

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE CIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & 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**

Présenté par :

AICHE Amna

BEY Donia

MECHICHE Amina

Intitulé

**Propriété anti-inflammatoire des extraits
d'*Asperula hirsuta***

Soutenu devant le jury composé de :

M ^r . KHERBACHE Abdallah	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Encadreur
M ^{me} . DEHIMI Khadidja	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Présidente
M ^{me} . BOUAZIZ Samia	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examinatrice

Année universitaire : 2021/ 2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة: الآية 31

صَلِّ عَلَى اللَّهِ الْعَظِيمِ

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce mémoire.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à Mr. KHERBACHE Abdallah, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, son attention, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordé nous a permis de réaliser ce travail.

Nous remercions chaleureusement les membres du jury, M^{me}. DEHIMI Khadija et M^{me}. BOUAZIZ Samia, Vous nous faites un grand honneur d'avoir accepté d'être le jury de notre soutenance.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mr. HARRAR Abdennassar pour sa gentillesse sans limite, ses bons conseils et ses orientations, ses qualités humains et ses encouragements constants envers nous et tous les étudiants.

Nos remerciements vont ainsi à tous les enseignants qui nous ont suivis durant notre cursus de formation.

À tous les étudiants de master de Biochimie "promotion 2022"

À tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude et nos remerciements.

En fin, nous ne serons achevées sans remercier nos chers parents qui nous ont soutenus durant tous ses années d'étude et qui nous ont encouragés sans cesse.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A Mon Père **Chaaban***

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime 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, tes consentis pour ma formation.

*A Ma Mère **Khemissa***

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

*A Ma tante **Louiza***

Pour leur amour, leur soutien. Tu représentes pour moi l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

*A mes très chères frères : **Adel, Bouaza, Fouaz, Abd Elkader**, sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie.*

*A mes très chères sœurs : **Naoual, Sara, Warda**, qui mon toujours soutenus et étaient toujours à mes cotés.*

A tous ma famille

*A Mes chères amies : **Amína et Donia***

*A mes copines : **Bessma, Farída, Fatíma, Khalissa, Khawla, Monira, Sabrina***

A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université

Amna





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A Mon Père **Miloud***

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, 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, tes Consentis pour ma formation.

*A Ma Mère **Zahra***

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

*A Ma tante **Baya***

Pour leur amour, leur soutien Tu représentes pour moi l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

*A mes très chères frères : **Abd ElOuahab, Djelol, Hossem**, sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie.*

*A mes très chères sœurs : **Monia, Monira, Fairouz**, qui mon toujours soutenus et étaient toujours à mes cotés.*

Atous ma famille.

*A mes chères amies : **Amina et Amna***

*A mes copines : **Saadia, Lobna, Iman***

Donia





اهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

والصلاة والسلام على نبينا محمد وعلى اله وصحبه اجمعين وبعد:

الحمد لله، الحمد لله، الحمد لله، اللهم لك الحمد ولك الشكر على نعمك علي التي لا تعد ولا تحصى، اللهم لك الحمد ولك الشكر على
نعمة: التوجيه، البسمة، الضحكة، الحفظ، الرعاية، التعويض، التشجيع، التيسير، التوفيق...

اهدي هذ العمل

لمن ربياني و علماني، نصحاني، وقفا معي، جاهدا و ضحيا من أجلي، مثالي و قدوتي أبي عمر وأمي مسعودة قاصري . حفظكما الله
لنا ورزقكما السعادة في الدنيا والاخرة .

إلى أخواي نبيل و خيرالدين،أختاي آسيا ولامية الذين يفرحون لفرحي ويحزنون لحزني، دائما واقفون معي، دون أن أنسى
محمدواضح زوج أختي آسيا .

إلى الناصح المرشد، الداعم والمعلم خالي عزالدين،إلى كل أعمامي وأخوالي وإلى كل أقربائي .

إلى المعلمة وهيبة بورنان على عطائها اللامحدود وكل الجهود التي تبذلها في سبيل تحفيظي وتعليمي وكذلك الأمهات على
دعواتهن، نصائحهن وتشجيعاتهن .

إلى المعلمة رزيقة بليزاك على دعمها وإرشادها وإلى كل معلمي وأساتذتي .

إلى الخالة فاطمة الزهراء فايد على دعواتها، ابتسامتها، كلماتها الطيبة و سؤالها الدائم عني .

إلى كلصديقاتي نبيلة،سعيدة عيساوى،مروة حساني شريف،شيماء مكاوي،دنيا مريخيفة،أميرة ونهادخيري و والدتهما الطيبة .

إلى زميلاتي في العمل آمنة ودنيا .

إلى كل من كان معي ولو بابتسامة .

شكرا جزيلا،أحبكم في الله

أمنية



Abstract

The objective of the present study is to evaluate the anti-inflammatory activity of aqueous (Aq.E) and methanolic (Met.E) extracts of aerial part from *Asperula hirsuta*. The contents of total polyphenols and flavonoids of the two extracts were determined using the method of Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride, respectively. The results reveal that Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of 148.20 ± 7.90 $\mu\text{g GAE/mg}$ of extract and 14.98 ± 0.16 $\mu\text{g QE/mg}$ of extract, respectively. Anti-inflammatory activity was assessed using human erythrocyte membrane stability (HRBC) assays and xylene-induced ear edema assay in mice, Compared with the synthetic anti-inflammatory diclofenac and indomethacin. The *in vitro* evaluation of anti-inflammatory activity shows that extracts have a strong inhibitory activity with a percentage inhibition of 99% at the dose 2 mg/ml and 78% at the dose 3 mg/ml respectively for the Met.E and Aq.E. The results of anti-inflammatory activity *in vivo* showed a remarkable reduction in the increase in edema volume with a percentage inhibition of 72% and 61% for Met.E and Aq.E, respectively a relatively high reduction to that obtained with indomethacin, the reference anti-inflammatory (57%). In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* possess a significant anti-inflammatory activity due to the presence of phenolic compounds which can be exploited in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: *Asperula hirsuta*, anti-inflammatory, polyphenols, flavonoids, plant extracts.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات للمستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Aspirula hirsuta*. تم التقدير الكمي لكل من متعدد الفينول والفلافونويدات باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu وثلاثي كلوريد الالومنيوم على التوالي. النتائج المتحصل عليها اظهرت ان المستخلص الميثانولي هو الاغنى بمتعدد الفينول والفلافونويدات بقيمة 7.90 ± 148.20 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و 14.98 ± 0.16 ميكروغرام مكافئ كيرستين/مع مستخلص, على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات بالاعتماد على اختبار استقرار غشاء كريات الدم الحمراء البشرية واختبار وذمة الاذن المحدث بـ Xylène عند الفئران، مقارنة مع ديكلوفيناك والاندوميتاسين على الترتيب. حيث اعطى اختبار استقرار غشاء كريات الدم الحمراء نتائج تثبت ان المستخلصان الميثانولي والمائي لهما نشاط فعال في حماية غشاء هذه الكريات ضد الانحلال بنسبة 99% بجرعة 2مغ/مل و 78% بجرعة 3مغ/مل على التوالي. من جهة أخرى اعطى العلاج عبر الفم بجرعة 200 مع/كغ من المستخلص الميثانولي و المائي تأثير مضاد لالتهاب الاذن المخفز بـ Xylène مع معدلات تثبيط تقدر بـ 72% و 61% لوذمة الاذن على التوالي. هذه النتائج أحسن من المتحصل عليها مع مضاد الالتهاب. في الختام, المستخلصين المائي والميثانولي لنبته *A. hirsuta* يمتلكان نشاطية عالية ضد الالتهاب بسبب وجود المركبات الفينولية التي يمكن استغلالها في صناعة الاغذية والادوية.

كلمات مفتاحية: *Asperula hirsuta*، مضادات الالتهاب، متعدد الفينول، فلافونويدات، مستخلصات النبتة.

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir anti-inflammatoire 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'E.Met est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de $148.20 \pm 7.90 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $14.98 \pm 0.16 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, respectivement. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en utilisant les tests de la stabilité membranaire des érythrocytes humains (HRBC) et le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris, en comparaison avec les anti-inflammatoires de synthèse (diclofénac et l'indométacine). L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire montre que les deux extraits ont une activité inhibitrice forte avec un pourcentage d'inhibition maximale de 99% à la dose 2 mg/ml et 78% à la dose 3 mg/ml respectivement pour l'E.Met et l'E.Aq. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* montrent une réduction remarquable de l'augmentation de volume d'œdème avec un pourcentage d'inhibition de 72% et 61% d'extrait méthanolique et aqueux respectivement, une réduction relativement élevée que celle obtenue avec l'indométacine, anti-inflammatoire de référence (57 %). En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* possèdent une activité anti-inflammatoire importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés : *Asperula hirsuta*, anti-inflammatoire, polyphénols, flavonoïdes, extraits de plante.

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS :Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

ANOVA: Analyse des variances

COX :Cyclooxygénase

PBS : Tampon phosphate saline

RBC: Globules rouges

SD:Ecart-type

SEM: Erreur standard de la moyenne

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réponse inflammatoire.....	5
Figure 2 :Modes d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens.....	7
Figure 3 :Aspect morphologique d' <i>Asperula hirsuta</i>	9
Figure 4 :Courbe d'étalonnage de l'acidegallique.....	13
Figure 5 :Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	14
Figure 6 :Effet de l'extrait méthanolique (E.Met) et aqueux (E.Aq) d' <i>Asperula hirsuta</i> sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique.....	19
Figure 7 :Effet des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Origines et fonctions des médiateurs inflammatoires.....	6
Tableau2. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux etméthanolique d' <i>A. hirsuta</i>	18

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Inflammation	4
I.1 Définition	4
I.2. Types de l'inflammation	4
I.2.1. Inflammation aiguë	4
I.2.2. Inflammation chronique	4
I.3. Médiateurs de l'inflammation.....	5
I.4. Implications pathologiques de l'inflammation	5
II. Anti-inflammatoires	6
II.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	6
II.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	6
II.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	7
III. La plante <i>Asperula hirsuta</i> (DESF.)	8

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES	11
I. Matériel	11
I.1. Matériel végétal	11
I.2. Animaux.....	11
I.3. Sang humain.....	11
I.4. Produits et réactifs.....	11
II. Méthodes	11
II.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	12
II.2. Préparation de l'extrait méthanolique.....	12
II.3. Dosage des polyphénols totaux	12
II.4. Dosage des flavonoïdes	13
II.5. Activité anti-inflammatoire des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i>	14
II.5.1. Stabilité membranaire des érythrocytes humains	14
II.5.2. Œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris	15
II.6. Analyses statistiques.....	16

RESULTATS ET DISCUSSION	18
I. RESULTATS	18
I.1. Préparation des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i>	18
I.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes	18
I.3. Activité anti-inflammatoire des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i>	19
I.3.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains.....	19
I.3.2. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	19
II. DISCUSSION	21
II.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	21
II.2. Activités anti-inflammatoires	23
II.2.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains	23
II.2.2.Effet anti-œdémateux.....	24
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	29

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets néfastes qui peuvent gêner leur utilisation au long cours. Dans le but de minimiser ces effets secondaires, les laboratoires développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

À travers l'histoire et les cultures, les plantes ont été utilisées pour traiter et soigner toutes sortes de maladies (Barata *et al.*, 2016). Les plantes médicinales possèdent des avantages qui permettent de leurs utilisations notamment la disponibilité, l'accessibilité, moins chère, et faible effets secondaires. Le traitement à partir des plantes médicinales a été utilisé par divers peuples, chacun selon ses connaissances héritées ou extraites d'expériences dans la vie quotidienne. Actuellement, la recherche sur les plantes médicinales est très importante pour l'amélioration de la santé humaine où les recherches autour des activités biologiques sont concentrées sur les plantes médicinales et leurs composés isolés et définis par nouvelle ou traditionnelle techniques d'extraction, séparation et identification pour trouver des substances ou molécules qui donnent des effets bénéfiques et sans ou moins effets indésirables.

L'Algérie, par sa bonne situation géographique, représente une véritable zone de diversité végétale (Ziani *et al.*, 2015), on compte approximativement 4000 espèces de plantes dont environ 300 sont considérées comme endémiques (Sadki, 2012). De plus, les algériens ont une longue connaissance sur la médecine traditionnelle et les plantes médicinales.

Dans ce contexte, l'objectif principal de notre travail est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* des extraits de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*.

Pour répondre à l'objectif fixé de ce travail, nous l'avons mené comme suit :

- Une synthèse bibliographique portant sur les différentes connaissances bibliographiques sur l'inflammation, les anti-inflammatoires et la plante étudiée.
- Dans la partie expérimentale, il s'agit de mettre au point :
 - 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 anti-inflammatoire des extraits *in vitro* par le test de stabilité membranaire des érythrocytes humains et *in vivo* par le test de l'œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris.
- La dernière partie serait consacrée aux résultats obtenus et leur discussion puis la conclusion.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Inflammation

I.1 Définition

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (Anosike *et al.*, 2012). L'objectif principal de l'inflammation est de détruire l'agent nocif et ou de minimiser ces effets néfastes. L'inflammation se décompose en deux types : inflammation à long terme dite chronique et inflammation à courte durée dite aigue (Debnath *et al.*, 2013). En général, l'inflammation est une réaction utile pour l'organisme puisque elle lui permet de se défendre contre les agressions. On parle alors de réaction inflammatoire aigue (Bourkhiss *et al.*, 2010). Mais dans certains cas, l'inflammation possède un aspect néfaste quand l'inflammation aigue se pérennise et devient chronique (Kanathip *et al.*, 2020).

I.2. Types de l'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories ces sont :

I.2.1. Inflammation aigue

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et elle se traduit par quatre symptômes cardinaux: œdème, rougeur, douleur et chaleur (Rathinam et Fitzgerald, 2016). Elle caractérisée par une vasodilatation, une exsudation de liquide et une infiltration de neutrophiles (Sherwood et Toliver-Kinsky, 2004). Les inflammations aigues guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles *et al.*, 2010). L'inflammation aigue se constitue en trois phases (**figure 1**) : une phase vasculaire caractérisée par la modification de la microcirculation locale, une phase cellulaire caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et cicatrisation qui conduit à la restauration des tissus (Weill *et al.*, 2003).

I.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aigue, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette

inflammation. L'inflammation chronique conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes (Howcroft *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014).

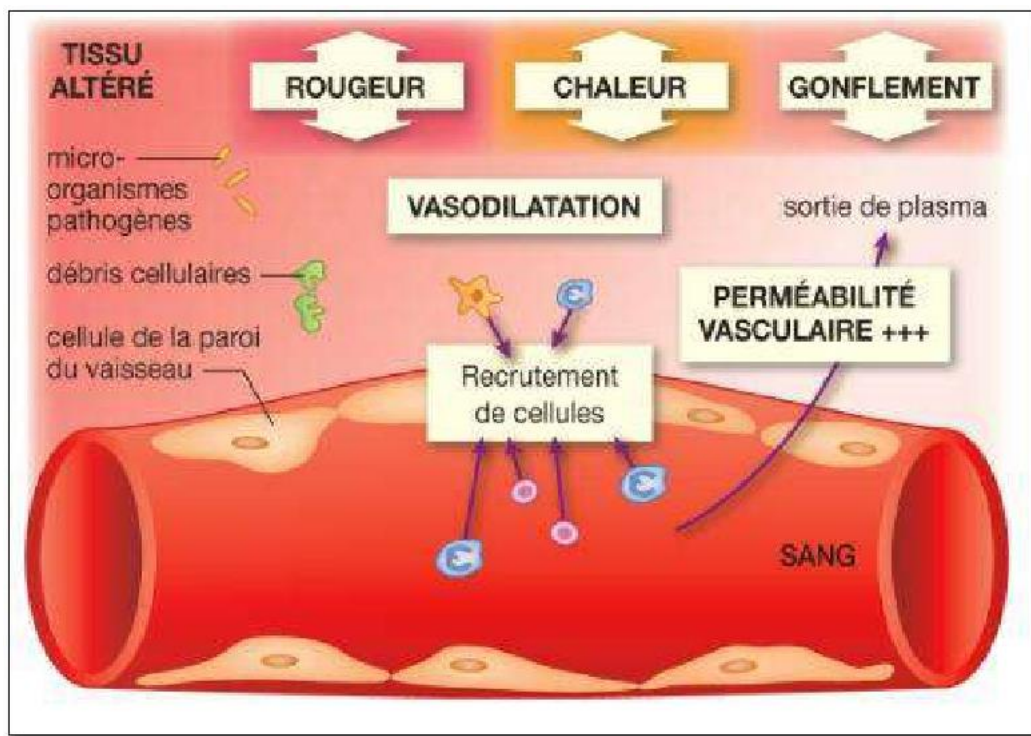


Figure 1 : Réponse inflammatoire (Kumar *et al.*, 2013).

I.3. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération des divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs sont synthétisés localement ou présent à l'état précurseur inactif dans la circulation sanguine qui affectent le développement et la résolution de l'inflammation. Le **tableau 1** résume l'origine et fonctions les plus importants de certains médiateurs de l'inflammation.

I.4. Implications pathologiques de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, l'implication de l'inflammation dans plusieurs pathologies humaines est bien évidente, elle regroupe une grande variété de maladies, telles que la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, la myopathie inflammatoire et le lupus érythémateux disséminé (Beyaert *et al.*, 2013).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Origines et fonctions des médiateurs inflammatoires (Jain *et al.*, 2015).

Médiateurs dérivés des cellules		
	Origine	Fonctions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	Dilatation des artérioles et augmentation de la perméabilité veineuse
Sérotonine	Mastocytes, plaquettes, le tractus gastro-intestinal	Vasoconstriction dans les tissus dénervés
Prostaglandines	Les tissus locaux et les vaisseaux sanguins, macrophages	Vasodilatation, perception de la douleur
Médiateurs dérivés du plasma		
Système du complément		Stimule la libération d'histamine par les mastocytes

II. Anti-inflammatoires

II.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Ces médicaments ont un effet anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique. Les effets des AINS résultent principalement de l'inhibition de la cyclooxygénase et ainsi de la synthèse des prostaglandines (Trichot et Jouzeau, 2014). Les bons effets des AINS sont cependant limités par leurs effets indésirables graves, principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux) et à moindre degré rénaux (Lahmidani *et al.*, 2012). En effet l'action des AINS s'explique essentiellement par l'inhibition non spécifique de l'activité des cyclooxygénases (COX₁ et COX₂), qui forment la voie principale de métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandine (Ouédraogo *et al.*, 2012).

II.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, également appelé corticostéroïdes sont des dérivés synthétiques des corticostéroïdes naturel, hormones secrétées par les glandes corticosurrénales. Ce sont des anti-inflammatoires largement utilisés pour supprimer les effets délétères des réponses inflammatoires (Janeway *et al.*, 2009). Ils ont néanmoins l'inconvénient de réduire la défense de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère

gastroduodéal...etc) ou chroniques tel que la prise de poids (Strehl *et al.*, 2011). Les AIS empêchent l'activation de la phospholipase A2, en bloquant à la fois la voie des prostaglandines et celles des leucotriènes (Mallem et Gogny, 2014).

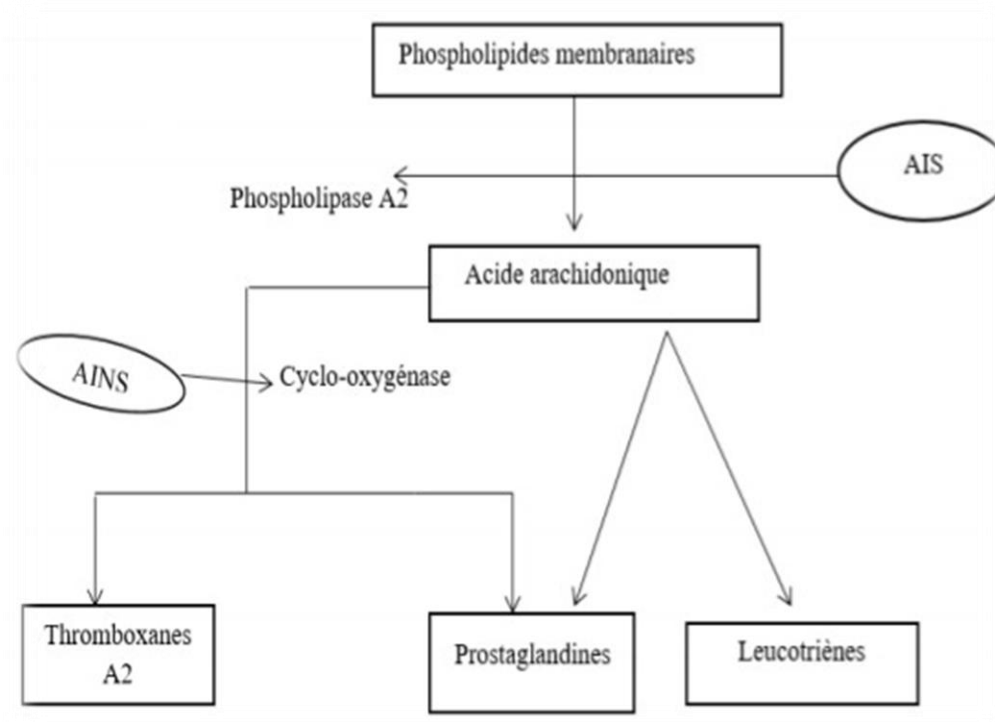


Figure 2: Modes d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (Nicolas *et al.*, 2001).

II.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bourkhiss *et al.*, 2010). Elles possèdent un spectre d'activité très grande. Certaines de ces composées phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires, beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (Fiebich et Chrubasik, 2004). De plus, les composés phytochimiques ont moins d'effets secondaires, une meilleure tolérance du patient, relativement moins cher et une longue histoire d'utilisation et de renouvellement dans la nature comme par rapport aux médicaments conventionnels disponibles coûteux et parfois associés avec des effets secondaires potentiellement mortels (Tabiri Henneh *et al.*, 2018).

III. La plante *Asperula hirsuta* (DESF.)

La famille des Rubiacées est représentée par environ 500 genres et 6000 espèces à travers le monde. Le genre *Asperula* de la famille *Rubiaceae* compte environ 200 espèces connues dans le monde et compte 40 espèces (52 taxons) en Turquie, dont 27 taxons endémiques (Ufuk *et al.*, 2018).

La famille des Rubiacées présente une grande diversité de substances telles que les iridoïdes, les alcaloïdes indoliques, les anthraquinones, les terpénoïdes (diterpènes et triterpènes), les flavonoïdes et autres dérivés phénoliques, avec l'accent sur la production d'alcaloïdes bioactifs (Daiane et Nunez, 2015). Actuellement, l'espèce d'*A. hirsuta* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique. Autres études ont révélé que le genre d'*Asperula* contient des glycosides d'iridoïdes, des glycosides de flavones et des dérivés de l'acide phénolique (Ufuk *et al.*, 2018).

Un grand nombre de ces plantes sont largement utilisées dans la médecine populaire et certaines se sont révélées comme anti-inflammatoires, analgésiques, antibactérien, antiviral et antioxydant (Ufuk *et al.*, 2018).

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 60cm 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*.

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail, comporte la partie aérienne de la plante *Asperula hirsuta* (*A. hirsuta*). L'espèce *A. hirsuta* a été récoltée de la région de Beni Ourtiliane, 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 jusqu'à son utilisation.

I.2. Animaux

L'étude de l'activité anti-inflammatoire dans ce travail est réalisée sur des souris femelles adultes de la souche *Swiss albinos* dont le poids est de 29g, fournies par l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux repartis en groupes sont hébergés dans des cages en polypropylène à température ambiante avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. L'aliment est fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El-Kassar-Bejaia. Après une période d'adaptation, les souris sont pesées, marquées et soumises à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

I.3. Sang humain

Le sang humain frais est obtenu par prélèvement à partir de donneur volontaire sain et non-fumeur et qui n'a pas pris de traitement médical pendant au moins quinze jours.

I.4. Produits et réactifs

Les réactifs utilisés dans la présente étude sont : acide gallique, carbonate de sodium (Na_2CO_3), chlorure d'aluminium (AlCl_3), chlorure de sodium (NaCl), diclofénac de sodium, eau distillée (H_2O), eau physiologie, indométacine, méthanol, quercétine, réactif de Folin-Ciocalteu, xylène proviennent de Sigma-Aldrich (Allemagne). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Merck (Allemagne). 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, 50g de poudre de la partie aérienne sont mis à bouillir dans 500ml d'eau distillée pendant 20min. 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°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 500ml 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°C dans un rotavapeur (BÜCHI). La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brun foncé qui est conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

II.3. Dosage des polyphénols totaux

II.3.1. Principe

La détermination des polyphénols totaux se fait colorimétriquement à partir du réactif de Folin-Ciocalteu (Delgado *et al.*, 2019). 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 765nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

II.3.2. Protocole

Le dosage des polyphénols totaux des extraits d'*A. hirsuta* a été réalisé selon la méthode de Kouadio Blaise *et al.* (2021). Dont un volume de 500µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois est mélangé avec 100µl des solutions d'extraits à différentes concentrations. Après une incubation pendant 4min à la température ambiante, 400µl de Na_2CO_3 (7.5%) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir pendant 1 heure et 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis la lecture des absorbances est faite à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la

gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentration (0-200 μ g/ml) comme standard. Le résultat est exprimé en μ g d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait)(figure 4).

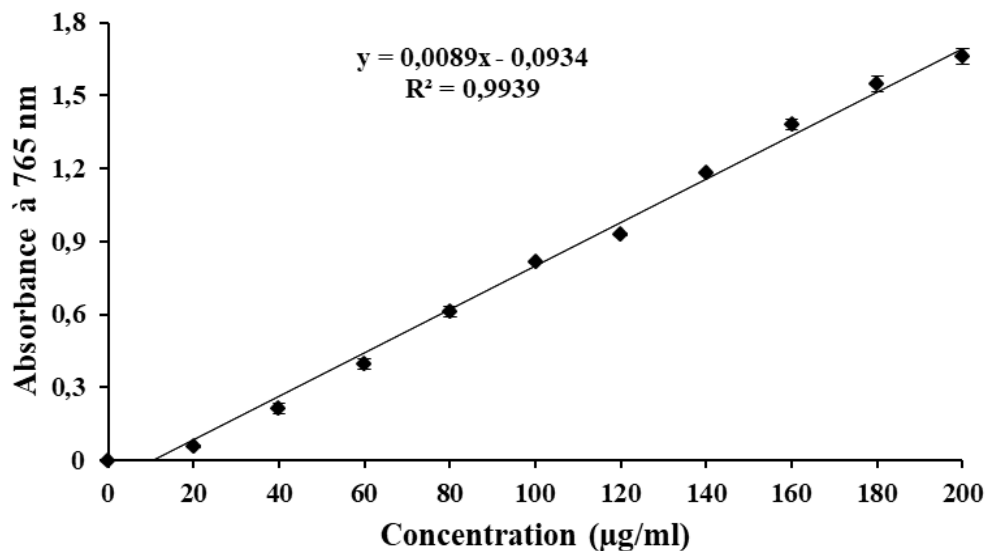


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

II.4. Dosage des flavonoïdes

II.4.1. Principe

Les flavonoïdes contenus dans le matériel végétal sont estimés par la méthode du trichlorure d'aluminium citée par Bahorun *et al.* (1996). 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 quantité de flavonoïdes dans un extrait devrait être déterminée selon le flavonoïde prédominant, cependant la quercétine est largement utilisée comme standard pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans un échantillon.

II.4.2. Protocol

Un 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 à température ambiante et dans l'obscurité puis la lecture de l'absorbance est faite à 430 nm. La teneur des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits d'*A. hirsuta* sont déduites à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine à différentes

concentration (0-16 μ g/ml) comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait) (**figure 5**).

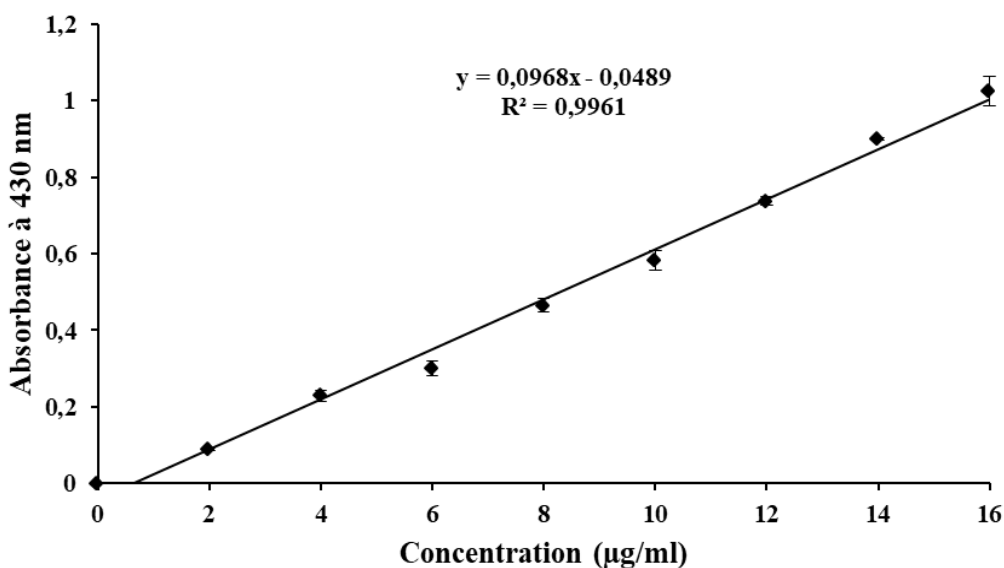


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

II.5. Activité anti-inflammatoire des extraits d'*Asperula hirsuta*

II.5.1. Stabilité membranaire des érythrocytes humains

- Préparation de la suspension des globules rouges humains

Le sang récupéré dans des tubes héparinés est soumis à une centrifugation pendant 10 min à 3000rpm. Le surnageant est éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec une solution PBS isotonique formé de tampon phosphate (10mM, pH=7,4 et 154mM de NaCl), jusqu'à l'obtention d'un surnageant claire, en centrifugeant chaque fois à la vitesse 3000rpm, pendant 10min. Après la dernière centrifugation, le culot est récupéré puis suspendu de nouveau dans la solution PBS isotonique à fin de préparer une suspension de 10% (v/v) de globules rouges humains.

- Détermination de la stabilité membranaire des globules rouges humains

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'*A. hirsuta* se base sur l'effet des extraits de la plante étudiée sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique, elle a été effectuée par la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges décrite par Debnath *et al.*(2013). Brièvement, 125 μ l de la suspension érythrocytaire diluée à 10% sont ajoutés à 1.25ml de chaque extrait à

MATERIELS ET METHODES

différentes concentration (1, 2, 3mg/ml) dissous dans un milieu hypotonique (10mM, pH=7,4 et 50mMNaCl) ou à 1.25 diclofénac de sodium qui est utilisé comme référence. Le control considéré comme 100% d'hémolyse contient la suspension érythrocytaire avec le milieu hypotonique seul. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, une centrifugation est effectuée à 3000rpm pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant récupéré est lue à 450nm. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = 100 \times (\text{Ac} - \text{Ae}) / \text{Ac}$$

Ac : absorbance de control

Ae : absorbance de l'échantillon

II.5.2. Œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris

L'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et méthanolique *in vivo* a été évaluée par le test de l'œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris selon la méthode de Rotelli *et al.* (2003).

- *Prétraitement par les extraits*

Une heure avant l'injection de xylène, un effectif de 28 souris est divisé en 4 groupes de 7 souris, chaque groupe reçoit par voie orale les solutions expérimentales comme suit :

- ✓ Groupe témoin : une solution de NaCl (0.9%).
- ✓ Groupe standard : Indométacine (50mg/kg) dissous dans l'eau physiologie.
- ✓ Groupe essai : Extrait aqueux (200mg/kg) dissous dans l'eau physiologie.
- ✓ Groupe essai : Extrait méthanolique (200mg/kg) dissous dans l'eau Physiologie.

- *Induction de l'inflammation*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire des extraits d'*Asperula hirsuta*, un œdème de l'oreille est induit par l'application topique de 30µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes, à l'aide d'une micropipette.

- *Evaluation de l'activité anti-œdémateuse et détermination de pourcentage d'inhibition de l'œdème*

L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par l'utilisation d'un pied à coulisse digital (Delaporte *et al.*, 2004). La différence de l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. Le pourcentage

MATERIELS ET METHODES

d'inhibition de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au groupe témoin. Il est obtenu selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = ((\Delta \text{ témoin} - \Delta \text{ traité}) / \Delta \text{ témoin}) \times 100$$

Δ témoin : Différence d'épaisseur de l'oreille avant et après l'induction de l'inflammation pour chaque souris de groupe témoin.

Δ traité : Différence d'épaisseur de l'oreille avant et après l'induction de l'inflammation pour chaque souris des groupes traités par les solutions expérimentales.

II.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SD et moyenne \pm SEM par un logiciel (Graphpad Prism version 9.2.0) respectivement, les différents tests sont déterminés par ANOVA (univariée et multivariée) suivie de test Dunnett pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$).

RESULTATS

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. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits méthanolique et aqueux d'*Asperula hirsuta* afin de déterminer la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes, dont la quantité de chaque composé chimique est définie grâce à la molécule de référence utilisé dans l'étude (acide gallique pour polyphénolset quercétine pour les flavonoïdes) et rapporter en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait), ou en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait(EAG/ mg d'extrait) respectivement pour les flavonoïdeset polyphénols.

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 2**).

Tableau 2. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta*

Extraits	Polyphénols ($\mu\text{g EAG} / \text{mg}$ d'extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ} / \text{mg}$ d'extrait)
E. Met	148.205 \pm 7.908	14.984 \pm 0.164
E. Aq	111.051 \pm 3.060	9.043 \pm 0.374

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

I.3. Activité anti-inflammatoire des extraits d'*Asperula hirsuta*

I.3.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'*A. hirsuta* qui compte sur l'étude de l'effet protecteur de ces extraits contre l'hémolyse des globules rouges induit par milieu hypotonique est illustré dans la **figure 6**.

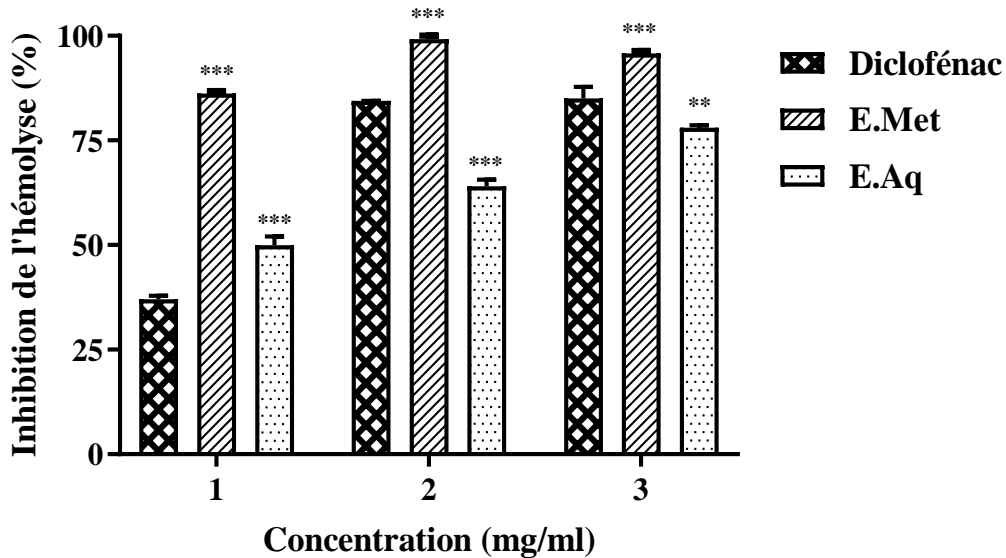


Figure 6 :Effet de l'extrait méthanolique (E.Met) et aqueux (E.Aq) d'*Asperula hirsuta* sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3). ***: $p < 0.001$; **: $p < 0,01$ vs diclofénac.

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits protègent significativement ($p < 0.001$) les érythrocytes humains contre l'hémolyse. A la concentration de 2mg/ml, l'extrait méthanolique a donné le taux d'inhibition de l'hémolyse le plus élevé (99.19 %) contre 84.42 % et 64.07% exercé par le diclofénac sodique et l'extrait aqueux, respectivement.

I.3.2. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

L'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et aqueux d'*Asperula hirsuta* a été évalué sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris qui est un modèle de l'inflammation aigüe.

Les souris du groupe témoin n'ayant reçu que la solution de xylène ont développé au bout de 30min un œdème caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de $120 \pm 6.81 \mu\text{m}$.

Le traitement oral avec 200mg/kg d'extrait méthanolique a induit une atténuation très significative ($p < 0.001$) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur est de $(36,66 \pm 4,94)$ μ m seulement. L'inhibition est donc de 72%. Ce pourcentage d'inhibition est supérieur à celui obtenu avec l'indométacine utilisé comme anti-inflammatoire de référence. En effet, l'augmentation de l'épaisseur 30min après l'induction de l'inflammation par 50mg/kg d'indométacine est de $(51,66 \pm 3,07)$ μ m, ce qui correspond à une inhibition de 57%. De même, une diminution très significative de l'œdème est observée chez les souris du groupe traité oralement avec 200mg/kg de l'extrait aqueux par rapport aux souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur est de $(48,57 \pm 5,08)$ μ m, soit un taux d'inhibition de 61%, un taux très proche à celui de l'indométacine mais significativement ($p < 0.1$) inférieur à celui exercé par l'extrait méthanolique (**figure 7**).

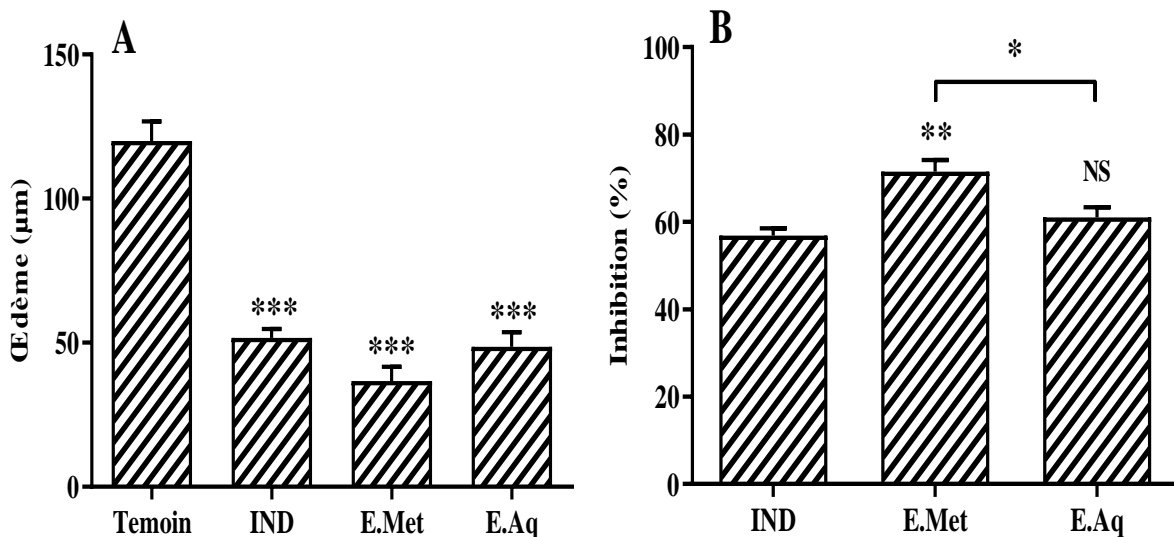


Figure 7 : Effet des extraits d'*Asperula hirsuta* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Les groupes des souris sont prétraités oralement par l'indométacine (**IND**) à 50mg/kg, l'extrait aqueux (**E.Aq**) ou méthanolique (**E.Met**) à 200mg/kg. Le groupe témoin reçoit du NaCl 0.9%. **A** : Différence de l'épaisseur avant et une demi-heure après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 7). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, NS : non significatif.

II. DISCUSSION

De nombreuses préparations des plantes prés largement décrétées pour le traitement des maladies inflammatoires à cause de leur richesse en molécules thérapeutiques dits métabolites secondaires tel que les flavonoïdes et polyphénols. Cependant, les anti-inflammatoires de synthèses sont largement utilisées actuellement. En effet, ces anti-inflammatoires ayant des complications concernant leur dommage pour la santé. Pour cela il y a une besoin de recherche et travaille de développement en phytothérapie.

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

La méthode d'extraction consiste une principale étape pour l'isolement des composés phénoliques des matières végétales après la préparation de l'échantillon (Nguyen *et al.*, 2022). Selon Makusa *et al.* (2020) l'extraction est le processus par lequel un composé souhaité est retiré à l'aide d'un solvant conformément avec la nature du composés à séparer, ceci permet de conclure que le but de l'extraction est d'attirer les composés bioactifs contenus dans l'échantillon. De nombreux paramètres doivent être prise en compte d'influencer cette méthode parmi lesquels : la nature chimique des composés phytochimiques, procédé d'extraction utilisé, tailles des particules de l'échantillon et les solvants choisis, ainsi que le temps d'extraction et la température (Nguyen *et al.*, 2022 ; Koçak et Pazir, 2018).

L'extraction dans cette étude a été effectuée par l'eau et le méthanol. Khodami *et al.* (2013) montrent que l'extraction par l'eau et le méthanol ainsi que leur mélange à différents rations sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques.

À fin de réaliser notre étude, on a choisi la partie aérienne pour obtenir les extraits de notre plante. Ceci peut être attribué au fait que la prédominance d'utilisation d'une partie par rapport à un autre découle de sa concentration en principe actif, par exemple on trouve que les feuilles sont les plus utilisées car elles sont en même temps un siège des réactions photochimiques et un réservoir de matières organiques (Hachi *et al.*, 2015).

Pendant la préparation de l'échantillon, la plante a été séchée à l'ombre afin de prévenir la transformation chimique telle que l'isomérisation et la dégradation causée par les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Jones et Kinghorn, 2005). En outre, le séchage inhibe la fermentation bactérienne qui peut être une cause directe de dégradation enzymatique

de certains composants comme les flavonoïdes qui se dégradent facilement en cas d'un matériel frais ou non séché (Seidel, 2005).

L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction de fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter leur surface du contact avec le solvant extracteur et faciliter sa pénétration à l'intérieure des cellules (Sasidharan *et al.*, 2011).

Le rendement des extraits aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* sont proches. L'extraction aqueuse est effectuée sous forme d'une décoction à temps réduit avec une température élevée. Selon King et Bott, (2012), la solubilité de certains composés et l'extraction est augmentée par le réchauffement du mélange matériel végétal et d'eau, cette information permet de conclure que le rendement d'extraction aqueuse augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que la température est un accélérateur d'extraction, elle augmente la solubilité des composés phénoliques dans le solvant. Toutefois, en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, une température trop élevée peut conduire à leur décomposition et leur dégradation, ceci interprète le déroulement de l'extraction à un temps réduit (Routray et Orsat, 2012). À l'autre côté l'utilisation d'un solvant alcoolique (le méthanol) au cours de l'opération d'extraction par macération est habituellement identifiée comme le dissolvant efficace pour l'extraction des composés phénoliques en raison de son propriété polaire et la capacité de solubiliser et récupérer des quantités optimales des composants actifs des plantes (sultana *et al.*, 2014). Même si 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). De manière générale le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions de séchage et de la richesse de chaque espèce avec des métabolites secondaires. La région et la période de récolte sont également des déterminants du rendement (Zhang *et al.*, 2018). 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 %.

L'étude quantitative des extraits d'*A. hirsuta* a été réalisées par dosage spectrophotométrique pour estimer la teneur en composées phénoliques. Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait

que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des phénols (Fadili *et al.*, 2017). Le dosage a été réalisé par deux méthodes : le Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement pour les polyphénols et les flavonoïdes. Ces 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). Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique d'*A. hirsuta* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux. Sepahpour *et al.* (2018) ont rapporté que les teneurs phénoliques totales dans les extraits de plantes dépendent de la haute solubilité des phénols dans les solvants polaires ce qui fournit une concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant ces solvants. De 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 anti-inflammatoires

II.2.1. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains

La méthode de stabilisation membranaire des globules rouges humains a été choisie pour étudier l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'*A. hirsuta* parce que la membrane de RBC est structurellement équivalente à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que les extraits peuvent ainsi stabiliser les membranes lysosomiales (Ghosh *et al.*, 2015). La stabilisation de la membrane lysosomale est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les enzymes bactéricides et les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (Alam *et al.*, 2015). L'exposition des globules rouges à des substances nocives telle que milieu hypotonique entraîne la lyse de la membrane accompagnée d'hémolyse et oxydation de l'hémoglobine. L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à accumulation excessive de liquide dans la cellule résultant dans la rupture de sa membrane (Mounnissamy *et al.*, 2007).

L'action principale des agents anti-inflammatoires est l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase responsable pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (PG). Spécifiquement, cet enzyme fait la conversion de la prostaglandine G₂ (PGG₂) en PGH₂ avec peroxydation qui est associé à la formation de longs canaux dans membranes. L'ouverture du canal se produit en raison de la libération de médiateurs chimiques et ainsi

l'acide arachidonique est reloué à partir de la membrane et converti en prostaglandine (Mounnissamy *et al.*, 2007). De même les anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que le diclofénac sodique, agissent soit en inhibant les enzymes lysosomales ou en tant que stabilisateurs des membranes lysosomales (Kherbache *et al.*, 2020).

D'après les résultats de cette expérimentation, les extraits étudiés d'*A. hirsuta* possèdent une action protecteur contre le milieu hypotonique dont laquelle l'extrait méthanolique ayant l'effet protecteur la plus élevé. Ces résultats nous orientent que la propriété anti inflammatoire de notre plante est liée à leur richesse aux composés phénoliques. En effet, Ghaudhuri *et al.* (2007) montrent que les flavonoïdes possèdent un effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse hypotonique, maintenant ainsi leur intégrité membranaire.

Aucune étude sur l'activité anti-inflammatoire 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 anti-inflammatoire des espèces de la même famille (Rubiaceae) comme les études qui ont fait par Chowdhury *et al.* (2014) sur *Gardenia corenaria* qui montrent que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de cette plante possède un effet protecteur de la membrane du globules rouges. De même le genre *Coptosapelta flavescens* Korth présente un effet anti-hémolytique (Kosala *et al.*, 2018).

II.2.2.Effet anti-œdémateux

L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris a été utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits d'*A. hirsuta*. Ce modèle expérimental reproductible concède une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Xu *et al.*, 2014). Le xylène est un hydrocarbure irritant aromatique formé d'un mélange de trois formes isométriques (ortho, méta et para). L'application du xylène sur l'oreille induit une accumulation de liquide intercellulaire conduisant à la formation d'un œdème qui est une caractéristique de l'inflammation aigüe (Debnath *et al.*, 2013). Richardson et Vasko, (2002) ont rapportés que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénase capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires, ces derniers sont des vasodilatateurs puissants et contribuent à la formation de l'œdème et la genèse des influx nociceptifs. De plus, le mécanisme d'action de l'indométacine sur l'inflammation est basé sur l'inhibition de synthèse pro-inflammatoire de prostaglandine (Li *et al.*, 2008).

Dans notre étude, les extraits étudiés d'*A. hirsuta* présentent une activité anti-œdémateuse. Cependant, l'extrait méthanolique possède l'effet le plus élevé que l'extrait aqueux et l'indométacine. Cet effet est probablement lié à la présence des composés phénoliques. En effet, Roko *et al.* (2020) confirment que les propriétés anti-inflammatoires des molécules bioactives liées aux flavonoïdes. Des études ultérieures ont montré que la famille des Rubiacées possède une activité anti-œdémateuse dont l'étude de Kosala *et al.* (2018) ont montré que l'extrait méthanolique de *Coptosapelta flavescens* Korth a exercé une inhibition de l'œdème de la patte des rats induit par la carragénine.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Les plantes médicinales ont fourni une réserve complète des remèdes pour guérir les maux de l'humanité. Elles restent la plus source abondante et largement disponible en molécules naturelles bioactives dotés d'activités biologiques.

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 anti-inflammatoire des mêmes extraits a été évalué *in vitro* et *in vivo*.

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 anti-inflammatoire observable. Les extraits étudiés ont exercé une protection importante de la membrane des globules rouges humains contre l'hémolyse par le milieu hypotonique et un excellent effet inhibiteur de l'œdème induit par xylène chez la souris.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant d'isoler les molécules qui sous-tendent les diverses activités détectées dans ces extraits, d'évaluer leurs effets sur les médiateurs de l'inflammation, les cellules inflammatoires et leurs voies de signalisations pour comprendre leurs mécanismes d'action à l'échelle cellulaire et moléculaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alam, M.N., Biozid, M.S., Islam, M.R., Rahman, M.M., Chowdhury, A.I., Mazumdar, M.M.U (2015). *In vitro* comparative study of anti-inflammatory and anti-arthritic effects of the methanol extract of *Cissus entagona Roxb* and *Thunbergia grandiflora Roxb. Leaf*. *The Pharma Innovation*, 4(4, part A), 39.

Anosike, C.A., Obidoa, O., Ezeanyika, L.U (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20-76.

Azwanida, N.N (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principale, strength and limitation. *Medicin Aromatical Plants*, 4(196), 2167-0412.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46, 1086-1089.

Barata, A.M., Rocha, F., Lopes, V., Carvalhe, A.M (2016). Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. *Journal of Industrial Crops and Products*, 88, 8-11.

Beyaert, R., Beaugerie, L., Van Assche, G., Brochez, L., Renauld, J.C., Viguier, M., Cocquyt, V., Jerusalem, G., Machiets, J.P., Prenen, H., Masson, P., Louis, E., De Keyser, F (2013). Cancer risk in immune-mediated inflammatory diseases (IMID). *Molecular cancer*, 12(1), 98-102.

Bourkhiss, M., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., Satrani, B (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis Articulata (VAHL)* masters du Maroc. *Bulletin de la Société des Sciences de Liège*, 79, 141-154.

Charles, N.S., Peter, A.W., Derek, W.G (2010). Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press, 2-3.

Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxydant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 42-48.

Chowdhury, A., Azam, S., Jainul, M.A., Faruq, K.O., Islam, A (2014). Antibacterial activities and *in vitro* anti-inflammatory (membrane stability) properties of methanolique extract of *Gardenia corenaria leaves*. *Internatinal Journal of Microbiology*, 5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Debnath, P.C., Das, A., Islam, A., Islam, M.A., Hassan, M.M., Gias Uddin, S.M (2013). Membrane stabilization-A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Journal of Pharmacognosy*, 5, 104-107.

Delaporte, R.H., Sarragiotto, M.H., Takemura, O.S., Sanchez, G.M., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker - Bromeliaceae. *Journal of Ethnopharmacol*, 95, 229-233.

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.

Fadili, K., Zerkani, H., Amalich, S., Zair, T (2017). Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa* L. *American Journal of Innovative Recherche and Applied Sciences*, 5(2), 108-118.

Fiebich, B.L., Chrubasik, S (2004). Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators *in vitro*. *Phytomedicine*, 11, 135-138.

Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S., Gomes, A (2015). *In vitro* and *in vivo* anti-arthritis and anti-inflammatory activity of *Bungarus fasciatus* venom. *Journal of Toxins*, 2(1), 5-8.

Howcroft, T.K., Campisi, J., Louis, G.B., Smith, M.T., Wise, B., Wyss-Coray, T., Augustine, A.D., McElhaney, J.E., Kohanski, R., Sierra, F (2013). The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY)*, 5, 84-93.

Jain, P., Pandey, R., Shukla, S.S (2015). Inflammation: Natural Resources and Its Applications. Springer Briefs in Immunology.

Janeway, C.A., Murphy, K., Walport, M (2009). Immunobiologie. De Boeck.

Jones, W.P., Kinghorn, A.D (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker, S.D, Latif, Z and Gray. A.I. *Natural products isolation*. Eds, Humana Press (Totowa): 323-411.

Kahkeshani, N., Farahanikia, B., Mahdavian, P., Abdolghaffari, A., Hassan Zadeh, G., Abdollahi, M., Khanavi, M (2013). Antioxidant and burn healing potential of *Galium odoratum* extract. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 197-203.

Kanathip, S., Pimchanok, C., Waritsara, C., Nirut, B., Pitsinee, F., Karitta, C (2020). Antilipoxygenase and anti-inflammatory activities of *Streblus asper* leaf extract on xylene-induced ear edema in mice. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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.

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.

Kherbache, A., Senator, A., Laouicha, S., Al-Zoubi, R.M., Bouriche, H (2020). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Helichrysum stoechas* (L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29(10), 18-26.

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

King, M.B., Bott, T.R. (Eds.) (2012). Extraction of natural products using near-critical solvents. Springer Science & Business Media.

Koçak, E., Pazir, F (2018). Effect of extraction methods on bioactive compounds of plant origin. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(6), 663-675.

Kosala, K., Aris Widodo, M., Santoso, S., Karyono, S (2018). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of *Coptosapelta flavescens Korth Root's* methanol extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(09), 042-048.

Kouadio Blaise, K., Koffi, M.A., Oussou, K.R., Ahoua Angora, R.C., Kablan Ahmont, L.C., Dongui, B.K., Attioua Koffi, B (2021). Phytochemical screening, determination of total polyphenols and flavonoids, and evaluation of the antibacterial activity of leaves of *Turraea heterophylla Smith (Meliaceae)*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(5), 16-21.

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*, 1-8.

Kumar, V., Abul, K.A., Jon, C.A (2013). Robbins Basic Pathology. Elsevier Health Sciences.

Lahmidani, N., Mellouki, I., El Yousfi, M., Aqodad, N., El Abkari, M., Ibrahim, A., Benajah, D (2012). L'ulcère bulbaire hémorragique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens: quelle gravité de l'accident hémorragique Bleeding peptic ulcer and non-steroidal anti-Inflammatory Drugs: what severity of bleeding. *Journal African Hépatogastroentérologie*, 6(3), 193-195.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Li, H., Lu, W., Zhang, S., Lu, M., Liu, H (2008).** Anti-inflammatory activity of Polysaccharide from *Pholiota nameko*. *Biochemistry*, 73, 669-675.
- Makusa, A.D., Ningsih, P (2020).** Analysis of Total Flavonoid Levels in Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata L.*) Using UV-Vis Spectroscopy Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, 2(1), 11-17.
- Mallem,Y., Gogny, M (2014).** Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. *EMCVétérinaire*, 1-12.
- 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.
- Mounnissamy, V.M., Kavimani, S., Balu, V., Quine, S.D (2007).** Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of ethanol extract of *Cansjera rheedii J. Gmelin (Opiliaceae)*. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 6(2), 235-237.
- Nguyen, N.V., Duong, N.T., Nguyen, K.N.H., Bui, N.T., Pham, T.L., Nguyen, K.T., Huu Le, P., Kim, K.H (2022).** Effect of extraction solvent on total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity of *Avicennia officinalis*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(2), 2678-2690.
- Nicolas, J.F., Cousine , F., Thivolet, J.(2001).** Immunologie Clinique et allergique : Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John libbey Eurotext, français, 98.
- Ouédraogo, N., Lompo1, M., Sawadogo1, R.W., Tibiri1, A., Hay, A.E., Koudou, J., Dijoux, M.G., Guissou1, I.P (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus Erinaceus Poir (Fabaceae)*. *Phytothérapie*, 10,286-292.
- Park, M.H., Kim, D.H., Lee, E.K., Kim, N.D., Im, D.S., Lee, J., Yu, B.P., Chung, H.Y (2014).** Agerelated inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Archives Pharmacal Research*, 37, 1507-1514.
- Rathinam,V.A., Nfitzgerald, K.A (2016).** Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, 165, 792–800.
- Richardson, J.D., Vasko, M.R (2002).** Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *Perspectives in Pharmacology*, 302, 839-845.
- Roko, O.G., Dougnon, V., Hounkpatin, A., Klotoé, J.R., Baba-Moussa, L (2020).** Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Properties of Ethanolic Extracts of Three Plants of Beninese's Pharmacopoeia: *Euphorbia hirta*, *Citrus aurantifolia* and *Heterotis rotundifolia*. *Asian Journal of Biology*, 8(4), 1-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., de la Rocha, N.E., Pelzer, L.E (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 48, 601-606.

Routray, W., Orsat, V (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 409-424.

Sadki, S (2012). Les plantes endémiques d'Algérie passent de 224 à 300 espèces. ElWatan, Edition du 10 Aout.

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.

Sepahpour, S., Selamat, J., Abdul Manap, M.Y., Khatib, A., Abdull Razis, A.F (2018). Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different Solvent Extraction Systems. *Molecules*. 23(2): 402-415.

Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), 385-405.

Strehl, A., Spies, C.M., Buttgerit, F (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 5 (68), 13-18.

Sultana, B., Anwar, F., Mushtaq, M., Aslam, M., Ijaz, S (2015). *In vitro* antimutagenic, antioxidant activities and total phenolics of clove (*Syzygium aromaticum L.*) seed extracts. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(4), 893-899.

Tabiri Henneh, I., Akrofi, R., Ameyaw, E.O., Konja, D., Owusu, G., Abane, B., Acquah-mills, J., Edzeameh, F.J., Tayman, F (2018). Stem bark extract of *Sterculia setigera* Delile exhibits anti-inflammatory properties through membrane stabilization, inhibition of protein denaturation and prostaglandin E2 activity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 22(5), 1-11.

Tréchet, P., Jouzeau, J.Y (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des AINS: Chemical and pharmacological basics of NSAIDs, *Revue française Allergologie*, 54 (3), 212-217.

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 taurinasubsp. caucasica*. *Özgül makale*, 42(1), 1-13.

Weill, B., Batteux, F (2003). Immunopathologie et réaction inflammatoires. 1re Édition, De Boeck et Larcier ISBN : 2- 8041- 4177-2 Université Bruxelles : 12-23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Xu, Q., Wang, Y., Guo, S., Shen, Z., Wang, Y., Yang, L (2014). Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152, 540-545.

Zhang, Q.W., Lin, L.G.,Ye., W.C (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20-29.

Ziani, B.E.C., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Hazzit, M., Ferreiral, C.F.R (2015). Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora : Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Industrial Crops and Products*, 77, 582-589.

Abstract

The objective of the present study is to evaluate the anti-inflammatory activity of the aqueous (Aq.E) and the methanolic (Met.E) extracts of the aerial part of *Asperula hirsuta*. The contents of total polyphenols and flavonoids of the two extracts were determined using the method of Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride, respectively. The results reveal that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of $148.20 \pm 7.90 \mu\text{g GAE/mg}$ of extract and $14.98 \pm 0.16 \mu\text{g QE/mg}$ of extract, respectively. Anti-inflammatory activity was assessed using human erythrocyte membrane stability (HRBC) assays and xylene-induced ear edema assay in mice. Compared with the synthetic anti-inflammatory diclofenac and indomethacin. The *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory activity shows that the extracts have a strong inhibitory activity with a percentage inhibition of 99% at the dose 2 mg/ml and 78% at the dose 3 mg/ml respectively for the Met.E and Aq.E. The results of the anti-inflammatory activity *in vivo* showed a remarkable reduction in the increase in edema volume with a percentage inhibition of 72% and 61% of Met.E and Aq.E respectively, a relatively high reduction to that obtained with indomethacin, the reference anti-inflammatory (57%). In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* possess a significant anti-inflammatory activity due to the presence of phenolic compounds which can be exploited in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: *Asperula hirsuta*, anti-inflammatory, polyphenols, flavonoids, plant extracts.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات للمستخلص المائي والميثانولي للجزء الهوائي لنباتة *Asperula hirsuta*. تم التقدير الكمي لكل من متعدد الفينول والفلافونويدات باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu وثلاثي كلوريد الألومنيوم على التوالي. النتائج المتحصل عليها أظهرت ان المستخلص الميثانولي هو الاغنى بمتعدد الفينول والفلافونويدات بقيمة 148.20 ± 7.90 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و 14.98 ± 0.16 ميكروغرام مكافئ كيرستين/مغمستخلص على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات بالاعتماد على اختبار استقرار غشاء كريات الدم الحمراء البشرية واختبار وذمة الاذن المحدث بـ Xylène عند الفئران، مقارنة مع ديكلوفيناك والانومييتاسين على الترتيب. حيث اعطى اختبار استقرار غشاء كريات الدم الحمراء نتائج تثبت ان المستخلصان الميثانولي والمائي لهما نشاط فعال في حماية غشاء هذه الكريات ضد الانحلال بنسبة 99% بجرعة 2مغ/مل و 78% بجرعة 3مغ/مل على التوالي. من جهة أخرى اعطى العلاج عبر الفم بجرعة 200 مع/كغ من المستخلص الميثانولي و المائي تأثير مضاد لالتهاب الاذن المحفز بـ Xylène مع معدلات تثبيط تقدر بـ 72% و 61% لوذمة الاذن على التوالي. هذه النتائج أحسن من المتحصل عليها مع مضاد الالتهاب. في الختام، المستخلصين المائي والميثانولي لنباتة *A. hirsuta* تمتلكان نشاطية عالية ضد الالتهاب بسبب وجود المركبات الفينولية التي يمكن استغلالها في صناعة الاغذية والادوية.

كلمات مفتاحية: *Asperula hirsuta*، مضادات الالتهاب، متعدد الفينول، فلافونويدات، مستخلصات النباتة.

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir anti-inflammatoire 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'E.Met est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de $148.20 \pm 7.90 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $14.98 \pm 0.16 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, respectivement. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en utilisant les tests de la stabilité membranaire des érythrocytes humains (HRBC) et le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. En comparaison avec les anti-inflammatoires de synthèse (diclofénac et l'indométacine). L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire montre que les deux extraits ont une activité inhibitrice forte avec un pourcentage d'inhibition maximale de 99% à la dose 2 mg/ml et 78% à la dose 3 mg/ml respectivement pour l'E.Met et l'E.Aq. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* montrent une réduction remarquable de l'augmentation de volume d'œdème avec un pourcentage d'inhibition de 72% et 61% d'extrait méthanolique et aqueux respectivement, une réduction relativement élevée que celle obtenue avec l'indométacine, anti-inflammatoire de référence (57 %). En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* possèdent une activité anti-inflammatoire importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés : *Asperula hirsuta*, anti-inflammatoire, polyphénols, flavonoïdes, extraits de plante.