

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة محمد بوضياف/المسيلة  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF DE M'SILA



FACULTEDES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE

MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE  
FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES  
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUÉE

Présenté par

**ABDELLI Safa**  
**RAHALI Meryem**  
**ZIDANE Imane**

Thème :

**Activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta***

DEVANT LE JURY :

**Mr. KHERBACHE Abdallah**  
**Mr. SELLOUM Mounir**  
**Mme. BOUAZIZ Samia**  
**Mr. FREIDJA Mohamed Lamine**

**Encadreur**  
**Président**  
**Examinatrice**  
**Examinateur**

*Promotion : 2019-2020*



## REMERCIEMENTS

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier d'abord **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à **Mr. KHERBACHE Abdallah**, notre directeur de recherche, qui a bien voulu accepter de diriger ce mémoire.

Nous avons énormément apprécié travailler avec vous durant notre cursus. Veuillez accepter, monsieur, notre très profonde reconnaissance et l'assurance de nos sentiments les plus distingués.

Nous remercions chaleureusement les membres du jury, **Mr. SELLOUM Mounir, Mme.**

**BOUAZIZ Samia et Mr. FREIDJA Mohamed Lamine**, Vous nous faites un grand honneur d'avoir accepté d'être le jury de notre soutenance, tout en remerciant vivement les responsables et le personnel du laboratoire de recherche des sciences de la nature et de la vie à l'université de Sétif, plus précisément, à **Mme. KADA Seoussen**, pour son aide et son soutien.

Nos sincères gratitudee à tous nos chers enseignants, tout le corps professoral et l'équipe scientifique et pédagogique du laboratoire de biochimie pour la qualité de leur enseignement, leurs conseils et leur intérêt incontestable qu'ils portent à tous les étudiants.



## Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce d'**Allah** que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie

### **A ma très chère mère**

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

### **A mon très cher père**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

### **A mes frères**

**Soheyb ; Khaled ; Oussama ; choaib ; Mohamed.**

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

### **A mes chères ami(e)s**

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

*Imane*

## **Dédicaces**

C'est avec l'aide et la grâce d'**Allah** que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie

### **A ma très chère mère**

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

### **A mon très cher père**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

### **A mon frère et mes sœurs**

**Aymen ; Asma ; Chaima**

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

### **A mes chères ami(e)s**

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

*Meryem*

## **Dédicaces**

C'est avec l'aide et la grâce d'**Allah** que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie

### **A ma très chère mère**

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse **ALLAH** le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

### **A mon très cher père**

De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de tous vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse **ALLAH** vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

### **A mes frères et sœurs**

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

### **A mes chères ami(e)s**

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

## 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  $144.68 \pm 10.87 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $32.78 \pm 2.06 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de DPPH, de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test du pouvoir réducteur. En comparaison avec l'antioxydant de synthèse (BHT), les deux extraits ont exhibé une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH avec des  $\text{IC}_{50}$  de  $19.54 \pm 1.60$  et de  $42.14 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$  pour l'E.Met et l'E.Aq respectivement. Ces extraits ont inhibé la peroxydation couplée de l'acide linoléique/ $\beta$ -carotène à 61% et 66% respectivement. De plus, les deux extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant. 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.

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  $144.68 \pm 10.87$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $32.78 \pm 2.06$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستعمال كل من اختبار جذر DPPH، تبيض بيتا كاروتين وكذلك اختبار القدرة على الارجاع. بينت المقارنة بمضاد الأكسدة المرجعي (BHT) أن المستخلص المائي والميثانولي أبديا قدرة عالية لإزاحة جذر DPPH بقيم  $IC_{50}$  تقدر ب  $1.60 \pm 19.54$  و  $0.57 \pm 42.14$  ميكروغرام/مل على التوالي. كما ثبت المستخلص المائي والميثانولي أكسدة بيتا كاروتين بقيم 66% و 61% على التوالي. إضافة على ذلك يملك المستخلصان قدرة مرجعة جيدة متعلقة بالتركيز. كخلاصة، فإن المستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta* لهما خصائص مضادة للأكسدة راجعة لاحتوائهما على مركبات فينولية والتي يمكن استعمالها في الصناعات الغذائية والدوائية.

الكلمات المفتاحية: *Asperula hirsuta*، الاجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، عديدات الفينول، المستخلصات النباتية.

## 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  $144.68 \pm 10.87 \mu\text{g GAE/mg}$  of extract and  $32.78 \pm 2.06 \mu\text{g QE/mg}$  of extract, respectively. The antioxidant activity of the two extracts was evaluated using DPPH radical,  $\beta$ -carotene bleaching and reducing power tests. Compared to the synthetic antioxidant (BHT), both extracts exhibited high antiradical activity against the free radical DPPH, with  $\text{IC}_{50}$  of  $19.54 \pm 1.60$  and  $42.14 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$  for Met.E and Aq.E respectively. These extracts inhibited the linoleic acid/ $\beta$ -carotene coupled peroxidation with 61% and 66% respectively. Besides, both extracts showed a strong concentration dependent reducing power. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* have antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds that can be exploited in the food and pharmaceutical industry.

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

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AU** : Acide urique

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

**CAT** : Catalase

**DPPH** : 2,2'-diphényle-1-picryl hydroxyle

**E.Aq** : Extrait aqueux

**E.Met** : Extrait méthanolique

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSG** : Glutathion oxydé

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**RLs** : Radicaux libres

**ROS** : Espèces réactives oxygénées

**SOD** : Superoxyde dismutase

**UV** : Ultra-violet

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène.

**Figure 2.** Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols.

**Figure 3.** Aspect morphologique d'*Asperula hirsuta*

**Figure 4.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

**Figure 5.** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

**Figure 6.** Activité antiradicalaire d'extrait méthanolique et d'extrait aqueux d'*Asperula hirsuta* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH.

**Figure 7.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en présence et en absence de l'extrait aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* et du BHT.

**Figure 8.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique de l'extrait aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* et du BHT.

**Figure 9.** Pouvoir réducteur d'extrait méthanolique et d'extrait aqueux d'*Asperula hirsuta* et du BHT.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Différents types des espèces réactives.

**Tableau 2.** Pathologies résultent de stress oxydatif.

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

**Tableau 4.** Valeurs des IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et PAR des extraits d'*A. hirsuta* et du BHT (Effet piègeur du radical libre DPPH).

**Tableau 5.** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*A. hirsuta* et du BHT (Pouvoir réducteur).

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>I. STRESS OXYDANT .....</b>	<b>3</b>
I.1. Radicaux libres .....	3
I.2. Formes des radicaux libres .....	3
I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	3
I.2.2. Espèces réactives de l'azote.....	3
I.3. Sources des radicaux libres .....	4
I.4. Oxydation des macromolécules.....	4
I.4.1. Peroxydation lipidique .....	4
I.4.2. Oxydation de l'ADN.....	5
I.4.3. Oxydation de protéines .....	6
I.5. Effets pathologiques du stress oxydant .....	6
<b>II. ANTIOXYDANTS.....</b>	<b>7</b>
II.1. Antioxydants enzymatiques .....	7
II.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) .....	7
II.1.2. Catalase (CAT).....	7
II.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) .....	8
II.2. Antioxydants non enzymatiques .....	8
II.2.1. Antioxydants non enzymatiques d'origine endogène.....	8
II.2.2. Antioxydants non enzymatiques d'origine exogène.....	9
<b>III. LA PLANTE <i>ASPERULA HIRSUTA</i> (DESF.).....</b>	<b>11</b>
III.1. Description et classification botanique .....	11
III.2. Phytochimie .....	12
III.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques .....	12

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>14</b>
<b>I. Matériel.....</b>	<b>14</b>
I.1. Matériel végétal .....	14
I.2. Produits et réactifs .....	14

<b>II. Méthodes .....</b>	<b>14</b>
II.1. Préparation de l'extrait aqueux .....	14
II.2. Préparation de l'extrait méthanolique .....	14
II.3. Dosage des polyphénols totaux .....	15
II.4. Dosage des flavonoïdes .....	15
II.5. Activité antioxydante des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	15
II.5.1. Effet piègeur du radical libre DPPH* .....	15
II.5.2. Blanchiment du $\beta$ -carotène .....	17
II.5.3. Pouvoir réducteur .....	18
II.6. Analyses statistiques .....	18
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>20</b>
<b>I. RESULTATS.....</b>	<b>20</b>
I.1. Préparation des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	20
I.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes .....	20
I.3. Activité antioxydante des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	20
I.3.1. Effet piègeur du radical DPPH .....	20
I.3.2. Effet sur le blanchiment du $\beta$ -carotène .....	22
I.3.3. Pouvoir réducteur.....	22
<b>II. DISCUSSION.....</b>	<b>25</b>
II.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes .....	25
II.2. Activités antioxydantes .....	27
II.2.1. Activité anti-radicalaire .....	27
II.2.2. Effet sur le blanchiment de la $\beta$ -carotène .....	27
II.2.3. Activité réductrice .....	28
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>31</b>

# INTRODUCTION

### INTRODUCTION

La médecine traditionnelle est toujours reconnue comme le système de soins de santé primaire préféré dans de nombreuses communautés, avec plus de 60% de la population mondiale et environ 80% dans les pays en développement dépendant directement des plantes médicinales à des fins médicales. Cela est dû à un certain nombre de raisons, notamment la disponibilité, l'accessibilité et le faible coût. Cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable, et c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales.

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué 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. Ces dommages sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et les acides nucléiques, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules.

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules antioxydantes et/ou thérapeutiques originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication. Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à évaluer l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*.

Les objectifs de ce travail sont :

- Préparation des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*.
- Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits étudiés.
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits *in vitro* par les tests de DPPH, blanchissement de  $\beta$ -carotène et le test du pouvoir réducteur.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Stress oxydant

Le stress oxydant est le terme se rapportant aux perturbations de l'équilibre entre la formation d'espèces réactives de l'oxygène et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes antioxydants. Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines), conduisant à l'apparition des diverses maladies humaines (Baudin, 2020).

### I.1. Radicaux libres

Les radicaux libres (RLs) sont des molécules présentant une instabilité et une réactivité élevées en raison de la présence d'un nombre impair d'électrons dans l'orbite la plus externe de leurs atomes (**Tableau 1**), qui réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité (Rios-Arrabal *et al.*, 2013). Dans la physiologie de l'organisme, les RLs possèdent des rôles importants dans la signalisation, la migration et la différenciation cellulaire, mais à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort cellulaire et l'apoptose (Ziech *et al.*, 2010).

### I.2. Formes des radicaux libres

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

Une espèce réactive de l'oxygène (ROS) est un radical oxygéné ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ) ou une molécule pouvant produire des radicaux libres ( $H_2O_2$ ). Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. En condition dite "physiologique", la production des ROS reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration (Panth *et al.*, 2016).

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

Le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) est issu de l'oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine. Le  $NO^{\cdot}$  peut réagir avec une grande variété de substances et de radicaux libres et conduire, par exemple après réaction avec  $H_2O_2$ , à la formation de nitrite ( $NO_2^-$ ) ou de nitrate ( $NO_3^-$ ). Le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) est formé suite à la réaction entre  $O_2^{\cdot-}$  et  $NO^{\cdot}$ . La forme protonée du radical peroxydinitrite ( $ONOOH$ ) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec  $OH^{\cdot}$  (Afkhami *et al.*, 2004).

**Tableau 1.** Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

Espèces Radicalaires		Espèces non Radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$	Oxygène singulet	$^1O_2$
Radical alkoxyde	$RO^{\bullet}$	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	$ROO^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOO^{\bullet}$

### I.3. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres formés dans le corps sont en raison de nombreux facteurs environnementaux et biologiques (**Figure 1**). Les facteurs environnementaux comprennent l'exposition aux rayons ultraviolets (UV), rayons X et rayons gamma, des radiations, le tabagisme, la pollution, l'ozone, et certains médicaments, produits chimiques ou pesticides. Les ROS produites biologiquement sont le résultat des réactions métaboliques où les espèces d'oxygène sont des intermédiaires donneurs d'électrons/accepteurs. La production des RLs est un processus naturel qui peut se produire avec ou sans l'aide des enzymes (Wang *et al.*, 2011).

La plupart des ROS sont générées dans les cellules par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les voies enzymatiques, tels que les systèmes NADPH oxydase, xanthine oxydase, cyclooxygénases, lipoxygénases, monooxygénase et cytochrome P450 sont les potentielles sources extra-mitochondriales des ROS (Al-Gubory *et al.*, 2010).

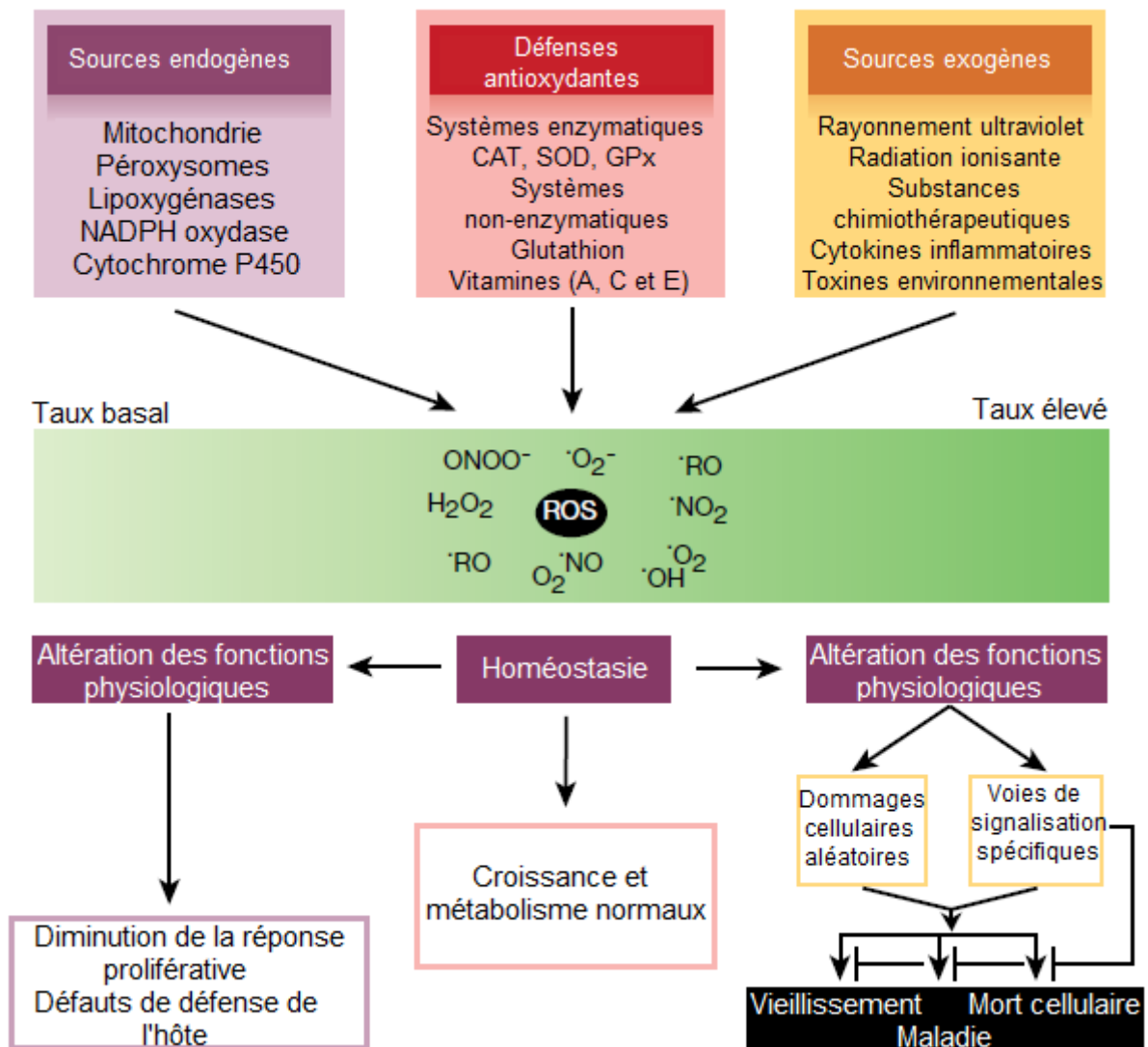
### I.4. Oxydation des macromolécules

Les lipides, les protéines et les acides nucléiques représentent les principales cibles des espèces réactives de l'oxygène.

#### I.4.1. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. L'oxydation des lipides génère des hydroperoxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes. Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques, le

malondialdéhyde (MDA) qui a une demi-vie plus longue que celle des RLs et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN. Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydroperoxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires (Cotticelli *et al.*, 2013).



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

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

Les espèces réactives, et plus particulièrement le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les ROS peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Ces modifications vont ainsi perturber la

transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagénèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (Valko *et al.*, 2006).

### **I.4.3. Oxydation de protéines**

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation peut rompre les liaisons peptidiques modifiant ainsi la chaîne protéique. Elle provoque des modifications par addition de produits issus de la peroxydation. Le dommage des protéines peut se produire par oxydation du thiol, une carbonylation, une fragmentation ou un mauvais repliement et déploiement, ce qui pourrait conduire à la perte de l'activité de la protéine (Pisoschi et Pop, 2015). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales et la formation des amas anormaux dans ou autour des cellules (Goto et Radak, 2013).

Les principaux produits de l'oxydation des protéines sont les carbonyles qui sont utilisés comme marqueurs du stress oxydant. Les acides aminés qui sont particulièrement vulnérables à l'attaque des ROS sont la proline, l'arginine, la lysine et la thréonine. L'oxydation de leurs chaînes latérales conduit à la formation de groupes carbonyle (aldéhydes et cétones) (Pisoschi et Pop, 2015).

### **I.5. Effets pathologiques du stress oxydant**

Un stress oxydatif est souvent associé à toutes sortes de maladies, mais il n'est pas toujours facile de déterminer s'il s'agit d'une cause ou une conséquence de l'état observé. Une sélection de pathologies pour lesquelles le mécanisme de stress oxydatif est bien documenté, est décrite dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2.** Pathologies résultent de stress oxydatif (Osali, 2020).

<b>Pathologies</b>	
Alzheimer	Inflammation
Cancer	Parkinson
Cardiovasculaire	Syndrome métabolique
Diabète	Arthrites rhumatoïde

## II. Antioxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Gulcin, 2020). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydrosolubles ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Boubekri, 2014).

### II.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

1. L'élimination des espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
2. L'induction de la synthèse des antioxydants.
3. L'augmentation de l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées (Pelletier *et al.*, 2004).

Parmi les principaux antioxydants enzymatiques, on cite la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GPx).

#### II.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

C'est une enzyme antioxydante endogène importante qui agit comme un composant du système de défense de première ligne contre les ROS. Elle catalyse la dismutation de deux molécules d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ), rendant ainsi l'anion superoxyde potentiellement nocif moins dangereux. La SOD est un métalloenzyme et, par conséquent, nécessite un cofacteur métallique pour son activité (Ighodaro *et al.*, 2017).

#### II.1.2. Catalase (CAT)

C'est une enzyme antioxydante commune présente presque dans tous les tissus vivants qui utilisent l'oxygène, essentiellement dans les peroxysomes. L'enzyme utilise le fer ou le manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire permettant l'élimination de celui-ci (Ighodaro *et al.*, 2017).

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

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme intracellulaire importante qui décompose les peroxydes d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau ; et les peroxydes lipidiques à leurs alcools correspondants principalement dans les mitochondries et parfois dans le cytosol. Cette enzyme joue un rôle plus crucial dans l'inhibition du processus de peroxydation lipidique et protège donc les cellules du stress oxydatif (Ighodaro *et al.*, 2017).

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

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation (exogène) ou par des composés endogènes.

### **II.2.1. Antioxydants non enzymatiques d'origine endogène**

#### **A) Glutathion (GSH)**

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes. Il peut régénérer la vitamine E et réagir avec les radicaux OH<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> directement et ainsi interrompre la chaîne d'oxydation. Il se présente alors sous la forme d'un radical GS<sup>•</sup> et se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme disulfure (GSSG). Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation (Narayanankutty *et al.*, 2019).

#### **B) Bilirubine**

C'est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger le ROO<sup>•</sup> et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Vítek, 2012).

#### **C) Acide urique**

L'acide urique (AU) est un antioxydant hydrosoluble produit de manière endogène qui est modifié à la fois par les médicaments et le régime alimentaire. L'AU représente plus de la moitié de l'activité de piégeage des radicaux libres dans le sang humain en désactivant le superoxyde et l'oxygène singulet et en protégeant l'oxydation de la vitamine C par chélation du fer. D'autres ont montré la capacité des acides ascorbiques à réparer l'urate

oxydé, ce qui met en évidence une synergie potentielle pour maintenir la capacité antioxydante par ces deux antioxydants (Bowman *et al.*, 2010).

### D) Ubiquinones

L'ubiquinone est une vitamine liposoluble, un cofacteur essentiel dans la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il agit comme un porteur d'électrons mobiles, en transférant les électrons du complexe I au complexe III ou du complexe II au complexe III. Il neutralise les RLs même après leur formation. Un rôle important de ce coenzyme est la régénération de la vitamine E. Ce coenzyme est présent dans toutes les cellules et les membranes et joue un rôle important dans d'autres processus de métabolisme cellulaire. (Mehta *et al.*, 2015).

## II.2.2. Antioxydants non enzymatiques d'origine exogène

### A) Vitamines C et E

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est un groupe d'antioxydants, solubles dans les lipides, trouvés dans toutes les membranes cellulaires. Elle est capable d'empêcher la peroxydation lipidique. L' $\alpha$ -tocophérol peut être régénéré lors de la réduction du radical tocophéryle par la vitamine C (Duncan *et al.*, 2017). Ce dernier c'est un antioxydant que l'on trouve chez les animaux et les plantes, mais ne peut pas être synthétisé chez l'homme, et doit être obtenu à partir de l'alimentation. Il est généralement considéré comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain. C'est un cofacteur pour beaucoup de réactions enzymatiques importantes. Il fournit la protection contre le stress oxydatif en agissant comme un boueur des ROS (Kurutas ,2016).

### B) Oligo-éléments

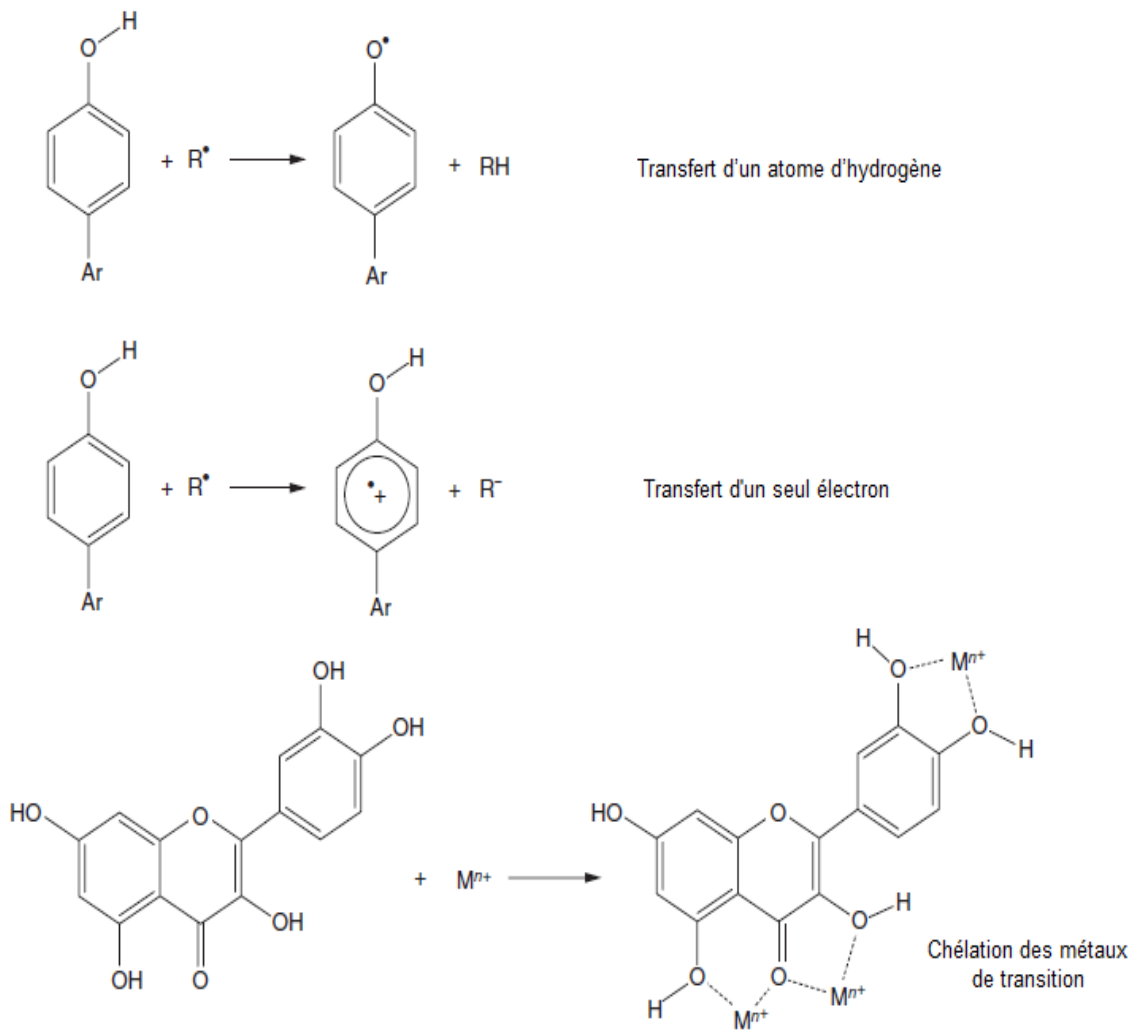
Les oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments (Cu, Zn, Mn et Se) on cite le zinc qui joue un rôle dans le système de défense d'antioxydant a été largement examiné. Car il agit comme un régulateur pour plus de 200 enzymes, c'est un cofacteur pour les SOD. Donc ce minéral protège les cellules contre des dégâts oxydatifs (Marreiro *et al.*, 2017).

### C) Polyphénols

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants, qui peuvent neutraliser les RLs en donnant un électron ou un atome d'hydrogène (**Figure 2**). Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent

réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu (Cherubim *et al.*, 2019).

La chélation des métaux de transition est un autre mécanisme antioxydant, les polyphénols peuvent inhiber la formation des ROS à travers les réactions de Haber-Weiss/Fenton, en raison de leurs propriétés de chélation des métaux (Leopoldini *et al.*, 2011).



**Figure 2.** Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols (Makris et Boskou, 2014).

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

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

*Asperula hirsuta* est une plante de la famille des Rubiacées, abondante dans l'Afrique du nord, à l'exception de l'Égypte et sa présence au Portugal est limitée à l'Algarve et au Baixo Alentejo. Cette espèce est très commune dans le Tell Algérien et toutes les régions montagneuses. Communément appelé Asperule et localement elle est appelée Fouaou. L'*Asperula hirsuta* (**Figure 3**) est une herbacée vivace multicaule de 15 à 60 cm de hauteur, à tiges dressées. Le feuillage est linéaire et sessile, disposé en verticilles de 4 à 6 (basal) et 6 à 8 (milieu et haut). Les fleurs sont groupées en inflorescences ramifiées, tétramères, à corolle hypocrateriforme, blanche ou rose (Clamote, 2017). La taxonomie d'*Asperula hirsuta* selon la flore d'Algérie est la suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Rubiales

Famille : Rubiaceae

Genre : *Asperula*

Espèce : *Asperula hirsuta* (desf.)



**Figure 3.** Aspect morphologique d'*Asperula hirsuta*

### III.2. Phytochimie

Selon les données de la littérature, l'espèce d'*A. hirsuta* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique à ce jour. Plusieurs investigations chimiques sur le genre d'*Asperula* ont révélé qu'il contient des glycosides d'iridoïdes, des glycosides de flavones et des dérivés de l'acide phénolique (Ufuk *et al.*, 2018). De plus, les coumarines glucosides et les anthraquinones ont été signalées comme les principales classes des métabolites secondaires présentés dans le genre *Asperula* (Kırmızıbekmez *et al.* 2017). Quatre composés sont identifiés comme constituants majoritaires de l'huile essentielle (linalol, bornéol, géraniol et  $\alpha$ -terpinéol) (Il'ina *et al.*, 2012).

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

L'aspérule est réputée traditionnellement avoir un intérêt 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 (Goetz et Le Jeune, 2011). Ainsi, certaines espèces d'*Asperula* sont utilisées comme diurétique, tonique, agent antidiarrhéique (Ufuk *et al.*, 2018) ; Elle est employée également pour réduire la pression artérielle et l'œdème, et pour le diabète. De plus, ce sont de riches sources d'agents antimicrobiens (Goetz et Le Jeune, 2011).

Très peu d'études ont été effectuées pour l'évaluation des activités biologiques d'*A. hirsuta*. Cependant plusieurs autres espèces du genre *Asperula* ont été largement étudiées. Par la suite ils ont déterminé leur activité thérapeutique dont l'activité anti-inflammatoire (Goetz et Le Jeune, 2011), antimicrobienne, antifongique et antihypoxique (Sergeevna *et al.*, 2015 ; Yurchenko *et al.*, 2013), mais essentiellement comme antioxydants (Ufuk *et al.*, 2018).

MATERIELS  
JET  
METHODIES

## MATERIELS ET METHODES

### I. Matériel

#### 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 la présente étude sont : Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ), chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ),  $\beta$ -carotène, acide trichloracétique (TCA), 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), acide gallique, quercétine, ferricyanide de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ], Tween 40, acide linoléique et 2,6 di-tert-butyl-4-méthyl phenol (BHT) proviennent de Sigma-Aldrich (Allemagne). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Riedel-de Haën (France). Les solvants sont de grade analytique et obtenus auprès de Sigma (Allemagne).

## 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). Brièvement, 50 g de poudre de la partie aérienne sont mis à bouillir dans 500 ml d'eau distillée pendant 20 min. Après filtration, l'extrait récupéré est soumis à une centrifugation. La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brun foncé qui est conservée à  $-32^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

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

L'extrait méthanolique d'*A. hirsuta* est préparé selon la méthode de Krimat *et al.* (2017). Une quantité de 50 g de poudre de la partie aérienne est mis à macérer dans 500 ml méthanol/eau (7:3, V/V) sous agitation pendant 24 heures, à l'ombre et à température ambiante. L'extrait récupéré par filtration est soumis à une évaporation du méthanol sous pression réduite à  $45^\circ\text{C}$  dans un rotavapeur (BÜCHI). La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brun foncé qui est conservée à  $-32^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

### II.3. Dosage des polyphénols totaux

L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Le dosage des polyphénols totaux des extraits d'*A. hirsuta* a été réalisé selon Delgado *et al.* (2019). Brièvement, un volume de 100  $\mu$ l des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 500  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min, 400  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  (7.5 %) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir pendant 2 heures à température ambiante, puis la lecture est faite à 765 nm. L'acide gallique (0-200  $\mu$ g/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en  $\mu$ g d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait) (**Figure 4**).

### II.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est évaluée selon la méthode colorimétrique de Makusa et Ningsih (2020), en utilisant comme réactif spécifique le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{+3}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait. Brièvement, 1 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'extrait à différentes concentrations préparées dans le méthanol. Le mélange est laissé réagir 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 (0-20  $\mu$ g/ml) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EQ/mg d'extrait) (**Figure 05**).

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

#### II.5.1. Effet piègeur du radical libre DPPH $\cdot$

L'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et méthanolique a été évaluée par le test de DPPH (Zabadi *et al.*, 2018). Le DPPH (diphényl picryl-hydrate) est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans le méthanol. Dans ce test les antioxydants

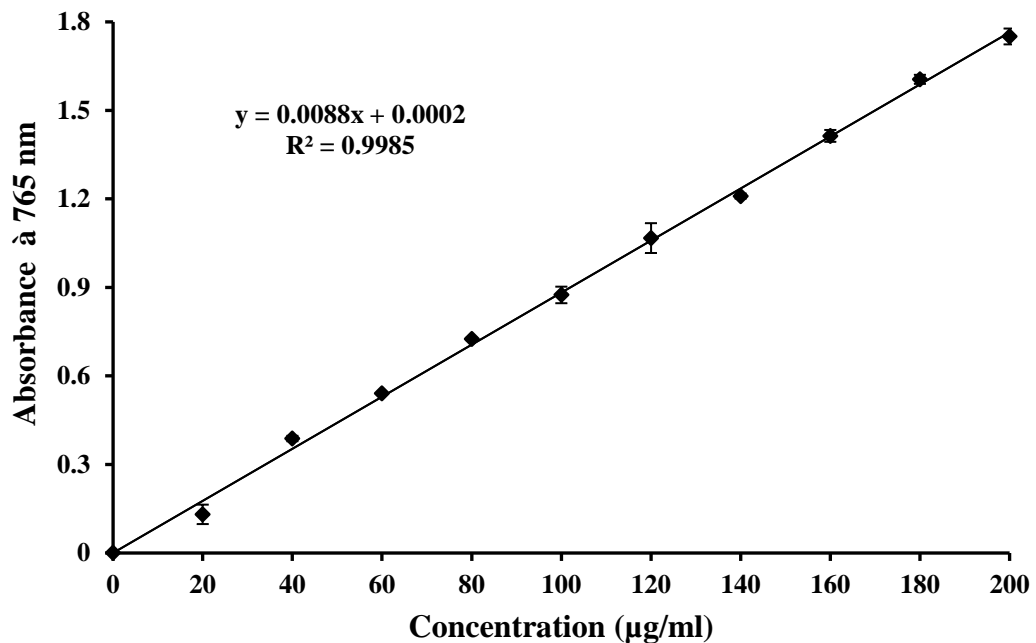
réduisent le DPPH ayant une couleur violette en diphényl picarel-hydrazine, de couleur jaunâtre dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. Pratiquement, 500 µl d'extrait à différentes concentrations (10-150 µg/ml) sont mis dans 500 µl de solution méthanolique de DPPH (0.1 mM). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution du radical DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc d'éthanol. Le BHT est utilisé comme antioxydant standard. L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

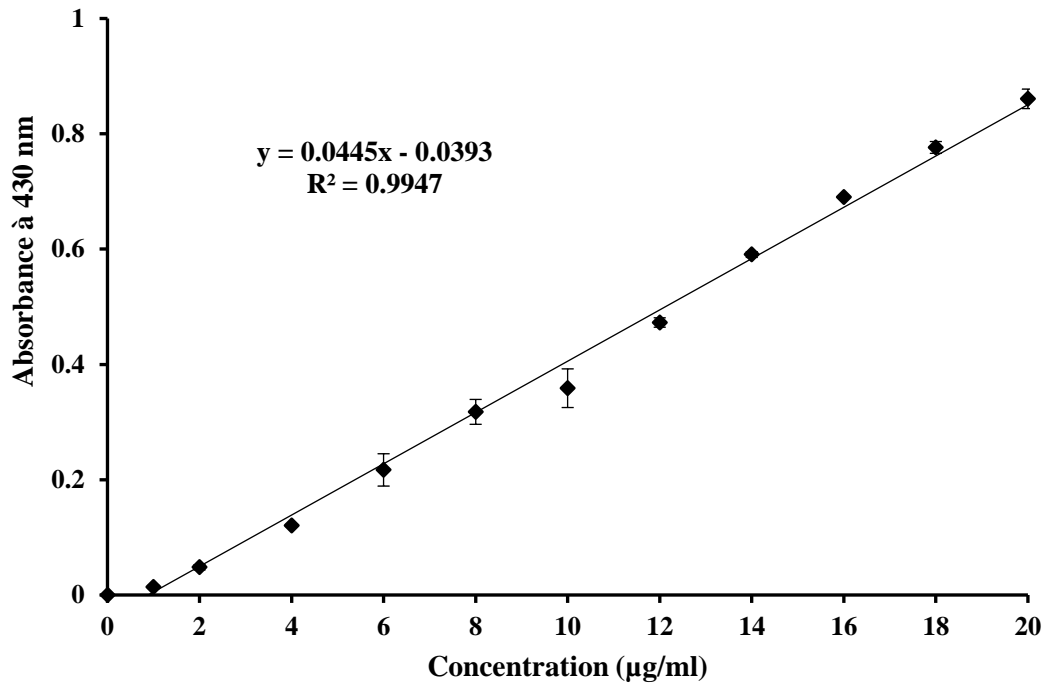
$A_C$  : absorbance du contrôle.

$A_T$  : Absorbance du test.

La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical DPPH ( $IC_{50}$ ) est déterminée.



**Figure 4.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



**Figure 5.** Courbes d'étalonnage de la quercétine.

### II.5.2. Blanchiment du $\beta$ -carotène

La capacité de prévenir le blanchiment du  $\beta$ -carotène par les extraits étudiés est déterminée selon la méthode décrite par Soltani *et al.* (2017), qui est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique. Brièvement, 1 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme est mélangée avec 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite à 45°C, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. Le milieu réactionnel contient 2.5 ml de l'émulsion de  $\beta$ -carotène/acide linoléique et 0.5 ml des solutions d'extraits (2 mg/ml) ou de l'antioxydant de référence BHT. Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation ( $t = 0$  min) et à des intervalles de 20 min jusqu'à la fin de l'expérience ( $t = 120$  min) à 490 nm. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [1 - (A_{t0} - A_{t120})_{\text{test}} / (A_{t0} - A_{t120})_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{t0}$  : absorbance au temps  $t = 0$ .

$A_{t120}$  : absorbance au temps  $t = 120$  min.

### II.5.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* est mesuré par la réduction directe de  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$  en une forme ferreuse  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$  qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe  $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]^3$  ayant une forte absorption à 700 nm (Ahmadi *et al.*, 2020). Des solutions d'extraits et d'antioxydant de référence à différentes concentrations (20-200  $\mu\text{g/ml}$ ) sont initialement mélangées avec 625  $\mu\text{l}$  du tampon phosphate (200 mM, pH 6.6) et 625  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min et laissé refroidir 15 min. Ensuite un volume de 625  $\mu\text{l}$  de TCA (10%) et un volume de 125  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  sont additionnés au mélange et la lecture de l'absorbance se fait à 700 nm. La valeur d' $\text{EC}_{50}$  est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

### II.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  et des  $\text{EC}_{50}$  sont calculées à partir de la courbe [% inhibition =  $f(\text{concentrations})$ ]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

RESULTS  
ET  
DISCUSSION

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. RESULTATS

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

La méthode de macération utilisée pour la préparation de l'extrait méthanolique donne une poudre brun foncé avec un rendement de 20.07 %. Tandis que, l'extrait aqueux préparé par décoction est aussi sous forme d'une poudre de couleur 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'*A. hirsuta*

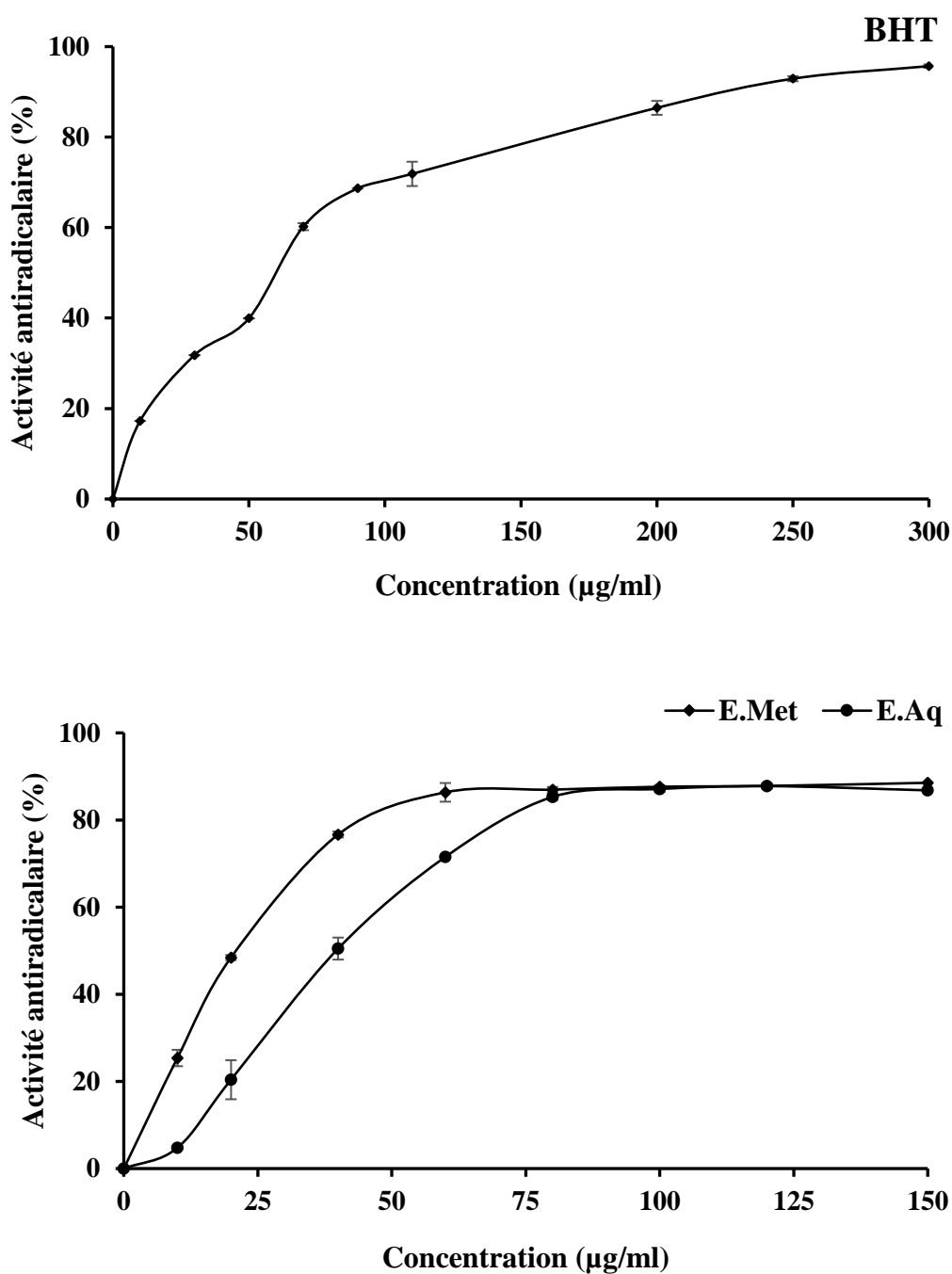
Extraits	Polyphénols ( $\mu\text{g EAG} / \text{mg d'extract}$ )	Flavonoïdes ( $\mu\text{g EQ} / \text{mg d'extract}$ )
E.Met	144.68 $\pm$ 10.87	32.78 $\pm$ 2.06
E.Aq	109.36 $\pm$ 19.41	14.77 $\pm$ 1.23

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

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

##### I.3.1. Effet piègeur du radical DPPH

Les résultats indiquent clairement que les extraits aqueux et méthanolique possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH $\cdot$ . Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les deux extraits étudiés ont une activité antiradicalaire significative ( $p < 0.05$ ) et concentration dépendante (**Figure 6**). En effet, à la concentration de 60  $\mu\text{g/ml}$ , les extraits méthanolique et aqueux montrent un effet piègeur de 86.97 % et 71.52 % respectivement. Ainsi, l'extrait méthanolique présente une  $\text{IC}_{50}$  de 19.54  $\pm$  1.60  $\mu\text{g/ml}$  qui correspond à une capacité de piégeage plus efficace par rapport à celle de l'extrait aqueux ( $\text{IC}_{50} = 42.14 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ ) suivie par le BHT ( $\text{IC}_{50} = 55.99 \pm 1.42 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figure 6.** Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux (**E.Aq**) et méthanolique (**E.Met**) d'*A. hirsuta* et du **BHT** vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Le **Tableau 4** montre les concentrations inhibitrices à 50% ( $IC_{50}$ ) des deux extraits et du **BHT**, ainsi que la concentration effective à 50% ( $EC_{50}$ ) et le pouvoir antiradicalaire (PAR).

**Tableau 4.** Valeurs des IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et PAR des extraits d'*A. hirsuta* et du BHT.

Echantillon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/µg DPPH)	PAR
<b>E.Met</b>	19.54 ± 1.60	0.25 ± 0.02	4.01 ± 0.34
<b>E.Aq</b>	42.14 ± 0.57	0.54 ± 0.01	1.85 ± 0.03
<b>BHT</b>	55.99 ± 1.42	0.72 ± 0.02	1.39 ± 0.04

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

### I.3.2. Effet sur le blanchiment du β-carotène

La **Figure 7** représente les cinétiques de blanchissement du β-carotène en présence et en absence des extraits d'*A. hirsuta* ainsi que du BHT. Les absorbances initiales des contrôles négatifs aqueux et méthanolique sont 0.627 et 0.623 atteignant, après 120 min, des valeurs minimales de 0.043 et 0.127 respectivement indiquant une peroxydation totale du β-carotène, tandis que les absorbances des extraits aqueux et méthanolique varient de 0.611 et 0.619 au temps 0 à des valeurs finales de 0.414 et 0.391 respectivement indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôles négatifs. Cependant, les absorbances du BHT restent stables tout au long des 120 minutes.

Les résultats montrent que les extraits méthanolique et aqueux exercent des effets inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique de 61 % et 66 % respectivement. Ces inhibitions sont statistiquement inférieures à celle du BHT (98 %) (**Figure 8**).

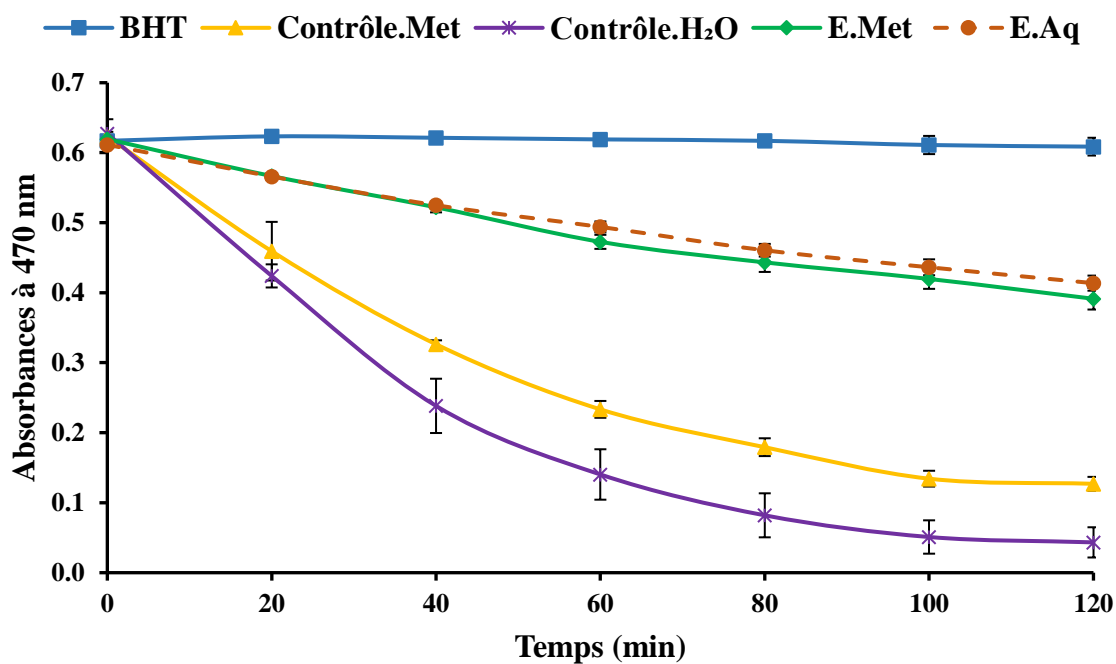
### I.3.3. Pouvoir réducteur

Les résultats montrent que les deux extraits d'*A. hirsuta* possèdent un pouvoir réducteur concentration dépendant ( $p < 0,01$ ). En effet, à la concentration de 100 µg/ml, l'extrait méthanolique a montré un pouvoir réducteur meilleur que celui de l'extrait aqueux. Le BHT montre un pouvoir réducteur maximal à 50 µg/ml (**Figure 9**). Les EC<sub>50</sub> sont représentés dans le **Tableau 5**.

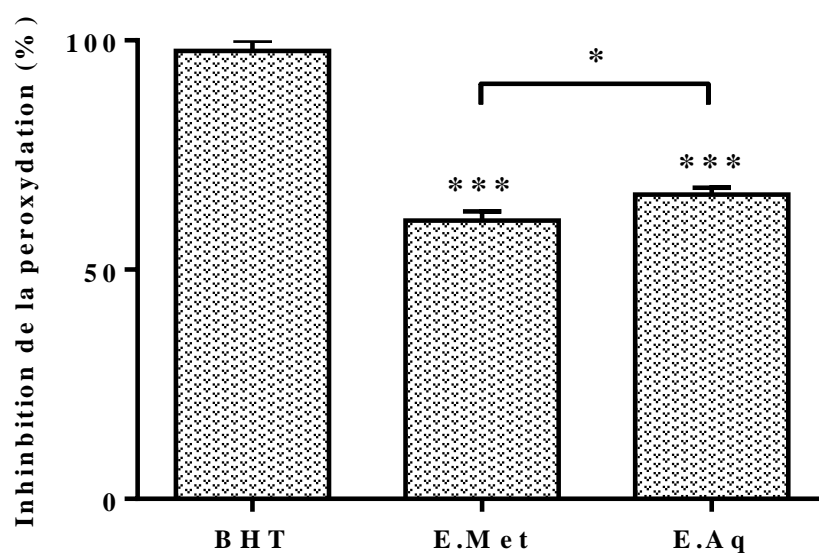
**Tableau 5.** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*A. hirsuta* et du BHT

Echantillon	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>E.Met</b>	48.45 ± 1.28
<b>E.Aq</b>	60.65 ± 3.65
<b>BHT</b>	22.79 ± 5.53

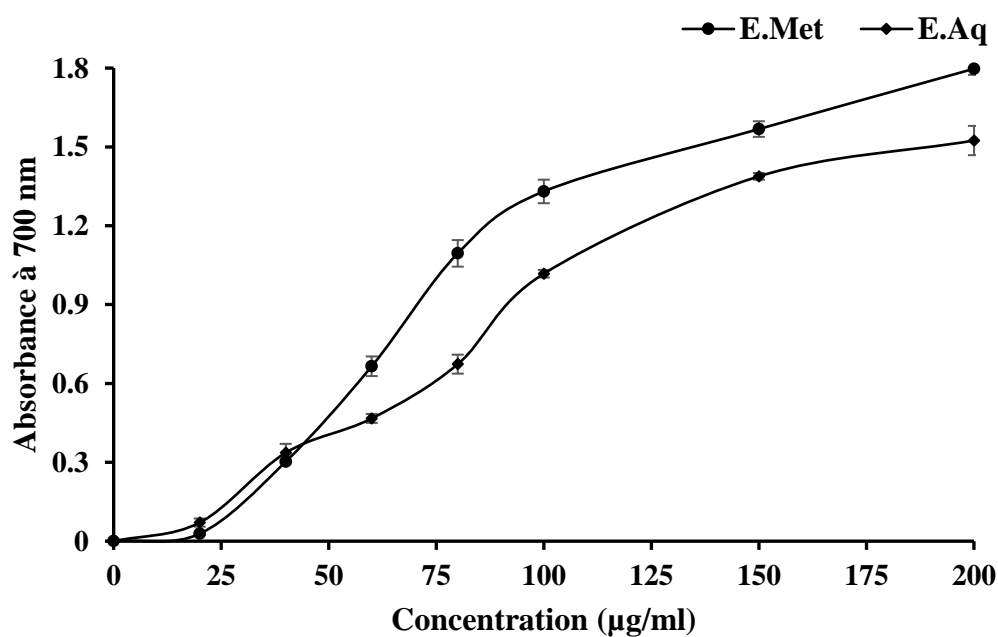
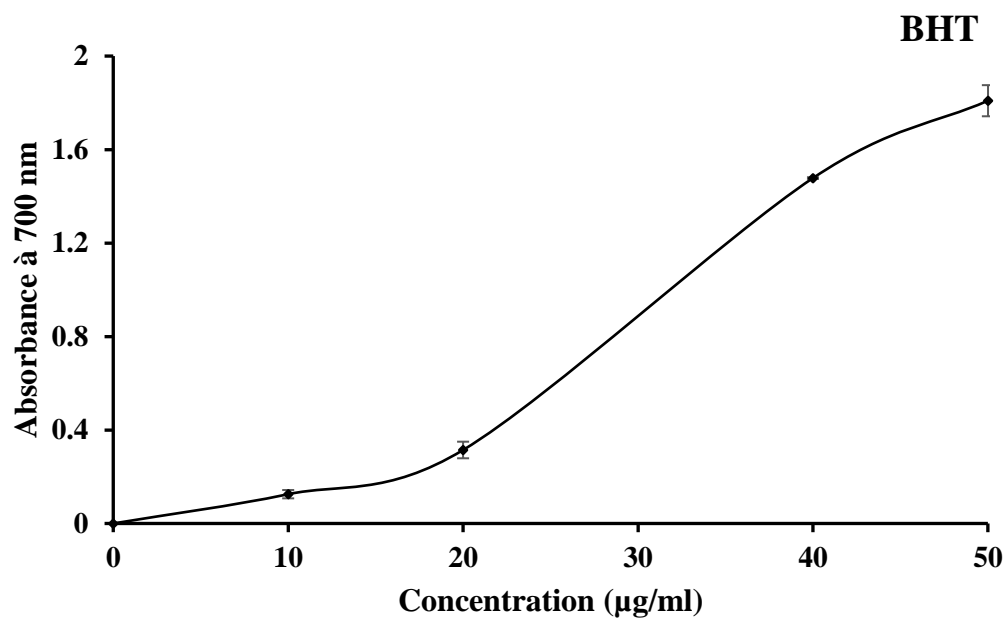
Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.



**Figure 7.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en présence et en absence de l'extrait aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) d'*A. hirsuta* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.



**Figure 8.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique de l'extrait aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) d'*A. hirsuta* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$  vs BHT.



**Figure 9.** Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux (**E.Aq**) et méthanolique (**E.Met**) d'*A. hirsuta* et du **BHT**. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

## II. DISCUSSION

Les antioxydants synthétiques et naturels sont largement utilisés dans les produits alimentaires. Cependant, certains antioxydants synthétiques montrent une activité antioxydante plus puissante que celle des antioxydants naturels, il y a une préoccupation concernant leurs effets néfastes sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse (Shahidi et Zhong, 2010).

Ce sont les raisons pour lesquelles, la recherche scientifique s'est focalisée récemment sur certain nombre de métabolites, tels que les composés phénoliques, extraits de plantes médicinales et aromatiques qui possèdent un potentiel antioxydant élevé, en raison de leurs groupes hydroxyles et protègent plus efficacement contre certaines maladies liées aux radicaux libres (Chaouche *et al.*, 2020). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante d'*A. hirsuta*.

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

L'extraction des métabolites secondaires dépend de plusieurs paramètres, dont certains sont liés au matériel végétal et d'autres sont dépendants de type d'extraction, de la nature du solvant utilisé, de la température et de la durée du processus d'extraction (Terblanche *et al.*, 2017). L'extraction par l'eau et le méthanol ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante (Barros *et al.*, 2010). Ces deux solvants ont été utilisés dans cette étude pour obtenir les extraits à partir de la partie aérienne d'*A. hirsuta*. L'utilisation de plantes sous forme de poudre rend l'extraction plus efficace, car l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant devient plus grande, la pénétration à l'intérieur des cellules est plus facile (Khoddami *et al.*, 2013).

Avant d'entamer l'extraction, la plante a été séchée à l'ombre afin d'éviter la dégradation enzymatique de certains composants comme les flavonoïdes qui se dégradent facilement en cas d'un matériel frais ou non séché. En outre, le séchage inhibe la fermentation bactérienne qui peut être une cause directe de cette dégradation. De même, le séchage de la plante à l'ombre prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et protège la plante contre les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Sarker *et al.*, 2005).

Le rendement des extraits aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* sont proches. L'utilisation des solvants alcooliques a pour but d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permettent d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Seidel, 2005). Néanmoins, l'extraction aqueuse est faite par décoction à température élevée pendant 20 min. Ce résultat est en accord avec celui de Su *et al.* (2006) qui ont rapporté que le rendement d'extraction aqueuse augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut cependant conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Cheaib *et al.*, 2018). C'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit. La localisation géographique de la plante, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales et la durée de conservation influencent également le rendement d'extraction (Gheffour *et al.*, 2015). En effet, Minareci *et al.* (2011) ont obtenu à partir des extraits méthanolique de cinq espèces endémiques du genre *Asperula* originaire de Turquie un rendement varie entre 6.08 - 9.41 %.

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été réalisé par des méthodes colorimétriques ; le Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement. Ces deux méthodes sont considérées comme les meilleures méthodes de détermination des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de plantes, car elles sont simples et reproductibles (Khadher, 2017). Les résultats montrent que l'extrait méthanolique d'*A. hirsuta* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux. Cela est attribué probablement à la différence de solubilité de ces composés dans le méthanol et l'eau. Selon Truong *et al.* (2019) une meilleure récupération de polyphénols et de flavonoïdes est obtenue avec le méthanol. Cependant, l'eau extrait particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins, tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Amamra *et al.*, 2018). Ce qui explique en grande partie la richesse des extraits hydro-méthanoliques par rapport aux extraits aqueux. Des études ultérieures ont montré que la famille des Rubiacées, est considéré comme une source importante de composés phénoliques (Wolff *et al.*, 2019 ; Sharifi-Rad *et al.*, 2016).

En plus, l'étude de Minareci *et al.* (2011) a montré des taux de flavonoïdes variant de 1.69 à 2.90 % d'extrait de cinq espèces du genre *Asperula*.

### II.2. Activités antioxydantes

Les activités antioxydantes devraient être évaluées par différentes méthodes afin de caractériser le potentiel antioxydant des principes actifs ou des extraits (Popovici *et al.*, 2009). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, plusieurs méthodes *in vitro* (test de DPPH, test du pouvoir réducteur et 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. Activité anti-radicalaire

Les résultats de cette étude montrent que les extraits d'*A. hirsuta* possèdent des effets piègeurs remarquables vis-à-vis du radical DPPH. Cette activité antiradicalaire serait probablement due aux composés phénoliques, connus par leurs activités antioxydantes (Zhang et Tsao, 2016). L'effet antioxydant des polyphénols, principalement les flavonoïdes dépend généralement de leur structure chimique et la distribution de leurs groupements hydroxyles qui sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres (Adida *et al.*, 2016).

Dans la bibliographie consultée, aucune étude sur l'activité antioxydante des extraits de l'*A. hirsuta* n'a été réalisée. En outre, très peu sont les travaux qui se sont consacrés à l'étude de l'effet antiradicalaire des espèces du même genre. Les extraits méthanoliques de cinq espèces endémiques du genre *Asperula* (*A. brevifolia*, *A. pseudochlorantha* var. *antalyensis*, *A. pseudochlorantha* var. *pseudochlorantha*, *A. purpurea* subsp. *apiculata* et *A. serotina*) possèdent un pouvoir intéressant de piéger le radical DPPH (Minareci *et al.*, 2011).

#### II.2.2. Effet sur le blanchiment de la $\beta$ -carotène

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des deux extraits est déterminé par le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence de l'acide linoléique. La peroxydation lipidique *in vivo* est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires catalysés par les radicaux libres. Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir comme modèle d'acides gras trouvés dans les membranes (Bougatet *et al.*, 2009). Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions

métalliques. Souvent, plus d'un seul mécanisme est impliqué pour avoir un effet en synergie (Moure *et al.*, 2001). Toutefois, la présence d'un antioxydant dans le milieu réactionnel pourrait soit inhiber l'oxydation de l'acide linoléique soit neutraliser les radicaux libres, ou les deux en même temps (Naidu *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus montrent que les extraits étudiés inhibent d'une manière efficace la peroxydation lipidique par rapport au contrôle négatif. Les flavonoïdes et les polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Ayala *et al.*, 2014). Ils inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce en scavengant les radicaux peroxydes, comme ils peuvent interrompre la chaîne de réactions radicalaires en donnant de l'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011). Il a été démontré aussi, que la structure et la propriété lipophile des polyphénols sont des facteurs favorisant la propriété antioxydante, 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.

### II.2.3. Activité réductrice

La présence de réducteurs dans les extraits, réduit le  $Fe^{3+}$ /complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, le  $Fe^{2+}$  peut être évalué en suivant l'augmentation de l'intensité de la couleur qui est fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Yadav *et al.*, 2012). Les extraits aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* ont montré de fortes capacités réductrices. Cette capacité pourrait être due à la présence de flavonoïdes qui sont des principaux donneurs d'électrons (Ghedadba *et al.*, 2015). Des études ultérieures 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* (Rubiacées) ont exercé un pouvoir réducteur très important.

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux, notamment les polyphénols qu'ils sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

Dans le présent travail, on a procédé en premier temps au dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*. Ensuite, l'effet antioxydant des mêmes extraits a été évalué *in vitro*.

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

Les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* possèdent un effet antioxydant remarquable. Les deux extraits étudiés ont exercé une forte inhibition du radical libre DPPH, un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais restent préliminaires et ils nécessitent d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Même des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés d'*Asperula hirsuta* qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composées accomplissent leurs rôles.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Adida, H., Baribal, N., Bechiri, A., Chekroun, E., Djaziri, R (2016).** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*, 14(4), 207-212.

**Afkhami, A., Nematollahi, D., Khalafi, L., Rafiee, M (2004).** Kinetic study of the oxidation of some catecholamines by digital simulation of cyclic voltammograms. *International Journal of Chemical Kinetics*, 37(1), 17–24.

**Ahmadi, S.M., Frahoosh, R., Sharif, A., Rezaie, M (2020).** Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. *Journal of Food Science*. 85(2), 298-305.

**Albano, S.M., Miguel, M.G (2010).** Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 338–343.

**Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A., Garrelc, C (2010).** The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(10), 1634–1650.

**Amamra, S., Charef, N., Arrar, L., Belhaddad, O., Khennouf, S., Zaim, k., Baghiani, A (2018).** Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Effects of Fruit Extracts of Algerian Ash, *Fraxinus excelsior*. *Indiana journal of pharmaceutical sciences*, 80(6), 1021-1028.

**Amessis-Ouchemoukh, N., Abou-reidah, I.M., Quirantes-Piné, R., Rodriguez-Pérez, C., Madani, K., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A (2014).** Tentative characterisation of Iridoids, phenylithanoid glucosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis*, 25 (5), 389-98.

**Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S (2014).** Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31.

**Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R (2010).** Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT- Food Science and Technology*, 43(3), 544–550.

**Baudin, B (2020).** Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue francophone des laboratoires*, 2020 (522), 22-30.

**Bokhari, J., Khan, M. R., Shabbir, M., Rashid, U., Jan, S., Zai, J. A (2013).** Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 24–29.

**Boubekri, C.H (2014).** Étude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en sciences spécialité Chimie, Université Mohamed Khider-Biskra. Faculté des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie département de Sciences de la matière.

**Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205.

**Bowman, G. L., Shannon, J., Frei, B., Kaye, J. A., Quinn, J. F (2010).** Uric Acid as a CNS Antioxidant. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(4), 1331-1336.

**Caceres, A., pinales-tabor, S.A., Ramos-medina, M.M., marroquín, M.N., Cruz, S (2020).** Alternative use of coffee beans and leaves from seven regions of Guatemala for their antioxidant activity and chemical composition. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 7(1), 5.

**Chaouche, T., Haddouchi, F., Boudjemai, O., Chellai, I (2020).** Antioxidant and hemolytic activity of *Ziziphus jujuba* Mill and *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae) extracts from Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 89, 1-14.

**Cheab, D., El Darra, N., Rajha, H., El-Ghazzawi, I., Maroun, R., Louka, N (2018).** Effect of the Extraction Process on the Biological Activity of Lyophilized Apricot Extracts Recovered from Apricot Pomace. *Antioxidants*, 7(1), 11.

**Cherubim, D.J., Martins, C.V., Fariña, L., Lucca, R.A (2019).** Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 19(1), 33-37.

**Clamote, F (2017).** Plantes: beauté et diversité. <http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2017/01/asperula-hirsuta.html>.

**Cotticelli, M.G., Crabbe, A.M., Wilson, R.B., Shchepinov, M.S (2013).** Insights into the role of oxidative stress in the pathology of *Friedreich ataxia* using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, 1(1), 398-404.

**Delgado, A. M., Issaoui, M., Chammem, N (2019).** Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *Journal of AOAC international*, 102(5), 1356-1364.

**Duncan, K., Suzuki, Y (2017).** Vitamin E Nicotinate. *Antioxidants*, 6(1), 20.

**Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M.C., Bousselsela, H., Oueld-Moukhtar, S.M (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydant et antimicrobienne des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13, 118-129.

**Gheffour, K., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z (2015).** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus*, 13, 288-294.

**Goetz, P., Le Jeune, R (2011).** *Asperula odorata L.*, Aspérule (partie aérienne de). *Phytothérapie*, 9(3), 185-188.

**Goto, S., Radak, Z (2013).** Implication of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *Journal of Sport and Health Science*, 2(2), 75-80.

**Gulcin, İ (2020).** Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651-715.

**Gutowski, M., Kowalczyk, S (2013).** A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1), 1-16.

**Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A (2017).** 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*. 54(4), 287-293.

**Il'ina, T.V., Kovaleva, A.M., Goryachaya, O.V., and Vinogradov, B.A (2012).** Essential oil of *Galium salicifolium* flowers and herb. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(1), 151-152.

**Kasmi, M., Aourach, M., El Boukari, M., Barrijal, S., Essalmani, H (2017).** Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. *Comptes Rendus Biologies*, 340(8), 386-393.

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

**Khadher, M., Bousta, D., El Hajaji, H., Lachkar, M., Barkai, H., Ibnsouda-K., Boukhchina S (2017).** Phytochemical Screening, Total Phenolics and Biological Activities of Tunisian *Peganum harmala* Seed Extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(2), 32-39.

**Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T (2013).** Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375.

**Kırmızıbekmez, H., Tiftik, K., Kúsz, N., Orban-Gyapai, O., Zomborszki, Z. P., Hohmann, J (2017).** Three New Iridoid Glycosides from the Aerial Parts of *Asperula involucrata*. *Chemistry & Biodiversity*, 14(3), e1600288.

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

**Kurutas, E.B (2016).** The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 15(71), 1-22.

- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- Makris, D.P., Boskou, D (2014).** Plant-Derived Antioxidants as Food Additives. In *Plants as a Source of Natural Antioxidants*; CABI. Oxfordshire, UK, 169-190.
- makusa, A, D., Ningsih, P (2020).** Analysis of Total Flavonoid Levels in Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata L.*) Using UV-Vis Sepctrofotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, 2(1), 11-17.
- Marreiro, D., Cruz, K., Morais, J., Beserra, J., Severo, J., de Oliveira, A (2017).** Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants*, 6(2), 24.
- Mehta, S.K., Joghi, S., Gowde, T (2015).** Members of Antioxidant Machinery and Their Functions.
- Minareci, E., Ergönül, B., Kayalar, H., Kalyoncu, F (2011).** Chemical compositions and antioxidant activities of five endemic *Aperula taxa*. *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 537-543.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez M.J., Parajo, J.C (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171.
- Naidu, M.M., Shyamala, B.N., Naik, P.J., Sulochanamma, G., Srinivas, P (2011).** Activity of husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Sci Technol*, 44 (2), 451-456.
- Narayanankutty, A., Job, J.T., Narayanankutty, V (2019).** Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Current Protein and Peptide Science*, 20(9), 907-917.
- Osali, A (2020).** Aerobic exercise and nano-curcumin supplementation improve inflammation in elderly females with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12(26).
- Özgen, U., Şener, S., Badem, M., Seçinti, H., Hatipoglu, S., Goren, A., Kazaz, C., Palaska, E (2018).** Evaluation of HPLC, phytochemical, anticholinesterase and antioxidant profiles of the aerial parts of *Asperula taurina subsp.caucasica*. *Fac. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, 42(1), 1-13.
- Panth, N., Paudel, K. R., Parajuli, K (2016).** Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Advances in Medicine*, 2016(9152732), 1-12.
- Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F (2004).** Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Edition PUQ, Nutrition artificielle de l'adulte. *Edition Springer*, 255.

- Pisoschi, A.M., Pop, A (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre. *Rev Gen Indus*, 4, 25-39.
- Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., León, J., Román-Marinetto, E., del Mar Salinas-Asensio, M., Calvente, I., Núñez, M. I (2013).** Involvement of free radicals in breast cancer. *Springer Plus*, 2(1), 404.
- Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P (2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I (2005).** Natural Product Isolation. *Humana Press (Totowa)*, 1-23.
- Seidel V (2005).** Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Eds, *Humana Press (Totowa)*, 27-37.
- Sergeevna, I.N., vasilevna, I.T., mihaylovna, K.A., leonidivna, T.E., Alek-sandrovna, K.I (2015).** The Antihypoxic and Sedative Activity of the Dry extract from *Asperula odorata L.* *Pharmacognosy Communications*, 5(4), 233-236.
- Shahidi, F., Zhong, Y (2010).** Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930-940.
- Sharifi-Rad, M., Iriti, M., sharifi-Rad, M., Gibbons, S., Sharifi-Rad, J (2016).** 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. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 39-45.
- Soltani, Y., Ali-Bouzidi, M., Toumi, F., Benyamina, A (2017).** Activités antioxydantes des extraits de trois organes de *Juniperus phoenicea L.* de l'Ouest algérien. *Phytothérapie*.
- Su, X., Duan, J., Jian, Y., Shi, J., Kakuda, Y (2006).** Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 348-353.
- Terblanche, U., Semakalu, S.C.C., Mtunzi, F., Pillay, M (2017).** Screening of variables influencing extraction yield of *Cotyledon orbiculata*: 23 full factorial design. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(3), 303-312.
- Truong, D.H., Nguyen, D. H., Ta, N.T.A., Bui, A.V., Do, T.H., Nguyen, H.C (2019).** Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 1-9.

- Ufuk, Ö., Sila, Ö., Merve, B., Hatice, S., Seda, D., Ahmet, C., Cavit, K., Erhan, P (2018).** Evaluation of HPLC, phytochemical, anticholinesterase and antioxidant profiles of the aerial parts of *Asperula taurina subsp. caucasica*. *Özgül makale*, 42(1), 1-13.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- Vítek, L (2012).** The Role of Bilirubin in Diabetes, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3(55).
- Wang, S., Melnyk, J.P., Tsao, R., Marccone, M.F (2011).** How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44(1), 14-22.
- Wolff, T., Berrueta, L.A., Valente, L.M.M., Barboza, R.S., Neris, R.L.S., Guimarães-Andrade, I.P., Assunção Miranda, I., Nascimento, A.C., Gomes, M., Gallo, B., Iriundo, C (2018).** Comprehensive characterisation of polyphenols in leaves and stems of three anti-dengue virus type-2 active Brazilian *Faramea* species (Rubiaceae) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Phytochemical Analysis*. 30(1), 62-72.
- Yadav, S.A., Raj, A.J., Sathishkumar, R (2012).** *In vitro* antioxidant activity of *Barleria noctiflora* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S716-S722.
- Yurchenko, N.S., Il-Ina, T.V., Kovaleva, A.M (2013).** Amino-Acid Composition of *Asperula odorata* Herb. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 401-402.
- Zabadi, R., Mohti, H., Moussaoui, F (2018).** Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine translationnelle*. 24 (2), 134-41.
- Zhang, H., Tsao, R (2016).** Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M.I (2010).** The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental and carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 334-339.

## 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  $144.68 \pm 10.87 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $32.78 \pm 2.06 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de DPPH, de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test du pouvoir réducteur. En comparaison avec l'antioxydant de synthèse (BHT), les deux extraits ont exhibé une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH avec des  $\text{IC}_{50}$  de  $19.54 \pm 1.60$  et de  $42.14 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$  pour l'E.Met et l'E.Aq respectivement. Ces extraits ont inhibé la peroxydation couplée de l'acide linoléique/ $\beta$ -carotène à 61% et 66% respectivement. De plus, les deux extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant. 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.

## ملخص

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 بـ  $10.87 \pm 144.68$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $2.06 \pm 32.78$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستعمال كل من اختبار جذر DPPH، تبييض بيتاكاروتين وكذلك اختبار القدرة على الارجاع. بينت المقارنة بمضاد الأكسدة المرجعي (BHT) أن المستخلص المائي والميثانولي أديا قدرة عالية لإزاحة جذر DPPH بقيم  $\text{IC}_{50}$  تقدر بـ  $19.54 \pm 1.60$  و  $42.14 \pm 0.57$  ميكروغرام/مل على التوالي. كما ثبت المستخلص المائي والميثانولي أكسدة بيتاكاروتين بقيم 66% و 61% على التوالي. إضافة على ذلك يملك المستخلصان قدرة مرجعة جيدة متعلقة بالتركيز. كخلاصة، فإن المستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Asperula hirsuta* لهما خصائص مضادة للأكسدة راجعة لاحتوائهما على مركبات فينولية والتي يمكن استعمالها في الصناعات الغذائية والدوائية.

**الكلمات المفتاحية:** *Asperula hirsuta*، الاجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، عديدات الفينول، المستخلصات النباتية.

## Abstract

The present study aims to evaluate the antioxidant power 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 aluminium, respectively. The results showed that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of  $144.68 \pm 10.87 \mu\text{g GAE/mg}$  of extract and  $32.78 \pm 2.06 \mu\text{g QE/mg}$  of extract, respectively. The antioxidant activity of the two extracts was evaluated using DPPH radical,  $\beta$ -carotene bleaching and reducing power tests. Compared to the synthetic antioxidant (BHT), both extracts exhibited high antiradical activity against the free radical DPPH, with  $\text{IC}_{50}$  of  $19.54 \pm 1.60$  and  $42.14 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$  for Met.E and Aq.E respectively. These extracts inhibited the linoleic acid/ $\beta$ -carotene coupled peroxidation with 61% and 66% respectively. Besides, both extracts showed a strong concentration-dependent reducing power. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* have antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds that can be exploited in the food and pharmaceutical industry.

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