

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**Du diplôme de Master Académique**

Par : Kouachi Mebarka

Mouissat Sabah

**Intitulé**

**Screening phytochimique et évaluation des activités  
antioxydante et analgésique d'*Asperula hirsuta***

Soutenu devant le jury composé de :

M <sup>f</sup> . Kherbache Abdallah	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Encadreur
M <sup>f</sup> . Selloum Mounir	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
M <sup>me</sup> . Ariech Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

{سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ

أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ}

سورة البقرة الآية: 35



## REMERCIEMENTS

*Nous commençons tout d'abord par rendre grâce à ALLAH, le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes de savoir et nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur **Mr. KHERBACHE ABDALLAH**, pour sa disponibilité, ses pertinents conseils que vous nous avez donnés en termes de note mémoire que ce soit dans la vie quotidienne et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.*

*Grand et respectueux remerciement va au **Mr. Selloum Mounir** d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire. Je vous remercie surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.*

*Nous adressons nos sincères remerciements au **Dr. Ariech Mounira** d'avoir accepté de juger et d'examiner notre travail et pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury.*

*Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine, pour leur aide.*

*Nous remercions aussi tous mes collègues de la promotion 2021-2022 et les étudiants de master et nous leur souhaitons beaucoup de réussite.*

*Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des Sciences pendant les cinq années de notre parcours.*

## *Dédicaces*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère 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 mon cher père mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras, mon guide, il est ma source d'encouragement et sécurité. Merci de m'avoir soutenu pendant ces années d'étude.*

*A mon adorable sœur et à mes frères à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour et de ma profonde admiration. Qu'Allah vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.*

*A mes amies proches, en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A tous ceux qui me sont chers ...*

*A ma promotion de biochimie 2021/2022.*



*Mebarka*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes Parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le long de mes études*

*A mes sœurs Dounya, Houda et Leila et mes frères Mouhammed, Abbas et Ishak*

*À mes Amies*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*



*Sabah*

## Abstract

The present study was designed to the identification of certain phytochemical compounds and the evaluation of the antioxidant and analgesic properties of the aqueous (Aq.E) and the methanolic (Met.E) extracts of the aerial part of *Asperula hirsuta*. The total polyphenols and flavonoids in both extracts were determined using the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride methods, respectively. The results showed that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of  $145,93 \pm 15,72 \mu\text{g AGE/mg extract}$  and  $107,65 \pm 9,86 \mu\text{g QE/mg extract}$ , respectively. The antioxidant activity of Met.E and Aq.E was evaluated using the hydroxyl radical and iron chelation tests. Results showed that both extracts exhibited a strong scavenging activity against hydroxyl radicals with  $\text{IC}_{50}$  values of  $631,58 \pm 21,29 \mu\text{g/mL}$  and  $232,58 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$ , respectively. In addition, the Met.E and Aq.E showed a good chelating activity with  $\text{EC}_{50}$  values of  $180,87 \pm 5,72 \mu\text{g/mL}$  and  $76,39 \pm 5,87 \mu\text{g/mL}$ , respectively. On the other hand, the treatment of mice with 200 mg/kg of Aq.E and Met.E inhibited the pain induced by acetic acid with 52% and 82%, respectively. In conclusion, the obtained results showed that the aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* contain bioactive compounds with strong antioxidant activity as well as interesting analgesic properties.

**Keywords:** *Asperula hirsuta*, antioxidant activity, analgesic activity, methanolic extract, aqueous extract.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحديد بعض المركبات الكيميائية النباتية وتقييم الخصائص المضادة للأوكسدة والمسكنة للمستخلص المائي والميثانولي من الجزء 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 بـ  $15,72 \pm 145,93$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $9,86 \pm 107,65$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص على التوالي. تم تقييم القدرة المضادة للأوكسدة باستعمال كل من اختبار جذر الهيدروكسيل و استخلاص الحديد. أظهر كل من المستخلص المائي والميثانولي نشاطية إزاحية جد عالية لجذر الهيدروكسيل بقيمة  $IC_{50}$  تقدر بـ  $2,66 \pm 232,58$  و  $21,29 \pm 631,58$  ميكروغرام/مل على التوالي. كما أظهر المستخلصان قدرة استخلاص معتبرة اتجاه المعادن وقدر التركيز الممارس لـ 50 % من الفعل التمثلي بـ  $5,87 \pm 76,39$  و  $5,72 \pm 180,87$  ميكروغرام/مل، على الترتيب. أظهرت معالجة الجردان بـ 200 مغ/كغ من المستخلص المائي والميثانولي قدرة معتبرة على تثبيط الألم المحدث بحمض الأستيك بنسب 52 % و 82 % على الترتيب. في الختام، تظهر النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات *Asperula hirsuta* المائية والميثانولية تحتوي على مركبات نشطة بيولوجياً ذات نشاط قوي مضاد للأوكسدة بالإضافة إلى خصائص مسكنة معتبرة.

**الكلمات المفتاحية:** *Asperula hirsuta* ، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مسكن، مستخلص ميثانولي، مستخلص مائي.

## Résumé

La présente étude porte sur l'identification de certains composés phytochimiques et l'évaluation des propriétés antioxydants et analgésiques 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  $145,93 \pm 15,72 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $107,65 \pm 9,86 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test de piégeage du radical hydroxyle et la chélation de fer. Les résultats montrent que l'E.Met et l'E.Aq possèdent une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical hydroxyle avec des  $\text{IC}_{50}$  de  $631,58 \pm 21,29 \mu\text{g/mL}$  et  $232,58 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. De même, une bonne activité chélatrice a été obtenue par les deux extraits avec des  $\text{EC}_{50}$  de  $180,87 \pm 5,72 \mu\text{g/mL}$  et  $76,39 \pm 5,87 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Le prétraitement par voie orale des souris par l'E.Met ou l'E.Aq à  $200 \text{ mg/kg}$  inhibe de façon significative la douleur induite par l'acide acétique avec un pourcentage de 82% et 52%, respectivement. En conclusion, nos résultats montrent que les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* contient des composés bioactifs d'une forte activité antioxydant ainsi que des propriétés analgésiques intéressantes.

**Mots clés :** *Asperula hirsuta*, activité antioxydant, activité analgésique, extrait méthanolique, extrait aqueux.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMM** : Analgésie multimodale

**ATP** : Adénosine triphosphate

**COX** : Cyclooxygénase

**G6PDH** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GR** : Glutathion réductase

**IASP** : Association internationale pour l'étude de la douleur

**LOX** : Lipoxygénases

**NADP** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NOS** : Nitrique oxyde synthétase

**ROS** : Espèces réactives d'oxygène

**SNC** : Système nerveux central

**SOD** : Superoxyde dismutase

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Aspect morphologique d'*Asperula hirsuta*.

**Figure 2.** Représentation schématique de la théorie du stress oxydant

**Figure 3.** Formation des radicaux libre.

**Figure 4.** Origine des différents radicaux libres oxygéné et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

**Figure 5.** Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives.

**Figure 6.** Stimulation des nocicepteurs par les algogènes.

**Figure 7.** Prétraitement orale des souris.

**Figure 8.** Injection intrapéritonéale de l'acide acétique.

**Figure 9.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

**Figure 10.** Droite d'étalonnage de la quercétine.

**Figure 11.** Effet piègeur du radical hydroxyle par l'extrait aqueux et méthanolique d'*A. hirsuta* et de l'acide ascorbique.

**Figure 12.** Activité chélatrice des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation.

**Figure 13.** Mouvement d'étirement de la patte postérieur de la souris et mouvement de contorsion abdominale.

**Figure 14.** Effet de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique d'*Asperula hirsuta* sur le nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Résultat des tests phytochimique de quelques métabolites secondaires des extraits d'*Asperula hirsuta*.

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

**Tableau 3.** Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta*.

**Tableau 4.** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*A. hirsuta* et d'EDTA.

# SOMMAIRE

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

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>I. LA PLANTE <i>ASPERULA HIRSUTA</i> (DESF.) .....</b>	<b>3</b>
I.1. Généralités.....	3
I.2. Description botanique.....	3
I.3. Classification.....	4
I.4. Intérêts thérapeutiques.....	5
<b>II. ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>	<b>5</b>
II.1. Stress oxydatif.....	5
II.2. Radicaux libres.....	5
II.3. Oxydation des macromolécules.....	7
II.4. Pathologies liées au stress oxydant.....	9
II.5. Antioxydants.....	9
<b>III. Activité analgésique.....</b>	<b>12</b>
III.1. Douleur.....	12
III.2. Classifications de la douleur.....	12
III.3. Mécanisme et chemin de la douleur.....	13
III.4. Antalgiques.....	15
III.5. Mécanisme d'action des substances analgésiques.....	15
III.6. Analgésiques d'origine végétale.....	17

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Matériel.....</b>	<b>19</b>
I.1. Matériel végétal.....	19
I.2. Matériel animal.....	19
I.3. Produits et réactifs.....	19

<b>II. Méthodes .....</b>	<b>19</b>
II.1. Préparation des extraits aqueux et méthanolique.....	19
II.2. Etude phytochimique.....	20
II.3. Dosage des polyphénols totaux.....	21
II.4. Dosage des flavonoïdes.....	21
II.5. Etude de l'Activité antioxydante des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	22
II.5.1. Piégeage du radical hydroxyle .....	22
II.5.2. Chélation du fer ferreux .....	22
II.6. Etude de l'activité analgésique des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	23
II.6.1. Test de contorsion dorso-abdominale (Test de torsion) .....	23
II.7. Analyses statistiques.....	24
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>25</b>
<b>I. Résultats.....</b>	<b>25</b>
I.1. Rendements des extractions.....	25
I.2. Etude phytochimique.....	25
I.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	26
I.4. Activité antioxydante des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i>	28
I.4.1. Piégeage du radical hydroxyle.....	28
I.4.2. Chélation de fer .....	29
I.5. Activité analgésique des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	30
I.5.1. Test de contorsion dorso-abdominale (test de torsion).....	30
<b>II. DISCUSSION .....</b>	<b>32</b>
II.1. Préparation des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i> .....	32
II.2. Etude phytochimique.....	33
II.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	33
II.4. Activité antioxydante.....	34
II.5. Activité analgésique des extraits d' <i>Asperula hirsuta</i>	35
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>39</b>

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (ROS) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité et l'exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ROS dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires. L'organisme se protège toujours contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à un système de défense hyper efficace, complétés par des apports alimentaires qui contiennent des substances antioxydantes. Ces derniers sont des métabolites secondaires très répandus chez les plantes. Ils sont étudiés de façon large pour leurs activités biologiques, pharmacologiques et antioxydantes.

De nos jours, la douleur reflète l'un des maux du siècle. Les traitements préconisés sont parfois lourds pour les patients, de part de leur effet secondaire et leur côté onéreux. La recherche de composés d'origine végétale dotés de pouvoir analgésique pourrait être intéressante. Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments ayant pour but d'éliminer ou d'atténuer la douleur par action périphérique et/ou centrale, sans provoquer une perte de conscience.

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles pour traiter les maladies. En Algérie, l'utilisation des plantes s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

*Asperula hirsuta* est une plante médicinale. Peu d'études existent sur les activités biologiques de cette plante ; dans ce travail, les activités antioxydante et analgésique des extraits préparés des parties aériennes de la plante sont étudiées *pour la première fois*.

Ce travail est une contribution à :

- Préparation des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Asperula hirsuta*.
- Investigation de la présence ou l'absence des principaux groupes des composés chimiques végétaux dans les extraits.
- 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 piégeage du radical hydroxyle et la chélation de fer.
- Etude de l'activité analgésique des extraits *in vivo* par le test de contorsion dorso-abdominale.

***PARTIE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. LA PLANTE ASPERULA HIRSUTA (DESF.)

### I.1. Généralités

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galénique ou encore sous forme de principes actifs comme matière pour l'obtention de médicaments (Naghibi *et al.*, 2005).

Les Rubiaceae font partie des plus grandes familles de plantes à fleurs, quatrième après les Asteraceae, Fabaceae et Orchidaceae avec un total d'environ 611 genres et 13143 espèces. Dans les régions tempérées, les Rubiaceae ne sont représentées que par un petit nombre de genres herbacés, par exemple, *Galium* et *Asperula*. Ce sont des arbres, des buissons, des lianes ou des plantes herbacées des régions froides, tempérées, subtropicales ou tropicales, elles sont largement répandues dans la zone tropicale. Bien que l'étude taxonomique sur les Rubiaceae soit déjà abordée dans différents pays, leur écologie, leur richesse et leur distribution restent jusqu'à présent mal connues (Jean-Claudel *et al.*, 2014).

Le nom de genre *Asperula* provient du latin asper signifiant rude, allusion aux poils raides présentés par plusieurs espèces. Le nom d'espèce fait référence aux propriétés tinctoriales des racines (Ferrez, 2004). Les aspérules constituent un groupe d'espèces de la famille des Rubiaceae, voisines de la Garance et des Gaillets, comme eux à feuilles groupées en verticilles, mais s'en distinguant par la forme de la fleur, dont la corolle est allongée en petit entonnoir au lieu d'être entièrement étalées étoile. Ce sont des herbes assez grêles, peu élevées, à fleur petites, blanches, rosées ou bleues, à pétales soudés ensemble et surmontant l'ovaire, qui évolue en fruit sec à 2 carpelles (Fournier, 1999).

### I.2. Description botanique

*Asperula hirsuta* est une plante vivace, multicaule, verdâtre ou vert-grisâtre, à tiges (15 à 60cm) dressées avec induction de poils hirsutes au moins sur la partie basale ; feuilles sèches, linéaires, disposées en verticilles de 4 à 6 (basales) et de 6 à 8 (moyennes et supérieures) ; les fleurs tétraèdres, avec la corolle hypotérriforme, blanche ou rose, groupées en inflorescences ramifiées (**figure 1**). *Asperula hirsuta* est abondante dans le Sud de la péninsule ibérique et l'Afrique du nord, à l'exception de l'Égypte. Cette espèce est très commune dans le Tell Algérien et toutes les régions montagneuses (Clamote, 2017).

### I.3. Classification

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 1.** Aspect morphologique d'*Asperula hirsuta*.

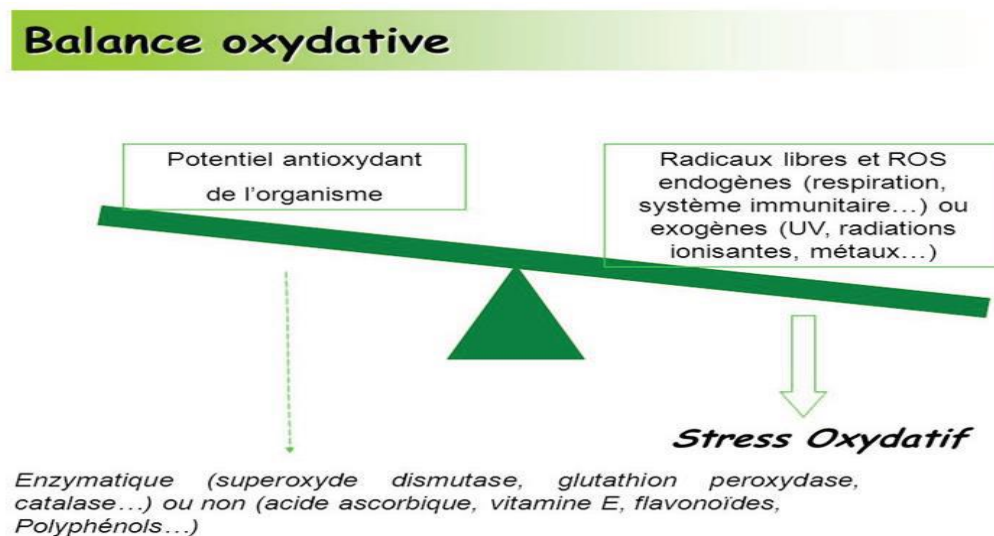
## I.4. Intérêts thérapeutiques

Très peu d'études ont été réalisées dans le but d'évaluer les activités biologiques d'*A. hirsuta*. Cependant plusieurs autres espèces du genre *Asperula* ont été largement étudiées. Certaines espèces d'*Asperula* comme *Asperula odorata* est largement utilisé dans la médecine populaire comme médicament sédatif à la névrose, la neurasthénie, hystérie, dépression, appliquée à une éruption allergique. Elle est également utilisée pour la métrite et la colpite en homéopathie et ainsi comme diurétique, sudorifique et agent cicatrisant, antimicrobien et antifongique (Sergeevna *et al.*, 2015 ; Yurchenko et Kovaleva, 2013).

## II. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

### II.1. Stress oxydatif

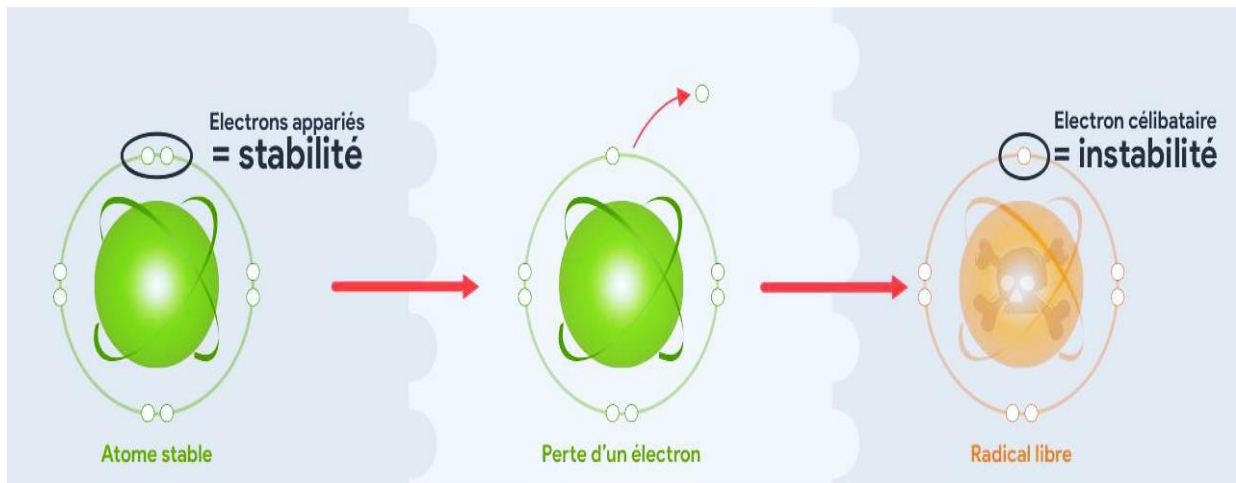
Le stress oxydant ou stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers avec comme conséquence une surproduction de radicaux libres entraînant de nombreux dégâts irréversibles au niveau de la cellule, conduisant à l'apparition des diverses maladies humaines (**figure 2**) (Baudin, 2020).



**Figure 2.** Représentation schématique de la théorie du stress oxydant (Gueye, 2019).

### II.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe et capables d'une vie indépendante. Cette caractéristique les rend instables. Par conséquent ils peuvent soit capter un ou plusieurs électrons (agissant alors comme un oxydant) ou en céder (se comportant comme un réducteur) pour se stabiliser (**figure 3**) (Flieger *et al.*, 2021).



**Figure 3.** Formation des radicaux libre (Ghouti et Halbigue, 2019).

### II.2.1. Principaux radicaux libres

- **L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ )**

Le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme, Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire, qui est réduit selon la réaction suivante (Lacolley *et al.*, 2007).



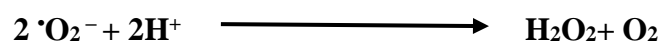
- **Le radical hydroxyle ( $\text{OH}$ )**

Ce radical se forme par la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sous l'action des métaux de transition tels que le fer II ( $\text{Fe}^{2+}$ ) selon la réaction de Fenton (Tuo, 2015).



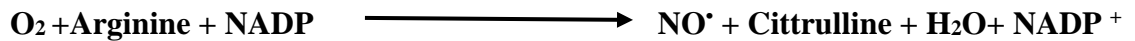
- **Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )**

Deux molécules qui ne sont pas des radicaux libres proprement dits (non radicalaires). L' $\text{H}_2\text{O}_2$  a la capacité de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires. Le ( $^1\text{O}_2$ ) est une forme excitée d'oxygène, hautement oxydative (Hadi, 2004).



- **Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)**

Il se forme par l'oxydation de l'un des atomes N-terminaux de la L- arginine. La réaction est catalysée par le nitrique oxyde synthétase (NOS) (Tuo, 2015).



## II.2.2. Principales sources de production des radicaux libres

### A) Sources endogènes

Parmi les réactions enzymatiques, plusieurs sont considérées comme source principale des espèces réactives d'oxygène (ROS) incluant : NADPH oxydase, lipoxygénase et la xanthine oxydase (enzyme dans le foie). La mitochondrie est un élément fondamental pour le fonctionnement de la cellule, c'est au niveau de cet organite que s'effectue la respiration cellulaire. La consommation de l'oxygène et les différentes réactions du transfert des électrons (énergie) produisent en performance les ROS. Les ions métalliques présents dans l'organisme ex ; fer cuivre, peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles (**figure 4**) (Poprac *et al.*, 2017).

### B) Sources exogènes

Les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou certains médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense ainsi que le tabagisme (Kalam *et al.*, 2015).

## II.3. Oxydation des macromolécules

### II.3.1. Oxydation des protéines

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (fragmentation, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Cette modification est un facteur de risque de plusieurs maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la cataracte et la maladie de Parkinson (Bouziane, 2018).

### II.3.2. Peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides est considérée comme le processus d'oxydation des macromolécules le plus dommageable connu pour tous les organismes vivants, elle est déclenchée par les lipoxygénases (LOX) ou les espèces réactives de l'oxygène (Marok, 2014). La réaction

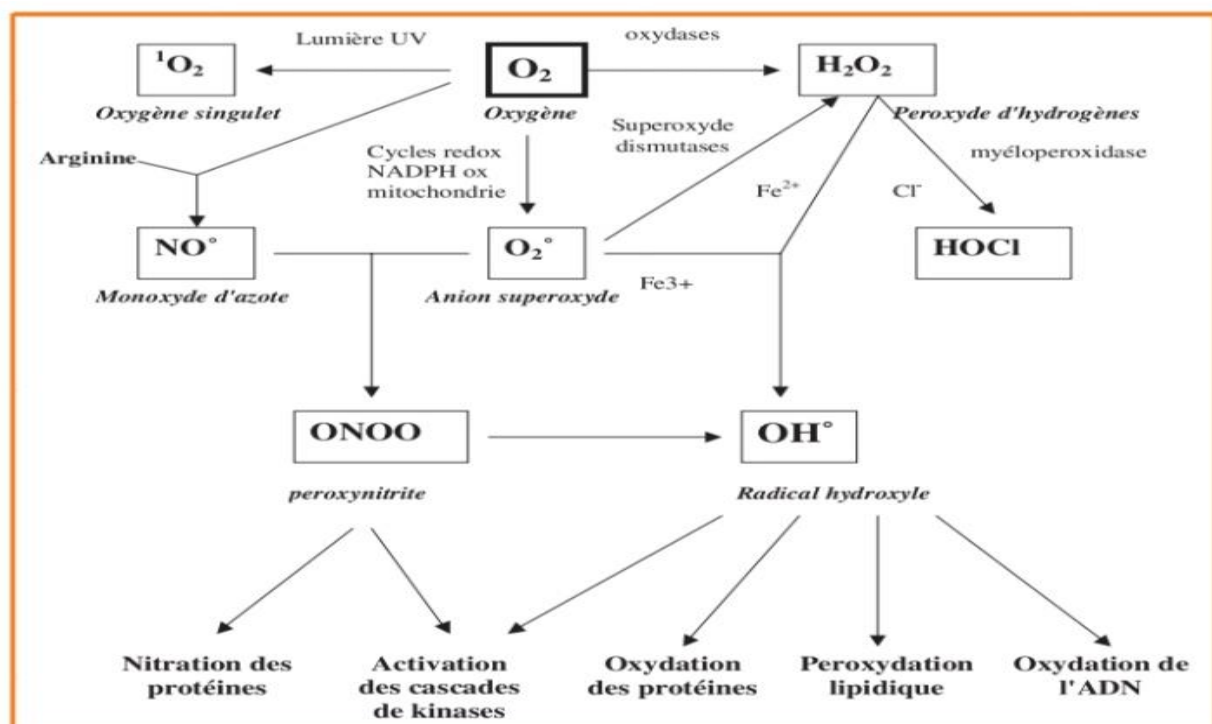
incontrôlée des ROS avec les lipides membranaires conduit à une génération innombrable de radicaux libres produits dans une réaction en chaîne, qui provoque la détérioration des membranes (Kardeh *et al.*, 2014).

### II.3.3. Oxydation de l'ADN

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories, modifications des bases, cassures simples ou doubles de la chaîne d'ADN et pontages avec des protéines. Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (léthalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et aussi dans le vieillissement cellulaire (Bouziane, 2018).

### II.3.4. Oxydation des glucides

Les ROS peuvent notamment attaquer les polysaccharides. En présence des ions métalliques le glucose peut s'oxyder provoquant la libération des cétoaldéhydes, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical OH qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).



**Figure 4.** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

## II.4. Pathologies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies comme l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, le cancer, la cataracte, le sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'œdème pulmonaire et l'Alzheimer (Pincemail *et al.*, 2002).

## II.5. Antioxydants

Les antioxydants sont des composés (naturels ou synthétiques), qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et protéger le système cellulaire contre les effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive (Bouziane, 2018).

### II.5.1. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux grands types selon leur source, c'est-à-dire les antioxydants naturels et synthétiques.

#### II.5.1.1. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont soit synthétisés dans le corps humain par le métabolisme d'autres sources naturelles, Ceci peut être divisé en deux catégories, c-à-d, antioxydants enzymatiques et antioxydant non enzymatique.

##### II.5.1.1.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont uniquement produits dans le corps humain et peuvent être subdivisés en antioxydants primaires et secondaires (**figure 5**).

#### A) Antioxydants primaires

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères. Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, une forme mitochondriale associée au manganèse et une forme extracellulaire. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (Valko *et al.*, 2007).

- **Catalase**

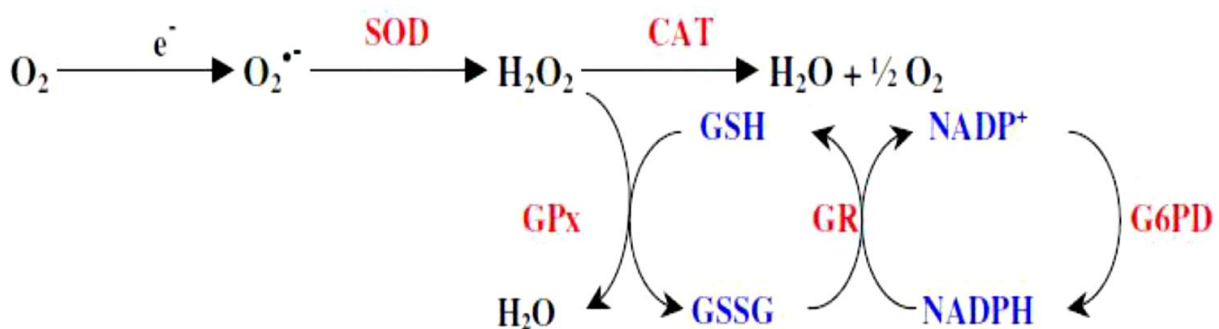
Cette enzyme est responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques. Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Chakraborty *et al.* 2009).

- **Glutathion peroxydase (GPx)**

Les glutathions peroxydases catalysent l'oxydation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion (GSH) sont oxydées en GSSG (Misra *et al.*,2014).

### B) Antioxydants secondaires

L'antioxydant secondaire comprenant la glutathion réductase (GR) et le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Ce dernier génère du NADPH. Le GR est nécessaire pour recycler la réduction du glutathion (GSH) à l'aide de l'enzyme secondaire GR et NADPH.



**Figure 5.** Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives (Kanoun, 2011).

#### II.5.1.1.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont généralement des micronutriments apportés par notre régime alimentaire. On peut citer :

- **Acide urique :** Produit par la xanthine oxydase et participe aux défenses antioxydantes à un taux de 60 % due à sa forte concentration et distribution, il interagit avec 10 à 15 % des radicaux hydroxyles produit quotidiennement, et piège les radicaux peroxydes et l'oxygène singulet, à des fortes concentrations il devient prooxydant (Boukerreche et Zellagui, 2019).
- **Bilirubine :** c'est un produit final du catabolisme hémique. Elle est considérée comme le meilleur antioxydant contre la peroxydation des lipides (Misra *et al.*, 2014).

- **Glutathion (GSH) :** Le glutathion est un peptide contenant la cystéine. Il est synthétisé dans les cellules à partir des constituants en acides aminés. Les propriétés antioxydantes du glutathion sont dues à la présence de la fonction thiol dans son fragment cystéine (Halliwell et Gutteridge, 2007).
- **Acide ascorbique (vitamine C) :** La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. C'est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène. Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les  $\alpha$ -tocophérol (Boubekri, 2014).
- **Vitamine E :** C'est une vitamine liposoluble qui existe dans huit différentes formes et possèdent des propriétés antioxydantes. La fonction principale de la vitamine E est la protection de la cellule contre la peroxydation lipidique.
- **Les oligoéléments :** Ce sont les micronutriments tels que (Fe, Cu, Se, Zn), ils contribuent au renforcement des systèmes de défenses en tant que cofacteurs essentiels des systèmes antioxydants enzymatiques. (Tuo, 2015)

### *II.5.1.2. Antioxydants synthétiques*

Les antioxydants synthétiques sont produits artificiellement ou synthétisés à l'aide de diverses techniques (Hamid *et al.*, 2010). Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), et les esters de l'acide gallique sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes. De plus, dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées pour les gallates, le BHA et le BHT. Enfin, des réactions allergiques (de type urticaire) ont été observées chez certains sujets sensibles au BHA et BHT. A ce jour, aucun texte ne mentionne ni ne règlemente l'utilisation de tels antioxydants (Zerargui, 2018).

### **II.5.2. Antioxydants d'origine végétale**

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydantes remarquables. Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les polyphénols (Ferradji,

2018). Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires. Ils sont très largement représentés dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives. Ils sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs. Notre comportement alimentaire joue un rôle important dans la faculté de l'organisme à lutter contre les effets néfastes du stress oxydant (Desmier, 2016).

### **III. Activité analgésique**

#### **III.1. Douleur**

La douleur est une fonction vitale du système nerveux en fournissant au corps un avertissement de blessure potentielle ou réelle (Reddi *et al.*, 2013). L'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) a défini la douleur comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des dommages aux tissus réels ou potentiels, ou décrits en termes de tels dommages (Das, 2015).

#### **III.2. Classifications de la douleur**

La douleur est multimodale, on peut donc en distinguer plusieurs types et proposer différentes classifications :

##### **III.2.1. Douleur aiguë et douleur chronique**

On peut classer la douleur selon son évolution dans le temps :

###### **A) Douleur aiguë**

La douleur aiguë est un signal d'alarme pour l'organisme. Elle est d'apparition brutale et signale une lésion tissulaire résultant d'un traumatisme (rupture, brûlure, distension...) qui est généralement associée à un phénomène inflammatoire aiguë (Abdi *et al.*, 2020).

###### **B) Douleur chronique**

Une douleur chronique est une douleur qui a une durée d'évolution de plus de 3 mois. Elle persiste et devient rebelle aux antalgiques usuels ; elle représente pour le patient l'essentiel de sa maladie avec un fort retentissement psychologique et social (Laroche, 2014). La douleur chronique n'est pas la conséquence exclusive et directe d'une lésion ou d'une inflammation mais résulte d'une activité inappropriée du système neurosensoriel (Abdi *et al.*, 2020).

### **III.2.2. Douleurs nociceptives, inflammatoires et neurogènes**

D'un point de vue neurobiologique, il existe trois types de douleur qui diffèrent selon leur étiologie et leur mécanisme respectifs, mais qui peuvent coexister.

#### **A) Douleur nociceptive**

Les nocicepteurs sont les récepteurs sensoriels spécialisés responsables de la détection de stimuli nocifs (désagréables). Distribué dans tout le corps (peau, viscères, muscles, articulations, méninges), ils peuvent être stimulés par des moyens mécaniques, thermiques ou chimiques (Reddi *et al.*, 2013). Pour affiner la distinction entre la douleur nociceptive et la douleur neuropathique, l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) a redéfini la douleur neuropathique comme douleur découlant directement d'une lésion ou d'une maladie du système somatosensoriel (Cesa *et al.*, 2015).

#### **B) Douleur neuropathique**

L'IASP a défini la douleur neuropathique comme étant « Douleur causée par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux » (Das, 2015). La douleur neuropathique est causée par des dommages à nerfs du système nerveux central ou périphérique. Les dommages peuvent être causés par un nombre des mécanismes, y compris le traumatisme ou la chirurgie, diabète sucré, chimiothérapie, radiothérapie, ischémie, infection ou malignité (Reddi *et al.*, 2013).

#### **C) Douleur inflammatoire**

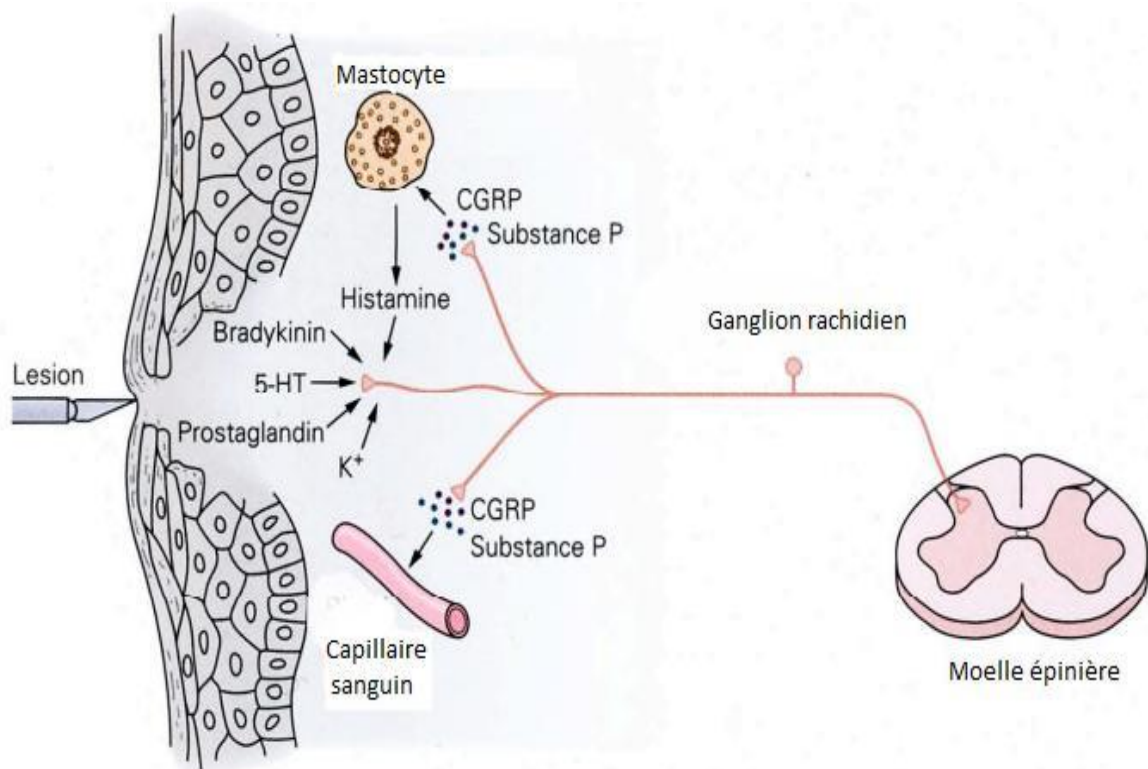
La douleur inflammatoire est l'hypersensibilité spontanée à la douleur qui survient en réponse à une lésion tissulaire et à une inflammation (p. ex., douleur postopératoire, traumatisme, arthrite) (Firestein *et al.*, 2012). La douleur inflammatoire est causée par des conditions associées à une lésion tissulaire directe (entraînant la libération du contenu intracellulaire des cellules lésées) ou indirecte (suite à la libération de médiateurs inflammatoires à partir de cellules immunes). Au cours de l'inflammation, les fibres afférentes sensorielles sont sensibilisées par des médiateurs inflammatoires cellulaires et humoraux tels que la bradykinine (BK), l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les interleukines, l'ATP et les eicosanoïdes (Myers *et al.*, 2006).

### **III.3. Mécanisme et chemin de la douleur**

Les stimulations thermiques et mécaniques activent directement les nocicepteurs. Les lésions traumatiques, inflammatoires ou ischémiques vont provoquer la libération par les tissus lésés de substances chimiques. Ces substances pourront, soit activer directement les nocicepteurs et sont dites allogènes (bradykinines, ions potassium, hydrogène, oxyde nitrique, histamine et sérotonine) soit sensibiliser les nocicepteurs à d'autres stimuli (Rabaud *et al.*, 2013). Les prostaglandines et les

leucotriènes, jouent un rôle de sensibilisateurs des nocicepteurs agissant sur d'autres substances tel que les peptides impliqués dans la transmission du message douloureux. La substance P est la plus connue comme neuropeptide (neurotransmetteur) et qui joue un rôle primordial dans la nociception et a une action vasodilatatrice. Il existe d'autres neuropeptides tel que le peptide associé au gène de la calcitonine (CGRP) et la neurokine (Rabaud *et al.*, 2013).

Le chemin de la douleur emprunte celui du réseau neuronal nociceptif, au travers de la moelle épinière et vers le cerveau (**figure 6**). La douleur est détectée par des récepteurs du nociception qui transforment le stimulus en influx nerveux douloureux. L'information détectée par les nocicepteurs est ensuite relayée par des fibres nerveuses qui arrivent au niveau de la moelle épinière par les racines dorsales puis à partir de la substance grise, le message électrique est transmis par les synapses, à un deuxième neurone qui est le neurone spinothalamique. Ce neurone chemine dans la substance blanche de la moelle épinière jusqu'au thalamus. L'influx nerveux parvient au cerveau par le thalamus et le cortex cérébral, où l'information est intégrée, ce qui engendre la localisation de la douleur (Gaillard, 2014).



**Figure 6.** Stimulation des nocicepteurs par les allergènes (Rabaud *et al.*, 2013).

### III.4. Antalgiques

Les analgésiques sont des médicaments qui éliminent ou atténuent la sensation de douleur qui accompagne de nombreux états pathologiques. Il est difficile d'énumérer toutes les situations dans lesquelles il est nécessaire d'utiliser des analgésiques. Les situations comprennent, par exemple, des douleurs musculaires et des maux de tête, pour lesquels on utilise habituellement des analgésiques de type aspirine, et lorsqu'il n'y a aucune possibilité de devenir dépendant. La douleur, plus intense durant et après l'intervention chirurgicale, est soulagée en utilisant des analgésiques opioïdes, comme la morphine et la mépéridine (Rogar, 2008).

### III.5. Mécanisme d'action des substances analgésiques

La douleur est une sensation indésirable, c'est pour cela on observe la présence d'une variété assez importante des analgésiques dans le marché pharmaceutique.

#### A) Anti-inflammatoire non stéroïdien drogues

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont parmi les médicaments les plus prescrits dans l'inflammation et la douleur musculo-squelettique. Ce groupe de médicaments comprend les AINS conventionnels et les inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase COX-2 (Capriz *et al.*, 2017). La production de prostaglandine est catalysée par l'enzyme cyclooxygénase (COX), qui existe en deux formes. COX-1 est la forme constitutive et se trouve dans de nombreux tissus. Il a fonctions, y compris la protection des muqueuses gastriques et la fonction plaquettaire. Inhibition de la COX par des anti-inflammatoires non stéroïdiens réduit la production de prostaglandine et, par conséquent, réduit l'activation et la sensibilisation des nocicepteurs et donc la douleur inflammatoire (Reddi *et al.*, 2013).

#### B) Paracétamol

Le paracétamol est un métabolite actif de la phénacétine. Il est de loin l'antalgique le plus utilisé à travers le monde. Il a une action analgésique et antipyrétique. Bien que découvert il y a plus de 100 ans et utilisé intensément depuis environ 50 ans, son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé. Il pourrait agir de différentes manières : comme inhibiteur de la synthèse de prostaglandines, comme bloqueur de la synthèse du monoxyde d'azote ou en renforçant le système sérotoninergique par l'intermédiaire d'un récepteur endo-cannabinoïde (CB1) (Bourquin *et al.*, 2008).

### **C) Opiïdes**

Les opioïdes réduisent la transmission de la douleur au corne dorsale en inhibant la libération de neurotransmetteurs excitateurs. Ils agissent dans la matière grise périaqueducale par augmentation de l'inhibition descendante. Les effets secondaires courants des opioïdes comprennent : dépression respiratoire, constipation, nausées et sédation (Reddi *et al.*, 2013). L'effet pharmacologique des opioïdes passe par des récepteurs spécifiques distribués à travers le système nerveux central et périphérique et dans le tractus gastrointestinal (Bourquin *et al.*, 2008).

### **D) Anesthésie locale**

Anesthésiques locaux (p. ex., bupivacaïne et lidocaïne) se lient de façon réversible aux canaux sodiques dans le neurone et prévient le sodium pendant la dépolarisation. Cela signifie ce seuil potentiel n'est pas atteint et la propagation potentielle de l'action est évitée. L'anesthésie locale agit sur les fibres motrices et autonomes, en plus des fibres sensorielles, et donc aussi causer une faiblesse motrice et changements autonomes. Des concentrations plasmatiques élevées d'anesthésiques locaux peuvent causer une toxicité grave pour le système nerveux central (SNC) et le système cardiovasculaire (Reddi *et al.*, 2013).

### **E) Antidépresseurs**

Ce sont des médicaments appartiennent à une catégorie d'une importance considérable en psychiatrie, ayant des propriétés psychotropes très puissantes et dont la découverte et l'emploi sont relativement récents. Leur entrée dans l'arsenal de la chimiothérapie a transformé le pronostic de certaines affections psychiatriques (Donnat et Boumeuf, 2006). La plupart des antidépresseurs possèdent un effet, soit de provoquer une augmentation de la disponibilité synaptique des neurotransmetteurs monoaminergiques suivants : la norépinéphrine (NE), la sérotonine (5-HT) et/ou la dopamine (DA). Ces agents fonctionnent soit en inhibant la recapture des neurotransmetteurs, soit en inhibant les enzymes responsables du catabolisme des neurotransmetteurs, soit en enlevant le tonus inhibiteur exercé sur le relâchement des neurotransmetteurs ou sur l'activité neuronale (Gardier, 2005).

### **F) Analgésie multimodale**

L'analgésie multimodale (AMM) repose sur l'association de deux ou plusieurs produits ou techniques analgésiques pour améliorer la qualité d'analgésie et/ou diminuer l'incidence de leurs effets collatéraux. Ces produits ou techniques analgésiques agissent au niveau de sites d'action différents et complémentaires, à l'origine d'interactions additives voire synergiques (Perdreau et Joudet, 2015).

### **III.6. Analgésiques d'origine végétale**

En médecine traditionnelle, il y a toujours une recherche soigneuse de la cause. La douleur étant avant considérée comme un symptôme, son traitement peut faire appel à une action curative de la cause de la douleur ou à un antalgique. Il est donc important face à un tradithérapeute de déterminer si le traitement soulage la douleur en elle-même ou également la cause. La douleur est donc une notion difficile à aborder avec un tradithérapeute. Il faut souvent poser de multiples questions sur les symptômes généralement ressentis par les patients avant et après le traitement pour vérifier que le traitement agit bien contre la douleur uniquement. Cependant, de nombreuses plantes sont utilisées traditionnellement pour soulager sélectivement les douleurs des patients (Lalleman, 2014).

***PARTIE***  
***EXPERIMENTALE***

## MATERIELS ET METHODES

### I. Matériel

#### I.1. Matériel végétal

La plante *Asperula hirsuta* a été récoltée dans son habitat naturel dans la région de Beni Outilane, au Nord-Ouest de Sétif, durant le mois de juin 2019. L'identification botanique de la plante a été faite par Dr. Djamel Sarri, Faculté des Sciences, Université de M'sila. Les parties aériennes de la plante ont été séchées à l'ombre et à température ambiante puis réduites en poudre et stockées à l'abri de la lumière en vue de leur analyse.

#### I.2. Matériel animal

Des souris *Swiss albinos* (NMRI) femelles, de poids variant entre 25 et 29 g ont été utilisées dans cette étude. Ces animaux ont été procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Des groupes comportant 8 souris ont été hébergés dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à une alimentation standard fournie par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Béjaïa. Les animaux sont adaptés pendant 7 jours avant leur utilisation.

#### I.3. Produits et réactifs

Les réactifs chimiques utilisés sont : acide acétique, acide ascorbique, acide chlorhydrique (HCl), acide gallique, acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), aspirine, carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>), chlorure ferreux (FeCl<sub>2</sub>), (FeCl<sub>3</sub>), EDTA, ferrosine, sulfate du fer (FeSO<sub>4</sub>), hydroxyde de sodium (NaOH), quercétine, réactif de Folin-Ciocalteu, salicylate de sodium, proviennent de Sigma-Aldrich (Allemagne). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Merck (Allemagne). Les solvants sont de garde analytique et proviennent de Sigma (Allemagne).

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des extraits aqueux et méthanolique

Une quantité de 50g de poudre de la partie aériennes d'*Asperula hirsuta* est mise à une macération dans 500 mL méthanol/eau (7 :3, V/V) sous agitation pendant 24h à température ambiante. L'extrait obtenue est filtré puis évaporé sous pression réduite à sec (45°C) dans un rotavapeur (Büchi Rota vapeur R-200). La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brun foncé qui est conservée à -32°C jusqu'à son utilisation. Cet extrait méthanolique est préparé selon la méthode de Krimat *et al.* (2017).

L'extrait aqueux d'*Asperula hirsuta* est préparé selon la méthode de ksmi *et al.* (2017). 50g de la matière végétale (poudre de la partie aériennes d'*Asperula hirsuta*) est mis à bouillir dans 500 mL d'eau distillée pendant 20 à 30 min. Après filtration, l'extrait récupéré et 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. Etude phytochimique

Pour investiguer la présence ou l'absence des principales familles des composés chimiques dans les extraits étudiés, on a utilisé des tests simples selon la méthode décrite par Sunil *et al.* (2012).

- **Mise en évidence des flavonoïdes**

On ajoute quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué à 1 mL d'extrait (4 mg/mL). L'apparition d'une couleur jaune intense puis sa disparition à l'addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) dilué indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

- **Mise en évidence des tanins**

Pour tester la présence des tannins, on met dans un tube à essai 1 mL d'extrait (concentration 4mg/mL) plus quelques gouttes de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) 0.1%. La présence des tannins est indiquée par la formation d'un précipité noir bleuâtre ou noir verdâtre.

- **Mise en évidence des quinones**

Dans un tube à essai on met 500  $\mu\text{L}$  d'extrait de concentration 4 mg/mL et 500  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de quinones.

- **Mise en évidence des terpénoïdes**

Un millilitre de chaque extrait (4mg/mL) est mélangé avec 0.5 mL de chloroforme. Puis, 0,75 mL d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) sont ajoutés doucement. La formation d'un anneau brun rougeâtre à l'interface indique la présence des terpénoïdes.

- **Mise en évidence des saponines**

À 500  $\mu\text{L}$  d'extrait (4mg/mL) sont ajoutés 3 mL d'eau distillée et agités vigoureusement pendant 15 minutes. La formation d'une couche stable de mousse indique la présence des saponines.

- **Mise en évidence des polyphénols**

Deux millilitres d'extraits (4mg/mL) est mélangé avec une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 %. L'obtention d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique une réaction positive (Tuo, 2015).

- **Mise en évidence des protéines**

Ce test est basé sur la réaction de la ninhydrine. Brièvement, à 5 mL de chaque extrait méthanolique et aqueux sont ajoutés 2 gouttes de ninhydrine 0.2%, le mélange est agité puis mis à ébullition pendant 1 à 2 minutes. La formation d'une couleur bleue est indicative de la présence des acides aminés, peptides ou protéines (Khan *et al.*, 2011).

### **II.3. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en phénols totaux des extraits d'*Asperula hirsuta* est déterminé selon la méthode de Delgado *et al.* (2019). Cette méthode est basée sur l'oxydation des phénols par le Folin-Ciocalteu. En entraîne un mélange de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) et l'oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ), lors de l'oxydation des phénols. Après 4 min de la version d'un volume de  $100\mu\text{L}$  des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à  $500\mu\text{L}$  de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) ;  $400\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%) sont additionnés. L'ensemble est incubé pendant 1h30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été ensuite mesurée à 765nm. L'acide gallique (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des phénols totaux est calculé. Le contenu phénolique total a été exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/ mg d'extrait).

### **II.4. Dosage des flavonoïdes**

Les flavonoïdes totaux ont été évalués à l'aide d'un test colorimétrique selon le protocole de Makusa et Ningsih (2020). En effet les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $\text{Al}^{+3}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait. Brièvement, 1 mL de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1 mL de la solution de l'extrait à différentes concentrations préparées dans le méthanol, le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min. La lecture des absorbantes est mesurée à 430 nm en utilisant un spectrométrie UV visible. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait).

## II.5. Etude de l'activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta*

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta* est effectuée par deux tests différents : piégeage du radical hydroxyle et la chélation de fer.

### II.5.1. Piégeage du radical hydroxyle

L'activité de piégeage du radical hydroxyle des extraits est mesurée selon la méthode de Sharma *et al.*, (2013). Pratiquement, 200 µL de différentes concentrations des extraits d'*A. hirsuta* ou l'acide ascorbique (standard) sont ajoutés à 1 mL de FeSO<sub>4</sub> (1.5 mM) et 750 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM). Après 5 min d'incubation, 300 µL de salicylate de sodium (20 mM) sont additionnées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 1 h à température ambiante, et l'absorbance est mesurée à 562 nm. Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

**A<sub>0</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>1</sub>** : absorbance du test.

**A<sub>2</sub>** : absorbance du test (sans salicylate de sodium).

### II.5.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits méthanolique et aqueux a été évaluée selon la méthode décrite par Le *et al.*, (2007). Un volume de 700 µL de solutions d'extraits à différentes concentrations (5-200 µg) est mélangé avec 50 µL de FeCl<sub>2</sub> (0.6 mM). Après 5 min d'incubation, 50 µL de ferrozine (5 mM) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir à température ambiante pendant 10 min, le temps nécessaire à la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrosine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence. La lecture est effectuée contre un blanc de méthanol.

L'activité chélatrice des extraits étudiés est exprimée en pourcentage et calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle à 562 nm.

**A<sub>t</sub>** : Absorbance de l'échantillon à 562 nm.

## II.6. Etude de l'activité analgésique des extraits d'*Asperula hirsuta*

L'évaluation de l'activité analgésique des extraits d'*Asperula hirsuta* est effectuée par le test de contorsion dorso-abdominale (test de torsion).

### II.6.1. Test de contorsion dorso-abdominale (Test de torsion)

L'activité antalgique vis à vis de la douleur provoquée par l'acide acétique est évaluée selon la méthode décrite par Koster *et al.* (1959). Les souris sont réparties en lots de 6 souris. Le premier lot est utilisé comme témoin et reçoit par voie orale du NaCl physiologique (10 mL/kg) et les autres lots reçoivent par voie orale une dose unique de 200 mg ou 100 mg/kg d'aspirine comme référence (**figure 7**).



**Figure 7.** Prétraitement orale des souris.

Un volume de 10 mL/kg d'acide acétique à 0.6 % est ensuite injecté par voie intrapéritonéale (**figure 8**). Le syndrome douloureux caractérisé par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsions de la musculature dorso-abdominale a été suivi en comptant le nombre de torsions pour chaque souris chaque 5 minutes au cours des 30 minutes après l'injection de l'acide acétique.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur. La moyenne des inhibitions des groupes traités par les extraits et l'aspirine a été comparée avec celle du groupe témoin. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Mc} - \text{Mt} / \text{Mc}) \times 100$$

**Mc** : moyenne du nombre de contorsions des souris du l t contrôle non traité.

**Mt** : moyenne du nombre de contorsion des souris du l t traité.



**Figure 8.** Injection intrapéritonéale de l'acide acétique.

## **II.7. Analyses statistiques**

Le logiciel utilisé pour l'étude statistique est Graph Pad Prism 9.3.1. Les résultats des tests antioxydants effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les valeurs des IC<sub>50</sub> sont calculées à partir de la courbe [% inhibition =  $f(\text{concentrations})$ ]. Les résultats de test analgésique sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA uni varié suivi du test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Résultats

#### I.1. Rendements des extractions

Les extraits obtenus ont l'aspect d'une poudre fine de couleur brune foncé. Les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal. La méthode de macération utilisée pour préparer l'extrait méthanolique a donné un rendement de 20,07 % d'un poids total égale à 50 g de poudre de la partie aérienne de la plante. La décoction utilisée pour préparer l'extrait aqueux a donné un rendement de 20,98% d'un poids total égale à 50 g de poudre de la partie aérienne de la plante.

#### I.2. Etude phytochimique

Le screening phytochimique consiste à détecter les différentes familles de composés existant dans la partie aérienne d'*Asperula hirsuta* par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitations ou de colorations par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 1**. Les résultats des études phytochimiques effectuées sur les extraits d'*Asperula hirsuta* présentent quelques métabolites secondaires (Tanins, Flavonoïdes, Polyphénols, Terpénoïdes, Saponines et Quinones).

**Tableau 1** : Résultat des tests phytochimique de quelques métabolites secondaires des extraits d'*Asperula hirsuta*.

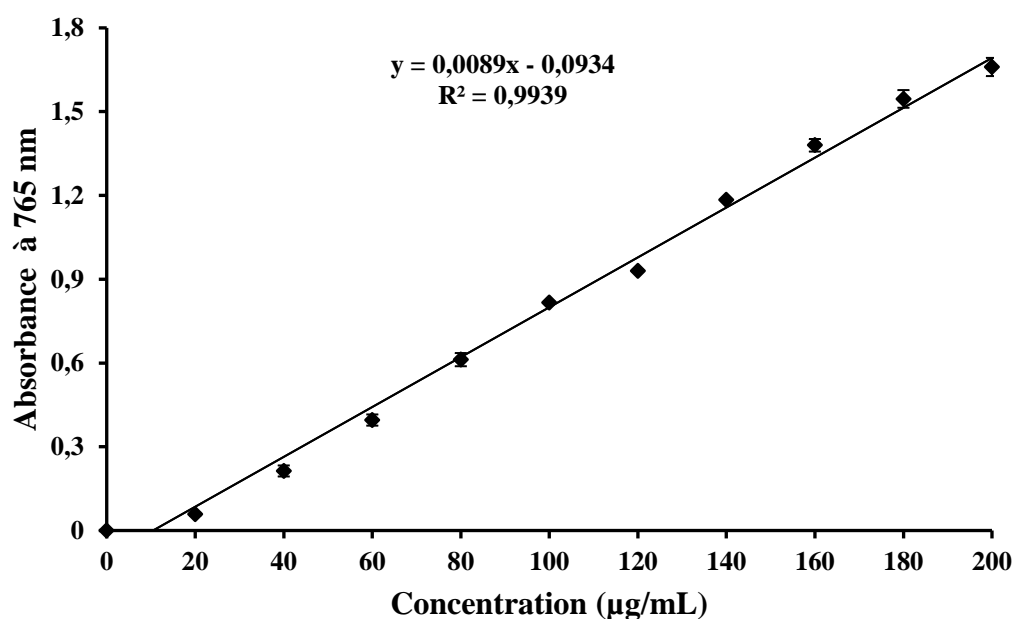
Groupes chimiques	E.Aq	E.Met
Polyphénols	++	+
Flavonoïdes	+	+
Tanins	++	++
Alcaloïdes	-	-
Quinones	+++	++
Saponines	+	++
Terpénoïde	+	+
Protéines	-	-

(-) Absent ; (+) présent ; (++) présent avec une concentration modérée ; (+++) présent avec une forte concentration.

### I.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

#### I.3.1. Dosage des polyphénols

On peut représenter la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 9**) en prenant la concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en fonction de l'absorbance, le coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9939$ .



**Figure 9.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ( $y = 0,0089x - 0,0934$ ). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme de l'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les extraits aqueux et méthanolique (**tableau 2**).

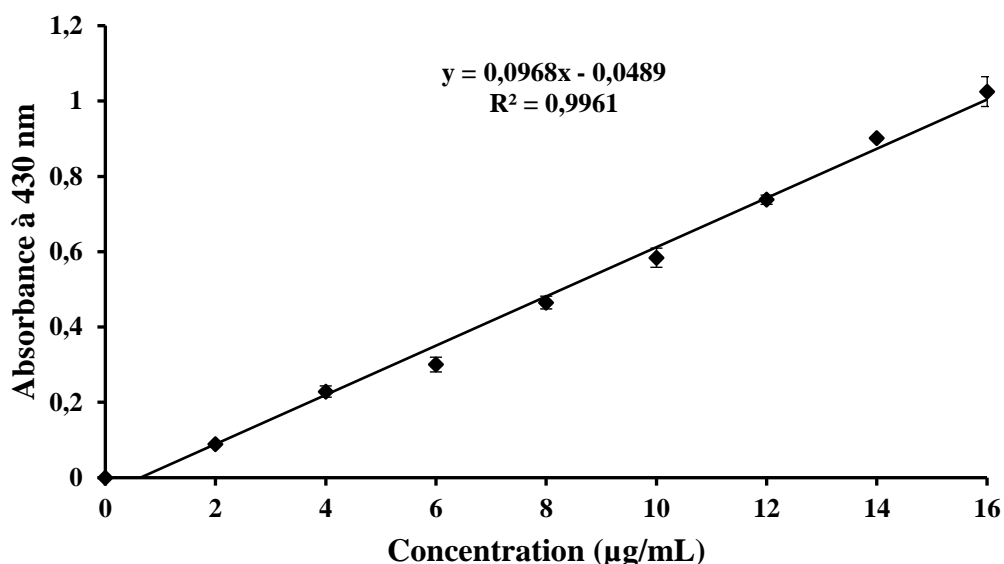
**Tableau 2 :** Teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta*.

Polyphénols	E.Aq	E.Met
( $\mu\text{g}$ d'équivalent d'acide gallique/ mg d'extrait)	$107,65 \pm 2,07$	$145,93 \pm 8,14$

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

### I.3.2. Dosage des flavonoïdes

On peut représenter la courbe d'étalonnage de la quercétine (**figure 10**) en prenant la concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en fonction de l'absorbance, le coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9961$ .



**Figure 10.** Droite d'étalonnage de la quercétine.

Les concentrations des flavonoïdes sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine ( $y = 0,0968x - 0,0489$ ). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par un milligramme de l'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des flavonoïdes contenus dans les extraits aqueux et méthanolique (**tableau 3**).

**Tableau 3 :** Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta*.

Flavonoïdes	E.Aq	E.Met
( $\mu\text{g}$ d'équivalent de quercétine/mg d'extrait)	$9,86 \pm 0,32$	$15,72 \pm 0,34$

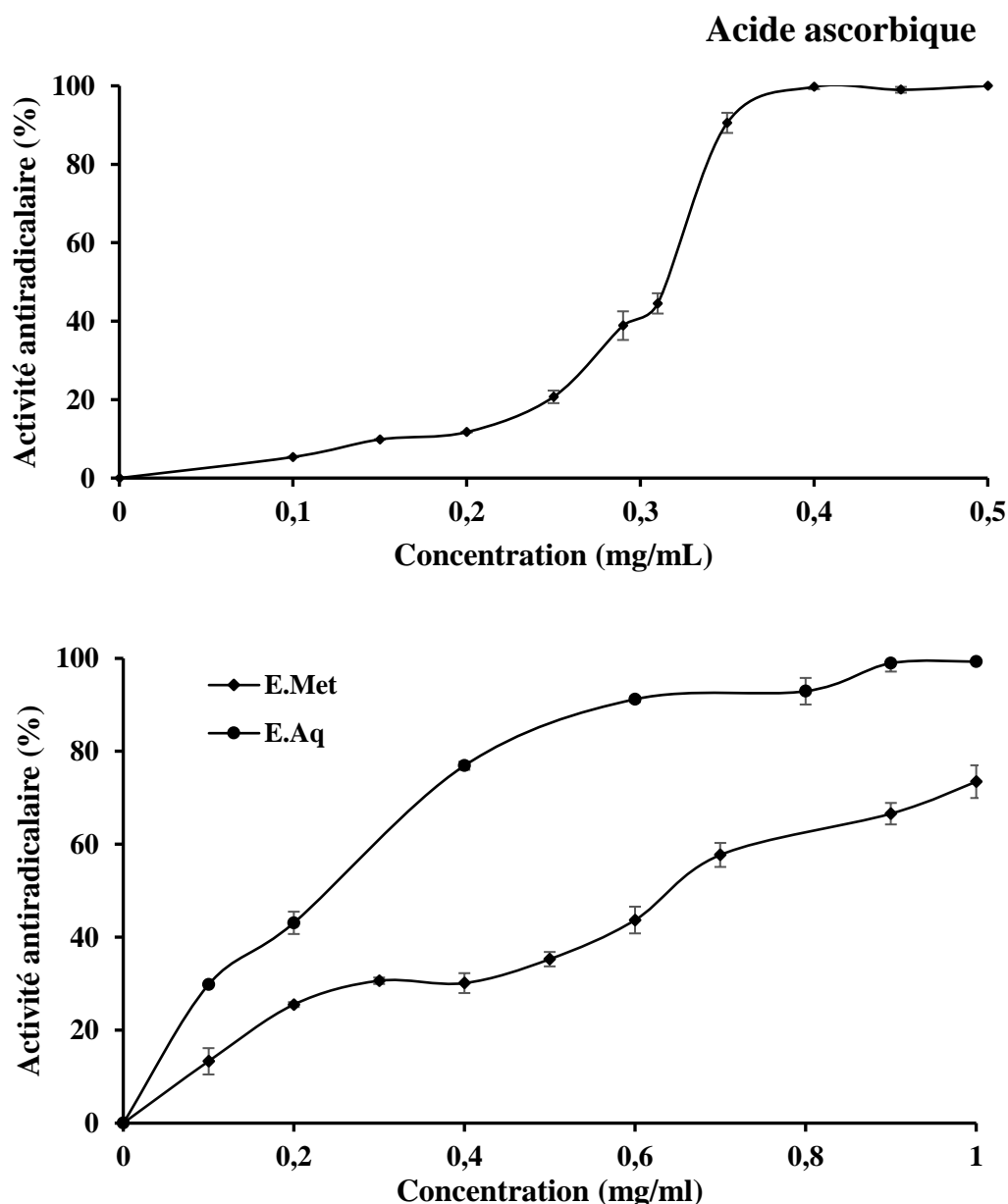
Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

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

## I.4. Activité antioxydante des extraits d'*Asperula hirsuta*

### I.4.1. Piégeage du radical hydroxyle

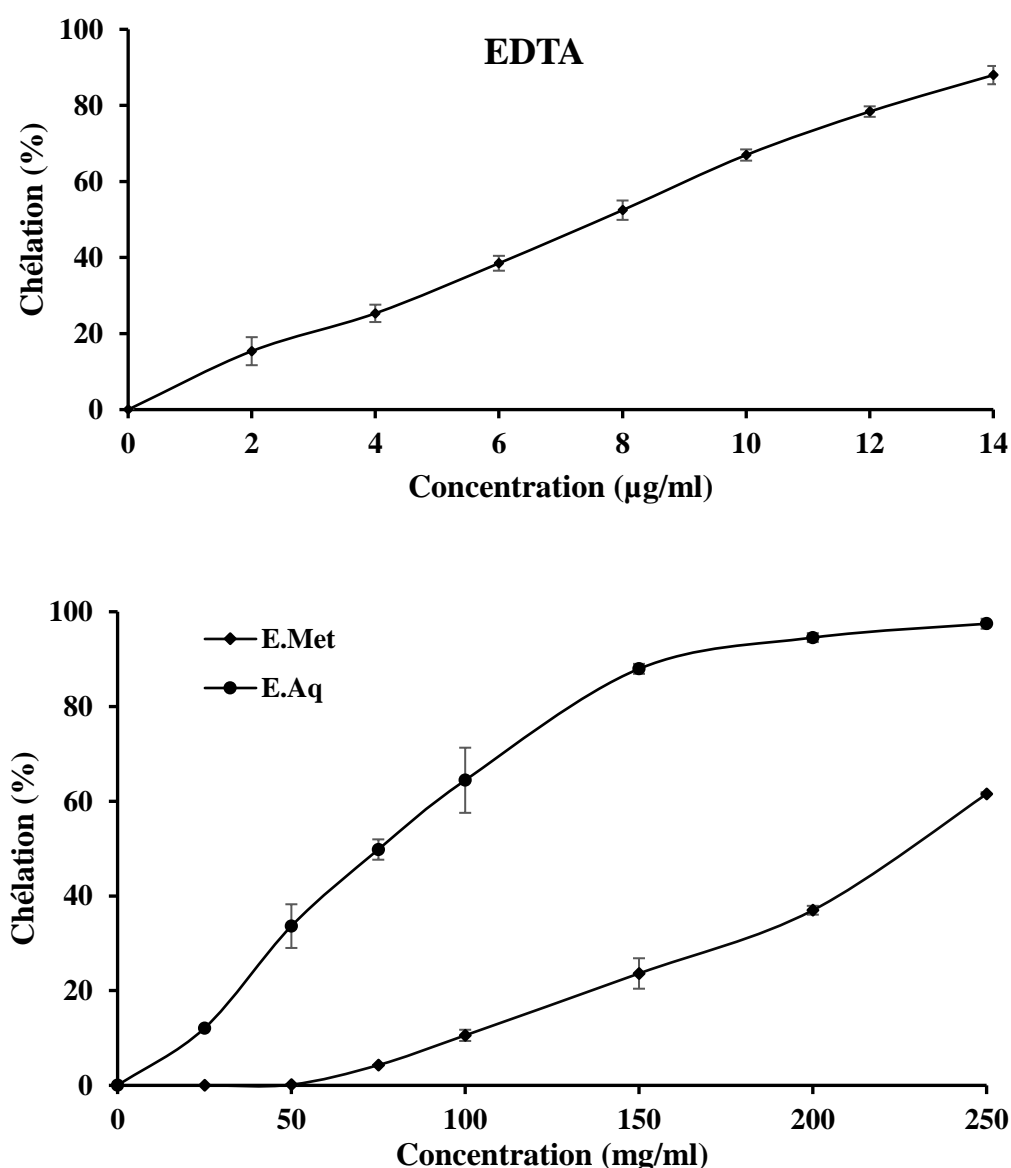
Les résultats obtenus montrent que les deux extraits d'*Asperula hirsuta* piègent le radical hydroxyle d'une manière concentration dépendante (**figure 11**). L'extrait aqueux présente une  $IC_{50}$  de  $232,58 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$  qui correspond à une capacité de piégeage plus efficace par rapport à celle de l'acide ascorbique ( $IC_{50} = 305,45 \pm 8,85 \mu\text{g/mL}$ ) suivie par l'extrait méthanolique ( $IC_{50} = 631,58 \pm 21,28 \mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 11.** Effet piègeur du radical hydroxyle par l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) d'*A. hirsuta* et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

### I.4.2. Chélation de fer

Les effets chélateurs envers les ions ferreux des 2 extraits d'*Asperula hirsuta* sont statistiquement significatifs ( $p < 0.01$ ) et sont concentration dépendants (**figure 13**). A 250  $\mu\text{g/mL}$ , l'E.Aq a montré un effet chélateur plus important (97%) que celui obtenu par l'E. Met (86%). L'EDTA utilisé comme chélateur de référence a exercé une chélation maximale de 88% à la concentration de 14 $\mu\text{g/ml}$ . Le **tableau 4** montre les valeurs d' $\text{EC}_{50}$  obtenues avec l'E.Aq, l'E.Met d'*Asperula hirsuta* et l'EDTA.



**Figure 13.** Activité chélatrice des extraits aqueux (**E. Aq**) et métanolique (**E. Met**) d'*Asperula hirsuta* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD.

**Tableau 4 :** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*A. hirsuta* et d'EDTA.

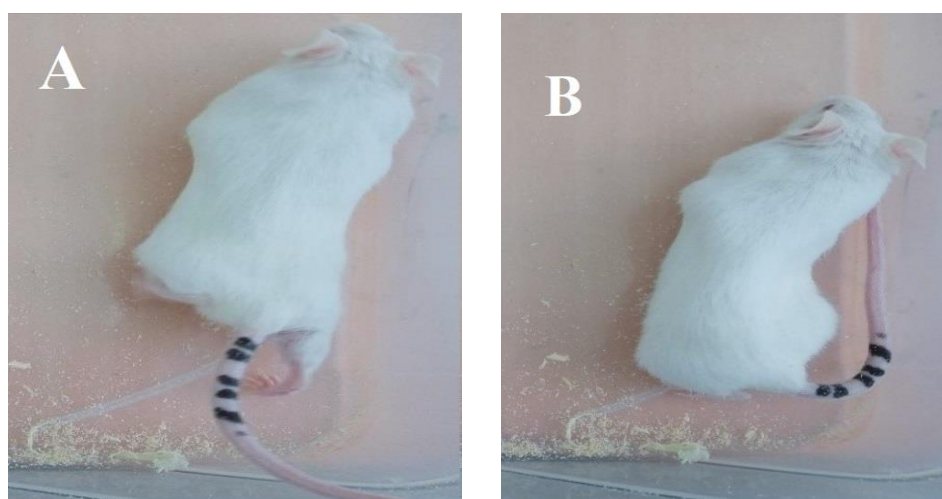
Echantillon	E.Aq
EDTA	7,62 ± 0,29
E.Met	180,86 ± 5,72
E.Aq	76,39 ± 5,87

## I.5. Activité analgésique des extraits d'*Asperula hirsuta*

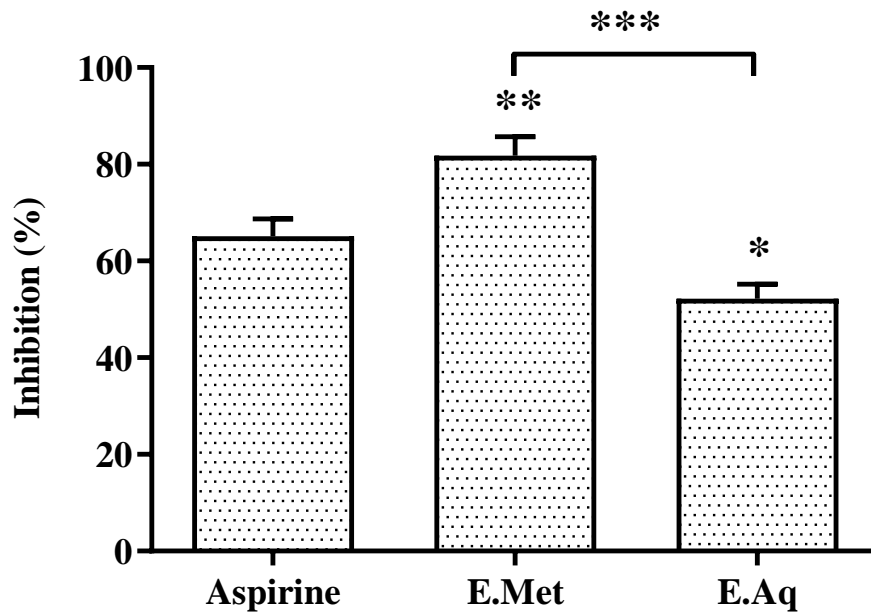
### I.5.1. Test de contorsion dorso-abdominale (test de torsion)

Suite à l'injection intrapéritonéale d'acide acétique à 0,6 %, des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale sont observés chez les souris (**figure 14**).

Les résultats présentés dans la **figure 15** montrent que l'administration de 200 mg/kg des extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* et 100 mg/kg d'aspirine ont exercés un effet protecteur vis-à-vis la douleur provoquée par l'acide acétique. Le puissant effet inhibiteur des contractions abdominales est enregistré avec l'E.Met (82%) suivi par l'aspirine (65%) utilisé comme standard. Ces effets sont meilleurs que celui de 200 mg/Kg de l'E.Aq (52%).



**Figure 14.** Mouvement d'étirement de la patte postérieur de la souris (**A**) et mouvement de contorsion abdominale (**B**).



**Figure 15.** Effet de l'extrait aqueux (**E. Aq**) et l'extrait méthanolique (**E. Met**) d'*Asperula hirsuta* sur le nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique. La douleur est induite par injection intrapéritonéale de 100  $\mu$ l d'acide acétique (0.6%). Une heure avant l'injection d'acide acétique, les souris sont traitées par 200 mg/kg d'extraits ou 100 mg/kg d'aspirine. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*\*:  $p < 0.001$  ; \*\*:  $p < 0,01$  ; \*:  $p < 0,05$  vs témoin.

## II. DISCUSSION

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a occupé une place importante dans la recherche biomédicale. Également une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique (Ghaouas, 2014). Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont utilisés comme antioxydants et analgésiques (Bouziane, 2018). Dans la présente étude nous sommes intéressés à la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et analgésique d'*Asperula hirsuta*.

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

L'extraction des métabolites secondaires dépend de plusieurs paramètres, selon la fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité (Daoudi *et al.*, 2015). La plante utilisée pour l'extraction a été séchée à l'ombre. L'objectif du séchage est d'obtenir un produit stabilisé dans l'air et sans risque de dégradation. Le séchage plante à l'ombre inhibe la fermentation bactérienne qui peut être une cause directe de cette dégradation, prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et protège la plante contre les radiations ultraviolettes de la lumière solaire et pour éviter la dégradation enzymatique de certains composants comme les flavonoïdes qui se dégradent facilement en cas d'un matériel frais ou non séché (Bourkhiss *et al.*, 2009). L'utilisation de plantes sous forme de poudre rend l'extraction plus efficace. Le broyage vise à diviser la matière pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction et à faciliter l'extraction de l'intérieur des tissus végétaux par cassure des tissus et des parois cellulaires (Amor *et al.*, 2008). Puisque chaque solvant est capable d'extraire des composés phytochimique qui ne peuvent être obtenus probablement que par l'utilisation de celui-ci, on a utilisé deux solvants de polarités différentes afin d'extraire le maximum de constituants chimiques du plant, la première extraction a été faite par un mélange hydrométhanolique pour obtenir initialement l'extrait brut. L'extraction par le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios permettent une plus haute récupération de composés phénoliques et l'obtention des meilleures activités. La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs (Bourgou *et al.*, 2016). La deuxième extraction a été réalisée par l'eau à température élevée. La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation. La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire, elle augmente les coefficients de diffusion, enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement

le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation. La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de dégradation thermique du soluté et les risques d'extraire des composés nuisibles (Amor *et al.*, 2008).

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 %. De plus, Abido (2013) a obtenu à partir de l'extrait aqueux de *Gardenia ternifolia*, espèce de la même famille d'*Asperula hirusita*, un rendement similaire de 23% contre 21% obtenu dans cette étude.

## **II.2. Etude phytochimique**

Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. Cela n'est abordable que par faire d'abord un appel à l'analyse phytochimique qui va permettre d'identifier les différents groupes chimiques présents dans l'extrait de plantes (Nacéri merabti, 2018). La caractérisation chimique des principes actifs de ces plantes a été réalisée par un screening phytochimique basée sur des tests de coloration et de précipitation des composés organiques présents dans les extraits vis-à-vis des réactifs spécifiques utilisés. L'analyse phytochimique a permis d'identifier les différents groupes chimiques présents dans les extraits d'*Asperula hirsuta* (Tanins, flavonoïdes, polyphénols, Terpénoïdes, Saponines et Quinones). Ces tests confirment la richesse de la plante en métabolites secondaires. Ces résultats sont comparables avec d'autres qui indiquent que sept plantes de la famille Rubiaceae, appartenant aux genres *Carphalea*, *Anthospermum*, *Gaertnera*, *Pauridiantha* et *Razafimandimbisonia* contiennent comme métabolites secondaires majoritaires des composés phénoliques et des triterpénoïdes. Aucun des échantillons étudiés n'a présenté de réactions positives sur les tests d'alcaloïdes (Rakotoarisoa *et al.*, 2016).

## **II.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes**

Le protocole d'extraction utilisé dans cette étude respecte les paramètres qui régissent les extractions solide-liquide concernant l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes qui sont : l'augmentation de la température et le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction, ainsi que la diminution de la taille des particules afin d'augmenter le coefficient de diffusion du solvant (Daoudi *et al.*, 2015). Les meilleures méthodes de détermination des

polyphénols et des flavonoïdes des extraits sont des méthodes colorimétriques ; le trichlorure d'aluminium et le folin-Ciocalteu respectivement, car elles sont simples et reproductibles (Khadher *et al.*, 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 (Ali-Rachedi *et al.*, 2018). De plus, la solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (Mahmoudi *et al.*, 2013). Des études ultérieures ont montré que la famille des Rubiacées, est considérée comme une source importante de composés phénoliques (Badiaga, 2011). 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.4. Activité antioxydante

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant des plantes médicinales ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Le piégeage du radical hydroxyle est basé sur la capacité des substances à piéger le radical hydroxyle et la chélation de fer qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe (II)-Ferrosine (Medjoujda, 2014).

#### II.4.1. Piégeage du radical hydroxyle

L'activité antiradicalaire est très importante due au rôle délétère des radicaux libres dans le domaine alimentaire et dans les systèmes biologiques (Gulcin *et al.*, 2010). La méthode de piégeage du radical hydroxyle a été utilisée pour évaluer la capacité de l'extrait aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* de piéger les radicaux libres. La capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical HO<sup>•</sup> et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques (Bouziane, 2018). Les résultats obtenus montrent que les deux extraits d'*A.hirsuta* présentent une forte capacité de piéger le radical hydroxyle. Ce pouvoir antiradicalaire des deux extraits est particulièrement dû à la présence des flavonoïdes, composés connus par leur capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. En effet, Il a été prouvé que les flavonoïdes présents en grandes quantités dans notre plante ont une bonne activité antiradicalaire vis-à-vis du radical hydroxyle (Trembl et Šmejkal, 2016).

#### II.4.2. Chélation de fer

Parmi les espèces d'ions métalliques, les ions Fe<sup>2+</sup> sont les prooxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée. La chélation du fer ferreux par les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* a été évaluée dans cette étude par la méthode de la ferrosine. Cette dernière

forme un complexe avec les ions  $Fe^{2+}$  libres. C'est la raison pour laquelle une diminution de l'absorbance du complexe  $Fe^{2+}$ -ferrosine indique la présence d'antioxydants chélateurs (Gulcin *et al* 2010). De nombreuses études sur l'activité antioxydante d'extraits de plantes ont confirmé une corrélation linéaire significative entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante (Yaici *et al.*, 2019). Les valeurs des  $EC_{50}$  obtenues (0.076 mg/mL et 0.18 mg/mL) avec l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique respectivement indiquent que les deux extraits possèdent de très fortes activités chélatrices. Dans la bibliographie consultée, aucune étude sur l'activité chélatrice des extraits d'*A. hirsuta* n'a été réalisée. En outre, très peu sont les travaux qui se sont consacrés à l'étude de l'effet chélateur des espèces du même genre de la même famille d'*A. hirsuta*. En effet, Etienne *et al.* (2020) ont trouvé que l'extrait aqueux et méthanolique de *Mitracarpus hirtus* ont d'excellents effets chélateurs. Par ailleurs, Ramalingum et Mahomoodally, (2014) ont montré que les extraits de *Vangueria madagascariensis*, connu par son potentiel antioxydant, a exercé une bonne activité chélatrice.

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

Le test utilisant l'acide acétique a été choisi pour chercher une éventuelle activité analgésique périphérique de nos extraits. Cette méthode est très sensible pour évaluer l'effet analgésique d'un produit. L'aspirine a été choisi comme produit de référence pour ce test grâce à son action analgésique périphérique en inhibant sélectivement l'enzyme cyclooxygénase COX-2. Ce dernier déclenche la biosynthèse de la prostaglandine. Ainsi cet analgésique diminue la production de prostaglandine ce qui inhibe la transmission de l'influx douloureux et diminue la sensation de la douleur. L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique chez la souris stimule la production de prostaglandine dans la zone péritonéale. La sensibilisation des récepteurs nociceptifs par ce médiateur chimique provoque un syndrome douloureux qui se traduit par les contractions abdominales observées après l'injection (Edina, 2016). Les résultats obtenus montrent que les extraits d'*A. hirsuta* réduisent le nombre de ces réactions abdominales par rapport au témoin négatif. Ceci suggère que les extraits empêcheraient la formation des prostaglandines par inhibition des cyclo-oxygénases. L'effet analgésique périphérique des extraits d'*A. hirsuta* pourrait être dû aux flavonoïdes et aux tanins qu'il contient. En effet, les flavonoïdes et les tanins sont connus pour être des analgésiques. Des études antérieures ont montré les effets anti-inflammatoire et analgésique des tanins, des flavonoïdes, des saponosides et des triterpènes stéroïdes (Ouedraogo *et al.*, 2012), ce qui suggère que l'effet de notre extrait pourrait être dû à sa richesse en composés bioactifs, principalement les polyphénols et les flavonoïdes. De plus, les résultats de Kouakou *et al.*, (2010) montrent que l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceées), une plante médicinale de Côte d'Ivoire, qu'il inhibe les crampes dues à l'injection d'acide acétique.

***CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES***

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les plantes médicinales continuent toujours d'être la provenance idéale des principes actifs, ce qui explique leur exploitation accrue en industrie pharmaceutique. Les polyphénols sont les composés végétaux les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

*Asperula hirsuta* est une plante médicinale de la famille des Rubiaceae, espèce intéressante car peu étudiée. Au cours des dernières décennies, une attention particulière a été accordée au développement des plantes médicinales en tant que sources de substances bio actives naturelles.

Le présent travail avait pour but la recherche des métabolites secondaires, la détermination de leur teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, étude phytochimique, ainsi que leur activité antioxydante et antalgique correspondante.

Les dosages ont montré que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes que l'extrait aqueux. L'analyse phytochimique a permis d'identifier les différents groupes chimiques présents dans les extraits d'*Asperula hirsuta* (Tanins, flavonoïdes, polyphénols, Terpénoïdes, Saponines et Quinones).

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Asperula hirsuta* selon la méthode de Chélation de fer et celle du Piégeage du radical hydroxyle (OH) montre que les deux extraits possèdent un effet antioxydant remarquable. Les deux extraits étudiés ont exercé une forte activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux ainsi qu'à piéger le radical OH.

L'évaluation de l'Activité analgésique des extraits de la plante d'*Asperula hirsuta* est effectuée par le teste de contorsion dorso-abdominale (test de torsion) indique un effet très importance surtout dans le cas d'extrait méthanolique.

Des études plus poussées pour identifier et caractériser les composés actifs responsables des différentes activités biologiques de cette plante par des méthodes plus efficaces seraient essentielles. Ces extraits pourraient ainsi constituer une alternative à certains additifs synthétiques pouvant être exploités à différents niveaux (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, etc.)

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdi, I., Lahouel, N., Lebioud, B., & Hireche, S. E. (2020).** Activité anti-inflammatoire d'*Aloysia citriodora* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- Abido, J. (2013).** Effets des extraits aqueux des feuilles de *Heliotropium indicum* Lehm (Boraginaceae) et de *Gardenia ternifolia* K. Schum (Rubiaceae) sur l'hypertension artérielle induite chez le rat albinos wistar. EPAC/UAC.
- Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima* L. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.
- Amor, B. (2008).** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée (DIC) (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle).
- Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- Baudin, B (2020).** Stress oxydant et protections antioxydantes. Revue francophone des laboratoires, 2020 (522), 22-30.
- Bidie, A. P., N'Guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1-12.
- Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- Boukerreche, A., & Zellagui, A. (2019).** Valorisation des substances bioactives d'origine végétale à activités pharmacologiques à partir des espèces.
- Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A., & Satrani, B. (2009).** Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*, 20(1), 44-48.
- Bourquin, V., Petignat, P. A., Besson, M., & Piguet, V. (2008).** Analgésie et insuffisance rénale. *Revue médicale suisse*, 4(175), 2218-2223.
- Bouziane, M., (2018).** Caractérisation structurale de quelques métabolites secondaires issus de quelques plantes de la famille 'Amarantaceae' du Sahara septentrional. Diss. Université Kasdi Merbah-Ouargla.
- Capriz, F., Chapiro, S., David, L., Floccia, M., Guillaumé, C., Morel, V., ... & Pickering, G. (2017).** Consensus multidisciplinaire d'experts en douleur et gériatrie : utilisation des antalgiques dans la prise en charge de la douleur de la personne âgée (hors anesthésie). *Douleurs*, 18, 234-47.

- Cesa, S., Tamburin, S., Tugnoli, V., Sandrini, G., Paolucci, S., Lacerenza, M., ... & Truini, A. (2015).** How to diagnose neuropathic pain? The contribution from clinical examination, pain questionnaires and diagnostic tests. *Neurological Sciences*, 36(12), 2169-2175.
- Chakraborty P, Kumar S, Dutta D, Gupta V (2009).** Role of antioxidants in common health diseases. *Res J Pharm Technol* 2(2) :238–244.
- Clamote, F (2017).** Plantes : beauté et diversité. <http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2017/01/asperula-hirsuta.html>.
- Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibjibijen, J., & Nassiri, L. (2015).** Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica* : *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences*, 87, 8094-8104.
- Das, V. (2015).** An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Progress in molecular biology and translational science*, 131, 1-30.
- 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.
- Desmier, T. (2016).** Les antioxydants de nos jours : définition et applications (Doctoral dissertation).
- Donnat, A. et J. Boumeuf (2006).** Librairie. Larousse, pp : 78-336.
- Edina, R. (2016).** Etudes chimique et évaluation de l’activités analgésique de l’espèce *Smilax anceps*. *Etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals. Pharmacologia*. 6(1), 11-20.
- Etienne, O. K., Dall’Acqua, S., Sinan, K. I., Ferrarese, I., Sut, S., Sadeer, N. B., ... & Zengin, G. (2021).** Chemical characterization, antioxidant and enzyme inhibitory effects of *Mitracarpus hirtus* extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113799.
- Favier, A (2003).** Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité Chimique*, 11 :108-115. DOI : 10.1155/2013/150780.
- Ferradji, A. (2018).** Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies de *pistacia lentiscus* (Doctoral dissertation).
- Ferrez, Y. (2004).** Connaissance de la flore rare ou menacée de Franche-Comté, *Asperula tinctoria* L.
- Firestein, G. S., Budd, R. C., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2012).** Kelley's Textbook of Rheumatology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J. et Maciejewski, R. (2021).** Antioxydants : classification, sources naturelles, mesures d'activité/capacité et utilité pour la synthèse de nanoparticules. *Matériaux*, 14 (15), 4135.
- Fournier, P. (1999).** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France.
- Gaillard A. (2014).** Emotional pain, physical pain Neurobiological mechanisms and treatment. *Annales Med Psy.* ;172(85) : 104-107.

- Gardier, A. (2005).** Compréhension du mécanisme d'action des antidépresseurs anciens ou nouveaux : apport des modèles de souris génétiquement modifiées en pharmacologie in vivo. *Thérapies*, 60(5), 469-476.
- Ghaouas, S (2014).** Intoxication par *peganum harmala* (centre antipoison et pharmacovigilance du Maroc). Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.31., Pp12.
- Gheffour, K., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z (2015).** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus*, 13, 288–294.
- Gueye, F. (2019).** Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant (Doctoral dissertation, Lyon).
- Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.
- Hadi, M. (2004) :** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro- oxydant capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur 155.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C. (2007).** Radicaux libres en biologie et en médecine. Oxford university press, Oxford, UK, 851p.
- Hamid A, Aiyelaagbe O, Usman LA, Ameen OM, Lawal A (2010).** Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. *Afr J Pure Appl Chem* 4(8) :142–151.
- Jean-Claude1, W., Dumbo, P., Mugisho Gérard, I et Zihalirwa Alphonse, B. (2014).** Distribution altitudinale des Rubiaceae dans les forêts de montagnes à l'est de la R.D. Congo. Lecas du parc national de Kahuzi-Biega et foret communautaire de Rwaga -Nirindja. *Continental J. Applied Sciences* 9 (2) : 1 – 9.
- K. Kanoun (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis L.* (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) Mémoire de Magister Université de Tlemcen. P 26-29-48-49.
- Kalam, S., Gul, M. Z., Singh, R., & Ankati, S. (2015).** Free radicals: Implications in etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals. *Pharmacologia*, 6(1), 11-20.
- Kardeh, S., Ashkani-Esfahani, S., & Alizadeh, A. M. (2014).** Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *European journal of pharmacology*, 735, 150-168.
- 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 Phenolic and Biological Activities of Tunisian *Peganum harmala* Seed Extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(2), 32-39.

- Khan, A. M., Qureshi, R. A., Ullah, F., Gilani, S. A., Nosheen, A., Sahreen, S., ... & Murad, W. (2011).** Phytochemical analysis of selected medicinal plants of *Margalla Hills* and surroundings. *Journal of medicinal plants research*, 5(25), 6055-6060.
- Koster R, Anderson M, De Beer J, (1959).** Acetic acid for analgesic screening, *Federal Proceeding*, 8, 412–417.
- Kouakou, S., Kouakou, G., Laba, I. D., & Brou, J. (2010).** Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(2).
- 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.
- Labioud, A., & Oltani, A. (2020).** Etude bibliographique de l'effet analgésique de plantes médicinales du genre *Thymus* chez un modèle biologique (souris) (Doctoral dissertation, Université laarbi tebessi Tébessa).
- Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Ghaleh B., Loirand G., Pinet F. & Samuel J.L., 2007 :** Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext 312, 316, 317.
- Lalleman, L. (2014).** Les représentations culturelles de la douleur au Bénin ont-elles un rôle dans son ressenti, dans son expression, dans son soulagement. *Médecine humaine et pathologie*.
- Laroche, F. (2014).** Douleur chronique. Thérapies comportementales et cognitives. *Annales Médico-Psychologiques*, 172 : 132-135.
- Le K, Chiu F, Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, 105, 353-363.
- M. Ghouti, H. Halbigue, (2019).** Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites. Mémoire de master, université de Djilali Bounaama-khmiss Milliana.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- Makusa, A. D., Ningsih, P (2020).** Analysis of Total Flavonoid Levels in Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Using UV-Vis Spectrophotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, 2(1), 11-17.
- Maloueki, U., Kunyima, K. P., Mbomba, I. D., Dani, N. A., Lukuka, K. A., Lami, N. J., ... & Muganza, C. D. (2015).** Activités antioxydante et antiplasmodiale d'extraits de *Massularia acuminata* (Rubiaceae). *Phytothérapie*, 13(6), 389-395.
- Marok, M. A. (2014).** Implication des mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la tolérance au stress hydrique chez deux variétés d'orge, Saïda et Express (Doctoral dissertation).
- Medjoujda, O. (2014).** Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales. *Régulation*, 6, 3.

- Meriem, E. (2017).** Structure et activités des substances naturelles : Principes et application. Faculté des sciences, Sétif.
- Minareci, E., Ergönül, B., Kayalar, H., & Kalyoncu, F. (2011).** Chemical compositions and antioxidant activities of five endemic *Asperula* taxa. *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 537-543.
- Misra, K., Dhillon, GS, Brar, SK et Verma, M. (2014).** Antioxydants. Dans Biotransformation de la biomasse des déchets en produits biochimiques de grande valeur (pp. 117-138). Springer, New York, NY.
- Myers, R. R., W. M. Campana and V. I. Shubayev (2006).** "The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets." *Drug Discov Today* 11(1-2) : 8-20.
- Nacéri Mrabti, H. (2018).** Étude Pharmacologique Toxicologique de *l'Arbutus unedo L.* au Maroc.
- Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi M. Set Ghorbani A-Labiatae. (2005).** Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research, vol. 2; pp 63-79.
- Ouedraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R. W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., ... & Guissou, 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(5), 286-292.
- Perdreau, A., & Joudet, T. (2015).** Efficacité de l'analgésie multimodale par infiltration associée aux corticostéroïdes après réparation arthroscopique de la coiffe des rotateurs. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*, 101(8), S310-S318.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defense. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :233-239.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017).** Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592-607.
- Rabaud, C; Rogeaux, O; Launay, O; Strady, C; Mann, C; Chassany, O; Bouhassira, D; and Gaillat, J. (2013).** Early antiviral treatment fails to completely prevent herpes-related pain. *Med & maladie inf*, 43: 461-466.
- Rakotoarisoa, M. A., Rakotoarivelo, H., Rakotonandrasana, S., Rasolofomanana, J. R., Randriamialinoro, F., Ranarivelo, L., ... & Ralambonirina, S. T. (2016).** Etudes chimique et biologique de sept plantes médicinales de Madagascar de la famille Rubiaceae.
- Ramalingum, N., & Mahomoodally, M. F. (2014).** Biologic propensities and phytochemical profile of *Vangueria madagascariensis* JF Gmelin (Rubiaceae): an underutilized native medicinal food plant from Africa. *BioMed Research International*, 2014.
- Reddi, D., Curran, N., & Stephens, R. (2013).** An introduction to pain pathways and mechanisms. *British journal of hospital medicine*, 74(Sup12), C188-C191.

- Riahi, R. C., Tarhouni, S., & Kharrat, R. (2011).** Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4), 19.
- Rogar J. (2008).** Analgesics, Opioids and Opioid Receptors. Annual Reports in Medicinal Chemistry. n°53. p 20-52 disponible [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)61113-6](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)61113-6).
- Sergeevna, I. N., Mihaylovna, K. A., Leonidivna, T. E., & Aleksandrovna, K. I. (2015).** The Antihypoxic and Sedative Activity of the Dry extract from *Asperula odorata L.* *Pharmacognosy Communications*, 5(4).
- Sharma P, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Gomathi D, Uma C, (2013),** In vitro antibacterial and free radical scavenging activity of green hull of *Juglans regia*. *J Pharm Anal*, 3(4): 298–302.
- Sunil H. G., Shweta P. D. & Patil S. U., (2012).** Preliminary Phytochemicals Investigation and TLC Analysis of *Ficus racemosa* Leaves. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*. 38(7), 592-607.
- Treml, J., & Šmejkal, K. (2016).** Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(4), 720-738.
- Tuo, K. (2015).** Criblage phytochimique, activité antioxydante et antiplasmodiale in vitro de cinq plantes utilisées traditionnellement en Côte d'Ivoire contre le paludisme (Doctoral dissertation, Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, Abidjan).
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*,
- Yaici, K., Dahamna, S., Moualek, I., Belhadj, H., & Houali, K. (2019).** Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydants et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea L.* (Ericaceae) dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien. *Phytothérapie*.
- Yurchenko, N. S., & Kovaleva, A. M. (2013).** Amino-acid composition of *Asperula odorata* herb. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(2), 401-402.
- Zerargui, F. (2018).** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis L.* et caractérisation des substances bioactives (Doctoral dissertation).

## Abstract

The present study was designed to the identification of certain phytochemical compounds and the evaluation of the antioxidant and analgesic properties of the aqueous (Aq.E) and the methanolic (Met.E) extracts of the aerial part of *Asperula hirsuta*. The total polyphenols and flavonoids in both extracts were determined using the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride methods, respectively. The results showed that the Met.E is the richest in polyphenols and flavonoids with values of  $145,93 \pm 15,72 \mu\text{g AGE/mg}$  extract and  $107,65 \pm 9,86 \mu\text{g QE/mg}$  extract, respectively. The antioxidant activity of Met.E and Aq.E was evaluated using the hydroxyl radical and iron chelation tests. Results showed that both extracts exhibited a strong scavenging activity against hydroxyl radicals with  $\text{IC}_{50}$  values of  $631,58 \pm 21,29 \mu\text{g/mL}$  and  $232,58 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$ , respectively. In addition, the Met.E and Aq.E showed a good chelating activity with  $\text{EC}_{50}$  values of  $180,87 \pm 5,72 \mu\text{g/mL}$  and  $76,39 \pm 5,87 \mu\text{g/mL}$ , respectively. On the other hand, the treatment of mice with 200 mg/kg of Aq.E and Met.E inhibited the pain induced by acetic acid with 52% and 82%, respectively. In conclusion, the obtained results showed that the aqueous and methanolic extracts of *Asperula hirsuta* contain bioactive compounds with strong antioxidant activity as well as interesting analgesic properties.

**Keywords:** *Asperula hirsuta*, antioxidant activity, analgesic activity, methanolic extract, aqueous extract.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحديد بعض المركبات الكيميائية النباتية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة والمسكنة للمستخلص المائي والميثانولي من الجزء 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  $145,93 \pm 15,72$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و  $107,65 \pm 9,86$  ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص على التوالي. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستعمال كل من اختبار جذر الهيدروكسيل و استخلاص الحديد. أظهر كل من المستخلص المائي والميثانولي نشاطية إزاحية جد عالية لجذر الهيدروكسيل بقيم  $\text{IC}_{50}$  تقدر بـ  $631,58 \pm 21,29$  و  $232,58 \pm 2,66$  ميكروغرام/مل على التوالي. كما أظهر المستخلصان قدرة استخلاص معتبرة اتجاه المعادن وقدر التركيز الممارس لـ 50% من الفعل التمثلي بـ  $180,87 \pm 5,87$  و  $76,39 \pm 5,87$  ميكروغرام/مل، على الترتيب. أظهرت معالجة الجرذان بـ 200 مغ/كغ من المستخلص المائي والميثانولي قدرة معتبرة على تثبيط الألم المحدث بـ حمض الأسيتك بنسب 52% و 82% على الترتيب. في الختام، تظهر النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات *Asperula hirsuta* المائية والميثانولية تحتوي على مركبات نشطة بيولوجيًا ذات نشاط قوي مضاد للأكسدة بالإضافة إلى خصائص مسكنة معتبرة.

**الكلمات المفتاحية:** *Asperula hirsuta* ، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مسكن، مستخلص ميثانولي، مستخلص مائي.

## Résumé

La présente étude porte sur l'identification de certains composés phytochimiques et l'évaluation des propriétés antioxydants et analgésiques 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  $145,93 \pm 15,72 \mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et  $107,65 \pm 9,86 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test de piégeage du radical hydroxyle et la chélation de fer. Les résultats montrent que l'E.Met et l'E.Aq possèdent une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical hydroxyle avec des  $\text{IC}_{50}$  de  $631,58 \pm 21,29 \mu\text{g/mL}$  et  $232,58 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. De même, une bonne activité chélatrice a été obtenue par les deux extraits avec des  $\text{EC}_{50}$  de  $180,87 \pm 5,72 \mu\text{g/mL}$  et  $76,39 \pm 5,87 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Le prétraitement par voie orale des souris par l'E.Met ou l'E.Aq à 200 mg/kg inhibe de façon significative la douleur induite par l'acide acétique avec un pourcentage de 82% et 52%, respectivement. En conclusion, nos résultats montrent que les extraits aqueux et méthanolique d'*Asperula hirsuta* contient des composés bioactifs d'une forte activité antioxydant ainsi que des propriétés analgésiques intéressantes.

**Mots clés :** *Asperula hirsuta*, activité antioxydant, activité analgésique, extrait méthanolique, extrait aqueux.