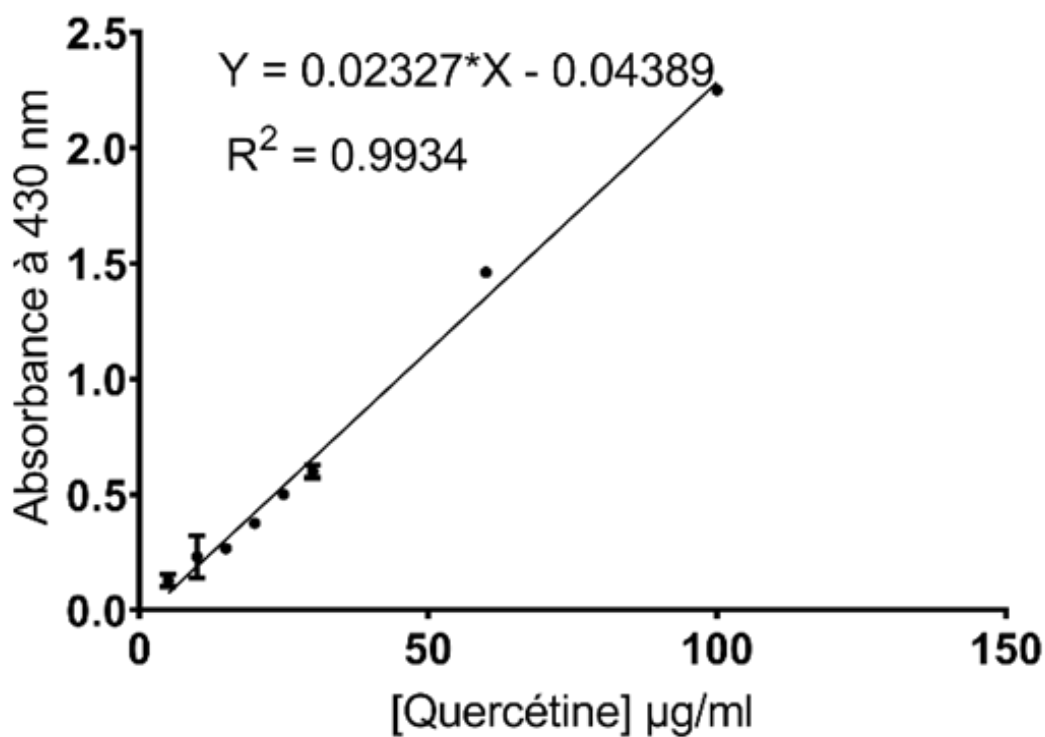


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols.

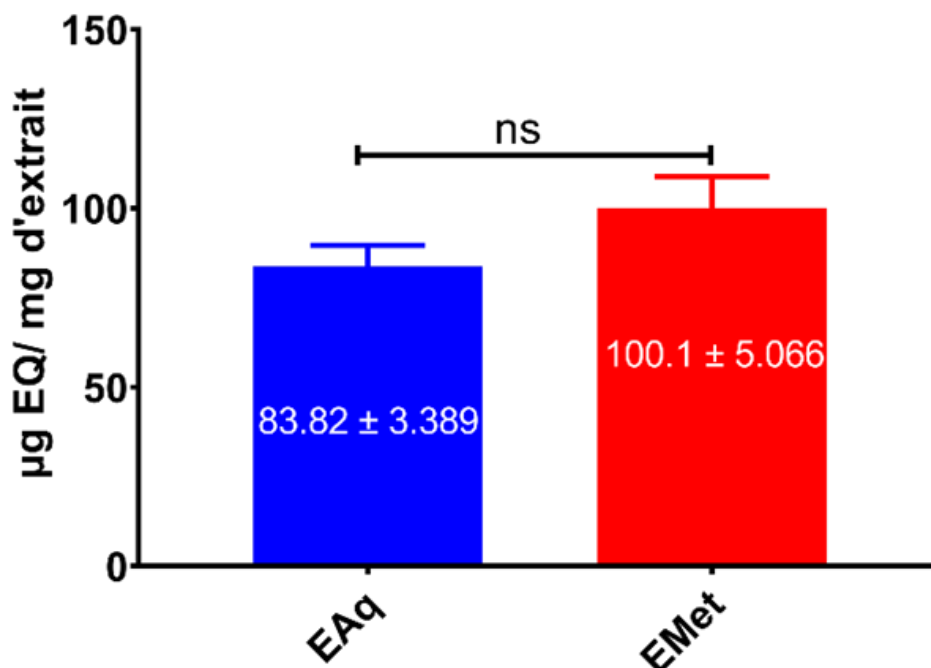


Figure 16 : Histogramme de la teneur en flavones et flavonols des deux extraits.

Tableau III : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des deux extraits.

Extrait	polyphénol	flavonoïdes	flavonols
Extrait aqueux	185.3 ± 3.662	47.27 ± 0.827	83.82 ± 3.389
Extrait méthanolique	235.9 ± 13.33	35.44 ± 1.301	100.1 ± 5.066

1.3. L'activité antioxydante et anti radicalaire :

1.3.1. Test anti-radicalaire

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiés et du BHT par piégeage du radical DPPH, a été déterminé par un passage de la couleur violette à la couleur jaune, en mesurant au spectrophotomètre à hauteur de 517 nm. La capture du radical DPPH est basée sur la détermination de l'abaissement de l'absorbance d'une solution éthanolique de DPPH à hauteur de nm. Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes d'apparence exponentielles avec une phase stationnaire de 100 % d'inhibition. La réduction est déterminée par la diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires. La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les pourcentages d'inhibition maximale ainsi que de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition, la valeur d'IC50 la moins élevée coïncide à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. L'observation de ces résultats, nous pouvons en déduire que tous les extraits émettent un pouvoir anti-radicalaire dose

dépendant, avec des profils de ressemblance exponentiels, suivie d'une phase stationnaire présentant le pouvoir maximal.

Les extraits EMet et EAQ aboutissent à un pouvoir maximal de l'ordre de 77,71-74,70% respectivement à la concentration de 150 $\mu\text{g/ml}$. Ces profils sont à celui du BHT qui atteint un pouvoir maximal de 70.79 % à la concentration de 150 $\mu\text{g/ml}$. Le rapprochement des résultats des IC₅₀. Nous permettons de déduire que, l'extrait Emet possède une meilleure aptitude de piégeage du radical DPPH (IC₅₀ = 63,56 $\mu\text{g/ml}$) à l'inverse de l'extrait EAQ qui révèle un faible pouvoir de piégeage du radical DPPH (IC₅₀ = 89,26 $\mu\text{g/ml}$), ces résultats sont confirmés statistiquement par l'existence d'une différence hautement significative au seuil de 5 % entre les extraits et le BHT et entre les extraits eux-mêmes.

Muchandi *et al.*, 2018, ont trouvé une valeur proche de notre résultat sur des graines de *P. cubeba* ; qui a été soumis à une extraction en continu au méthanol par l'utilisation de l'appareil de Soxhlet pendant 48 h. l'extrait de la plante a présenté une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 58,75 $\mu\text{g/ml}$.

L'étude réalisée par Ramal et Hameed sur l'extrait des fruits de *P. cubeba* par bidistillation ont montré que l'extrait aqueux présente des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 70,36 mg /ml.

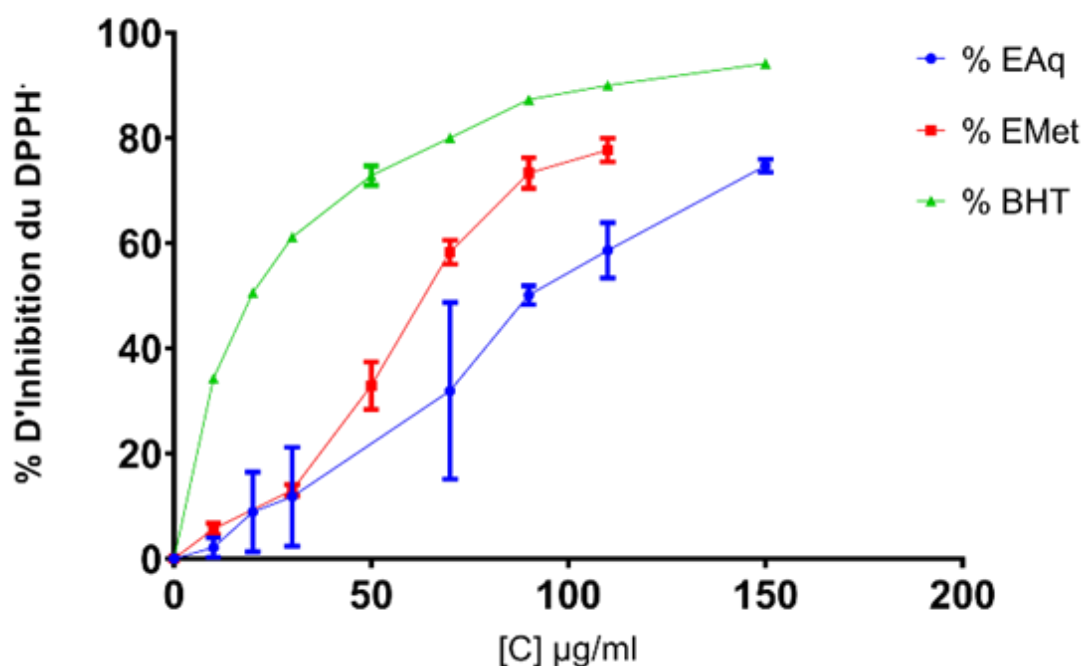


Figure 17 : Variation du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT et des deux extraits.

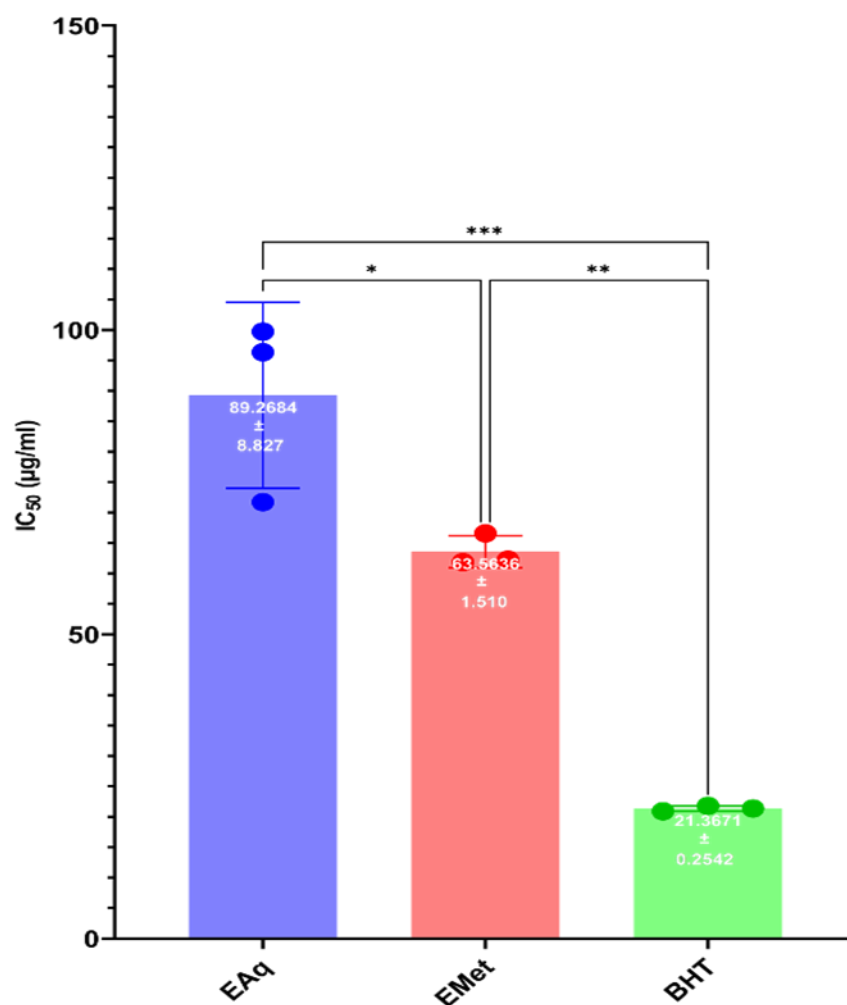


Figure 18 : Histogramme des IC₅₀ des deux extraits de *P. cubeba* et du BHT.

Tableau IV : Pouvoir antiradicalaire des deux extraits EAq et EMet des graines de *P. cubeba* vis-à-vis le radical DPPH.

Extrait	% d'inhibition maximal (concentration d'inh max µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
EAq	74.70 (150)	89.2 ± 68.82
EMet	77.71 (150)	63.5 ± 61.51
BHT	70.79 (150)	21.3 ± 60.25

1.3.2. Test de la réduction du fer (FRAP) :

Dans l'objectif d'évaluer la capacité de réduction des ions métalliques tels que le fer, le relevé du pouvoir réducteur des graines de *P. cubeba* a été faite par la méthode de FRAP, en mesurant la réduction du fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺ et la capacité des composés à

transmettre des électrons par l'accroissement de la densité de la couleur verte dans le milieu réactionnel à hauteur de 700 nm. Cette activité réductrice est évaluée par la concentration efficace (EC50) qui correspond à une absorbance égale à 0,5 acquis par extrapolation de la courbe de régression linéaire.

L'acide ascorbique a été servi comme contrôle positif. Les résultats reçus nous ont permis de dessiner des courbes d'absorbances en fonction des concentrations pour chacun des extraits. On observe que la diminution du fer III est proportionnelle à la concentration des échantillons. L'extrait EMet (EC50 = 148.62 μ g/ml) entraîne un pouvoir réducteur proche que celui de l'extrait EAq (EC50 = 155.93 μ g/ml), confirmé par l'absence d'une différence hautement évocatrice au seuil de 5 % entre les deux extraits mais il existant entre les extraits et l'acide ascorbique (Tab. V). Cela prouve leur propriété de donation d'électrons et donc l'affectation au contrôle du nombre des radicaux libres. Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est possiblement dû à l'existence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme transmetteur d'électron. Tamuly *et al.*, 2014 a mentionné que les extraits méthanolique des graines de *P. Willichii* présent un pouvoir réducteur du Fe avec une EC50 de l'ordre de 41.7 μ g/ml.

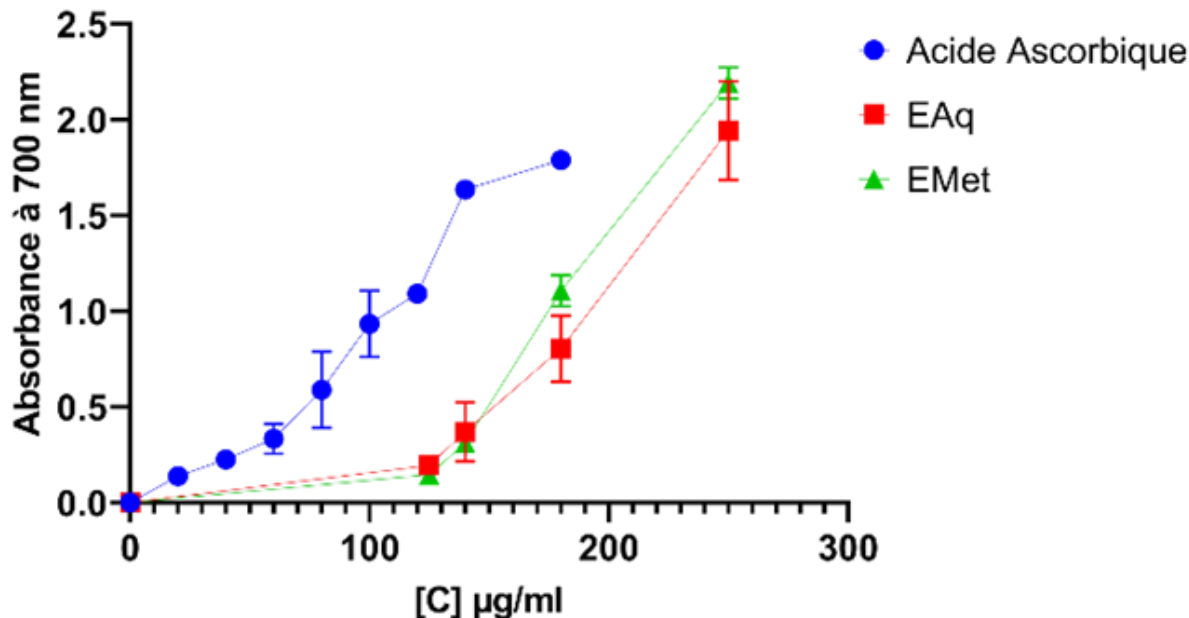


Figure 19 : Pouvoir réducteur des extraits aqueux et Méthanolique de *P. cubeba* et de l'acide ascorbique.

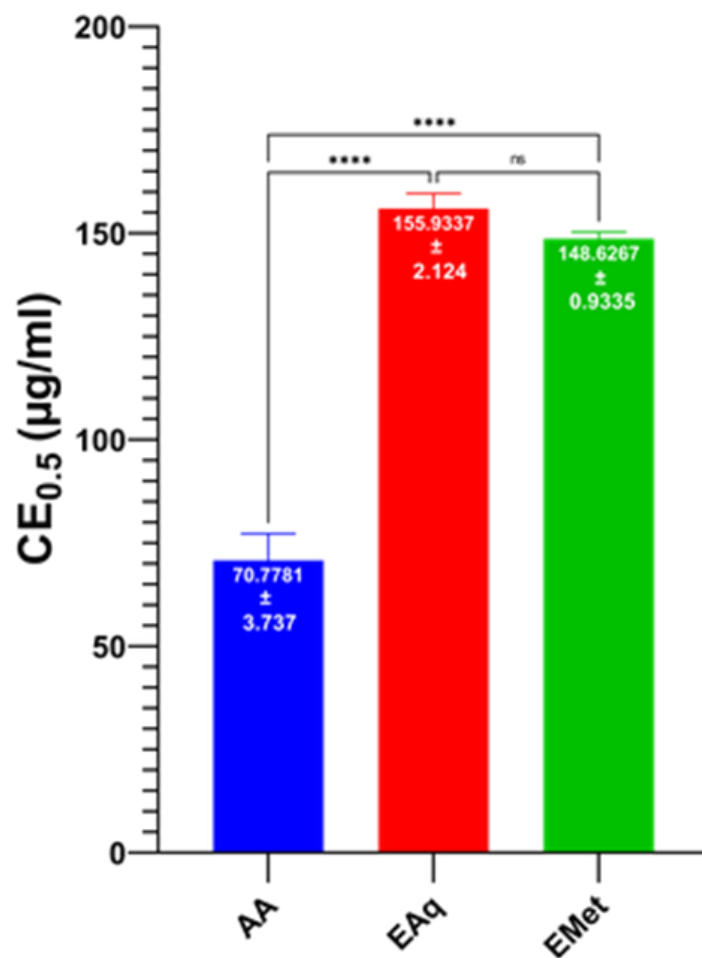


Figure 20 : Histogramme des EC50 des extraits et de l'acide ascorbique.

Tableau V : Pouvoir antioxydant total des deux extraits et d'acide ascorbique.

Extrait	Teneurs (µg EAA/mg E)
Méthanolique	70.77 ± 3.73
Aqueux	155.93 ± 2.12
Acide ascorbique	148.62 ± 0.93

Conclusion

Beaucoup de travaux ont été menés en Algérie afin de découvrir des molécules naturelles à activité antioxydante à partir de plantes médicinales. Les extraits naturels venant des plantes comportant une variété de composés phénoliques et des flavonoïdes auxquels on confère le pouvoir antioxydant, ces molécules naturelles de nature phénolique sont très désirées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments.

La teneur totale en phénol a été ajustée selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats montrent que les extraits sont riches en composés polyphénoliques dans le même temps, les flavonoïdes et les flavonols sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ce qu'il contient une quantité considérable des flavonoïdes et important de flavones

Dans cette étude, l'activité antioxydante d'extrait méthanolique et aqueux de *Piper cubeba* a été déterminé par deux méthodes : le test de réduction de radical libre DPPH et le test de pouvoir réducteur de fer (FRAP). Les résultats ont montré que les deux extraits aqueux et méthanolique possèdent une activité antioxydante et antiradicalaire importante, grâce à leur constituants (composés polyphénolique), Pour le premier et le deuxième test les aboutissements ont montré que l'activité antioxydante est élevée dans l'extrait méthanolique, par contre elle est peu élevée pour l'extrait aqueux.

Ces résultats consolident le maniement de cette espèce en médecine traditionnelle en accordant à la médecine occidentale un potentiel qui peut être valorisé dans différents domaines comme les industries pharmacologiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ABDUL-JALIL, T. Z., et NASSER, Z. A. (2020).** *Piper cubeba*: phytochemical and pharmacological review of a routinely used spices. International Journal of Pharmaceutical Research, (1). p. 761-768.
- Aganga, A. A. & Mosase, K.W. (2001).** Tanins contenent, nutritive value and dry matter of Lonchocars capussa, Ziziphus mucropata, Sclerocarya birrea, Kiria acuminata and rhuslanca seeds. Animal Feed Science and technologie. 91: 107-113p.
- Ahmad, W., Hasan, A., Abdullah, A., Tarannum, T., & Zeenat, F. (2012).** An appraisal of Medicinal properties of Kabab Chini (*Piper cubeba*). Unimed Kulliyal, 2, 13-18.
- Ahsan H, Ali A and Ali R (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. Clinical and Experimental Immunology, 131, 398-404.
- Akrayi HFS. (2012).** Effect of some plant extracts on isolated bacteria from eyelids of natural eye liner users and eye cosmetics users. Journal of Applied Pharmaceutical Science.; 2(11): 003-008
- Alam, A., Ahmed, S., Husain, S., Bano, H., Ahmed, Z., & Azeez, A. (2013).** Kabab chini (*Piper cubeba*) & Its Healing Corollary in Unani Medicine: An Overview. *AJPHR 2013; 1 (6): 1, 9.*
- Alam, M. A., Ahmed, S., Husain, S., Bano, H., and Ahmed, Z. (2013).** Kabab Chini (*Piper cubeba*) and Its Healing Corollaryin Unani Medicine: An overview. *American Journal of Pharmacy and Gealth Research*, 1(6): 1-9.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008).** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food research international, 41(1), 1-15.
- Al-Iraqi RA and Abdulla HI. (2012).** The biology of flour rust red beetle on some spices. The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 43(3), 106-112.
- Al-Tememy TMK. (2013).** Antibacterial activity of *Piper cubeba* Linn fruit extracts against selected bacterial pathogens in Basrah city. Bas.J.Vet.Res; 12(1): 142-151.
- AlSaid, M., Mothana, R., Raish, M., Al-Sohaibani, M., Al-Yahya, M., Ahmad, A., ... Rafatullah, S. (2015).** Evaluation of the Effectiveness of *Piper cubeba* Extract in the Amelioration of CCl4-Induced Liver Injuries and Oxidative Damage in the Rodent Model. BioMed Research International, 2015, 1–11.

- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A. (2005).** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (MOSC)*, 70, 200-14. **Ann, Z. F., & Rukayadi, Y. (2019).** Antibacterial activity of ethanolic *Piper cubeba* L. extract against *Escherichia coli* and its effect on microbiological quality of raw chicken meat during storage. *International Food Research Journal*, 26(3), 933-944.
- AREF, M., & HEDED, M. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf).
- Aruoma O I (1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific. Journal of Clinical Nutrition*, 8 (1), 53-63.
- Ashok Muchandi, Shashikant Dhawale (2018).** A review on *Piper cubeba* L: A potential medicinal plant *Current Research. Journal of Pharmaceutical and Allied Sciences*, Vol. 2, 1-4.
- Badheka, L. P., Prabhu, B. R., and Mulchandani, N. B. (1986).** Dibenzylbutyrolactone lignin from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, 25: 487-489.
- Badheka, L. P., Prabhu, B. R., and Mulchandani, N. B. (1987).** Lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, 26: 2033-2036.
- Bahorun T., Gressier B., Troitin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, 46 :1086-1089.
- Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle, Food and Agricultural Research council Mauritius, 83-94.
- Barch, D., Barve, N., Gupta, K., Chandra, S., Jain, N., Tiwari, S., Leon-Sicairos, N., Canizalez-Roman, A., Rodrigues dosSantos, A., and Hassan, S. S. (2013).** Exoproteome and secretome derived broad spectrum novel drug and vaccine candidates in *Vibrio cholera* targeted by *Piper betel* derived compounds. *PLOS One*, 8: e52773.
- Benslama, A., Harrar, A. (2016).** Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian Sahara medicinal plants extracts. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(6), 158-161.
- Benslama, A., Harrar, A., Gul, F., & Demirtas, I. (2017).** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Zizyphus lotus* L. leaves extracts. *The natural products journal*, 7(4), 316-322.

- Bentes de Souza AM, Wang CC, Chu CY, Briton-Jones CM, Haines CJ & Rogers MS. (2004).** In vitro exposure to carbon dioxide induces oxidative stress in human peritoneal mesothelial cells. *Hum Reprod* 19, 1281-1286.
- Bharathi, R. P. and Newand, B. M. (1985).** Lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, 24(2): 329-331.
- Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2008.** Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585: 325-337.
- Bos, R., Woerdenbag, H. J., Kayser, O., Quax, W. J., Ruslan, K., and Elfami. (2007).** Essential oil constituents of *Piper cubeba* L. fil. from Indonesia. *J. Essent. Oil Res.*, 19: 14-17.
- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bordat A.G., Douk T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, 383(6), p. 93.
- Chitnis, R., Abichandani, M., Nigman, P., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2007).** Actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Piper cubeba* (Piperaceae). *Ars Pharm* , 48 (4), 343-350.
- CHOI, Eun-Mi et HWANG, Jae-Kwan. (2003).** Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 89, no 1, p. 171-175.
- Cohen J H, Kristal A R and Stanford J L (2000).** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- Collard J. 2014.** Stress oxydant. (WWW. Labocollard .be J. Collard: Stress oxydant 2014).
- DEBYDUPONT, G., DEBY, C. AND LAMY, M. (2002).** Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène : Current data on the toxicity of oxygen. *Réanimation*, 11(1), pp.28-39.
- Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008).** Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanius* at different phenological stages. *Food Chemistry*. 110: 927-931p.
- Evans W J (2000).** Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 647-652.

- Favier A., 2003.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique, novembre-décembre, pp : 108-115.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108(10), 863-832.
- Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. 64, 390- 396.
- Finaud J, Lac G & Filaire. (2006).** Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med. 36, 327-358.
- Finaud J, Lac G & Filaire. (2006).** Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med. 36, 327-358.
- Fiorucci, S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoides : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat. Nice. 211p.
- GANZ, Chrischta. Heilpflanze des Jahres 2016: Kubeben-Pfeffer (*Piper cubeba*).** Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin/Swiss Journal of Integrative Medicine, 2016, vol. 28, no 1, p. 20-22.
- Gilçin I, 2011.**Antioxidant activity of food constituents an overview. Arch Toxicol 1-50p.
- Grupiv's Blog. (2016).** Método DPPH. [online] Available at: <https://grupiv.wordpress.com/2009/11/03/metodo-dpph>.
- Halliwell B., 1995.** Antioxidant characterization, methodology and mechanism Biochem Pharmacol :49: 1341-8.
- Houston M.C. (2007).** The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. Altern Ther Health Med 13 : S128-133.
- Hu Y, Block G, Norkus EP, Morrow JD, Dietrich M & Hudes M. (2006).** Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. Am J Clin Nutr. 84: 70-76.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856. DOI 10.1021/jf030723c.
- Jensen, S., Hansen, J., and Boll, P. M. (1993).** Lignans and neolignans from Piperaceae (Review). *Phytochemistry*, 33: 523-530.
- Khan Azam. Asma ul Advia, 2002,** Aligarh Muslim University, Press, 199.

- Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165-177.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Köhler, F. E. (1887).** Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America (Vol. 1). FE Köhler.
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. (2004).** and Vladimir-Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm.*; 54: 65-72.
- Koul, J. L., Koul, S. K., Taneja, S. C., and Dhar, K. L. (1996).** Oxygenated cyclohexanes from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, 41: 1097-1099.
- Kumar R.S., Narasingappa R.B., Joshi C.G., Girish T.K., Prasada Rao U.J., Danagoudar A. (2017).** Evaluation of *Cassia tora* Linn. against Oxidative Stress-induced DNA and Cell Membrane Damage/*J Pharm Bioallied Sci*, 9(1):33-43. Doi: 10.4103/0975-7406.206215.
- Laguerre M., Lecomte J., & Villeneuve P., 2007.** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–282.
- Lee J, Koo N and Min D B (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.
- Lim, T. K. (2012).** *Piper cubeba*. In *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* (pp. 311-321).
- Maazoun A.M., Belhadj F., Jemâa J.B. & Marzouki M.N. (2018).** Assessment of antioxidant potential and α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Urginea maritima* (L.) Baker bulbs. *J Mater Environ Sci*. 9(12): 3197-3205.

- Meziti, H. (2008).** Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L. Thèse de magistère. Département de Biologie. Université de FERHAT Abbas (Setif).
- Miliauskas, G., Vensutonis, P.R., & Van Beek, T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chemistry*, 85: 231-237.
- Møller, P., Wallin, H., & Knudsen, L. E. (1996).** Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions*, 102(1), 17–36.
- Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goll L., Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cerebral: les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate, Implications sur la survie neuronale, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 :502-509.
- NAHAK, Gayatri et SAHU, R. K. (2011).** Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 1, no 8, p. 153-157.
- NIRMALA NITHYA R, & SAI NANDHINI R. (2019).** SCREENING AND EVALUATION OF SECONDARY METABOLITES PRESENT IN *PIPER CUBEBA*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol.12, 81–83.
- Okafor, O. T. (2015).** Establishing A Method for The Mass Propagation of *Piper Guineense* (Schumach) Via Tissue Culture (Doctoral dissertation).
- Pachpute, A. P. and Tushar, A. (2012). Deshmukh. *International Journal of Pharma World Research*, 3(4): 1-12.
- Packer L and Weber S U (2001).** The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. In: Kramer K, Hoppe P P and Packer L. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York (Marcel Dekker), pp: 27-43.
- Parmar, V. S., et al. (1997).** Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597-673.
- Pedneault, K., Léonhart, S., Angers, P., Gosselin, A., Ramputh, A., Arnason, J.T. & DoraisM. (2001).** Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence. 5ième colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Université Laval. Canada. 2p.

- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233-239.
- Prabhu, B. R. and Mulchandani. (1985).** Lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, 24(2): 329-331.
- Qazi Zaid Ahmad, Aziz Ur Rahman and Tajuddin, 2017.** ETHNOBOTANY AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF KABAB CHINI (*PIPER CUBEBA*). *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, Vol 6 (8), 2418-2436.
- Que, F., L. Mao and X. Pan, (2006).** Antioxidant activities of five chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, 39(5): 581-587.
- Rezende, A. A. A. D. (2012).** Estudo comparativo dos efeitos moduladores da (-)-cubebina sobre a mutagenicidade/recombinogenicidade induzida por diferentes agentes químicos.
- Ribèreau-Gayon J, Peynaud m, Ribèreau-Gayon P and Sudraud P. (1972).** Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.
- Sayre, L., Smith, M., & Perry, G. (2001).** Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 721–738.
- Singh MMM and Bhatnagar S. (2019).** Concept and significance of use of spices as per Ayurveda. *IJHSR.*; 9(4):250-254
- Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M. (1999).** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.*;152-177.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005–L1028.
- Usia, T., Watabe, T., Kadota, S., and Tezuka, Y. (2005).** Potent cyp3A4 inhibitory constituents of *Piper cubeba*. *Journal of Natural Products*, 68: 64-68.
- Valko M, Morris H & Cronin MT. (2005).** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12,1161-1208.
- Wang L., Yen JH., Liang HL., Wu1 MJ. (2003).** Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of Food and Drug Analysis* 1, 60-66.
- Wu, Q., Wang, S., Tu, G., Feng, Y., and Yang, J. (1997).** Alkaloids from *Piper puberulum*. *Phytochemistry*, 44: 727-730.

Yaffe, Paul B., Doucette, Carolyn D., Walsh, Mark, et al. (2013), Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. *Experimental and molecular pathology*, vol. 94, no 1, p. 109-114.

Zahin, M., Khan, M. S., Abul Qais, F., Abulreesh, H. H., & Ahmad, I. (2018). Antioxidant properties and anti-mutagenic potential of *Piper cubeba* fruit extract and molecular docking of certain bioactive compounds. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(3), 358–367.

Zou, Y., Qian, Z. J., Li, Y., Kim, M. M., Lee, S. H., & Kim, S. K. (2008). Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7001-7009.