

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2017

Thèse
Présentée par

MEZITI Asma

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière: Biologie

Spécialité: Biochimie

Thème

**Régulation de l'inflammation par les extraits de *Rubus fruticosus*
et *Zizyphus vulgaris***

Soutenue publiquement le 10/05/2018

Devant le Jury

Président

BELHATAB Rachid

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

BOURICHE Hamama

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

SENATOR Abderrahmane

Pr. U. Batna

SATTA Dalila

Pr. U. Constantine 1

HAMBABA Leila

Pr. U. Batna

Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, sans eux je n'aurai pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches, et surtout leur disponibilité de garder mes enfants.

A mon mari Amirouche, en signe de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence,

A mes deux petits princes, Anes et Oussama qui m'ont porté bonheur.

A mes chers frères et sœur, Hicham, Aissam et Leila ainsi qu'à leurs petites familles.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime ma profonde gratitude à madame le Pr Bouriche hamama, qui m'a fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils pertinents, sa compétence scientifique et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse :

Monsieur le Pr. Belhatab Rachid, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Monsieur le Pr. Senator abderrahmane, madame le Pr. Satta Dalila et madame le Pr. Hambaba Leila d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurés de ma profonde gratitude.

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux Professeurs Ibrahim demirtas (Université de Cankırı-Turquie) et Murat Kizil (Université de Dicle-Turquie).

Je ne remercierai jamais assez kada soussen pour les nombreux services qu'elle m'a rendus durant la réalisation de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.

En fin, je ne saurais achever sans remercier mon frère meziti hicham dont l'inestimable collaboration à mes recherches m'a apporté l'aide essentielle à la réalisation de ce travail.

ملخص

تستخدم نباتتا *Zizyphus vulgaris* و *Rubus fruticosus* بكثرة في الطب الشعبي لخصائصهما العلاجية. في هذه الدراسة تم تقدير النشاطية المضادة للالتهاب للمستخلص الميثانولي لأوراق *Rubus fruticosus* (ERF) وجذور *Zizyphus vulgaris* (EZV)، أظهر التحليل بواسطة TOF/MS HPLC بأن ERF أكثر غنى بالبولىفينول و الفلافونويدات مقارنة بـ EZV. أدت معالجة الفئران عن طريق الفم بـ 400 مغ/كغ من مستخلصي ERF و EZV الى تثبيط معتبر لوذمة الأذن المحفزة بالكزيلان بنسبة 70.77% و 51.81% على التوالي، ولوحظ ان تأثير هذين المستخلصين مماثل لتأثير الاندوميتاسين الذي استعمل كمضاد التهاب نموذجي. كما أدت المعالجة الموضعية لوذمة الأذن المحفزة بزيت كروتون بـ 2 مغ من ERF و EZV الى تثبيط معتبر قدر بـ 75.72% و 64.24% على الترتيب. اضافة الى ذلك أدت معالجة الفئران عن طريق الفم بـ 400 مغ/كغ من ERF الى تثبيط معتبر (33.57%) لنفاذية الأوعية المحفزة بحمض الخل، بينما أبدى المستخلص EZV تأثير غير معتبر. كما تم أيضا دراسة تأثير المستخلصين على الاشتعال التنفسي وإنزيمات الكريات المتعادلة، أظهرت النتائج المتحصل عليها، بأن ERF و EZV يثبطان بصورة معتمدة على التركيز: Myeloperoxidase , Elastase وكذلك الاشتعال التنفسي.

من جهة أخرى، تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلص ERF و EZV باستعمال عدة تقنيات في الكائن الحي وفي الزجاج. أظهرت النتائج المتحصل عليها بأن ERF يمتلك قدرة إزاحية عالية لجذر DPPH تقدر بـ $IC_{50} = 14$ ميكروغرام/مل، 1.58 مل مول مكافئ Trolox /مغ مستخلص و 3.39 مل مول مكافئ $FeSO_4$ /مل مستخلص في تقنيتي ABTS و FRAP على التوالي. كما أبدى هذين المستخلصين تأثير وقائي لـ ADN تجاه الهدم التأكسدي المحفز بـ H_2O_2/UV . كما أدت معالجة الفئران اليومية عن طريق الفم بـ 200 مغ/كغ من ERF و EZV خلال ثلاث أسابيع إلى تحسين قدرة الدم للمضادة للأكسدة ، حيث قدر وقت نصف التحلل لكريات الدم الحمراء HT_{50} بـ : 151.45 دقيقة و 146.72 دقيقة عند الفئران المعالجة بـ ERF و EZV على الترتيب مقابل 122.5 دقيقة عند الفئران الغير معالجة. الختام وفي يمكن اعتبار *Zizyphus vulgaris* و *Rubus fruticosus* مصدرا واعدة لمضادات الالتهاب.

الكلمات المفتاحية : مضاد الأكسدة، مضاد الالتهاب، الخلايا المتعادلة، الوذمة، البولىفينول، *Rubus fruticosus* ، *Zizyphus vulgaris*

Résumé

Rubus fruticosus et *Zizyphus vulgaris* sont deux plantes largement utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés thérapeutiques. Le but de la présente étude est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques des feuilles de *Rubus fruticosus* (ERF) et des racines de *Zizyphus vulgaris* (EZV). L'analyse phytochimique de ces extraits par HPLC/TOF/MS a révélé la richesse de ERF en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport à EZV. L'administration par voie orale de 400 mg/kg de ERF ou de EZV montre une inhibition significative de 70,77 % et 51,81% respectivement de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. L'effet de ERF est comparable à celui de l'indométacine, utilisé comme anti-inflammatoire standard. De même, le traitement local des souris par 2 mg/oreille de ERF ou de EZV montre un effet significatif sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, avec des inhibitions de 75.72% et 64.24% respectivement. En outre, l'administration orale de 400 mg/kg de ERF exerce une inhibition significative de 33.57 % sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. Par contre, l'inhibition exercée par EZV est non significative. L'effet des extraits étudiés sur la flambée respiratoires et les enzymes des neutrophiles humains a été également investigué. Les résultats obtenus montrent que l'ERF et l'EZV inhibent d'une façon dose dépendante l'élastase, la myeloperoxydase et la flambée respiratoire.

D'autre part, l'effet antioxydant des extraits ERF et EZV a été évalué en utilisant plusieurs tests *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus révèlent que ERF possède une meilleure capacité antioxydante avec IC₅₀ de 14 µg/ml dans l'essai de DPPH, 1,58 mmol Trolox/mg extrait et 3,39 mmol FeSO₄/mg extrait dans les essais ABTS et FRAP respectivement. En outre, les deux extraits étudiés montrent un effet protecteur dose dépendant de l'ADN contre la dégradation oxydative induite par H₂O₂/UV. L'administration quotidienne par voie orale de 200 mg/kg de ERF ou de EZV durant trois semaines chez la souris entraîne une amélioration de la capacité antioxydante totale du sang avec un temps de demi-hémolyse (HT₅₀) de 151,45 min et 146,72 min pour les groupes traités par RFE et ZVE respectivement *versus* 122.5 min pour le groupe contrôle. En conclusion, cette étude a permis de dévoiler des propriétés anti-inflammatoires très prometteuses des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV).

Mots clés : Antioxydant, Anti-inflammatoire, Inflammation, Neutrophile, Oedème, Polyphénols, *Rubus fruticosus*, *Zizyphus vulgaris*.

Abstract

Rubus fruticosus and *Zizyphus vulgaris* are two plants widely used in the folkmedicine for their therapeutic properties. The aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Rubus fruticosus* leaves (RFE) and *Zizyphus vulgaris* roots (ZVE). The phytochemical analysis by HPLC/TOF/MS revealed that RFE possesses higher polyphenolic and flavonoid content than ZVE. The oral administration of 400 mg/kg of RFE and ZVE exerted 70.77 % and 51.81% of inhibition, respectively in the xylene induced ear edema test in mice. These effects were statistically similar to that of indomethacin which is a standard anti-inflammatory. The topical application of 2 mg/ear of RFE and ZVE inhibited the croton oil-induced ear edema by 75.72% and 64.24% respectively. Moreover, the oral administration of 400 mg/kg of RFE inhibited significantly (33.57%) acetic acid induced vascular permeability in mice. However, the inhibition effect exerted by ZVE was not significant. The effect of the studied extracts was also investigated on human neutrophil enzymes and respiratory burst and the obtained results showed that RFE and ZVE inhibited in dose dependent manner elastase, myeloperoxidase and respiratory burst.

On the other hand, the antioxidant effect of RFE and ZVE was evaluated using different assays *in vitro* and *in vivo*. The obtained results showed that RFE possesses the highest antioxidant capacity with IC₅₀ value of 14 µg/ml in DPPH assay, 1.58 mmol of Trolox E/mg extract and 3.39 of mmol FeSO₄/mg extract in ABTS, and FRAP assay respectively. The studied extracts showed a concentration-dependent protective effect on DNA cleavage induced by H₂O₂/UV-photolysis. The daily oral administration of 200 mg/kg of RFE or ZVE during three weeks showed an improvement of the blood total antioxidant capacity; the half time hemolysis (HT₅₀) values were 151.45 min and 146.72 min for the groups treated with RFE and ZVE, respectively *versus* 122.5 min for the control group. In conclusion, this study revealed a very promising anti-inflammatory properties of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts.

Keywords: Antioxidant, Anti-inflammatory, Neutrophil, Edema, Polyphenols, *Rubus fruticosus*, *Zizyphus vulgaris*

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN-sc:** ADN superenroulé
- ADN-oc:** ADN circulaire ouvert
- ADN-lin :** ADN linéaire
- AINS:** Anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- AIS:** Anti-inflammatoires stéroïdiens.
- AP-1:** Protéine activatrice 1
- CGRP:** Calcitonin gene-related peptide
- COX:** Cyclooxygenase
- ERN:** Espèce réactive d'azote
- ERO:** Espèce réactive d'oxygène
- f-MLP:** formyl-Mét-Leu-Phé)
- GSH:** Glutathion
- GSSG:** Glutathion dissulfide
- HEPES:** acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- ICAM :** Inter cellular adhesion molecule
- IL:** Interleukine
- INF:** Interféron
- iNOS :** Oxyde nitrique synthase inductible
- LOX:** Lipooxygénase
- LPS:** Lipopolysaccharides
- LTB:** Leucotriène.
- MBP:** Major basic proteins
- MPO:** Myeloperoxydase
- NF- κ B:** Nuclear factor-kappaB
- OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economiques
- PAF:** Facteur activateur des plaquettes
- PGE:** Prostaglandine E
- PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acétate
- PNs:** Polynucléaires neutrophiles
- TGF- β :** Transforming Growth Factor- β
- TNF:** Facteur de necrose tumoral
- TPA:** 12-o-tétracanoilphorbol-13-acétate
- VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- VEGF:** Vascular endothelial growth factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Etapes de l'inflammation aiguë.....	4
Figure 2 : Formation d'un exsudat.....	5
Figure 3: Diapédèse leucocytaire.....	6
Figure 4 : Etapes de l'inflammation chronique.....	8
Figure 5 : Mécanisme oxydatif et enzymatique du neutrophile durant la phagocytose.....	10
Figure 6: Mécanisme d'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoires par le stress oxydant et les voies d'AP-1 et NF-κB.....	14
Figure 7 : Productions des espèces réactives durant l'inflammation.....	15
Figure 8 : Principales classes des polyphénols.....	19
Figure 9 : Aspect morphologique de <i>Rubus fruticosus</i>	22
Figure 10: Aspect morphologique de <i>Zizyphus vulgaris</i>	25
Figure 11: Profil chromatographique des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> (A) et <i>Zizyphus vulgaris</i> (B) analysés par HPLC-TOF-MS.....	42
Figure 12 : Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	45
Figure 13: Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	47
Figure 14 : Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris.....	50
Figure 15: Cytototoxicité des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et de <i>Zizyphus vulgaris</i> sur les neutrophiles.....	51
Figure 16 : Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur l'activité de l'élastase.....	53
Figure 17: Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur l'activité de la myeloperoxydase.....	55
Figure 18: Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur la flambée respiratoire des neutrophiles.....	58
Figure 19 : Activité antiradicalaire des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> vis-à-vis du radical DPPH.....	60
Figure 20: Effet des extraits sur la dégradation d'ADN induite par H ₂ O ₂ /UV.....	61
Figure 21 : Effet des extraits <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur la cinétique de la lyse érythrocytaire.....	64
Figure 22 : Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> sur le temps de demi-hémolyse (HT ₅₀).....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires.....	12
Tableau 2 : Mécanismes anti-inflammatoires des composés phénoliques.....	20
Tableau 3 : Teneur des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> en polyphénols totaux et flavonoïdes.....	39
Tableau 4 : Composition phénolique des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i> identifiés par HPLC-TOF-MS.....	41
Tableau 5 : Concentrations inhibitrices à 50% (IC ₅₀) des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i>	63

SOMMAIRE

Résumé	
Abstract	
Liste des abéviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Inflammation	3
I.1 . Etiologie de l'inflammation	3
I.2 . Inflammation aigue	3
I.2.1. Phase vasculaire	4
I.2 .3 . Phase cellulaire	6
I.2. 3. Phase de résolution	7
I.3. Inflammation chronique	7
I.4. Cellules inflammatoires	9
I.5. Médiateurs chimiques inflammatoires	11
I.5. Inflammation et espèces réactives	13
I.5.1. Réaction inflammatoire et production des espèces réactives	13
I.5.2. Implication des espèces réactives dans le processus inflammatoire	15
I.6. Anti-inflammatoires	17
I.6.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens	17
I.6.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	18
I.7. Polyphénols comme anti-inflammatoires naturels	18
II. plantes étudiées	21
II.1.La plante <i>Rubus fruticosus</i> L.	21
II.1.1.Taxonomie	21
II.1.2. Aspect botanique de <i>Rubus fruticosus</i>	21
II.1.3. Usage thérapeutique traditionnel de <i>Rubus fruticosus</i>	23
II.1.4. phytochimie	23
II .1.5.Propriétés biologiques	23
II.2. La plante <i>Zizyphus vulgaris</i> Lam.	24
II.2.1.Taxonomie	24
II.2.2.Aspect botanique de <i>Zizyphus vulgaris</i>	24
II.2.3. Usage thérapeutique traditionnel de <i>Zizyphus vulgaris</i>	25

II.2.4. Phytochimie et propriétés biologiques.....	26
--	----

MATÉRIEL ET MÉTHODE.....

I. Matériel.....	27
I.1. Réactifs.....	27
I.2. Matériel biologique	27
I.2.1. Matériel végétal.....	27
I.2.1. Animaux.....	27
I.2.3. Sang humain	28
II. Méthodes.....	28
II.1. Analyse phytochimiques des extraits	28
II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i>	28
II.1.2. Dosage des composés phénoliques.....	28
II.1.3. Dosage des flavonoïdes.....	29
II.1.4. Identification des composés phénoliques par HPLC/TOF/MS.....	29
II.2. Toxicité aiguë des extraits de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i>	30
II.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i>	30
II.3.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris	30
II.3.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	31
II.3.3. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris	31
II.3.4. Effet des extraits de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i> sur les neutrophiles	32
II.3.4.1. Isolement des neutrophiles.....	32
II.3.4.2. Cytotoxicité des extraits de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i>	32
II.3.4.3. Effet sur l'activité de l'élastase.....	33
II.3.4.4. Effet sur l'activité de la myeloperoxydase	33
II.3.4.5. Effet sur la flambée respiratoire	34
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris</i>	34
II.4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang chez la souris.....	34
II.4.2. Effet scavenger du radical DPPH	35
II.4.3. Effet scavenger du radical ABTS.....	35
II.4.4. Pouvoir réducteur du fer	36
II.4.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse d' H ₂ O ₂	36
II.5. Analyses statistique.....	37

RESULTATS ET DISCUSSION.....	
I. Etude phytochimique de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i>	38
1.1. Préparation des extraits.....	38
I .2.Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.....	38
I.3. Analyse par HPLC-TOF-MS	39
II. Etude de la toxicité aigue des extraits.....	43
III. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i>	43
III.1.Effet sur L'œdème de l'oreille induit par le xylène.....	43
III.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton.....	46
III.3.Effet des extraits sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique.....	48
III.4.Effet sur les neutrophiles.....	51
III .4.1.Cytotoxicité des extraits sur les neutrophiles.....	51
III.4.2. Effet des extraits sur l'activité de l'élastase.....	52
III.4.3. Effet des extraits sur l'activité de la myeloperoxydase.....	54
III.4.4. Effet des extraits sur la flambée respiratoire.....	57
IV. Activité antioxydante des extraits de <i>Rubus fructuosis</i> et <i>Zizyphus vulgaris</i>	59
IV.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang	59
IV.2. Effet scavenger des radicaux libres.....	62
IV. 3. Pouvoir réducteur	65
IV.4. Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse d' H ₂ O ₂	66
CONCLUSION ET PESPECTIVES	67
REFERANCE BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION

L'inflammation est un processus physiologique qui aide normalement à lutter contre l'infection et contribue à la réparation des tissus. Le dysfonctionnement de la réponse inflammatoire, par contre, favorise le développement et la progression de plusieurs maladies chroniques communes, telles que l'asthme, l'arthrite, le diabète et l'athérosclérose. Ces maladies et d'autres sur fond de pathologie inflammatoire représentent un fardeau du point de vue des coûts de santé et de la souffrance humaine à la grandeur de la planète. Les maladies inflammatoires chroniques sont en effet la troisième cause de mortalité, après les affections cardiovasculaires et les cancers ; et parmi les premières causes de morbidité dans les pays développés.

Devant l'augmentation considérable du nombre de pathologies inflammatoires et les effets secondaires des anti-inflammatoires synthétiques, de nombreux chercheurs à travers le monde, se sont orientés vers la recherche des composés d'origine végétale qui pourraient traiter les désordres inflammatoire sans effets négatifs.

Les plantes représentent un réservoir immense de métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Elles sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire des expériences des populations ainsi que de la médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles scientifiques précises et ne tient pas compte des mécanismes thérapeutiques. Pour cela, des recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal est d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de deux plantes médicinales couramment utilisées en phytothérapie : la ronce (*Rubus fruticosus*) et le jujubier (*Zizyphus vulgaris*).

Cette étude englobe trois volets:

- Le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la quantification et l'identification des composés phénoliques.
- Le second est consacré à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits sur :
 - a. l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton ou le xylène chez la souris
 - b. la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris.

c. d. l'activité de la myeloperoxydase

e. la flambé respiratoire des neutrophiles humains

- le troisième volet est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, FRAP, ABTS et la photolyse d'ADN) et *in vivo* en testant la capacité antioxydante totale du sang chez la souris.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Inflammation

La réponse inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle a pour objet de diriger les molécules sériques et les cellules du système immunitaire vers le site de la lésion tissulaire, afin d'éliminer ou d'isoler l'agent agresseur du reste de l'organisme et de permettre le plus rapidement possible, la réparation des tissus (Winyard et *al.*, 2013).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalie de régulation du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (Medzhitov, 2008 ; Mittal et *al.*, 2014).

I.1. Etiologie de l'inflammation

Les agents initiateurs de l'inflammation sont nombreux et variés : les infections bactériennes virales, parasitaires ou fongiques ; les facteurs physiques (chaleur, froid, UV et rayons X) ; les facteurs chimiques (toxine, caustique et venin) ; les traumatismes (blessure et intervention chirurgicale) ; les désordres immunologiques (maladies auto-immunes et allergie) et l'hypoxie le plus souvent par ischémie.

L'agent agresseur entraîne en général une destruction tissulaire ou cellulaire, formant le signal d'appel de la réaction du système immunitaire. Selon cet agent, la réponse inflammatoire varie en intensité et en durée (Blétry et *al.*, 2006 ; Lakhani et *al.*, 2009).

I .2. Inflammation aigue

IL s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses qui se manifeste par quatre signes cardinaux; oedème, douleur, chaleur et érythème. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent s'accompagner d'atteinte fonctionnelle régionale selon la gravité de l'agression (Serhan et *al.*, 2010 ; Mallem et Gognyé, 2014).

L'inflammation aigue se déroule en trois phases successives (**Figure 1**) et interdépendantes.

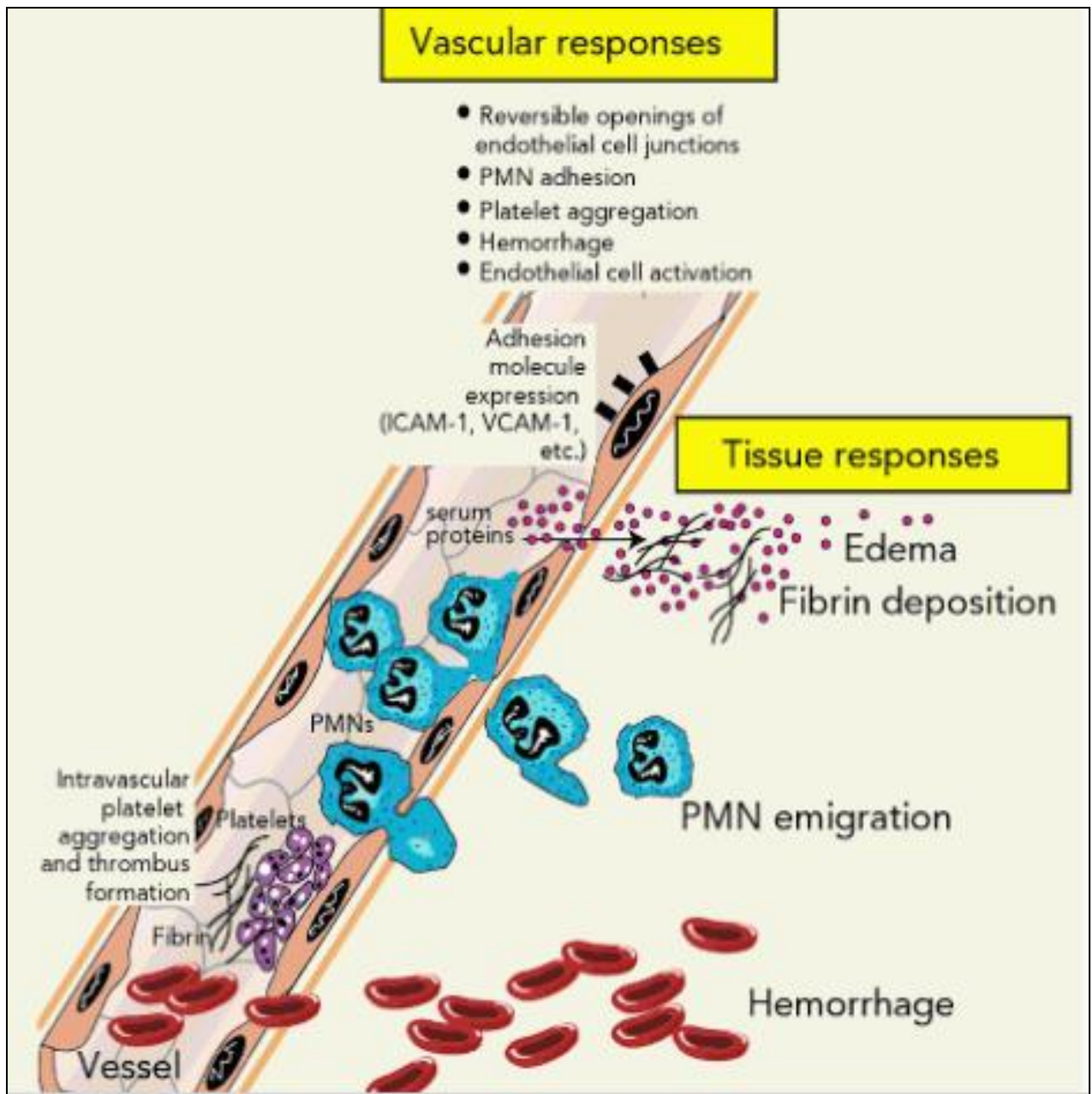


Figure 1: Etapes de l'inflammation aigue (Serhan et *al.*, 2010).

I.2.1. Phase vasculaire

Cette phase comporte une vasoconstriction extrêmement brève de quelque seconde de type reflexe sous l'action du système nerveux sympathique. La vasoconstriction permet de perturber le mouvement des plaquettes dans la circulation sanguine et entraîner leur activation. Les plaquettes activées sont capables de produire du thromboxane A2 aux propriétés agrégante et vasoconstrictrice. Outre son rôle dans l'hémostase primaire, cette phase immédiate vasculaire a aussi pour fonction d'isoler l'agent étranger. De plus,

l'activation des facteurs de coagulation en présence de facteurs tissulaires aboutit à la formation de fibrine qui vient consolider le clou hémostatique formé par l'agrégation des plaquettes. La fibrine est un puissant agent chimiotactique des polynucléaires neutrophiles (Weill et Batteux, 2003).

La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation durable médiée par plusieurs facteurs, incluant les kinines, la sérotonine, l'histamine et des dérivés de l'acide arachidonique libérés par les plaquettes activés et les mastocyte en plus des anaphylatoxines C3a et C5a générées par l'activation du complément (Clos, 2012).

La dilatation des vaisseaux sanguins est accompagnée d'une augmentation du débit locale et d'une modification de la perméabilité vasculaire. Cette dernière est due à l'élargissement des fenêtres intercellulaires, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques et des cellules vers les tissus (**Figure 2**). L'augmentation du débit microcirculatoire au niveau du site enflammé explique partiellement l'apparition de chaleur et de rougeur. L'exsudation plasmatique induit un œdème par distension des tissus et provoque une hyperpression sur les terminaisons nerveuse locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill et batteux, 2003 ; Kumar et Jain, 2014)

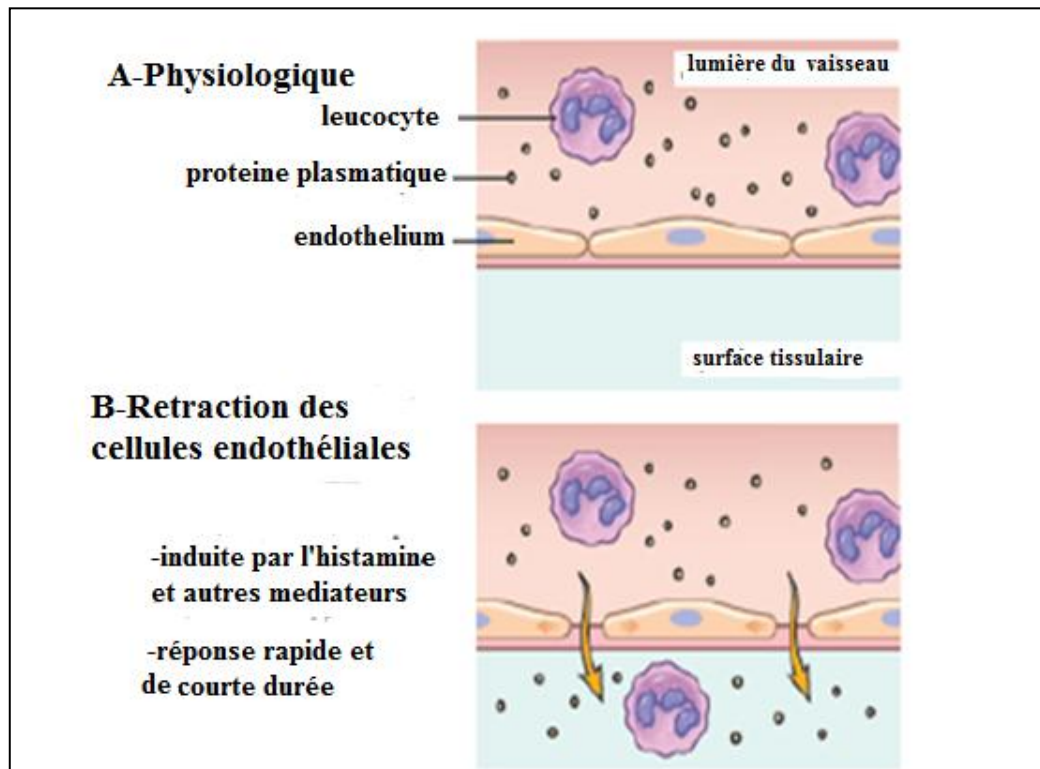


Figure 2 : Formation de l'exsudat (Kumar et Jain, 2014).

I.2.3 . Phase cellulaire

Il s'agit du recrutement des leucocytes sanguins dans les tissus. Les neutrophiles arrivent les premiers et leurs population est maximale dans les six heures suivant le début de l'inflammation. Cette étape est assurée par les cellules endothéliales activées par les médiateurs de l'inflammation. Dans un premier temps, ces dernières expriment, à leur surface, les sélectine P puis E qui lient faiblement des récepteurs leucocytaires, ces interactions ralentissent les leucocytes qui roulent alors sur l'endothélium. En se rapprochant du site de l'inflammation les leucocytes en roulement lient des chémokines par leurs récepteurs spécifiques, Cette phase d'activation se traduit par un changement de leur intégrines. Ces molécules établissent alors des liaisons stable avec des molécules d'adhérence de l'endothélium ICAM (Inter Cellular Adhesion Molecule) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ce qui assure l'adhésion des leucocytes. Cette étape est suivie par la diapédèse (**Figure 3**) qui amène les leucocytes dans les tissus. Ces cellules sont dirigées vers le lieu de l'infection par des gradients de facteurs chimiotactiques l'IL8, C5a, LTB4 et le f-Met-Leu-Phe (Aymeric et Lefranc, 2009).

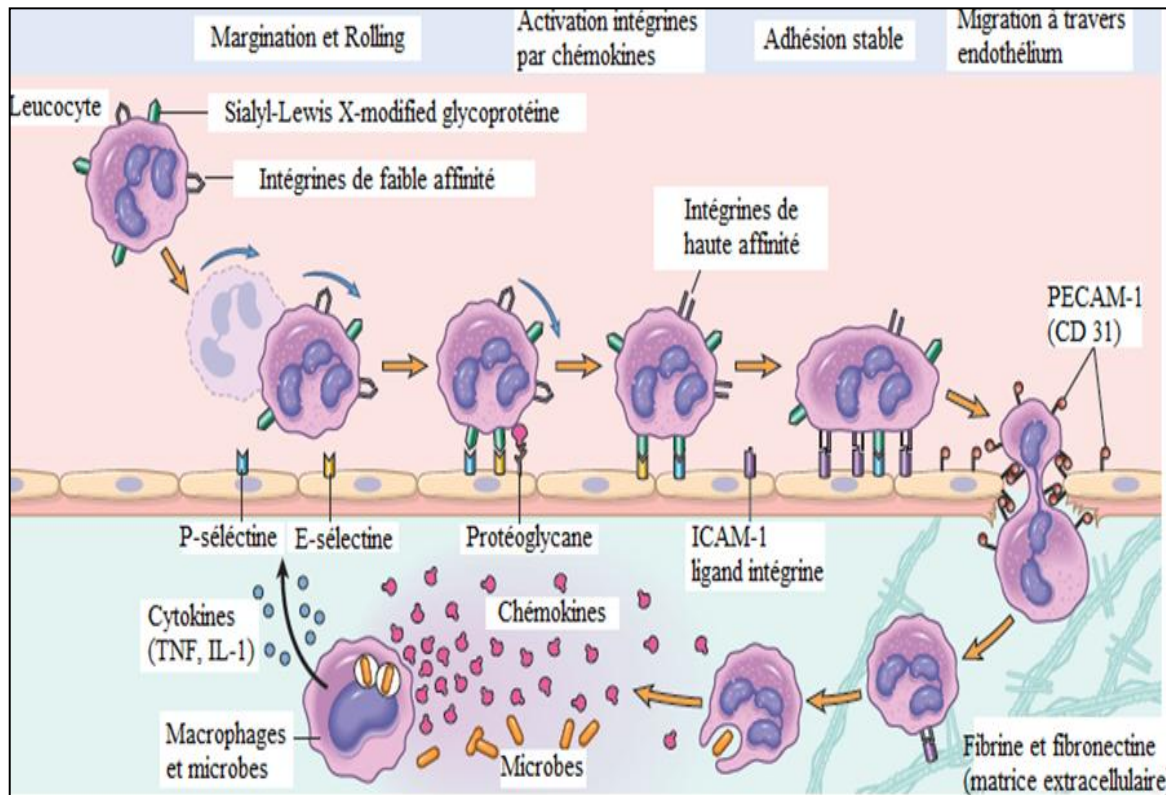


Figure 3:Diapédèse leucoctaire (Kumar et Jain, 2014).

Une fois présents dans le foyer inflammatoire, les polynucléaires phagocytent les substances étrangères opsonisées ou non. Les substances phagocytées sont englobées dans des vacuoles de phagocytose. Les lysosomes fusionnent avec la vacuole de phagocytose et y déversent leur contenu enzymatique, aboutissant à l'hydrolyse enzymatique du contenu des vacuoles et à l'activation du métabolisme cellulaire oxydatif avec production de radicaux libres oxygénés et azotés toxiques (Defranco et *al.*, 2009).

La deuxième vague cellulaire, qui survient 12 h à 48 h après l'agression, est constituée de monocytes circulants subissant le même sort que les polynucléaires (chimiotactisme et adhérence). Ils gagnent le foyer inflammatoire attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles où ils se transforment en macrophages. Ceux-ci assurent le nettoyage du foyer inflammatoire en cas d'inflammation aiguë et participe à la poursuite du processus inflammatoire dans le cas d'inflammation chronique (Aymeric et Lefranc, 2009).

I.2.3. Phase de résolution

Le retour à un état physiologique après une agression consiste dans un premier temps à l'arrêt de la réponse inflammatoire et ensuite la réparation des tissus lésés. Une fois leur rôle rempli, les neutrophiles rentrent dans un processus d'apoptose. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages les conduit à sécréter des lipoxines et des résolvines. Ces médiateurs lipidiques inhibent l'infiltration de nouveaux neutrophiles (Serhan et Savill, 2005 ; Soehnlein et Lindbom, 2010). La phagocytose des neutrophiles et des débris restants déclenche également un programme transcriptionnel de résolution qui va permettre aux macrophages d'exercer des fonctions de réparation. En effet, ils vont sécréter divers facteurs tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et l'IL10 ou encore le VEGF (Vascular endothelial growth factor), essentiel pour la revascularisation (Martin et Leibovich, 2005; Soehnlein et Lindbom, 2010). Le TGF- β joue aussi un rôle important dans la cicatrisation de la lésion en stimulant la division des fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus (Delves et *al.*, 2008).

I.3. Inflammation chronique

Si un agent inflammatoire persiste en raison de sa résistance à la destruction métabolique ou la déficience du système immunitaire qui devient alors incapable d'éliminer le germe, la

réponse inflammatoire évolue vers une chronicité pathologique. L'inflammation chronique se manifeste pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois, elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998 ; Delves et *al.*, 2008).

L'inflammation chronique se caractérise principalement par une dérégulation du système immunitaire de l'individu, celui-ci échappe à son contexte protecteur et réparateur pour occasionner d'importants dommages anatomiques et fonctionnelles caractéristiques de la gravité de différentes maladies inflammatoires chroniques telles que la goutte, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, la fibrose pulmonaire ...etc. (Amulic et *al.*, 2012).

L'inflammation chronique (**Figure 4**) se différencie de l'inflammation aiguë essentiellement par i) La coexistence des phénomènes vasculaires et cellulaires, ii) La prédominance de macrophages dans l'infiltrat cellulaire, iii) Les lymphocytes T et les plasmocytes sont fréquemment présents. iiiii) La phase de réparation fait intervenir des fibroblastes à l'origine d'un tissu cicatriciel fibreux n'ayant pas les propriétés du tissu initial (Blétry et *al.*, 2006).

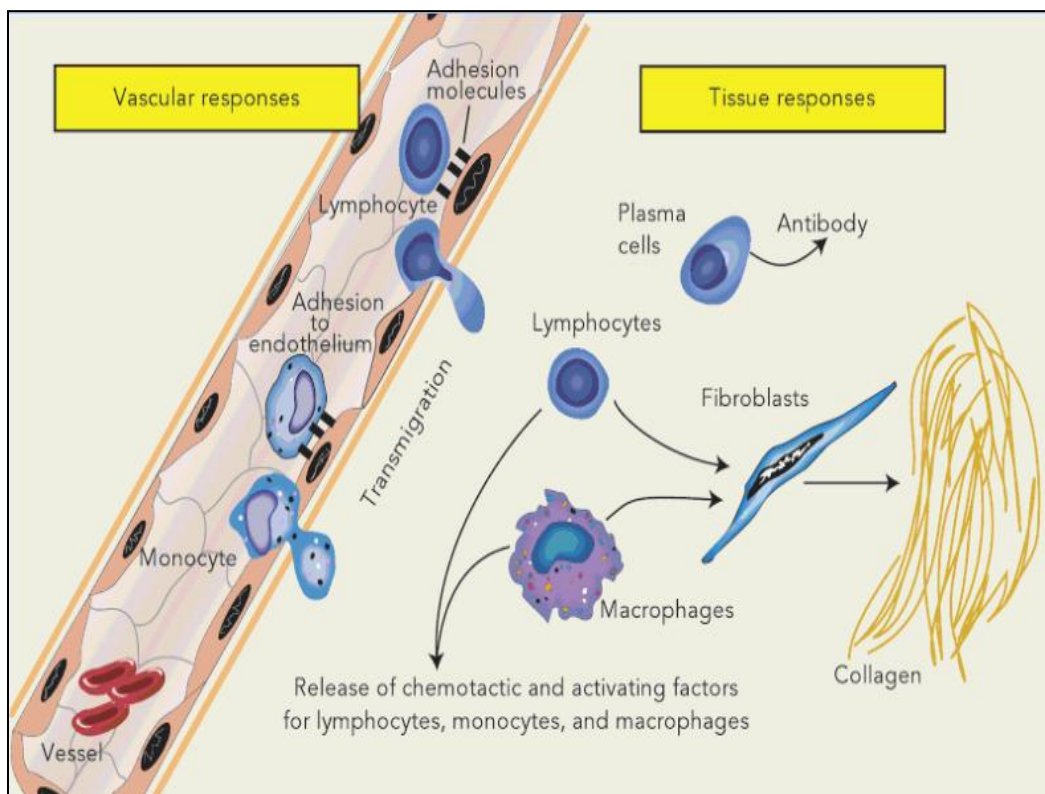


Figure 4 : Etapes de l'inflammation chronique (Serhan et *al.*, 2010)

I.4. Cellules inflammatoires

I.4.1. Polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNs) représentent 50% à 70% des leucocytes totaux et plus de 95% de la population granulocytaire. Elles sont les principales cellules de l'immunité qui migrent vers les sites inflammatoires, où elles ingèrent et détruisent les microorganismes infectieux (Defranco et *al.*, 2009). Les activités microbicides et cytotoxiques des PNs dépendent de différents mécanismes (**Figure 5**) qui sont d'ailleurs intriqués; libération d'enzymes protéolytiques stockés dans des granules spécifiques et production rapide et massive de radicaux libres, un processus que l'on appelle l'explosion oxydative des PNs.

Les neutrophiles contiennent en effet quatre types de granules intracellulaires : les granules primaires ou azurophiles (élastase, myéloperoxydase), granules secondaires ou spécifiques, granules tertiaires ou gélatinases et vésicules sécrétaires ou granules riches en phosphatase alcaline. Ces granules peuvent fusionner au phagolysosome à l'intérieur de la cellule et contribuer à la phagocytose ou fusionner à la membrane plasmique et larguer leur contenu dans le milieu extracellulaire par exocytose. C'est la mobilisation contrôlée de ces granules qui permet aux neutrophiles de passer de l'état de cellule circulante passive à celui de cellule immunitaire (Borregaard, 1997 ; Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014).

I.4.2. Polynucléaires éosinophiles

Les polynucléaires éosinophiles représentent de 1 à 5% des leucocytes circulants, ils possèdent de nombreux granules cytoplasmiques riches en une protéine basique, la MBP (major basic proteins) dont la fonction principale est de s'attaquer aux parasites et aux pathogènes de grande taille qui ne peuvent pas être endocytés (Male et *al.*, 2007, Lakhani et *al.*, 2009). Les éosinophiles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (Hogan et *al.*, 2008).

I.4.3. Polynucléaire basophiles

Les Polynucléaire basophiles représentent moins de 1% des leucocytes circulants. Les basophiles possèdent des granulations cytoplasmiques volumineuses contenant des substances (Héparine, histamine, kalikreine) qu'ils libèrent pour réguler les réactions allergique et inflammatoire (Kierszenbaum, 2002).

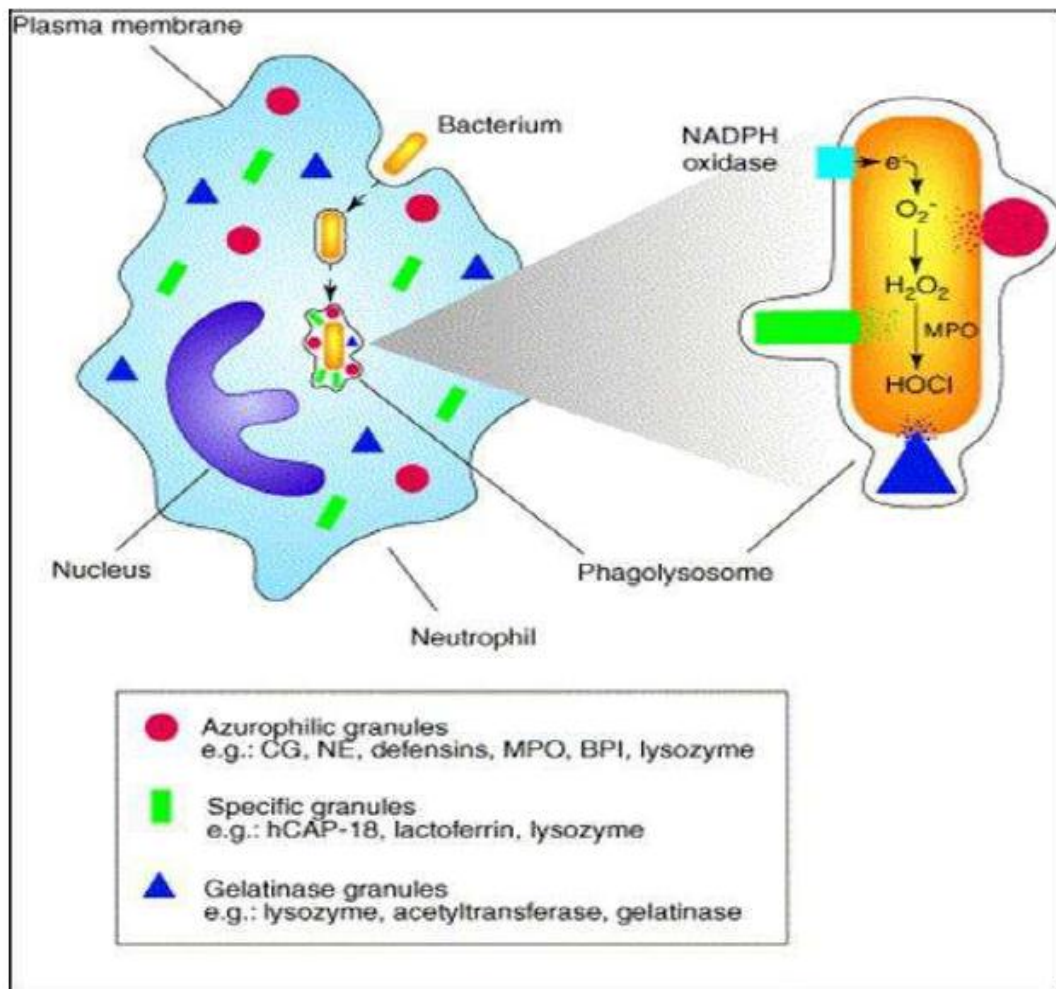


Figure 5 : Mécanisme oxydatif et enzymatique du neutrophile durant la phagocytose (Mayer-Scholl *et al.*, 2004).

I.4.4. Macrophages

Représentent 4% des leucocytes circulants. Ce sont des cellules à durée de vie longue qui assurent la surveillance immunitaire dans les tissus et qui y jouent un rôle d'entretien important. Ils dérivent des monocytes qui circulent dans le sang et ils se différencient en quittant le flux sanguin. Comme les neutrophiles, les macrophages sont des cellules phagocytaires. Ils ingèrent et détruisent les microorganismes pathogènes. Ils interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Les macrophages sont considérés comme les cellules pivots de l'inflammation chronique (Defranco *et al.*, 2009). Ils interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007 ; Callahan et Yates., 2014).

I.4.5. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules du tissu conjonctif qui ont des ressemblances fonctionnelles et histologiques aux basophiles (Caughey, 2011). Ils jouent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (Weill et Bateux, 2003). Ils contiennent de nombreux granules renfermant des médiateurs chimiques comme l’histamine, la sérotonine (Williams et Galli, 2000).

I.4.6. Lymphocytes

Les lymphocytes représentent 20% des leucocytes circulants. Ils interviennent plus tardivement et participent à la réponse immunitaire spécifique. Les lymphocytes T sont la principale source de cytokines. Les lymphocytes B et leurs dérivés, les plasmocytes, produisent des anticorps, notamment les opsonines, facilitant ainsi la phagocytose (Callahan et Yates, 2014).

I.4.7. Plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont indispensables à l’hémostase primaire. Elles contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs comme le PAF, le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine (Steinhubl, 2007).

I.5. Médiateurs inflammatoires chimiques

Le déclenchement et la poursuite de l’inflammation, ainsi que sa diffusion à partir du foyer inflammatoire font appel à différent type de médiateurs (**Tableau 1**) synthétisés localement par les cellules inflammatoires ou qui sont présents à l’état de précurseur inactif dans la circulation sanguine.

Tableau 1 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires (Defranco et *al.*, 2009 ; Winyard et *al.*, 2013).

	Médiateurs	Origine	Actions
Médiateurs plasmatiques	Kalicroéine	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
	Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.
	Fibrine	Présente dans le plasma, formé à partir du fibrinogène	Intervient dans la formation du caillot sanguin.
	C3a C5a	Fraction C3 du complément inactif. Fraction C5 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes. Augmente la vasodilatation, et la perméabilité vasculaire Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophile, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.
Médiateurs cellulaires	Amines vasoactives		
	Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
	Serotonine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
	Médiateurs lipidiques		
	Leucotriènes	Macrophage, mastocytes	Augmente la contraction des muscles lisses et la perméabilité vasculaire
	Prostaglandine E2(PGE2)	Macrophage, mastocytes	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
	Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Macrophage mastocyte	Agrégation plaquettaire, accroît l'adhérence des cellules endothéliales
	Cytokines proinflammatoires		
	IL1	Macrophage, mastocytes, cellule endothéliale	Augmente l'adhérence des cellules endothéliale, active les lymphocytes
	IL8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production de radicaux libres. Intervient dans la réparation tissulaire
	Facteur de necrose tumoral (TNF α)	Macrophage, mastocytes	Augmente la perméabilité vasculaire, adhérence des cellules endothéliales, activation des phagocytes
	Espèces oxygénées et azotées réactives		
	Superoxyde et peroxyde d'hydrogène	NADPH oxydase (neutrophile, eosinophile, macrophage)	Effet cytotoxique sur les microorganismes
	Acide hypochloreux	Myeloperoxydase (neutrophile)	Effet cytotoxique sur les microorganismes
Monoxyde d'azote peroxy nitrite	NOS inductible (macrophage, neutrophile, cellules endothéliale)	Vasodilatation, perméabilité vasculaire, production de prostaglandines effets cytotoxique sur les microorganismes	

I.5. Inflammation et espèces réactives

Les espèces réactives sont des molécules hautement énergétiques et instables, elles sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Ces espèces réactives peuvent être dérivées de l'oxygène (ERO, espèce réactive d'oxygène) ou l'azote (ERN, espèces réactives de l'azote). En faible quantité, elles servent de messager intracellulaire et sont nécessaires à la différenciation cellulaire, à l'apoptose, à l'immunité et à la défense contre les microorganismes (Sanchez et *al.*, 2015). Cependant, lorsque leur production est excessive, cela conduit à l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'ADN (Phaniendra et *al.*, 2015).

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation des espèces réactives est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes comme le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et inflammatoires (Pincemail et *al.*, 2002).

I.5.1. Réaction inflammatoire et production des espèces réactives

La phagocytose est notamment caractérisée par une explosion respiratoire avec une surconsommation d'oxygène, pouvant atteindre 10 à 20 fois la consommation basale chez les neutrophiles activés (Halliwell et Guttridge, 2008). La flambée respiratoire implique l'activation de la NADPH-oxydase, de la myeloperoxydase (MPO) et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), agissant de concert pour éliminer les microorganismes en produisant des espèces réactives (**Figure 6**) capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Serteyn, 2003).

La NADPH oxydase est l'enzyme responsable de la synthèse du superoxyde $O_2^{\cdot-}$ par transfert d'électrons depuis une molécule de NADPH, issue de la voie des hexoses mono-phosphates, vers une molécule d'oxygène. La NADPH-oxydase est un système multimoléculaire complexe formé de différents composants protéiques dispersés entre le cytosol et la membrane dans le PN à l'état de repos.

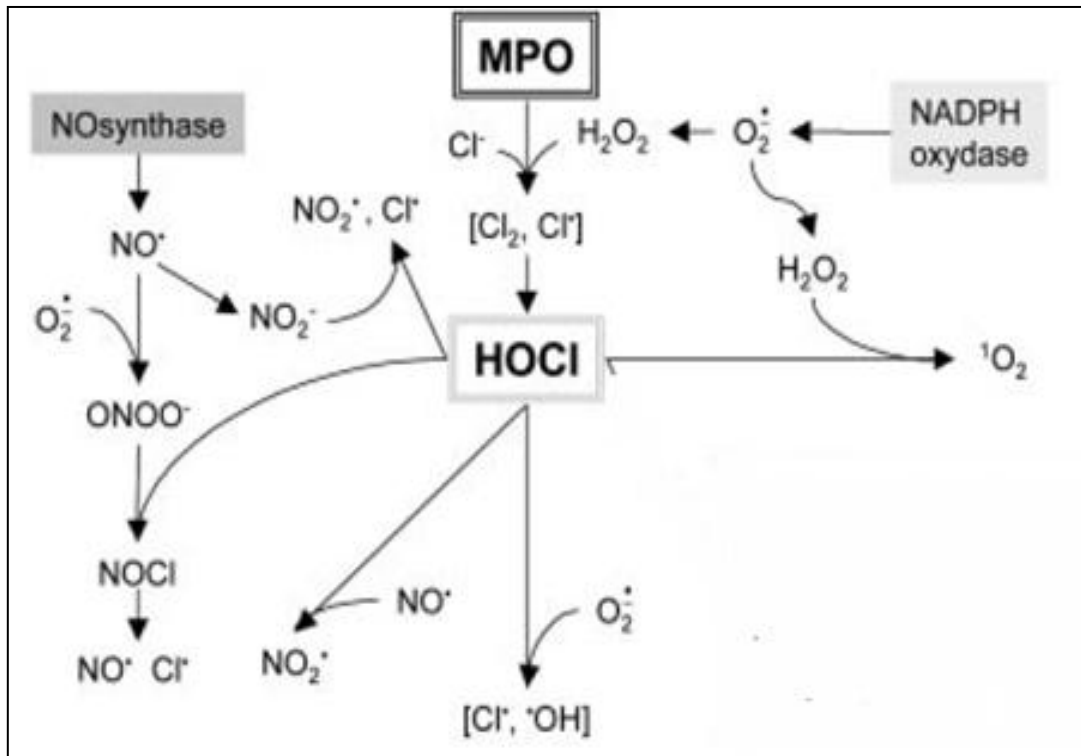


Figure 6 : productions des espèces réactives durant l'inflammation (Serteyn, 2003).

La NADPH-oxydase active est formée par le regroupement de ses divers composants au niveau membranaire après stimulation du PN par un grand nombre de facteurs solubles tels que le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), le fMLP et l'ionomycine, ou par des stimuli particuliers tels que des bactéries opsonisées (Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014).

La dismutation du radical superoxyde produit par la NADPH-oxydase en peroxyde d'hydrogène est favorisée par l'acidité du phagolysosome. La concentration en peroxyde d'hydrogène dans les vésicules de phagocytose peut atteindre 100 $\mu\text{mol/L}$ (Valko et *al.*, 2007).

D'autres enzymes complètent également le rôle de la NADPH-oxydase dans la production des espèces réactives : La myéloperoxydase qui est une peroxydase hémunique présente en concentrations importantes (2 -5 % en poids) dans les granules azurophiles des PN. Elle est présente également dans les monocytes en concentration plus faible et devient indétectable lors de la maturation en macrophages (Serteyn et *al.*, 2003).

Durant l'explosion oxydatif lors de la phagocytose, la MPO est activée et catalyse la transformation de H_2O_2 en présence d'ion chlore Cl^- en acide hypochloreux (HOCl), composé voisin de l'eau de javel et qui est hautement bactéricide (Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014).

Enfin, la iNOS forment des ERN et notamment du monoxyde d'azote radicalaire $\bullet\text{NO}$ qui, en réagissant avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ produit par la NADPH-oxydase, donne naissance au peroxydinitrite OONO^{\bullet} . Toutes ces ERO/ERN qui interagissent les unes avec les autres afin de détruire le pathogène traduisent l'explosion oxydative (Migdal et Serres, 2011).

I.5.2. Implication des espèces réactives dans le processus inflammatoire

Les ERO agissent comme un second messager dans plusieurs mécanismes transductionnels inflammatoires (**Figure 7**). Elles modulent notamment l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κB , le facteur inductible par l'hypoxie (HIF) ou encore la protéine activatrice1 (AP-1) chez de nombreux types cellulaires (cellules épithéliales bronchiques, cellules endothéliales, neutrophiles et mastocytes) (Sagai et Bocci, 2011 ; Moran *et al.*, 2011 ; Sesti *et al.*, 2012).

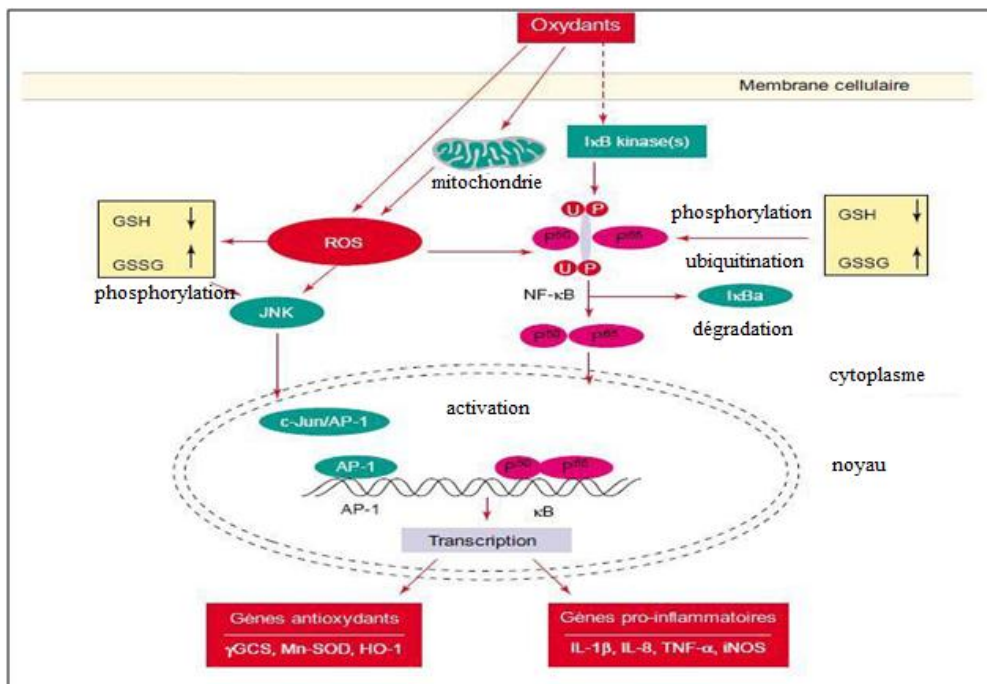


Figure 7: Mécanisme d'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoires par le stress oxydant et les voies d'AP-1 et NF- κB (MacNee et Rahman, 2001).

Le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κB est classiquement activé par la liaison de facteurs comme les lipopolysaccharides (LPS) ou le TNF- α à leurs récepteurs. Ceci déclenche une cascade de signalisation menant à la dégradation d'I κB , la protéine inhibitrice du NF- κB . Les ERO peuvent eux aussi mener à la dégradation de I κB et entraîner l'activation

du NF-kB (**Figure 7**) (Halliwell et Guttridge, 2008 ; Précourt, 2011). Une fois libéré, le NF-kB est transloqué au noyau où il se lie à l'ADN pour induire l'expression de différents gènes pro-inflammatoires. L'activation de NF-kB induit en effet l'expression des gènes codant pour l'IL-6, le TNF- α , la cyclooxygénase-2 (COX-2), IL-8 et IL-1 β (Précourt, 2011, Sagai et Bocci, 2011). Le NFk-B mène également à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion comme l'E-sélectine, ICAM et VCAM-1 et facilite ainsi l'adhérence des cellules phagocytaires (Précourt, 2011).

Les radicaux libres de l'oxygène activent le NF-kB par un autre mécanisme qui implique la diminution des taux cellulaires de glutathion. En effet, lors d'une augmentation du stress oxydatif, il existe une mise en jeu des défenses antioxydantes et notamment du glutathion réduit (GSH) dont les taux sont diminués en cas d'un stress oxydant prolongé. Il a été montré que le GSH avait une action inhibitrice directe sur l'activation du NFk-B par le TNF- α . Le GSH module également la formation de molécules d'adhésion (ICAM). Il peut donc directement agir sur la voie du NF-kB, mais aussi sur les facteurs transcriptionnels résultant de son activation. Cette modulation du NF-kB par le GSH va donc limiter la production de facteurs proinflammatoires comme l'IL-8, l'IL-1 et le NO et l'expression des gènes de l'inflammation. Les variations du ratio GSH/glutathion dissulfide (GSSG) vont aussi agir sur la protéine activatrice1. Il a également été montré que l'activation d'AP-1 par le LPS est inhibée par la N-acétyl-cystéine (précurseur de GSH) et que la surexpression de la glutamine cystéine synthétase inhibait l'activation d'AP-1 (Huet et Duranteau, 2008 ; Biswas et *al.*, 2016).

Le remodelage de la chromatine est un autre événement induit par les radicaux libres de l'oxygène qui peut être à l'origine d'une inflammation accrue. Dans des circonstances normales, l'ADN est enroulé autour des « core » d'histones et cette configuration prévient la transcription excessive par des facteurs comme NFk-B tout en réduisant l'accès de l'ARN polymérase à l'ADN, le tout conduisant à une répression transcriptionnelle. Sous le contrôle de l'histone acétyltransférase, les résidus de l'histone sont acétylés induisant une modification de l'interaction de l'ADN avec les histones. Cela permet l'accès des facteurs de transcription comme NFk-B à l'ADN ou à l'ARN polymérase conduisant à une augmentation de l'expression des gènes (Adcock, 2005).

La modification des bases d'ADN provoquée par les ERO est également impliquée dans l'induction de l'inflammation. En effet, la réparation par excision de base d'ADN endommagée ou modifiée (7,8-dihydro-8-Oxoguanine) par la 8-oxoguanine-ADN glyoxalase-1 induit une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation de NF-kB entraînant une

expression de gènes proinflammatoires et l'accumulation de cellules inflammatoires. Le 8-isoprostane, un produit final de l'acide arachidonique et un marqueur du stress oxydatif, augmente l'expression de l'IL-8 dans les macrophages humains par activation de la voie des MAP kinases (Biswas et *al.*, 2016).

I.6. Les anti-inflammatoires

I.6.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) appelés communément glucocorticoïdes. Ce sont des dérivés de synthèse de la cortisone. Ils constituent un groupe très homogène sur le plan structural avec une activité anti-inflammatoire puissante en plus de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques. Les AIS empêchent l'activation de la phospholipase A2, bloquant à la fois la voie des prostaglandines et celles des leucotriènes (Mallem et Gogny, 2014).

Les glucocorticoïdes agissent à de multiple niveaux sur toutes les phases de l'inflammation qu'elle soit aiguë ou chronique. Leurs action sur la phase vasculaire se produit à travers l'inhibition de la synthèse des médiateurs de l'inflammation ou l'augmentation de leurs catabolisme, ainsi que par l'induction de la synthèse de protéines anti-inflammatoires. Leur action sur la phase cellulaire est caractérisée par une forte inhibition de la migration des leucocytes et une réduction de la phagocytose des cellules lésées et de la prolifération lymphocytaire, ce qui a pour conséquence une limitation de la réaction immunitaire au site de l'inflammation. Les glucocorticoïdes représentent le traitement le plus efficace des maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Kessel et *al.*, 2014). Ils ont néanmoins l'inconvénient de réduire les défenses de l'organisme, de provoquer des perturbations métaboliques et endocriniennes survenant notamment lors de l'administration prolongée (Strehl et *al.*, 2011).

I.6.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent d'un point de vue chimique un groupe très hétérogène, mais partage en commun la propriété d'inhiber la synthèse des prostaglandines, qui est en grande partie à la base de leurs effets anti-inflammatoires, antipyrétique et analgésique. Tous les AINS agissent sur la phase précoce de l'inflammation.

Ils limitent la perméabilité et la formation d'œdème par réduction de formation de médiateurs vasoactives PGE2. A la différence des glucocorticoïdes, les AINS n'ont pas d'action sur la phase cellulaire tardive de l'inflammation (Mathews et *al.*, 2013). Leur emploi devrait donc être réservé aux affections inflammatoire aigue ou aux accès douloureux des phénomènes chroniques. Ils sont surtout indiqués dans les affections articulaires et musculosquelettiques. Ils présentent tous, à divers degrés, des effets secondaires gastriques, rénaux et hémorragiques, qui sont exacerbés en cas de surdosage (Mallem et Gogny, 2014).

I.6.3. Les polyphénols comme anti-inflammatoires naturels

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées, allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (Lima et *al.*, 2014).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside. Les polyphenols sont communément subdivisés en deux grands groupes (**Figure 8**): Les non flavonoïdes (les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes) et les flavonoïdes, dont on distingue principalement les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, et flavanols (Tangney et Rasmussen, 2013).

Contrairement aux composés pharmacologiques qui agissent spécifiquement via un récepteur ou une voie de signalisation, les polyphénols ont des modes d'action multi-cibles. De nombreuses études *in vitro* montrent que les flavonoïdes pourraient affecter leurs cibles biologiques en modulant certaines activités enzymatiques, l'expression de gènes ou bien la signalisation cellulaire, en interagissant avec des récepteurs membranaires ou cellulaires, ou via des régulations épigénétiques. La diversité de ces mécanismes d'action potentiels explique le large spectre d'activités biologiques des flavonoïdes observées *in vivo*. Parmi celles-ci, des activités anti-angiogéniques, anti-prolifératives, antioxydantes et anti-inflammatoires ; ces activités sont potentiellement intéressantes en participant aux effets santé associés à la consommation de produit végétaux ou de plantes médicinales (Morand et Milenkovic, 2014 ; Pavlova et *al.*, 2015).

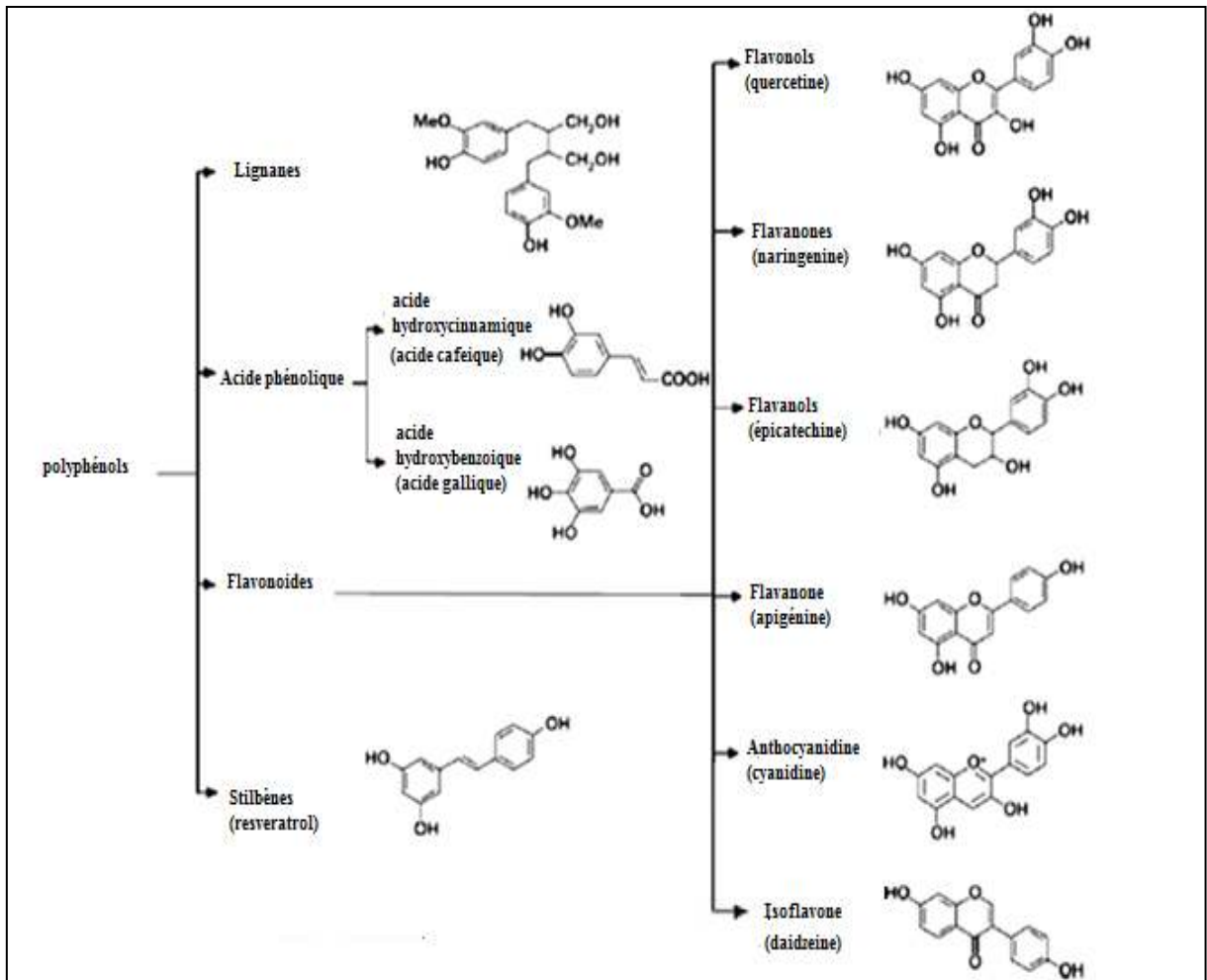


Figure 8 : Principales classes des polyphénols (Tangney et Rasmussen, 2013).

Les polyphénols peuvent moduler l’inflammation par plusieurs mécanismes (**Tableau 2**), incluant la modulation des voies de signalisation, l’inhibition des enzymes impliqués dans le métabolisme de l’acide arachidonique ; cyclooxygénase-2 (COX-2) et 5-lipooxygénase (5-LOX) ainsi que les enzymes qui génèrent les ERO/ERN, le piégeage directe des ERO/ERN, l’inhibition des facteurs de transcription NFκB et la réduction de l’adhérence des cellules immunitaires à l’endothélium (Stevenson et Hurst, 2007 ; Tangney et Rasmussen, 2013).

Tableau 2: Mécanismes anti-inflammatoires des composés phénoliques (Tangney et Rasmussen, 2013).

Modification des cascades de signalisation et de facteur de transcription
<p><i>-Inhibition des enzymes prooxydantes</i></p> <p>Suppression de l'activité et l'expression de NADPH oxydase endothéliale, de la COX-2, 5-LOX, MPO, phospholipase, iNOS.</p> <p><i>- Inhibition de la signalisation et l'expression du NFkB</i></p> <p>Diminution de la synthèse de TNFα, IL1β, IL6</p> <p>Réduction de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1</p> <p>Réduction de l'expression MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) et de MIP (macrophage inflammatory protein)</p>
Activité antioxydante
<p>Inhibition des espèces oxygénés et azoté réactive</p> <p>Effet scavenger directe du peroxydrite, radical hydroxyl, anion superoxyde et du monoxyde d'azote.</p>
Réduction de l'adhésion des cellules immunitaire à l'endothélium
<p>Suppression des marqueurs d'adhésion à l'endothélium CD40, VCAM, ICAM, E-selectine, P-selectine.</p> <p>Inhibition de l'expression de métalproteinase1</p>

Des travaux menés *in vitro* ont également montré que les flavonoïdes (lutéoline, apigénine, kaempferol, quercétine, myricétine, naringénine, catéchine, phlorétine, butéine, pelargonidine) et les lignanes sont de puissants inhibiteurs de la production de TNF- α par des macrophages stimulés au LPS (Muzamal et al., 2013).

Récemment, Zeinali et ses collaborateurs (2017) ont montré que la chrysin est un puissant anti-inflammatoire qui exerce un effet agoniste sur le NF-kB, qui contrôle l'expression des gènes codant pour les cytokines pro inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), les enzymes inducibles (COX-2 et iNOS) et les molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, E-selectine). La chrysin exerce aussi un effet antagoniste sur le récepteur activé par les proliférateurs de peroxydrites (PPAR- γ) qui est impliqué dans la répression des enzymes pro inflammatoires tels que la MPO, la COX-2, la iNOS et la phospholipase A2.

Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes est inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (Salas-Salvado et *al.*, 2008) et que la consommation d'anthocyanes est associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et INF- α) circulantes (Karlsen, 2007).

II. Plantes étudiées

II.1. La plante *Rubus fruticosus* L.

Le nom *Rubus fruticosus* provient du latin *ruber* ; rouge en référence à la couleur des fruits avant leur complète maturité. *Frutex* signifie rejeton ou en forme d'arbrisseau. *Rubus fruticosus* L. est une plante appartenant à la famille des rosacées. Elle est communément connue sous le nom de Ronce commune, Murier sauvages, Blackberry en anglais et Tût el Ullayq en Algérie (Lim, 2012). Cette espèce est originaire d'Asie et d'Europe. C'est une plante spontanée qui se trouve dans les terrains incultes, le long des haies, clairières des bois, bords des chemins, lisière et coupe forestière (Rameau et *al.*, 2003).

II.1.1. Taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement: Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Genre : *Rubus*

Espèce : *Rubus fruticosus*

II.1.2. Aspect botanique de *Rubus fruticosus*

La ronce est un arbrisseau vivace (**Figure 9**), épineux, à tiges bisannuelles très longue, ligneuses et anguleuses. Les feuilles sont alternes et caduques, mais elles peuvent persister sur les turions jusqu'en fin d'hiver. Elles présentent 3 à 5 folioles à bord denté, disposées en éventail. Les feuilles des tiges florifères, de seconde année, peuvent n'avoir qu'un limbe

divisé en 3 ou 2 folioles, voire une seule. La surface supérieure des feuilles est verte et glabre ou légèrement pileuse ; la surface inférieure, plus claire. Les fleurs sont hermaphrodites et régulières, d'un diamètre moyen de 2 cm. Le calice comporte 5 sépales verts, renversés après la floraison. Les pétales, au nombre de 5, sont alternés avec les sépales. Ils sont étalés et de couleur pouvant varier du blanc au rosé foncé. Il y a un grand nombre d'étamines qui, après floraison, se dessèchent et se recourbent sur la face interne de leurs filets. Les carpelles, très nombreux, sont glabres ou pileux. Ils se transforment en drupes agglomérées, pour former le fruit bleu foncé à noir, appelé communément : mûre (Rameau et *al.*, 1993).

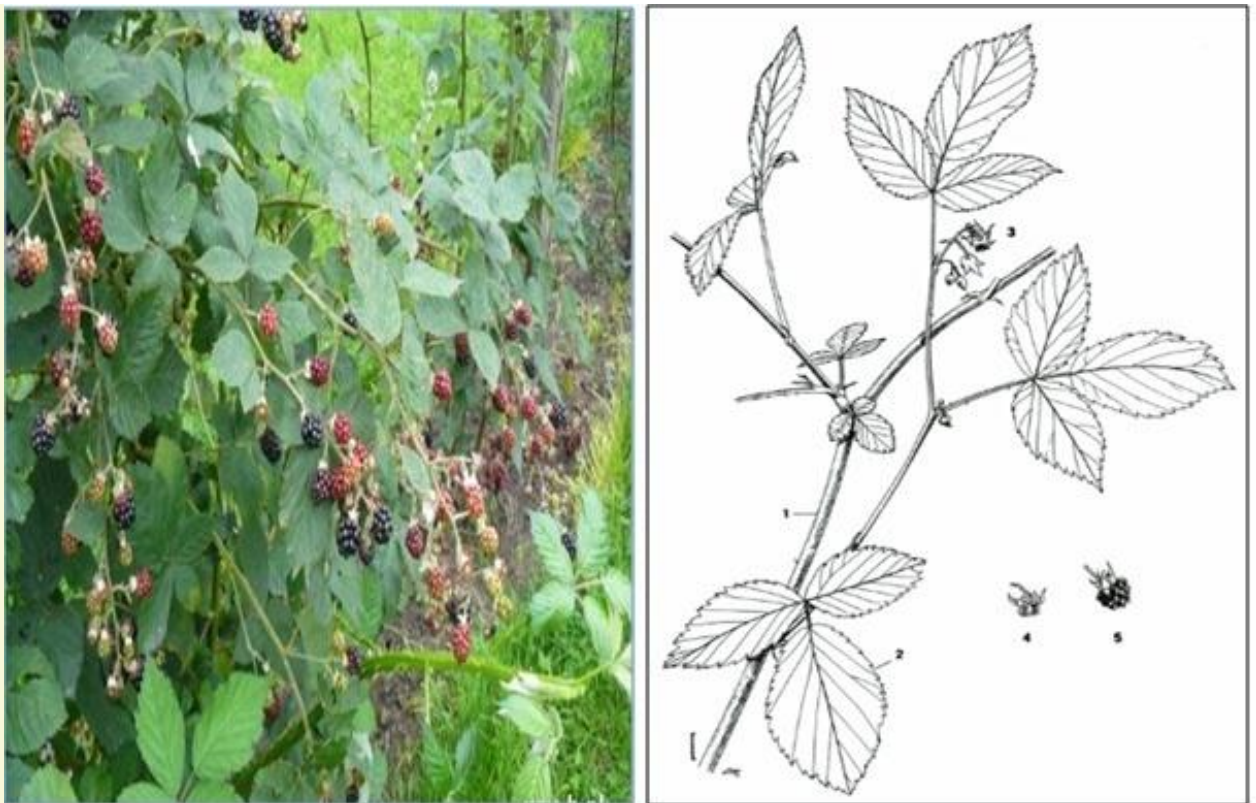


Figure 9 : Aspect morphologique de *Rubus fruticosus* L
(<http://www.arkive.org/bramble/rubus-fruticosus-agg/imag>)

II.1.3. Usage thérapeutique traditionnel

La ronce est une plante médicinale très appréciée pour son efficacité à traiter certaines maladies. Constituée essentiellement de tanin, cette plante détient un pouvoir astringent et anti-diarrhéique. Le gargarisme par la décoction de la ronce est utilisé pour le traitement des inflammations de la bouches comme les aphtes, les gingivites, les pharyngites. Les feuilles de la ronce possèdent une action antibactérienne et antifongique ; ainsi elles sont utilisées pour soigner les plaies et les blessures extérieures. Le décocté des feuilles peut servir de collyre pour les yeux. Les bourgeons sont employés pour guérir la bronchite et permet d'atténuer les problèmes d'insuffisance respiratoire. La ronce est dotée aussi de propriétés carminative, diurétique et anti hémorroïdaire (Fournier, 2010 ; Zia-Ul-Haq et *al.*, 2014).

II.1.4. Phytochimie

Plusieurs études phytochimiques réalisées sur la plante *Rubus fruticosus* ont permis d'identifier certains composants bioactifs auxquels sont attribuées les activités pharmacologiques de cette plante, dont les plus important sont les acides phénoliques comme l'acide éllagique, l'acide gallique, l'acide cafféique, l'acide p-coumarique et les flavonoids comme la quercetine, le kaempferol, la myricitine, la catéchine, l'epicatéchine, l'epicatéchine gallate, la cyanidine-3-O-glucoside et la quercetine-3-D-glucoside. (Gudej et Tomczyk, 2004 ; Radovanović et *al.*, 2013 ; Milivojevic et *al.*, 2011). Des Triterpenes acides comme l'acide rubutique, rubinique et 2- α -Hydroxyursolique ont été isolés à partir de *Rubus fruticosus* (Zia-Ul-Haq et *al.*, 2014). Les composés aromatiques tels que le 5-hydroxymethylfurfural et le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one sont éventuellement présents dans cette plante (Turemis et *al.*, 2003).

II.1.5. Propriétés biologiques

La plante *Rubus fruticosus* est très utilisée en phytothérapie notamment grâce à ses propriétés biologiques. L'extrait aqueux de cette plante a montré un effet anti-inflammatoire *in vitro* supérieur à celui de l'aspirine par inhibition de la hyaluronidase (Marquina et al, 2002). La Cyanidin-3-O-glucoside isolée de *Rubus fruticosus* supprime la production du NO par inhibition de l'activation du NF-kB ou des MAP kinase. Elle possède également une forte activité antioxydante et anticancéreuse. Elle inhibe la transformation néoplasique, la

métastase et induit l'apoptose dans les cellules néoplasiques HL-60 (Ding et *al.*, 2006). En outre, *Rubus fruticosus* a montré un effet hypoglycémiant chez la souris dans le modèle du diabète induit par la streptozotocine et l'alloxane. Cet effet est lié à l'inhibition de l' α glucosidase intestinale et l' α amylase pancréatique (Zia-Ul-Haq et *al.*, 2014).

II.2. La plante *Zizyphus vulgaris* Lam.

C'est un arbrisseau épineux originaire d'Asie et s'est ensuite naturalisé dans toute la région méditerranéenne. Il apprécie les sols légers et supporte bien des périodes de sécheresse. *Zizyphus vulgaris* L. appartient à la famille des Rhamnaceae et est bien connu au moins par ses fruits, les jujubes. Il est communément connu sous le nom de jujubier commun, dattier chinois en anglais, sidr ou nbegue en arabe (Rameau et *al.*, 2008 ; Debuigne et Couplant, 2013).

II.2.1. Taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement: Magnoliophyta

Sous-embranchement: Magnoliophytina

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Rosidae

Ordre: Rhamnales

Famille : Rhamnaceae

Genre : *Zizyphus*

Espèce : *Zizyphus vulgaris* Lam.

II.2.2. Aspect botanique

Zizyphus vulgaris est un arbrisseau épineux (**Figure 10**) qui possède un port très particulier dû à ces rameaux de 2 sortes, les un grêles et effilés, les autres tortueux et en Zig Zag, garnis à leurs insertions de deux aiguilles droites presque égales. Ses feuilles sont alternes sur deux rangs opposés, obliquement ovale-oblongues, un peu dure lisse marquées de trois nervure profondes convergentes vers le haut. Les fleurs sont petites, axillaires et attachées à des

pédoncules fort courts, en petit paquet à l'aisselle des feuilles. Les fruits sont des baies de la forme et de la grosseur d'une olive, brun rougeâtre à leurs maturités (Rameau et *al.*, 2008).



Figure 10: Aspect morphologique de *Zizyphus vulgaris* Lam (<http://www.alamy.com/stock-photo-jujube-fruits-zizyphus>).

II.2.3. Usage thérapeutique traditionnel

Le jujubier est une plante courante dans la médecine populaire. Sa racine est utilisée en décoction pour traiter les maladies du tube digestif et du foie. Les feuilles sont utilisées en décoction comme anti diarrhéique, vermifuge, antidiabétique et antiseptique urinaire. Le fruit riche en mucilage est surtout employé dans les traitements des affections des voies respiratoires. Le jujubier possède d'autres propriétés telles que : sa valeur tonique, émolliente, laxative, diurétique et sédative (Fournier, 2010 ; Debuigne et couplant, 2013).

II.2.4. Phytochimie et propriétés biologiques

Très peu d'études phytochimique et pharmacologique sont effectuées sur l'espece *Zizyphus vulgaris*, cependant le genre *Zizyphus* est généralement connu par son contenu en molécules biologiquement actives telles que les polyphénols (flavonoides, tanins), les triterpènes, les anthraquinones, les alcaloïdes (cyclopeptides et isoquinolides) et les saponosides de type damarane (Le crouéour, 2002 ; Borgi et Chouchane, 2006).

Des études pharmacologiques menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les extraits du genre *Zizyphus* possèdent des activités anti-inflammatoires, analgésique, antispasmodique antiulcérogène, antibactérienne, antifongique et molluscicide (Ghedira, 2013).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

I.1. Produits et réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude sont : Indométacine, huile de croton *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide), composés phénoliques, reactif de Folin–Ciocalteu, ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazine-6-sulfonic acid)), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), cytochalasine B, dextran, DPPH (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl), Hanks' Balanced Salt solution sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (HBSS₁) ou avec Ca²⁺ et Mg²⁺ (HBSS₂), héparinate de lithium, Ficoll-Histopaque, fMLP (formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine), *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-*p*-Nitroanilide, superoxyde dismutase (SOD), tetraméthyle benzidine, hexadecyltriméthylammonium bromide (HTAB) et ferricytochrome c, provenant de Sigma (Allemagne). Le Bleu d'Evans est obtenu auprès de RAL reactifs (France). La minipreparation kit d'ADN plasmidique provient de Qiagen (Espagne). Tous les solvants, les sels et les autres produits utilisés sont de grade analytique et proviennent Panreac (Espagne), Fluka et Prolabo (France).

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Rubus fruticosus* et les racines de *Zizyphus vulgaris* ont été récoltées au mois de September 2011 de la région de Bordj Bou Arréridj. L'identification a été faite par Pr Laouar Houcin (Laboratoire de Botanique à l'Université de Sétif). Les plantes sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante, puis stockées à l'abri de la lumière.

I.2.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris *Swiss albinos* dont le poids varie entre 25 et 30 g procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux répartis en groupes comportant 7 à 9 chacun, sont hébergés dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à l'aliment fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia. Après une période d'adaptation de 7 jours, les souris sont pesées, marquées, et soumises à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

I.2.3. Sang humain

Les neutrophiles sont isolés à partir du sang humain frais obtenu par prélèvement veineux au pli du coude de volontaires sains et non fumeurs, ayant certifié n'être sous aucune médication au moins durant les derniers 15 jours qui ont précédé le prélèvement

II. Méthodes

II.1. Analyse phytochimique des extraits

II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

L'extrait méthanolique de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* est préparé selon la méthode de Tadeg et ses collaborateurs (2005). Le matériel végétal broyé est mis à macérer dans un mélange méthanol/eau (8 : 2 V/V) avec un rapport de 10 g/100 ml sous agitation douce pendant 48 heures à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un Rotavapor (BÜCHI). L'extrait obtenu est lyophilisé pendant 12 heures.

II.1.2. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon Li et *al.*, (2007) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Brièvement, 1 ml de réactif de Folin - Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard (acide gallique) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Annexe) établie avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et est exprimée

en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

II.1.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al. 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. À 1 ml d'échantillon ou de standard (Quercétine) est ajouté 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage (Annexe) établie avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et est exprimée en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

II.1.4. Identification des composés phénoliques par HPLC-TOF-MS

L'analyse chromatographique des extraits bruts de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* est réalisée par HPLC-TOF-MS selon le protocole décrit par Demirtas et al., (2013). Le système utilisé est Agilent Technologies serie 1260 doté d'un détecteur 6210 Spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight (TOF)/MS) et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100mm, 3.5 μm).

La phase mobile est constituée d'un mélange de deux solvant A et B (acétonitrile et acide formique à 0.1% respectivement dans de l'eau bi distillée) avec un gradient dont le programme du solvant est le suivant: 0-1 min 10% B, 1-20 min 50% B, 20-23 min 80% B, 23-25 min 0% B; 25-30 min 10% B. Les extraits bruts (200 μg) sont solubilisés dans le méthanol et filtrés à travers un filtre PTFE (0.45 μm) pour éliminer les particules. Le volume injecté est 10 μl . Le débit du solvant est de 0.6 ml min⁻¹ et la température de la colonne est 35°C.

Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF/MS est négatif et fonctionne avec une température du gaz d'azote de 325°C, un débit d'azote gazeux de 0,7 mL/min, un nébuliseur de 40 psi, un voltage capillaire de 4000 V et un voltage du fragmenteur de 175 V.

II.2. Toxicité aiguë des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

La toxicité aiguë des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* a été investiguée conformément à la méthode décrite dans la ligne directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) code 423 (OCDE, 2002). Suivant cette méthode, une dose des extraits étudiés est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. L'absence ou la manifestation de mortalité dans le groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante :

- Arrêt de l'essai
- Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- Administration d'une dose supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

L'expérience est effectuée pour chaque étape sur trois souris. Ces souris sont mises à jeun avec accès libre à l'eau, 4 h avant et 2 h après l'administration orale des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. La dose initiale choisie est de 50 mg/kg. Les souris traitées sont gardées sous observation de façon continue durant tout le jour de gavage pour noter toute perturbation immédiate. L'observation du taux de mortalité, du comportement des animaux et des signes de toxicité est effectuée en continue durant les 14 jours qui suivent l'exposition pour déceler d'éventuels effets retardés des extraits.

II.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

II.3.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

L'œdème de l'oreille induit par le xylène, selon la méthode de Rotelli et ses collaborateurs (2003), est utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. Quatre groupes de souris sont utilisés dans ce test. Les souris des groupes traités reçoivent 400 mg/Kg des extraits étudiés et 5 mg/kg de l'anti-inflammatoire standard (l'indométacine) respectivement par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème, alors que les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0.9 %.

L'œdème de l'oreille est induit par l'application locale de 30 µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes à l'aide d'une micropipette. L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par un pied à coulisse digital (Delaporte et *al.*, 2004). La différence de

l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

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

II.3.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux du traitement local par l'extrait de *Rubus fruticosus* et *zizhyus vulgaris*, le model de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, selon la méthode de Manga et ses collaborateurs est utilisé (2004). Pour chacune des souris des quatre groupes utilisés dans ce test, 15 µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de croton sont appliqués localement sur la face interne de l'oreille droite à l'aide d'une micropipette. Les groupes de souris reçoivent localement 2 mg ou 0,5 mg par oreille de l'extrait de *Rubus fruticosus* ou *Zizhyus vulgaris* et de l'indométacine respectivement, simultanément avec l'agent phlobogénique. Les souris du groupe témoin reçoivent uniquement la solution de l'huile de croton.

L'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital (Delaporte et *al.*, 2004) avant le traitement et six heures après l'induction de l'inflammation. La différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'huile de croton est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule précédente.

II.3.3. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

L'effet des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizhyus vulgaris* sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris a été évalué selon la méthode de Kou et ses collaborateurs (2006). Quatre groupes de souris sont utilisés. Les souris des groupes traités reçoivent 400 mg/Kg d'extrait de *Rubus fruticosus* ou *Zizhyus vulgaris* et 50 mg/Kg de l'anti-inflammatoire standard par voie orale. Les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0,9 %. Une heure après, les souris reçoivent une injection intraveineuse de 10 ml/Kg d'une solution de bleu d'Evans 1%, suivie d'une injection intra péritonéal de 10 ml/Kg d'acide acétique 0,7%. Trente minutes après, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'exsudat péritonéal est récupéré par lavage de la cavité péritonéale par 3 ml d'une solution saline normale. La solution de lavage est ensuite centrifugée.

L'absorbance du surnageant est mesurée à 610 nm contre une solution NaCl 0,9% qui représente le blanc. La concentration du bleu d'Evans dans la solution de lavage de la cavité péritonéale est ensuite déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage.

La concentration du bleu d'Evans exprime la perméabilité vasculaire. Le pourcentage d'inhibition de la perméabilité vasculaire est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [\text{Concentration (Témoin)} - \text{Concentration (Traité)} / \text{Concentration (Témoin)}] \times 100$$

II.3.4. Effet sur les neutrophiles

II.3.4.1. Isolement des neutrophiles

Les neutrophiles sont isolés à partir du sang frais prélevé sur héparinate de lithium (5 U/mL) selon la méthode adaptée par Bouriche et ses collaborateurs (2009). Brièvement, l'isolement des PNs est réalisé par centrifugation sur un gradient de densité de Ficoll-Histopaque® après une sédimentation des hématies par le dextran. Les globules rouges restants sont éliminés par lyse hypotonique. Les neutrophiles sont finalement comptés, suspendus dans l'HBSS1 et conservés à une concentration de 6×10^6 cellules/mL dans un bain de glace. La viabilité cellulaire des cellules récupérées (vérifiée par le test d'exclusion au bleu de trypan) est supérieure à 95% dont plus de 95% sont des neutrophiles.

II.3.4.2. Cytotoxicité des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

La cytotoxicité des extraits testés dans la présente étude est évaluée par le test d'exclusion au bleu de trypan. 250 µl de la suspension des neutrophiles (3×10^6 cellules/mL) sont incubés pendant 30 min à 37°C en présence de 200 µg /mL d'ERF et EZV, puis un volume équivalent d'une solution de bleu de trypan (0.4%) est ajouté. Après 10 min d'incubation à 37°C, le nombre de PNs mortes colorés en bleu, est compté à l'aide d'une cellule de Thoma. Le pourcentage de viabilité est alors défini selon la formule suivante:

$$\% \text{ viabilité} = (N_{\text{total}} - N_{\text{mortes}} / N_{\text{total}}) \times 100$$

II.3.4.3. Effet sur l'activité de l'élastase

L'effet des extraits étudiés sur l'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles est évalué selon la méthode de Bieth et ses collaborateurs (1974).

Les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont incubés pendant 15 min à 37°C dans HBSS2 en présence de l'agent stimulant ; l'fMLP (10^{-6} M) supplémenté par la cytochalasine B (10^{-5} M). Après centrifugation (15 min à 3000 rpm), 75 µl de surnageant contenant l'élastase sont incubés 10 min à 37°C dans les puits d'une plaque de microtitration en absence et en présence de différentes concentrations des extraits étudiés (0-100 µg/ml). Ensuite 75 µl de substrat spécifique de l'élastase (N-Méthoxy-Suc-(Ala)2-Pro-Val-p-Nitroanilide, 10^{-4} M) préparé dans le méthyle 2-pyrulidone et dilué dans le tampon HEPES 0.1 M sont ajoutés. Après 25 min d'incubation à 37°C, l'absorbance de p-nitroaniline libéré est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Stat Fax 2100, USA). L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité qui représente 100% d'activité.

II.3.4.4. Effet sur l'activité de la myeloperoxydase

L'effet des extraits étudiés sur l'activité de la myeloperoxydase est évalué selon la méthode de Maruyama et collaborateurs (2005) avec quelques modifications.

La myeloperoxydase leucocytaire est produite par incubation des neutrophiles (5×10^6 cellules/mL) dans le HBSS₂ pH 7,4, pendant 15 min à 37°C, en présence de 25 µL de fMLP/Cytochalasine B (10^{-6} M/ 10^{-5} M). Après centrifugation 10 min à 400 g, le surnageant enzymatique est réparti dans les puits d'une plaque de microtitration en présence de 30 µl de différentes concentrations des extraits étudiés (0-80 µg/ml) en plus de 25 µl de tetraméthyle benzidine (1,6 mM). La réaction est initiée par l'addition de 100 µl de H₂O₂ (0,003% préparé dans le tampon phosphate pH 5,4 contenant 0,05 % de HTAB). Après 5min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par 50 µl d'acide sulfurique (2 M). L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm, L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité qui représente 100% d'activité.

II.3.4.5. Effet sur la flambée respiratoire

L'effet des extraits testés sur la flambée respiratoire est évalué en mesurant la quantité d'anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit par les neutrophiles selon la méthode de Cohen et Chovaniec (1978) qui est basée sur la réduction du ferricytochrome c (FC) par le $O_2^{\cdot-}$. Cette réaction s'accompagne d'un changement de coloration du FC qui est détecté à 550 nm sur un spectrophotomètre (Thermo Spectronic, USA). Le teste est réalisé en incubant 400 μ L d'une suspension cellulaire de PNs (2.5×10^6 cellules/mL) avec 100 μ L de concentrations croissantes (0-100 μ g/mL) en extraits étudiés, pendant 10 min à 37°C. 100 μ L de fMLP/Cytochalasine B (10^{-6} M / 10^{-5} M) et 100 μ L de cytochrome c (0.2 mg/mL) sont ensuite additionnés. Le tout est incubé 15 min à 37 °C. Dans les tubes blancs les PNs sont remplacés par le HBSS₂. La spécificité de la réaction est vérifiée en utilisant la superoxyde dismutase (330 UI/mL). Après une centrifugation pendant 5 min à 400 g et à 4 °C, l'absorbance des surnageant est lue à 550 nm contre les tubes blancs. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la génération d'anion superoxyde exercée par les extraits en fonction de leur concentration par rapport au contrôle considéré comme 100% d'activité.

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizhyphus vulgaris*

II.4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang chez la souris

Le potentiel global de défense antioxydante est mesuré par le test KRL (kit de dosage des Radicaux Libres) selon le protocole décrit par Girard et ses collaborateurs (2006). Avec quelques modifications en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] par le *tert*-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) (Manna et *al.*, 2002). Ce test consiste à soumettre un échantillon du sang total à une agression radicalaire dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des érythrocytes afin de résister à cette agression, jusqu'à ce que la membrane cellulaire en soit modifiée au point de libérer leurs contenu cellulaire.

Les souris sont réparties en trois groupes. Deux groupes sont gavés quotidiennement par 200 mg/kg de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. Les souris du groupe témoin reçoivent le même volume d'une solution saline normale.

Après trois semaines de traitement, le sang est prélevé par une ponction cardiaque. 100 µl de sang totale sont transféré immédiatement vers un autre tube contenant 2,4 ml tampon phosphate (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4) Afin d'obtenir une dilution de 4%. Des aliquotes de 80 µl de chacune des solutions sanguines obtenues précédemment sont déposés dans des puits de microplaque et exposés au radicaux produits par la décomposition thermique à 37 C° de 136 µl de *t*-BHP (166 µM).

La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm par un lecteur de microplaques (Stat Fax 2100, USA). La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (Temps de demi Hémolyses ; HT₅₀).

II.4.2. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*, le DPPH est utilisé comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Saija et al (1998). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). Brièvement, 37,5 µL d'extraits sont ajoutés à 1,5 ml de la solution de DPPH (100mM) le mélange est gardé à l'obscurité pendant 20 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}_{517}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

II.4.3. Effet scavenger du radical ABTS

La capacité des extrait de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* à piéger le radical ABTS est évaluée selon la méthode décrite par Re et al (1999). Les cations du radical ABTS sont produit par l'oxydation de 1.7 mM ABTS avec le persulfate de potassium (concentration finale 4, 3mM). Le mélange est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 12-16 heures avant utilisation. La solution d'ABTS est ensuite diluée pour donner une absorbance de 0.7± 0.02 à 734 nm. 50 µL de l'extrait sont additionnés à 2ml de l'ABTS. Après 6min

d'incubation à température ambiante et à l'obscurité l'absorbance est mesurée à 734 nm. La capacité antioxydante est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage (annexe) établie avec le Trolox (0,015-0,5mM) et exprimé en m mol équivalents trolox /mg extrait.

II.4.4. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés est évalué selon la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) décrite par Benzie et Strain (1996) avec quelques modifications. Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+}) à pH acide. Ce complexe de tripyridyltriazine ferreux a une couleur bleu intense mesurée par spectrophotomètre à 593 nm.

Une solution fraîche du réactif FRAP est préparée par mélange de 2,5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2,5ml du $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) et 25 ml du tampon acétate (300 mM acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique). 50 μl de l'extrait avec dilutions appropriées (0,03-1 mg/ml) sont ajoutés à 1 mL du réactif FRAP. Après 4 min d'incubation à 20°C, l'absorbance est mesurée à 593 nm en utilisant le réactif FRAP comme blanc. Une gamme du FeSO_4 (annexe) entre 100 et 1000 μM est utilisée pour calculer les valeurs FRAP des extraits qui sont exprimées en mM du FeSO_4 /mg d'extrait.

II.4.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse d' H_2O_2

L'effet protecteur des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* contre les dommages oxydatifs de l'ADN est étudié sur l'ADN plasmidique pBluescript M13 (+) selon le protocole décrit par (Attaguile et al., 2000).

L'ADN est oxydé par H_2O_2 et l'UV en présence des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. Brièvement, les expériences sont effectuées dans des tubes de microcentrifugation (10 μL) contenant 200 ng d'ADN dans un tampon phosphate (7.14 mM phosphate et 14.29 mM NaCl, pH = 7.4), l' H_2O_2 est additionné à une concentration finale de 2.5 mM en présence ou en absence de 1 μL (100, 250, 350, 500 $\mu\text{g/mL}$) des extraits de *Rubus fructuosis* et *Zizyphus vulgaris*. La réaction est initiée par l'irradiation UV et

continué pendant 5 minutes sur la surface d'un transilluminateur UV (8000 μ W/cm) à 300 nm et à température ambiante.

Après irradiation, le mélange réactionnel (10 μ L) avec colorant de charge sont placés sur un gel d'agarose 1% pour électrophorèse. L'ADN plasmidique non traité est utilisé comme témoin dans chaque essai d'électrophorèse sur gel avec un traitement partiel soit UV ou H₂O₂ seulement. Les gels sont colorés avec du bromure d'éthidium et photographiés avec le système de documentation de gel (Gel Doc-XR, BioRad, Hercules, CA). L'intensité de chaque bande d'ADN est quantifiée au moyen de densitomètre.

II.5. Analyses statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ou SEM. Les valeurs IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse ainsi que la détermination du HT₅₀ sont effectués par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Dunnett pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude phytochimique de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

1.1. Préparation des extraits

La macération de la poudre de feuilles de *Rubus fruticosus* dans le méthanol/eau (8:2 v/v) a donné un extrait brut de couleur verte foncée avec un rendement de 21,5%. De sa part, la macération de la poudre des racines de *Zizyphus vulgaris* a donné un extrait brut qui possède un aspect cristallin de couleur rouge brique avec un rendement de 30,27%.

L'utilisation du solvant hydro-alcoolique permet une bonne récupération des composés polaires, ainsi que les composés de moyenne et de faible polarité, principalement les composés phénoliques (Xia et al., 2010). La méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Seidel, 2006).

1.2. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes des plantes sont attribuées à ces composés (Zhang et Tsao, 2016).

La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu est considérée comme la meilleure méthode de détermination des polyphénols totaux des plantes. C'est une méthode standardisée, simple et reproductible. Les interférences avec la matrice de l'échantillon sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (Huang et al., 2005).

Les résultats du dosage des polyphénols (**Tableau 3**) montrent que l'extrait de *Rubus fruticosus* contient une grande quantité de composés phénoliques $227.15 \pm 46.35 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait. La teneur en polyphénol rapportée par Salehi et collaborateur (2013) est inférieure à

la notre 79,135 µg EAG/mg d'extrait. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en composés phénoliques (Cheurfa et Allem, 2016). En comparaison avec l'extrait de *Rubus fruticosus*, L'extrait de *Zizyphus vulgaris* contient presque la moitié de la teneur en composés phénolique 134,62 µg EAG/mg d'extrait. En outre, les flavonoïdes comme composés les plus intéressants des polyphénols sont aussi déterminés par la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus révèlent que l'extrait de *Rubus fruticosus* contient 24,27 EQ/mg d'extrait. Cependant, une très faible quantité 0,33 µg EQ/mg d'extrait est trouvée dans l'extrait de *Zizyphus vulgaris*.

Tableau 3: Teneur des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* en polyphénols totaux et flavonoïdes

	Composés phénoliques	Flavonoïdes
	(µg EAG/mg extrait)	(µg EQ/mg extrait)
Rubus fruticosus	227.15 ± 46.35	24.27 ± 0.46
Zizyphus vulgaris	134.62 ± 8.06	0.33 ± 0.023

I.3. Caractérisation des composés phénoliques par HPLC-TOF-MS

La chromatographie liquide haute pression est sans doute la technique d'analyse, de caractérisation d'extraits en composés phénoliques la plus utilisée. Elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte (Wollgast et Anklam, 2000). Le couplage de HPLC avec la spectrométrie de masse est devenu courant dans le domaine de la chimie analytique. C'est l'une des techniques les plus adaptées pour l'analyse d'extraits de plantes de par sa robustesse et la possibilité d'analyse sur une large gamme de masse et de polarité moléculaire. De ce fait, cette technique a été optée dans la

présente étude dans le but de caractériser qualitativement et quantitativement les composés phénoliques des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*.

L'analyse des extraits par l'HPLC-TOF-MS a permis la mise en évidence de l'existence d'un nombre d'acides phénoliques et de flavonoïdes (**Tableau 4, Figure 11**) ; L'extrait de *Rubus fruticosus* présente un profil chimique composés de plusieurs polyphenols incluant huit acides phénoliques et huit flavonoïdes appartenant à différentes classes ; la scutellarine en tant que flavones représente le composés phénolique majoritaire suivi par l'acide chlorogénique. La quercétine-3- β -D-glucoside représente le flavonol majoritaire suivi par la fisétine. En outre, l'acide Hydroxybenzoïque et le kampferol sont présent en faible quantité dans l'extrait de *Rubus fruticosus*. Ces résultats concordent relativement avec les investigations phytochimiques de Radovanović et al.,(2013) et Milivojevic et al.,(2011) qui ont conduit à la caractérisation d'acides phénoliques tels que l'acide ellagique, gallique, caféique et *p*-coumarique, et de flavonoïdes comme la quercétine hyperoside, kaempferol, myricitine, (+) catéchine, (-) épicatechine, épicatechine gallate, procyanidine et quercétine-3-D-glucoside, dans les fruits et les feuilles de *Rubus fruticosus*. Les travaux de Gudej et Tomczyk (2004) menés sur les feuilles de différentes espèces du genre *Rubus* y compris *Rubus fruticosus* révèlent aussi la présence de l'acide éllogique, le kampherol et la quercétine.

En comparaison avec l'extrait de *Rubus fruticosus*, l'extrait de *Zizyphus vulgaris* présente un profil chromatographique avec moins de composés phénoliques. Ce qui confirme les résultats du dosage des polyphenols par la méthode de Folin ciocalteu, En effet, l'analyse de l'extrait de *Zizyphus vulgaris* révèle la présence de sept composés phénoliques incluant quatre acides phénoliques et trois flavonoïdes. L'acide protocatéchine représente le composé phénolique majoritaire suivi par la catéchine.

D'après la bibliographie, aucun travail de recherche n'a été consacré jusqu'à présent pour l'étude phytochimique des racines de *Zizyphus vulgaris*. Cependant Kaennakam et ses collaborateurs (2013) ont identifié quatre flavonoïdes dans les racines de *Zizyphus rugosa* ; à savoir kaempferol, afzeline, quercitrine et (+) catéchine.

Tableau 4: Composition phénolique des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* Identifiés par HPLC-TOF-MS.

Composés phénoliques	Classes	Temps de Retention (min)	<i>Rubus fruticosus</i> (µg/g extrait)	<i>Zizyphus vulgaris</i> (µg/g extrait)
Acide Gentisique	Acide phenolique	4.55	74.46	93.39
Catéchine	Flavanol	6.15	145.34	932.07
Acide chlorogenique	Acide phenolique	6.22	5918.51	—
Acide protocatechique	Acide phenolique	6.93	131.48	219.49
Acide 4hydroxybenzoique	Acide phenolique	7.69	4.13	44.19
Acide caffeique	Acide phenolique	7.70	420.93	—
Acide vanillique	Acide phenolique	8.04	61.06	106.73
Acide syringique	Acide phenolique	9.35	145.72	—
Rutine	Flavonol	9.49	35.34	18.23
Acide éllagique	Acide phenolique	9.97	1367.81	—
Quercetine-3-β-D-glucoside	Flavonol	10.07	2247.62	—
Naringine	Flavanone	10.63	53.44	39.41
Fisetine	Flavonol	11.02	179.34	—
Scutellarine	Flavone	11.02	13093.34	—
Néohesperidine	Flavanone	11.42	33.81	—
Kaempferol	Flavonol	16.84	13.95	—

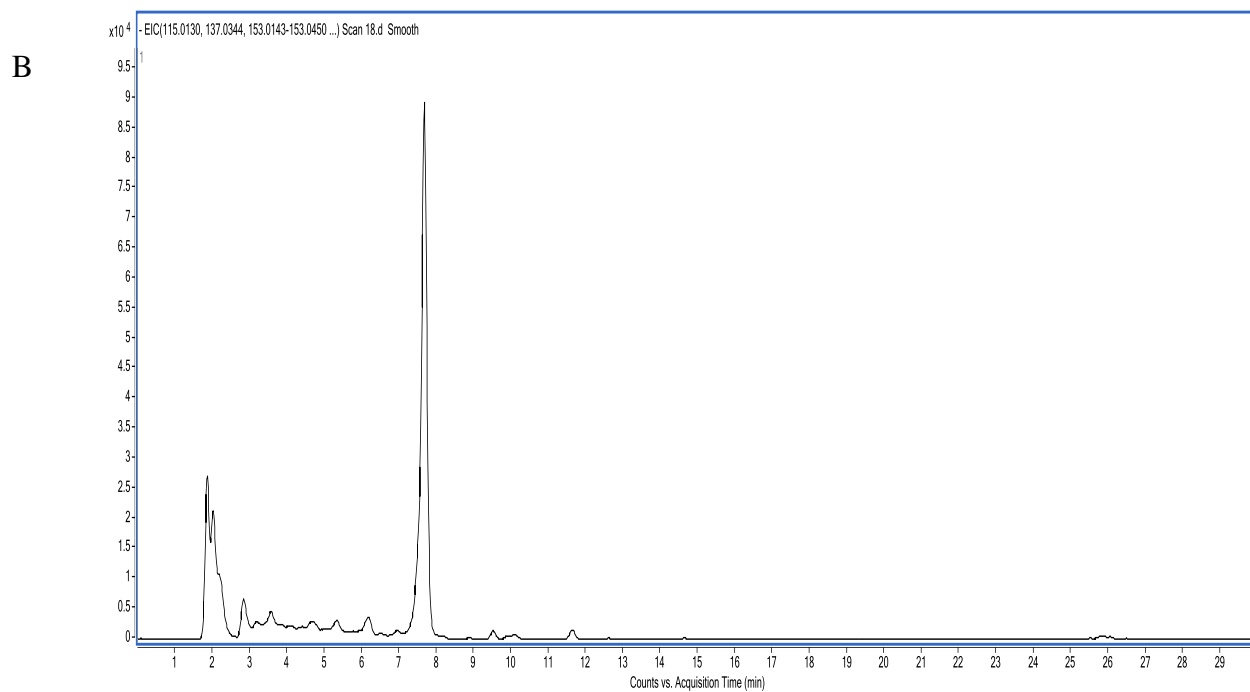
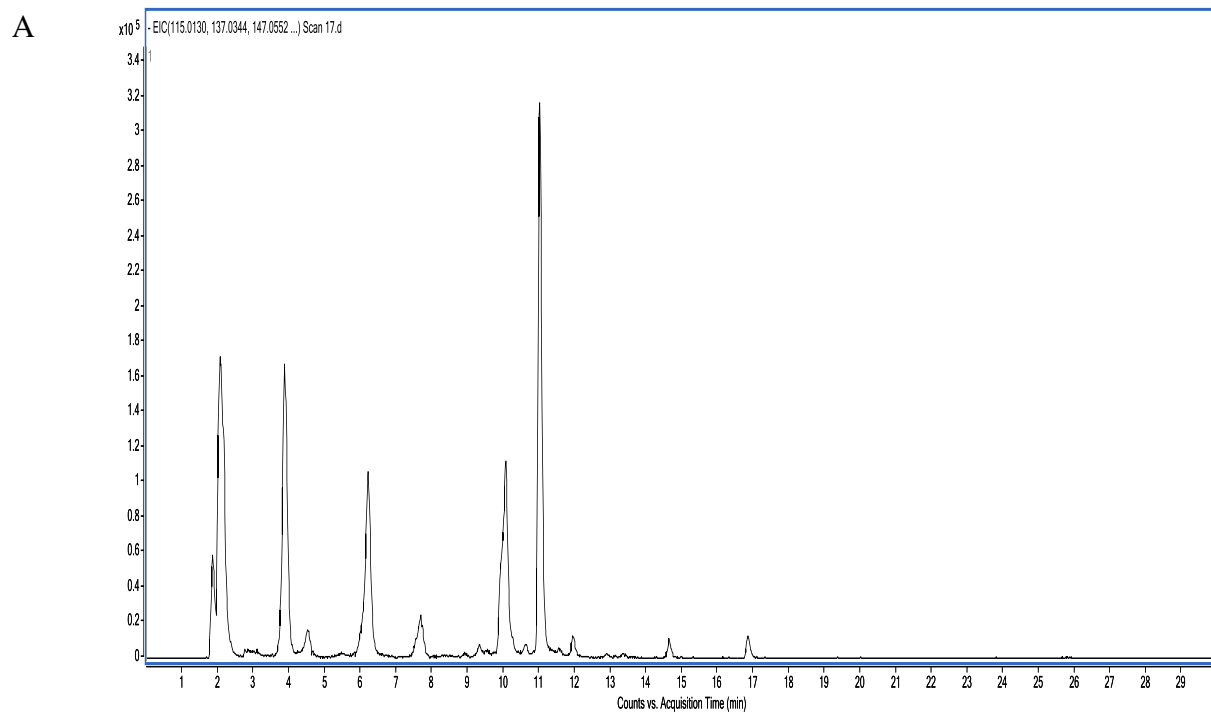


Figure 11: Profil chromatographique des extraits de *Rubus fruticosus* (A) et *Zizyphus vulgaris* (B) analysés par HPLC-TOF-MS.

II. Toxicité aigue des extraits

La première étape dans la recherche pharmacologique est l'étude de la toxicité et en particulier la toxicité aigue. Dans cette étude, la toxicité aigue des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* par voie orale chez la souris, a été testée selon la ligne directrice n° 423 de L'OCDE. Cette méthode est reproductible et utilise très peu d'animaux. Les résultats ne montrent aucune mortalité et aucun signe clinique de toxicité après l'administration par voie orale des doses de 5, 50, 300, 2000 mg de l'extrait/kg de poids corporel (pc). Tous les animaux ont survécu à l'issue des 14 jours d'observation, ce qui indique que la DL₅₀ est supérieure à 2000 mg/kg de pc. Selon le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH, 2003), les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* sont non toxiques par voie orale chez la souris.

III. Activité anti-inflammatoire des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques. ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques et des leucocytes vers les tissus (Kumar et al., 2014). De ce fait, l'œdème, la perméabilité vasculaire et les neutrophiles sont exploités dans le présent travail pour évaluer l'effet des extraits étudiés sur l'inflammation aiguë.

III.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène

L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris qui est un modèle d'inflammation aiguë, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*. La mesure de l'œdème est un excellent outil pour la quantification de l'inflammation induite par les agents phlogogénique comme le xylène.

Le xylène est un hydrocarbure irritant aromatique formé d'un mélange de trois formes isomérique (ortho, meta et para). L'application du xylène sur l'oreille induit une exudation et l'accumulation de liquide intercellulaire conduisant à la formation d'un œdème qui est caractéristique de l'inflammation aiguë (Okoli et al., 2007 ; sandor et al., 2009). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 30 minutes après l'application du xylène (Sandor et al., 2009).

Le mécanisme d'action cellulaire et moléculaire de xylène implique des peptides proinflammatoires sensoriels comme la substance P (SP) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) libéré par les fibres sensibles activées par la capsaïcine. La SP induit une extravasation des protéines plasmatiques par l'activation des récepteurs neurokinine1 dans les cellules endothéliales, tandis que le CGRP provoque une vasodilatation et potentialise l'action proinflammatoire induite par la SP dans les zones innervées, ce qui est nommé inflammation neurogénique (Sandor et al., 2009). Ces peptides peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules inflammatoires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines proinflammatoires, ces derniers sont des vasodilatateurs puissants et contribuent à la formation de l'œdème et la genèse des influx nociceptifs (Richardson et Vasko, 2003).

La différence de l'épaisseur de l'oreille des souris avant et une demi heure après l'application locale du xylène a été exploitée dans la présente étude pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*.

Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 12**. Le groupe contrôle développe un œdème très important après une demi-heure. Cependant le traitement oral (400 mg/kg) par les extraits de *Rubus fruticosus* montrent une réduction très significative ($p < 0.001$) de l'œdème avec une inhibition de l'ordre de 70,77 %, cette inhibition est très proche de celle obtenue avec 50 mg/kg d'indométacine (78,18%).

D'autre part, le traitement par 400 mg/Kg de l'extrait de *Zizyphus vulgaris* provoque une réduction moins significative (51,81%, $p < 0.01$) de l'inflammation en comparaison avec l'extrait de *Rubus fruticosus*. Cette inhibition est inférieure à celle de l'indométacine. L'effet antioedémateux des extraits testés peut être dû à la réduction de la libération de la substance P ou à l'antagonisation de son action, ou même à la réduction de médiateurs proinflammatoires tels que les prostaglandines.

L'activité importante de *Rubus fruticosus* est fort probablement attribuée à sa richesse en composés phénoliques dont l'activité antinflammatoire a été bien étudiée (Tangney et Rasmussen, 2013 ; Zeinali et al., 2017). En effet, l'étude phytochimique montre que l'extrait de *Rubus fruticosus* contient une teneur très élevée en flavonoïdes et en acides phénoliques ; scutellarine, quercétine-3- β -D-glucoside, acide chlorogénique, acide élлагique et caféique.

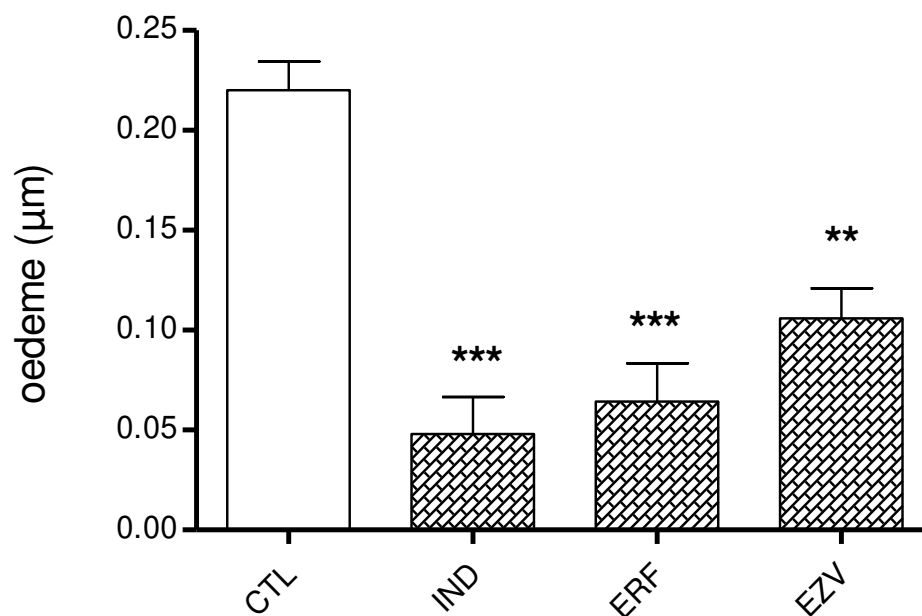


Figure 12 : Effet des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. La comparaison est faite par rapport au groupe contrôle. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6-7). ** : p < 0.01, *** : p < 0.001.

Furtado et ses collaborateurs (2016) ont constaté que la rutine, l'acide chlorogénique et l'acide caféique réduisent significativement l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. La scutelline qui représente le flavonoïde majoritaire identifié dans *Rubus fruticosus* a prouvé sa puissante efficacité dans le traitement de l'inflammation neurogène par réduction de l'activation des cellules microgliales. Le mécanisme d'action implique l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que NO, TNF- α , IL-1 β et les ERO (Wang et al., 2011).

III.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris, qui est aussi un modèle de l'inflammation aiguë, a été utilisé pour confirmer l'effet anti-inflammatoire du traitement local par l'extrait méthanolique de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* obtenu précédemment. Ce modèle expérimental est largement utilisé pour étudier le processus inflammatoire de la peau ainsi que pour le criblage d'anti-inflammatoires synthétiques ou naturels à effet local (Cabrin et al., 2011).

L'huile de Croton est un agent phlogogène extrait des graines de *Croton tiglium*. (*Euphorbiaceae*). Il contient le 12-o-tétracanoilphorbol-13-acétate (TPA) et d'autres esters de phorbol comme principaux agents irritants (Leite, 2011). L'application topique de cette huile provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire, un œdème et une infiltration de neutrophiles (Araruna, 2014). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 4-6 heures après l'application de l'huile de croton (Carlson et al., 1985). Le mécanisme d'action de l'huile de croton (TPA) implique l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui à son tour active d'autres cascades enzymatiques comme la voie des MAPK et la phospholipase A2 conduisant à la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires tels que le PAF, l'acide arachidonique, l'histamine et la sérotonine (Leite, 2011). La protéine kinase C active aussi le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) qui induit l'expression de plusieurs enzymes inflammatoires comme COX-2, 5-LOX et iNOS, en plus de cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 et le TNF- α (Valenzuela-Barra et al., 2015).

Dans la présente étude, Les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* exercent une inhibition significative du développement de l'œdème de l'ordre 75,72 % et 64,24% respectivement (**Figure 13**).

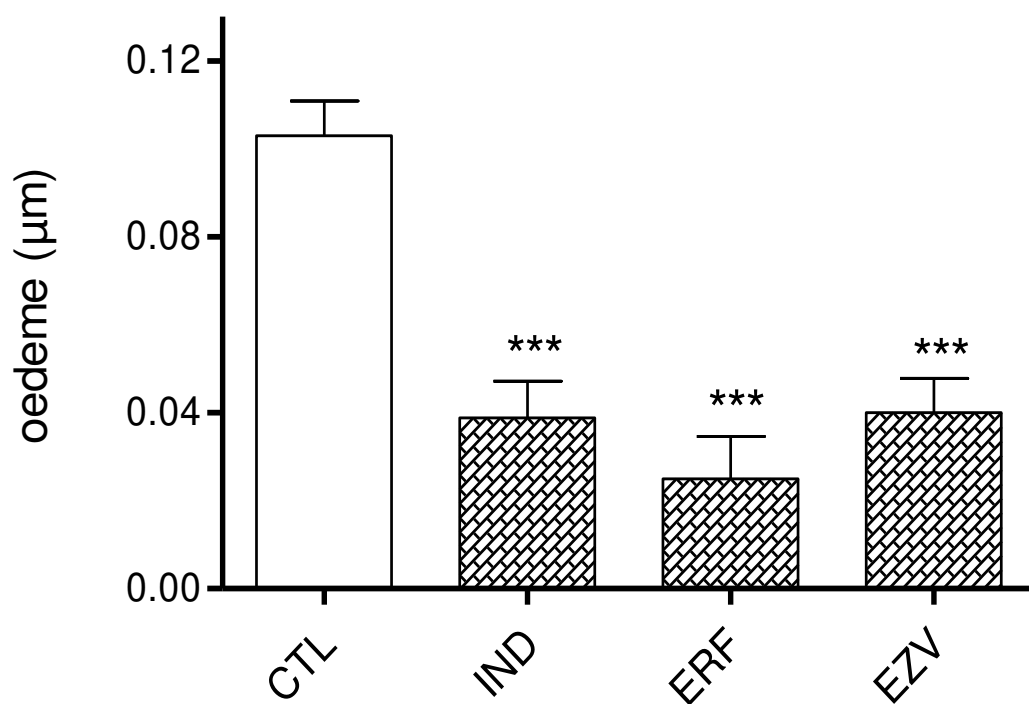


Figure 13: Effet des extraits de *de Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. La comparaison est faite par rapport au groupe controle. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =6-7). *** : $p < 0.001$.

Ces inhibitions sont supérieures à celle exercée par l'indométacine (62.24%). Ces résultats se concordent relativement avec les travaux de Pandey et al. (2013) qui ont montré que l'extrait éthanolique de *Rubus ulmifolius* exerce une inhibition de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris supérieure à celle du diclofénac.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet anti-inflammatoire exercé par les deux extraits. Les acides phénoliques et les flavonoïdes identifiés par l'analyse phytochimiques sont en partie responsables de cet effet. En effet, Mo et al. (2013) ont montré que l'application topique de l'acide éllagique inhibe significativement l'œdème de l'oreille induit par le TPA dont le mécanisme d'action implique l'inhibition de l'infiltration des leucocytes et la modulation des cytokines proinflammatoires, IL- β et TNF- α . De même, l'acide chlorogénique a montré un effet antioedemateux important dans ce modèle expérimental (Chagas-paula, 2011).

la quercétine exerce une forte inhibition sur la cyclooxygénase et la lipooxygénase épidermiques (Kim *et al.*, 1998). L'acide caféique, ferulique, cinnamique et chlorogénique inhibe directement la COX-1 et COX-2 d'une façon dose dépendante (Valenzuela-Barra *et al* 2015).

Selon Fu et ses collaborateurs (2011), l'effet antioxydant des extraits de plante est responsable en partie de leur activité anti-œdematogène. En effet, ils ont montré une corrélation significative entre l'effet anti-inflammatoire des extraits de *Sapium sebiferum* et leur activité antioxydante ainsi que leur teneur en composés phénoliques. Les espèces oxygénées réactives produites au cours de l'inflammation par les cellules phagocytaires peuvent activer la phospholipase A2 pour produire les prostaglandines et les leucotriènes et stimuler la libération des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine1 et le TNF α (Geronikaki et Gavalas, 2006 ; Arurana *et al.*, 2014). L'effet anti-inflammatoire des extraits étudiés pourrait être partiellement lié à leur activité antioxydante qui a été déjà mise en évidence par cette étude *in vitro* et *in vivo*.

III.3. Effet sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

La réponse inflammatoire est une caractéristique spécifique des tissus vascularisés. La principale symptomatique de l'inflammation aigüe est la vasodilatation, l'exsudation de plasma, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la migration des leucocytes au site de

l'inflammation. La perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique est un modèle expérimental typique pour évaluer l'effet des substances naturelles ou synthétiques sur la phase exsudative de l'inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007).

L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique induit une augmentation du contenu péritonéal en prostaglandines (PGE2 α et PGF2 α), sérotonine et histamine (Chen-Xiao *et al.*, 2011). Ceci conduit à une dilatation des artérioles et des veinules et une augmentation de la perméabilité vasculaire avec une contraction et une séparation des cellules endothéliales en exposant la membrane basale et par conséquent, l'extravasation des protéines plasmatiques vers la cavité péritonéale (kumar et Jain, 2014).

Le bleu d'évans est un colorant qui se lie à l'albumine. Dans les conditions physiologiques l'endothélium est imperméable à l'albumine donc le bleu d'Evans reste piégé dans les vaisseaux sanguins. Cependant dans les conditions inflammatoires, Les cellules endothéliales perdent partiellement leurs contacts proches et l'endothélium devient perméable aux petites protéines comme l'albumine. Ce ci permet l'extravasation de bleu d'évans dans les tissus (Radu et Chernouf, 2013). De ce fait, la mesure de la concentration du bleu d'Evans dans le liquide de lavage de la cavité péritonéale de souris après l'injection intra péritonéale de l'acide acétique permet d'évaluer l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

Le prétraitement des souris par 400 mg/kg de l'extrait de *Rubus fruticosus* entraîne une inhibition significative (33,57%) de la perméabilité vasculaire. Cette inhibition est inférieure à celle exercée par l'indométacine (**Figures 14**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Pandey *et al* (2013) qui ont montré que l'extrait éthanolique de *Rubus ulmifolius* inhibe significativement la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. En revanche, le prétraitement des souris par 400 mg/kg de l'extrait de *Zizyphus vulgaris* provoque une inhibition faible et non significative (25,51%).

La richesse de l'extrait de *Rubus fruticosus* en composés phénoliques et flavonoïdes contribue à cet effet anti-inflammatoire. Ces composés ont le pouvoir d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les leucotriènes, et les prostaglandines (Tangney et Rasmussen, 2013).

La capacité d'inhiber la perméabilité vasculaire par l'extrait de *Rubus fruticosus* indique qu'il est apte à moduler et contrôler l'amplification de la réaction inflammatoire. Ce qui peut expliquer l'effet anti-œdémateux significatif observé dans les deux tests précédents.

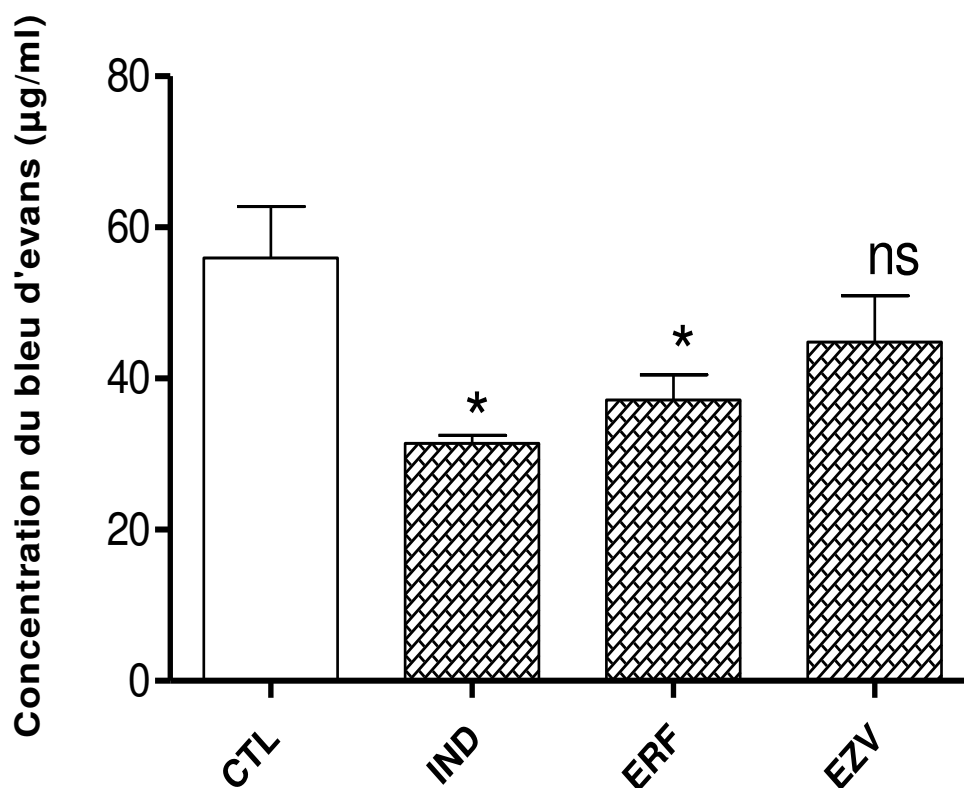


Figure 14 : Effet des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris*(EZV) sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. La comparaison est faite par rapport à celle du groupe controle. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6).
 * : $p < 0.05$, ns : non significatif

III.4. Effet des extraits sur les neutrophiles.

III .4.1.Cytotoxicité

L'évaluation de la toxicité des substances testées envers les PNs est indispensable avant de tester leurs propriétés pharmacologiques. Dans la présente étude, cet effet est évalué par le test d'exclusion au bleu de trypan.

L'incubation des PNs avec 100 µg/ml des extraits de *Rubus fruticosus* et de *Zizyphus vulgaris* pendant 30 min a donné une viabilité supérieure à 95%, aucune différence significative n'a été enregistré par rapport au contrôle (**Figure 15**). Ces résultats montrent l'absence de tout effet cytotoxique des extraits utilisés envers les neutrophiles humains, du moins aux concentrations utilisées dans ce travail. Il est donc exclu que tout effet inhibiteur de ces extraits soit dû à leur cytotoxicité.

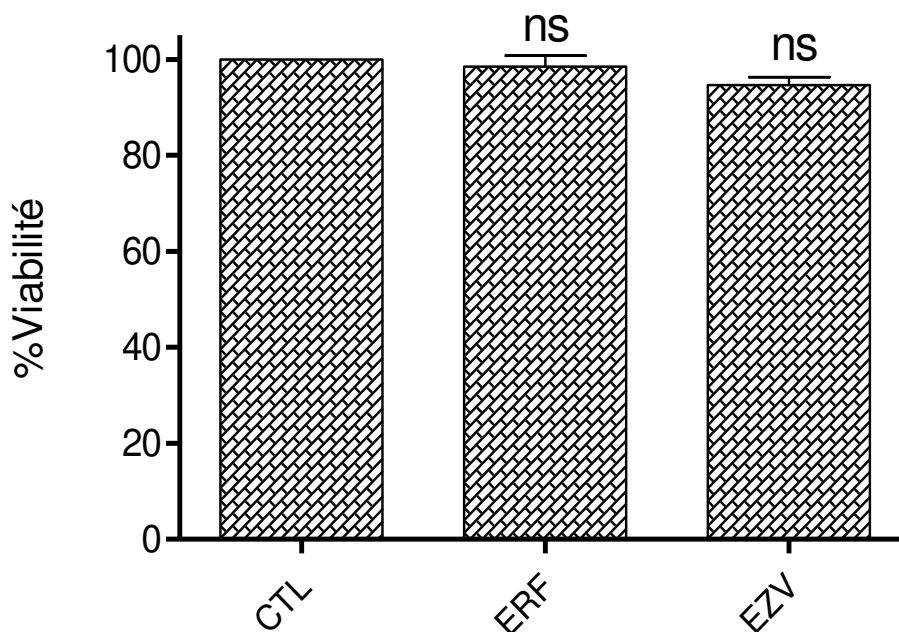


Figure 15: Cytotoxicité des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et de *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur les neutrophiles. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM ($n = 3$). ns : non significatif

III.4.2. Effet des extraits sur l'activité de l'élastase

L'élastase du neutrophile humain est une serine protéase localisée dans les granules azurophiles. Sa fonction primaire est la dégradation des microorganismes phagocytés. Elle possède une large spécificité de substrat, étant capable non seulement de dégrader l'élastine mais aussi diverses protéines de la matrice extracellulaire menant ainsi à la dégradation des tissus conjonctifs (Benedek *et al.*, 2007).

L'effet inhibiteur des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* vis-à-vis de l'élastase leucocytaire est évalué spectrophotométriquement en suivant l'absorbance du produit à 405nm. Les résultats obtenus montrent que la pré-incubation de surnageant enzymatique en présence de 0,05- 100 µg/ml de l'extrait méthanolique de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* inhibent significativement ($p < 0,05$) et d'une manière dose-dépendante l'activité de l'élastase. A 100 µg/ml cette inhibition atteint le taux de 85,12 % et 73,24 % pour *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* respectivement (**Figure 16**). Johansson et ses collaborateurs (2002), ont montré que l'extrait de *Rubus ideaus*, une espèce du même genre que *Rubus fruticosus*, à 100 µg/ml provoque une inhibition de l'élastase de l'ordre de 80%. Dans une étude menée sur l'activité antiélastasique des extraits de 150 plantes, Van Wyk et Wink (2004) ont rapporté que seulement 6 plantes présentent une inhibition supérieure à 65%.

L'activité anti-élastasique des extraits étudiés peut être attribuée aux acides phénoliques et aux flavonoïdes présents dans ces extraits. En effet, Paula et ses collaborateurs (2009) ont montré l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur l'activité catalytique de l'élastase. Les flavonoïdes présentent également un effet anti-élastasique, soit direct en inhibant cette enzyme, soit indirect via leur activité anti-oxydante, en piégeant certains radicaux libres et en inhibant certains systèmes enzymatiques (Middleton *et al.*, 2000), préservant ainsi l'activité des inhibiteurs spécifiques de l'élastase comme l' α -antitrypsine (Dallegrì et Ottonello, 1997 ; Bouriche *et al.*, 2007).

L'acide éllagique, l'un des acides phénoliques majoritaire identifié dans *Rubus fruticosus* a montré son efficacité potentielle dans l'inhibition de l'élastase avec une IC_{50} de l'ordre de 1,44 mg/ml (Xing *et al.*, 2016). De même, la catéchine et l'epigallocatechine sont des inhibiteurs de l'élastase et de la collagenase (Kim *et al.*, 2004).

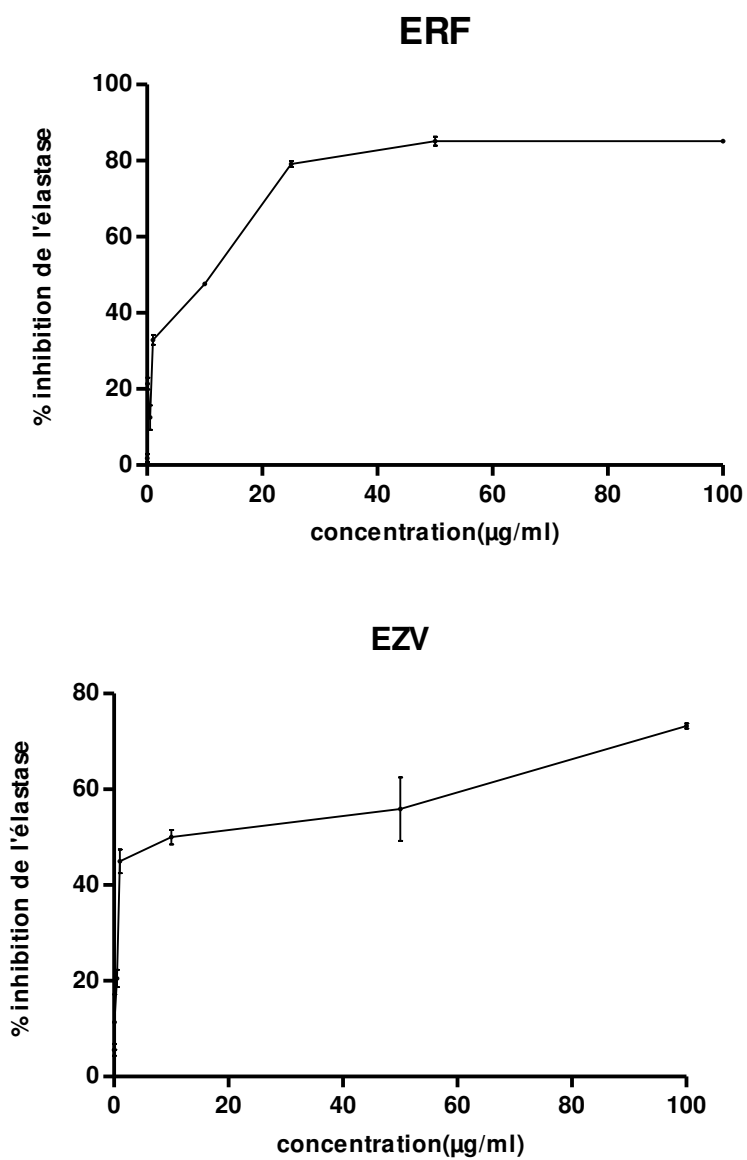


Figure 16 : Effet des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur l'activité de l'élastase. Chaque point représente la moyenne de 3 essais \pm SEM.

En s'opposant à l'action de l'élastase, une enzyme qui détruit l'élastine lors des phénomènes inflammatoires, les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* pourraient avoir un effet thérapeutique prometteur dans le traitement des désordres inflammatoires reliés à l'élastase tels que la lésion pulmonaire aigue, le syndrome de détresse respiratoire aigue et la fibrose cystique (Won Ryu et *al.*, 2016).

III.4.3. Effet des extraits sur l'activité de la myeloperoxydase

La myéloperoxydase est une enzyme héminique présente à une concentration élevée dans les granules primaires des polynucléaires neutrophiles. Elle joue un rôle essentiel dans le système antimicrobien grâce à sa capacité d'oxyder les ions chlorure par l'eau oxygénée, produisant ainsi l'acide hypochloreux. La MPO est aussi capable d'oxyder une large gamme de molécules biologiques et de compliquer le processus inflammatoire (de Vargas et *al.*, 2016).

L'effet des extraits étudiés sur l'activité de la myeloperoxydase leucocytaire a été évalué spectrophotométriquement en suivant la peroxydation de TMB par la MPO libérée des neutrophiles stimulés. Les résultats obtenus montrent que la préincubation de surnageant enzymatique en présence de 1-80 µg/ml d'extrait de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* inhibent d'une manière dose-dépendante l'activité de la myeloperoxydase (**Figure 17**). L'inhibition exercée par les deux extraits est similaire avec une IC₅₀ de l'ordre de 16,41 µg/ml.

L'effet inhibiteur important de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* est probablement dû aux flavonoïdes et aux acides phénoliques qu'ils contiennent. En effet, Boufadi et ses collaborateurs (2014) ont mis en évidence une forte corrélation entre la teneur en polyphénol de plusieurs variétés de propolis et leurs activités inhibitrices vis-à-vis de la myeloperoxydase.

Kato et ses collaborateurs (2003) ont montré que la quercétine, l'acide férulique, cafféique et gallique sont de puissants inhibiteurs de la MPO humaine. De nombreux travaux ont été menés pour comprendre les mécanismes moléculaires d'action des flavonoïdes sur la myeloperoxydase (Meotti et *al.*, 2008 ; Shiba et *al.*, 2008 ,Tian et *al.*, 2017). De ces donnés, il ressort que les flavonoïdes se fixent sur le site actif de la MPO et se comportent comme inhibiteurs compétitifs.

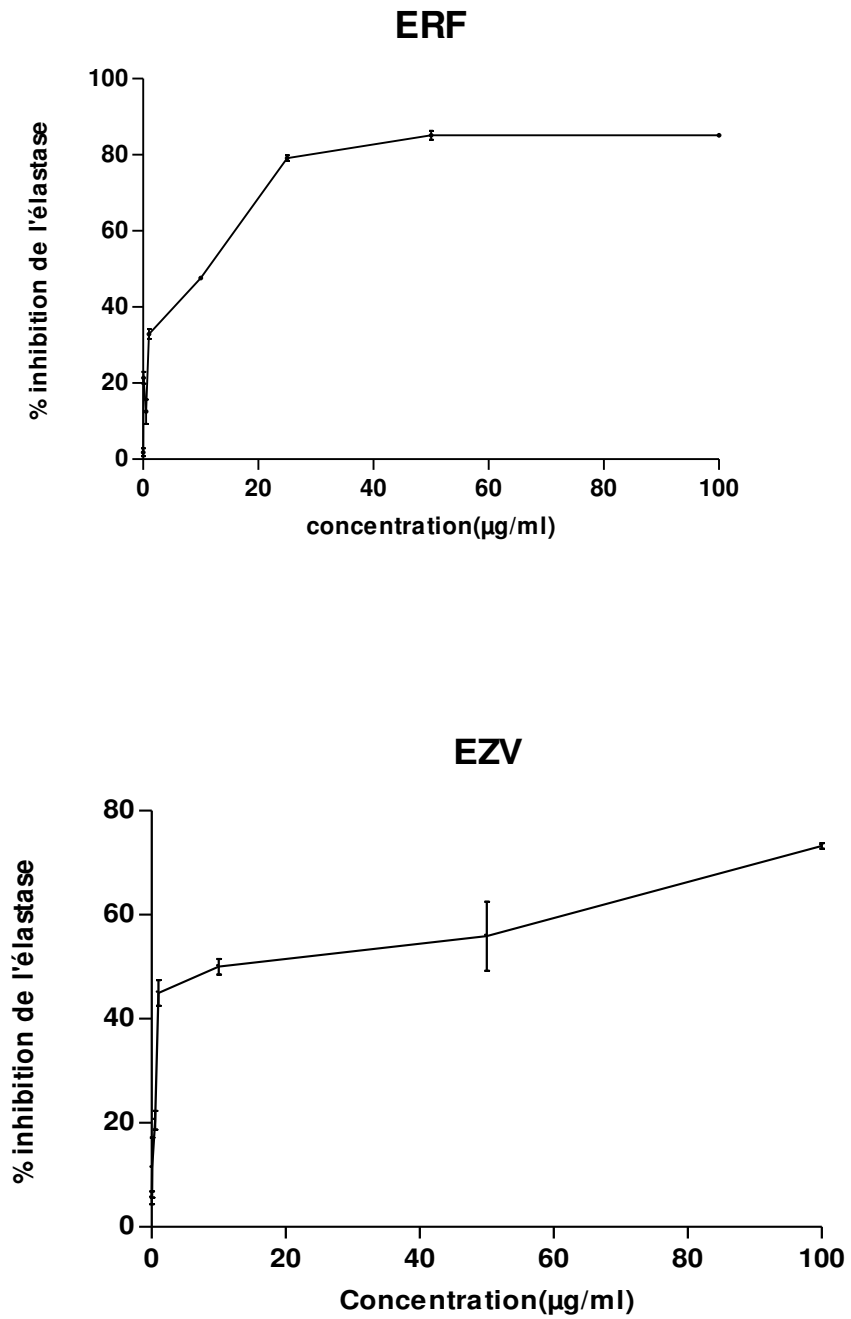


Figure 17: Effet des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur l'activité de la myeloperoxydase. Chaque point représente la moyenne de 3 essais \pm SEM

Dans le but d'identifier les groupements potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables de l'effet inhibiteur vis-à-vis de la myeloperoxydase, Shiba et ses collaborateurs (2008) ont étudié la relation structure-activité de plusieurs flavonoïdes. Ils ont suggéré que les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui possèdent des hydroxyles en position 3, 5, et 4' et une double liaison en C2-C3.

Selon deVargas et *al.*, (2016), la diminution de l'activité de la myeloperoxydase en présence des extraits des plantes n'est pas directement liée à l'inhibition de cette enzyme, mais elle est probablement attribuée à l'effet scavenger des ERO ou à la chélation de métaux tels que le fer et le cuivre qui sont nécessaires pour l'activité de la MPO.

Dans les modèles d'inflammation *in vivo* tels que l'œdème de l'oreille, la myeloperoxydase est utilisée comme un indice d'infiltration leucocytaire. Dans ce contexte, Srivastava et *al.* (2010) ont étudié l'effet antioedémateux de l'extrait phénolique de trois variétés de *Rubus sp* et ils ont parallèlement évalué l'activité de la myeloperoxydase dans l'homogénat tissulaire. Les résultats obtenus montrent que l'application locale de ces extraits réduit significativement l'œdème de l'oreille et l'activité de la myeloperoxydase. Cet effet est corrélé positivement avec la teneur des extraits en composés phénoliques et avec leur activité antioxydante.

Dans les conditions physiologiques, environ 10 à 15 % de la MPO se trouve dans le milieu extracellulaire. Hors, lors d'une inflammation incontrôlée qui induit une dégranulation massive des granules primaires des neutrophiles, la MPO peut être relarguée en quantité importante. Elle peut également être déversée dans le milieu extracellulaire lorsque les neutrophiles sont adhérents à des structures trop grandes pour être phagocytées. Dans le liquide extracellulaire, la MPO peut oxyder une large gamme de molécules biologiques et cause des dégâts cellulaires importants (Serteyn et *al.* (2003). La MPO est majoritairement impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë, les fibroses pulmonaires, les maladies inflammatoires rénales comme les glomérulonéphrites ou les néphrites interstitielles, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Nastasijevic et *al.*, 2012). L'effet inhibiteur des extraits vis à vis de la MPO ouvre de nouvelles stratégies pour la prophylaxie ou le traitement des maladies inflammatoires dans lesquelles elle est incriminée.

III.4.4. Effet des extraits sur la flambée respiratoire

L'activation des PNs par le peptide chimiotactique (fMLP) stimule la NADPH oxydase qui libère une quantité importante d'anions superoxydes. L'effet des extraits étudiés sur la flambée respiratoire des PNs est évalué en suivant la réduction de ferricytochrome C par le superoxyde en ferrocyclochrome C.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* exercent un effet inhibiteur puissant sur la génération du $O_2^{\cdot-}$ par les PNs stimulés par le fMLP. La diminution de la production de l'anion superoxyde, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration des extraits, montre que cette inhibition est dose-dépendante (**Figure 18**). L'extrait de *Rubus fruticosus* semble être l'extrait le plus puissant avec une IC_{50} de 15.42 $\mu g / mL$, alors que l'extrait de *Zizyphus vulgaris* présente une IC_{50} de 23.57 $\mu g / mL$.

La spécificité de la réduction du cytochrome c par l'anion superoxyde est vérifiée à l'aide de la superoxyde dismutase. Cette dernière accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène empêchant la réduction du ferricytochrome C (Cabanis et al, 1996). En effet, le pourcentage d'inhibition de la réduction du cytochrome C en présence de 330 U/mL de SOD est de $91.32 \pm 1.5\%$. Ce qui confirme que cette réduction est due à la présence des anions superoxydes.

Le complexe NADPH oxydase est activé par plusieurs enzymes, elles-mêmes activées à travers différentes voies de transduction (Panday et al., 2015). L'effet inhibiteur exercé par les extraits étudiés sur la flambée respiratoire est probablement dû, à l'inhibition d'une ou de certaines enzymes impliquées dans l'activation du NADPH oxydase ou sur la NADPH oxydase elle-même.

L'effet des flavonoïdes sur la flambée respiratoire a été étudié par Ciz et ses collaborateurs (2012). Ces chercheurs ont rapporté que la flambée respiratoire des PNs fMLP-stimulés est inhibée par plusieurs flavonoïdes tels que la quercétine, le kaempferol et l'isorhamnétine. Cet effet est attribué à l'inhibition de la voie de la PKC, la phospholipase D et celle des MAP Kinases, enzymes clés dans la transduction du signal cellulaire.

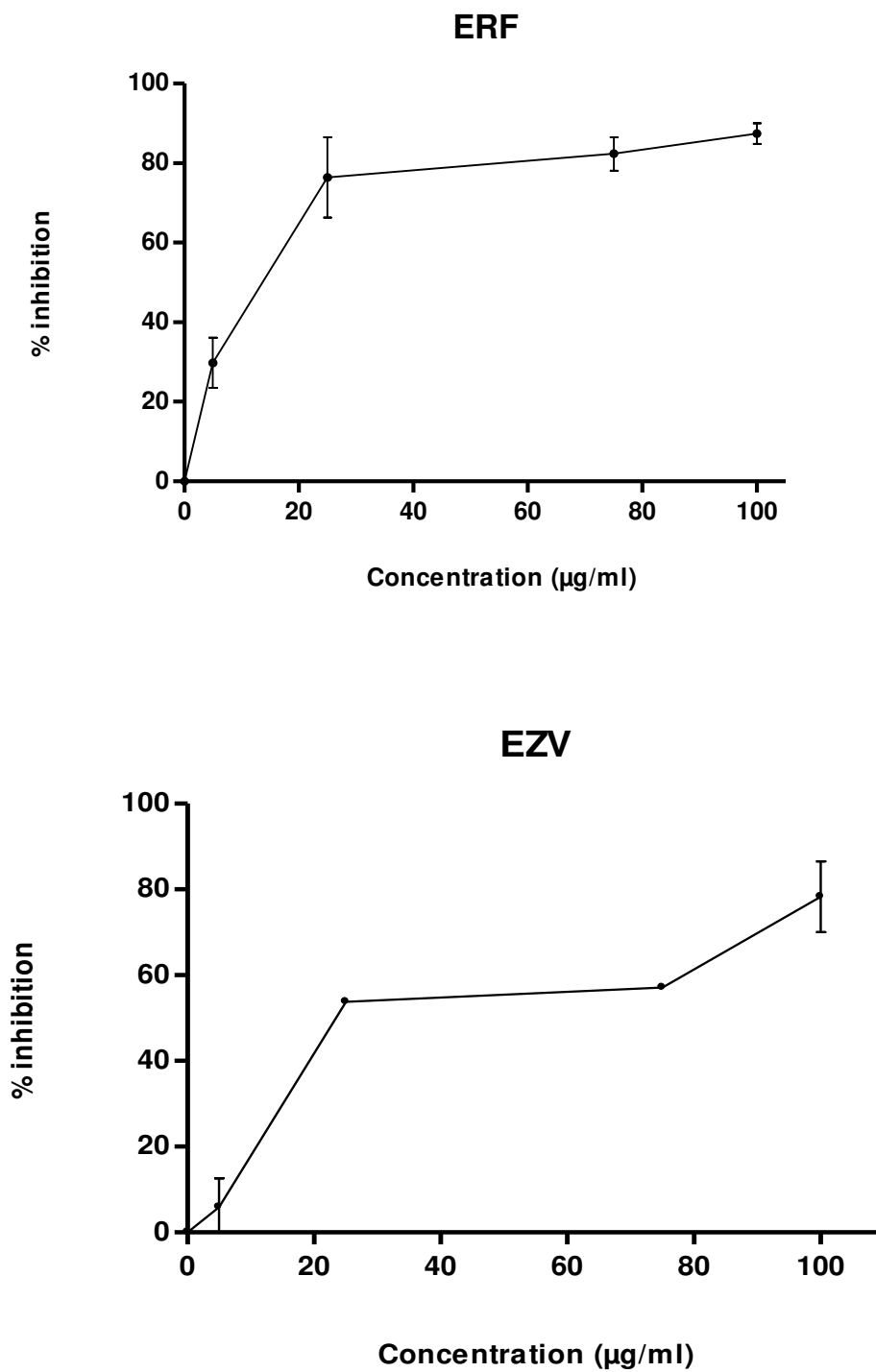


Figure 18: Effet des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur la flambée respiratoire des PNs. Chaque point représente la moyenne de 3 essais \pm SEM.

De même, il a été constaté que la rutine et la quercétine, inhibiteurs de la PI-3kinase, inhibent de manière dose-dépendante la génération des ERO par les PNfMLP-stimulés (Selloum *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2007). Dudek et ses collaborateurs (2016) ont trouvé que les dérivés de l'acide caféique isolés de *Galinsoga parviflora* inhibent la flambé respiratoire dans les neutrophiles humains fMLP-stimulés. Ribeiro et ses collaborateurs (2013) ont étudié la relation entre la structure et l'effet de 24 flavonoïdes sur la flambé respiratoire dans les neutrophiles humains PMA stimulés. Ils conclurent que le groupement catéchol sur le noyau B et la présence du groupement méthoxyle en position 3' et 4' du cycle B sont nécessaires pour la modulation de la flambé respiratoire. Ils ont montré aussi que l'hydroxylation sur le cycle A n'est pas déterminante pour l'activité des flavonoïdes, cependant elle influence leur lipophilie et leurs capacités de traverser la membrane plasmique des neutrophiles.

IV. Activité antioxydante des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*

IV.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang

L'effet du traitement par les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*, sur l'état de défense globale des souris vis-à-vis des radicaux libres a été évalué par le test de la capacité antioxydante totale. Ce test, réalisé sur le sang entier des souris, considère toutes les défenses de l'organisme, étant donné que le sang contient les diverses classes d'antioxydants moléculaires et enzymatiques (Stocker *et al.*, 2003). Ces antioxydants se mobilisent lors d'une attaque radicalaire induite *ex vivo* par le *t*-BHP pour protéger l'intégrité des érythrocytes présentes dans l'échantillon sanguin et retarder ainsi leur hémolyse. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT₅₀).

À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues (**Figure 19**), il paraît que le traitement par les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* entraîne un retardement de l'hémolyse qui est évident dans un décalage des sigmoïdes d'hémolyse vers la droite. Effectivement les valeurs d'HT₅₀ calculées révèlent un prolongement du temps de demie hémolyse chez tous les groupes traités par rapport au groupe contrôle (**Figure 20**).

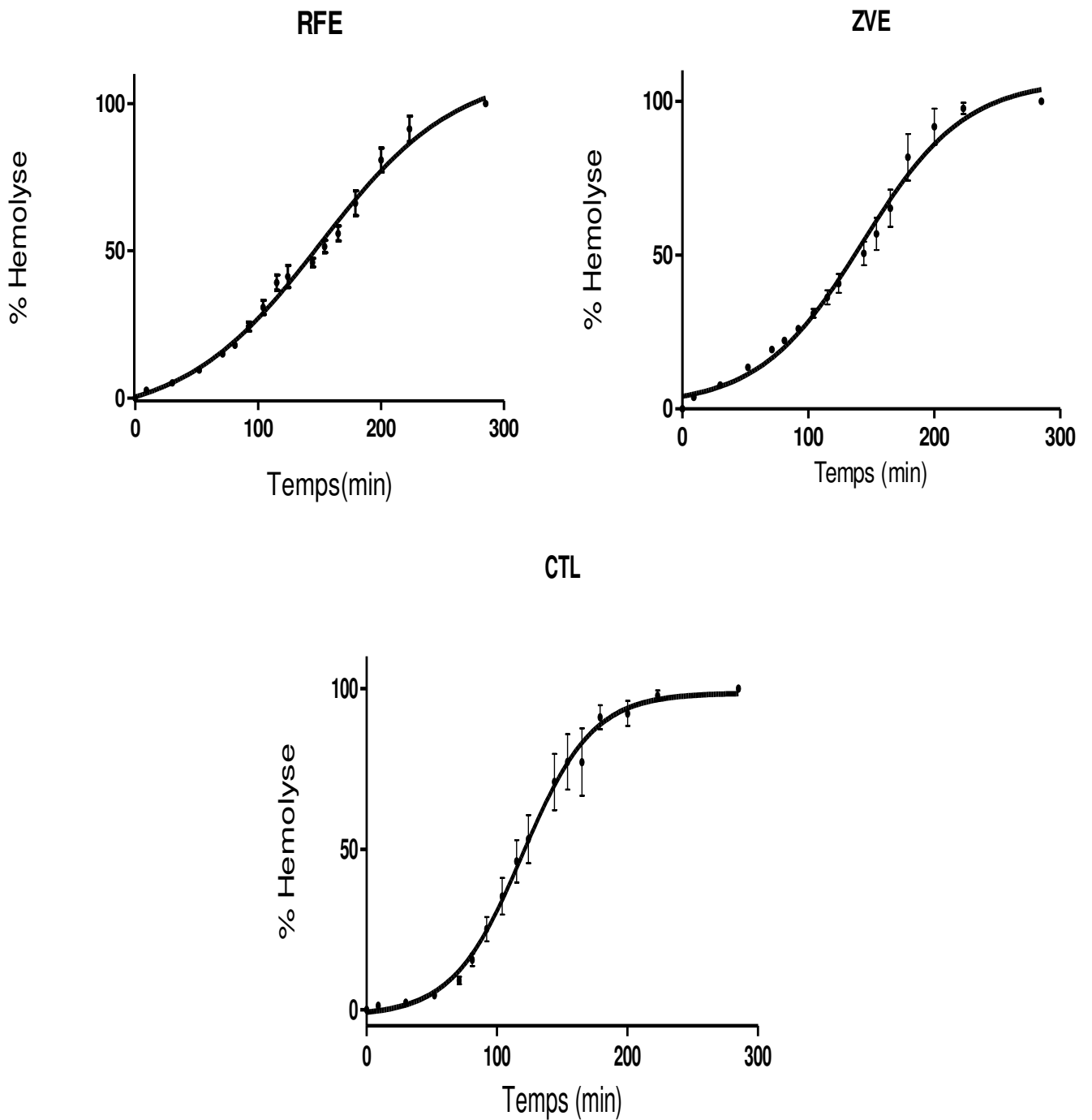


Figure 19 : Effet des extraits *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur la lyse érythrocytaire. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6-7).

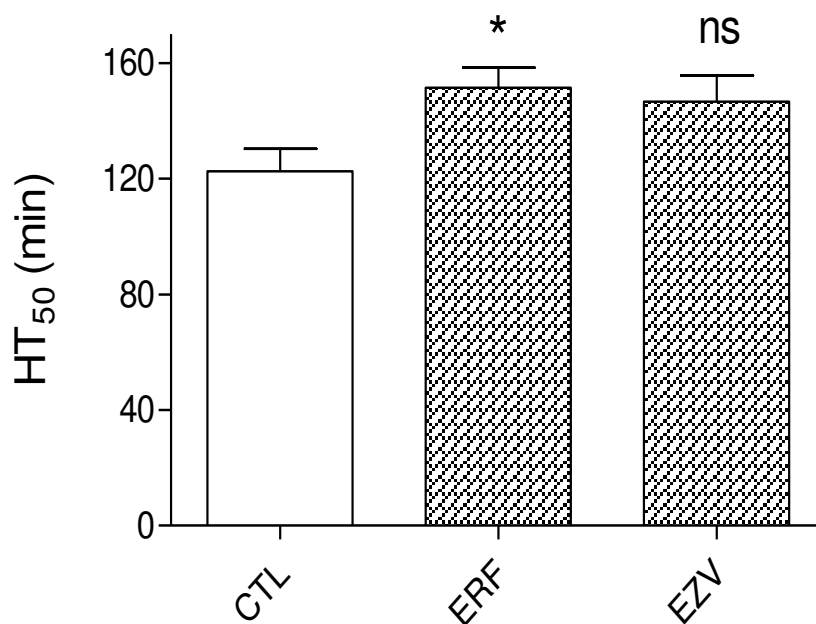


Figure 20 : Effet des extraits *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur le temps de demi-hémolyse (HT₅₀). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 6-7). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle ; * : P < 0.05, ns : non significative.

Pour les souris du groupe EZV traités par l'extrait *Zizyphus vulgaris* (200 mg/kg), l'augmentation de l'HT₅₀ (HT₅₀=146.72min) reste statistiquement non significative en comparaison avec le groupe contrôle (HT₅₀=122.5min).

Par contre, dans le groupe ERF traité par l'extrait de *Rubus fruticosus* (200 mg/kg), le retardement de l'hémolyse est plus important et statistiquement significative (HT₅₀=151.45min). La synthèse des résultats obtenus dans la présente étude montre que le traitement par l'extrait de *Rubus fruticosus* améliore significativement la capacité antioxydante totale chez la souris. Cependant, le comportement de cet extrait contre l'attaque radicalaire est toujours difficile à expliquer car le sang est une matrice complexe dans laquelle

les substances pharmacologiques évaluées pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le cytoplasme cellulaire, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Stocker *et al.*, 2003 ; Djeridane *et al.*, 2007).

Bohn *et al* (2010) ont étudié l'effet d'un régime alimentaire enrichi en antioxydant à base de plusieurs plantes médicinales incluant *Rubus fruticosus* et *Rubus idaeus* sur les défenses cellulaires des globules rouges et les défenses plasmatiques chez des fumeurs sains. Les résultats obtenus montrent que ce traitement induit une surexpression des gènes impliqués dans la réparation d'ADN, l'hypoxie et l'apoptose et une augmentation de la concentration des antioxydants (caroténoïde et polyphénol) plasmatiques dont les plus importants sont ; lutéine, α et β carotène, acide vanillique, acide protocatechique et acide gallique.

En effet, plusieurs chercheurs ont signalé que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont des antioxydants très puissants qui peuvent protéger les globules rouges et inhiber très efficacement l'hémolyse oxydative induite par les radicaux libres que se soit *in vivo* ou *in vitro* (Youdim, 2000 ; Dai *et al.*, 2006 ; Suwalsky, 2016). Ils ont montré aussi que l'effet protecteur des flavonoïdes contre la lyse oxydative des erythrocytes peut être lié à leur fixation sur les protéines et les lipides membranaires, ce qui permet d'inhiber significativement la peroxydation lipidique et favoriser l'intégrité des cellules contre la lyse (Blasa, 2007 ; Chaudhuri 2007 ; Cyboran 2012). De même, Liao *et al* (2016) ont montré que le kampferol inhibe significativement l'hémolyse oxydative induite *in vitro*. Le mécanisme d'action implique en plus de l'inhibition de la peroxydation lipidique, la préservation de l'intégrité des enzymes antioxydantes intrinsèques ; catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase.

IV.2. Effet scavenger des radicaux libres

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, plusieurs méthodes *in vitro* sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante. Le plus souvent il faut combiner les résultats de différents tests complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante (Popovici *et al.*, 2009)

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en

contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'antioxydant à piéger ce radical (Ghazghazi et al., 2013).

L'activité scavenger des différents extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (**Figure 21**) révèlent que les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC₅₀ de chacun des extraits ont été déterminées (**Tableau 5**).

Tableau 5: Concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* vis à vis du radical DPPH.

	IC ₅₀ (µg /ml)
Rubus fruticosus	14.00 ± 0.004
Zizyphus vulgaris	29. 81 ± 0.35

L'extrait de *Rubus fruticosus* montre une activité antioxydante importante avec une IC₅₀ très faible de l'ordre de 14 µg /ml. Une activité similaire 15,2 µg /ml du meme extrait a été rapportée par Salehi et ses collaborateurs (2013). Cependant, l'étude réalisée par Asnaashar et al., (2015) a révélé une faible capacité à piéger le radical DPPH avec IC₅₀ = 65,043 µg/ml . En outre, l'extrait de *Zizyphus vulgaris* montre le double de l'IC₅₀ (29,81 µg /ml) obtenue avec *Rubus fruticosus*. C'est-à-dire la moitié de l'activité antioxydante. L'activité importante de *Rubus fruticosus* est probablement attribuée à sa haute teneur en composés phénolique et en flavonoïdes. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires (Zhang et Tsao, 2016).

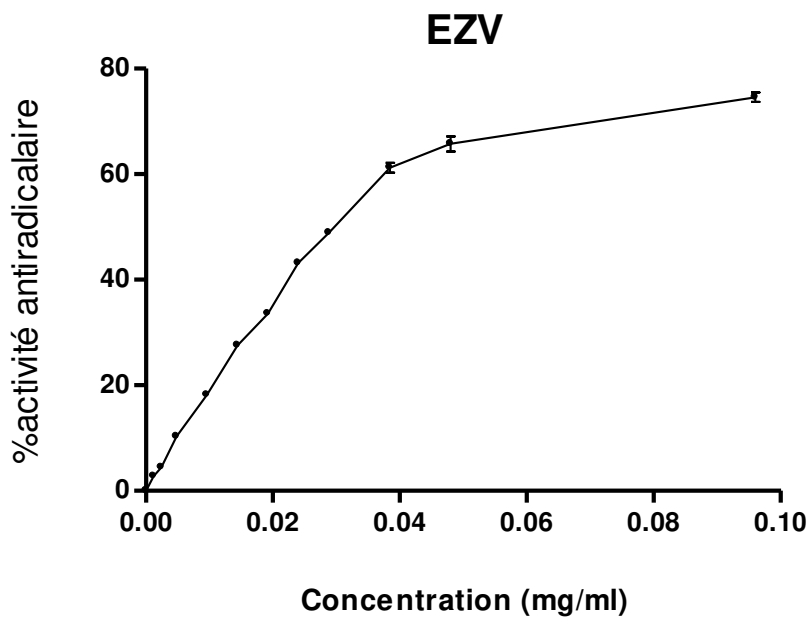
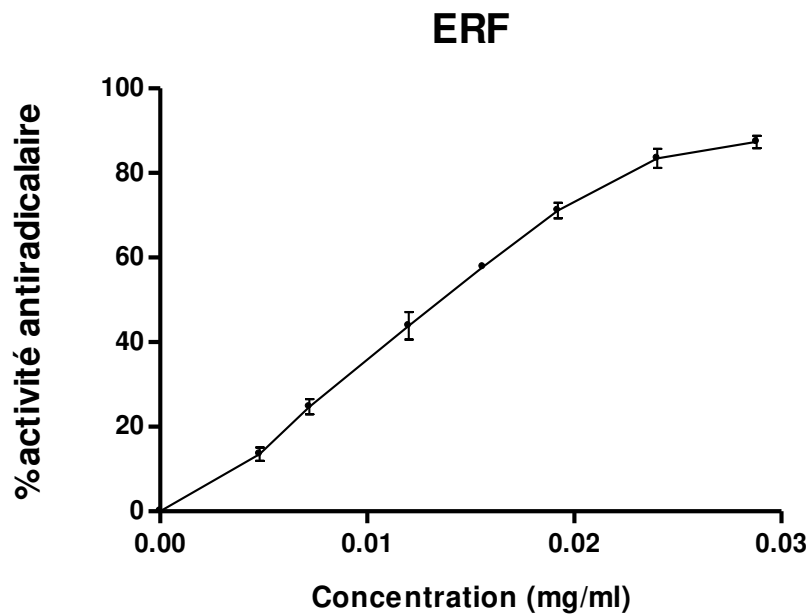
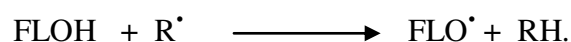


Figure 21 : Activité antiradicalaire des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) vis-à-vis du radical DPPH, Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

L'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres (R[•]) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO[•]) et à la molécule radicalaire rendue stable (RH).



Le FLO[•] subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde (Javanovic et al., 1994).

De nombreuses études ont établi des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité antioxydante vis à vis du radical DPPH. L'activité de ces molécules dépend essentiellement de leur structure. Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic et al., 2003 ; Sokol-Letowska, 2007).

La capacité antiradicalaire des extraits étudiés est confirmée par le test ABTS qui est largement utilisé pour mesurer la capacité antioxydante des extraits de plante. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique ABTS⁺ (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de coloration bleue-verte en ABTS incolore, par le transfert d'un électron à partir d'un antioxydant (Huang et al., 2005; Olszowy et widowicz, 2016).

Similairement aux tests de DPPH, le test d'ABTS révèle que l'extrait de *Rubus fruticosus*, plus riche en composés phénoliques, exerce la capacité antioxydante la plus élevée de l'ordre de 1,58 m mol E Trolox /mg extrait. L'extrait de *Zizyphus vulgaris* possède la moitié de cette activité 0,79 m mol E Trolox /mg extrait. Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour cette activité antioxydante du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres (Verzelloni et al., 2007; Zhang et al., 2011).

IV.2. Pouvoir réducteur

La technique FRAP, appelée également le test de réduction du fer, est considéré comme une méthode directe et rapide qui permet de mesurer la réduction du Fe³⁺ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux) en présence d'antioxydants. Cette réduction est rapide avec tous les

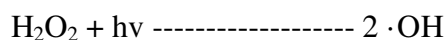
réducteurs ayant des potentiels de la demi réaction de réduction supérieur à celui du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} (Olszowy et widowicz, 2016).

D'une manière similaire à ce qui a été observé avec les tests précédant ; DPPH , ABTS , L'extrait de *Rubus fruticosus* montre aussi l'activité la plus importante dans le test FRAP avec un pouvoir réducteur de l'ordre de 3,39 m mol $FeSO_4$ /mg extrait suivi par l'extrait de *Zizyphus vulgaris* avec un pouvoire reducteur de l'ordre de 1,04 m mol $FeSO_4$ /mg extrait. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de (Belkacem et al., 2014 ; Parikh et Patel 2016; Ismail et al., 2017) qui ont mis en évidence une corrélation réciproque entre la teneur des extraits en composés phénoliques et en flavonoïdes et leurs activité antioxydante dans les tests DPPH, ABTS et FRAP.

Pour comprendre le mécanisme réactionnel des flavonoïdes dans la test FRAP , Firuzi et al (2005) ont étudié le potentiel redox et le pouvoir réducteur de 18 flavonoïdes appartenant à différentes classes ; ils ont tiré comme conclusion que la capacité de ces molécules à réduire les ions ferreux dépend essentiellement de leurs structure et de leurs potentiel redox ; les flavonoïdes les plus actif (quercétine, fisétine et myricetine) possèdent un potentiel redox faible (+0,3 - 0,39V) et renferme des groupement O-dihydroxy dans le cycle B , 3-hydroxy et une double liaison 2-3 dans le cyle C. L'étude phytochimique des deux extraits qui a révélé la présence de quercetin-3- β -D-glucoside et de fisétine dans l'extrait de *Rubus fruticosus* explique le pouvoir réducteur puissant montré par cet extrait.

IV. 3 .Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse d' H_2O_2

L'effet protecteur des extraits *Rubus fructicosu* et *Zizyphus vulgaris* contre les dommages oxydatifs de l'ADN induits par H_2O_2 /UV a été étudié sur l'ADN plasmidique pBluescript M13 (+). La photolyse de H_2O_2 survient quand il absorbe une quantité significative de lumière d'une longueur d'onde inferieure à de 380 nm. Ce processus peut être décrit en général par la réaction suivante:



En raison de la formation du radical d'hydroxyle fortement réactif et extrêmement oxydant, la configuration superenroulée d'ADN plasmidique (SC) change vers la forme circulaire ouverte (OC) et la forme linéaire entaillée (Lin), qui causent un changement de

leurs propriétés et leurs mobilités électrophorétiques (Yasmeen et *al.*, 2016).

La figure (22 A) montre le profil de migration électrophorétique de l'ADN en présence ou en absence des extraits de *Rubus fruticosus* ou *Zizyphus vulgaris* (100, 250, 350 and 500 µg/ml). L'ADN plasmidique montre deux bandes sur l'électrophorèse de gel d'agarose (ligne 1) une bande importante à déplacement rapide correspond à l'ADN natif circulaire superenroulé (l'ADN-sc) et une bande infime à déplacement plus lent ; c'est la forme circulaire ouverte (l'ADN-oc). L'irradiation d'ADN par l'UV en présence de H₂O₂ (ligne 2) entraîne le clivage d'ADN-sc pour donner une bande l'ADN-oc importante et une bande infime d'ADN linéaire, indiquant que le OH généré par la photolyse de H₂O₂ provoque la scission des brins de l'ADN. Il a été remarqué que le traitement UV seul et H₂O₂ seul (ligne 3 et 4, respectivement) ne peut pas endommager l'ADN comme il est indiqué dans le traitement combiné (ligne 2).

L'addition des extraits de *Rubus fruticosus* ou *Zizyphus vulgaris* (ligne 6-9) au milieu réactionnel a empêché la formation d'ADN-lin et a induit une protection significative de l'ADN circulaire superenroulé d'une façon dose dépendante. En fait, l'intensité de bandes d'ADN-sc (**Figure 22 B**) scannés à partir du profil electrophoretiques de gel d'agarose était 81.64, 87.18, 91.07 et 93.31% pour l'ADN plasmidique traité avec H₂O₂ en présence de 100, 250, 350 et 500 µg/ml de l'extrait de *Rubus fruticosus* et de 59.87, 66.32, 72.45 et 69.17% en présence de l'extrait de *Zizyphus vulgaris* respectivement en comparaison avec l'ADN plasmidique non traité.

L'activité des extraits étudié est probablement attribué au composés phénolique et flavonoïdes qu'ils contiennent. Ces derniers sont connus par leurs rôles protecteurs au sein des plantes contre les dommages des rayonnements UV. Sevgi et *al* (2015) ont étudié l'effet protecteur de plusieurs acides phénoliques sur les dommages oxydatifs de l'ADN induits par H₂O₂/UV. Les résultats obtenus montrent que l'acide ferulique est le plus actif suivie par l'acide caféique, rosmarinique et vanillique. Les acides cinnamique, gallique, p-hydroxybenzoïque et protocatechique ne présentent aucune activité. L'effet protecteur des extraits étudiés vis-à-vis des endommagements oxydatifs de l'ADN revient probablement à la présence de l'acide caféique et vanillique dans l'extrait de *Rubus fruticosus* et de l'acide vanillique dans l'extrait de *Zizyphus vulgaris*.

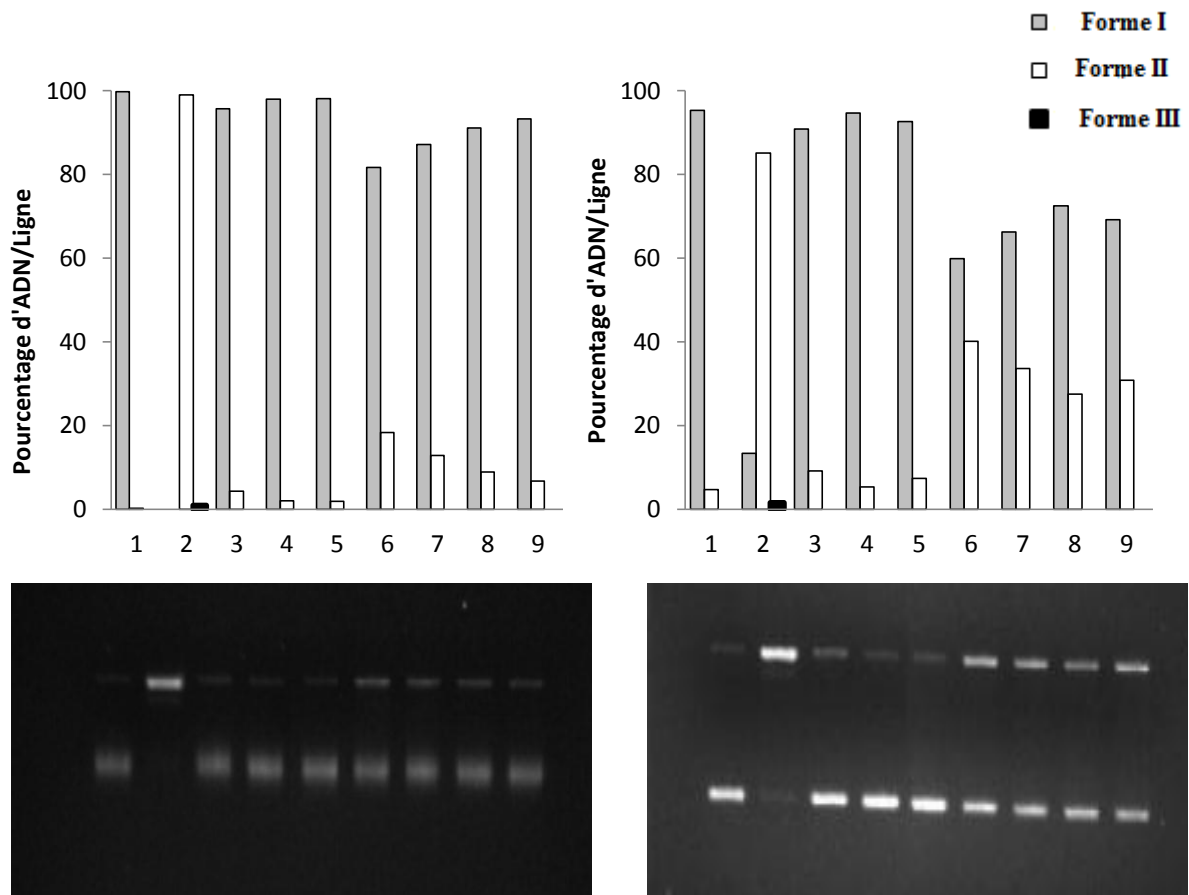


Figure 22: Effet des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV) sur l'oxydation d'ADN induite par H_2O_2/UV . (A) intensité des bandes quantifiées pour ADN-sc (forme I), ADN-oc (forme II) ADN-lin (forme III). (B) profil électrophoretique d'ADN pBluescript M13+ après UV/H_2O_2 photolyse en présence et en absence des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV). Ligne 1: ADN controle ; Ligne 2: ADN + H_2O_2 (2.5 mM) + UV; Ligne 3: ADN + UV; Ligne 4: ADN + H_2O_2 (2.5 mM); Ligne 5: ADN + extrait + UV; Ligne 6: ADN+ extrait (100 $\mu g/mL$) + H_2O_2 (2.5 mM) + UV; Ligne 7: ADN + extrait (250 $\mu g/mL$) + H_2O_2 (2.5 mM) + UV; Ligne 8: ADN + extrait (350 $\mu g/mL$) + H_2O_2 (2.5 mM) + UV; Ligne 9: ADN + extrait (500 $\mu g/mL$) + H_2O_2 (2.5 mM) + UV.

Plusieurs études ont également mis en évidence le rôle protecteur des flavonoïdes contre les dommages oxydatifs de l'ADN induit par des agents carcinogènes sur différentes lignées cellulaires (Piao et *al.*, 2013 ; Sevgi et *al.*, 2015 ; George et *al.*, 2017). Le kaempferol protège l'ADN des cellules HL-60 (human leukemia cells) contre les irradiations γ . la quercetin protège l'ADN des lymphocytes humain contre les dommages induits par le Benzo(a)pyrene, la fisetine protège les cellules V79-4 (Chinese hamster lung fibroblasts) contre les dommages oxydatifs de l'ADN induits par les irradiations γ .

Le radical hydroxyle peut être produit à l'intérieur des cellules par des réactions diverses comme la décomposition de H_2O_2 induite par l'UV utilisée dans la présente étude conduisant à l'endommagement des macromolécules biologiques incluant les lipides, les protéines et l'ADN, ce qui entraîne l'apparition de plusieurs maladies. Le radical hydroxyle réagit avec tous les composants de la molécule d'ADN; les bases puriques et pyrimidiques ainsi que le squelette de désoxyribose entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Phaniendra et *al.*, 2015).

L'effet protecteur des extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* correspond à leur potentiel antioxydant. Ces extraits pourraient donc être utilisés pour prévenir du cancer. Ainsi, l'identification de substances naturelles capables de fournir la protection contre des réponses inflammatoires induites par le stress oxydatif peut avoir des implications importantes sur la santé humaine.

Conclusion et perspectives

Les plantes *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris* sont parmi les plantes largement exploitées dans la médecine traditionnelle. Dans Cette étude, les extraits des feuilles de *Rubus fruticosus* et des racines *Zizyphus vulgaris* semblent présenter un intérêt réel et potentiel dans la régulation de l'inflammation à plusieurs niveaux.

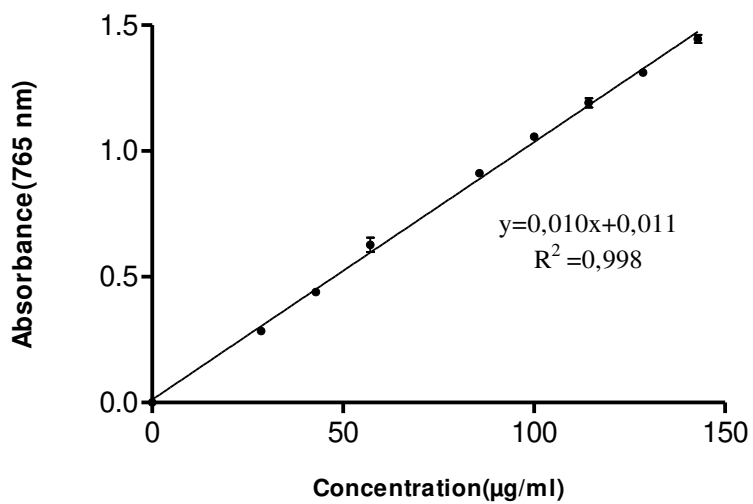
L'analyse phytochimique révèle la richesse de l'extrait de *Rubus fruticosus* en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport à l'extrait de *Zizyphus vulgaris*. Ces deux extraits montrent un effet anti-inflammatoire dans plusieurs modèles de l'inflammation. Les deux extraits exercent un effet tant que sur la phase précoce que sur la phase tardive de l'inflammation. En effet, les deux extraits exercent un effet antioedémateux important soit administrés par voie orale ou appliqués localement et réduisent la perméabilité vasculaire. De même, ces extraits inhibent d'une façon dose dépendante l'élastase, la myeloperoxydase et la libération des médiateurs respiratoires dans les neutrophiles humains.

D'autre part, l'extrait ERF montre une activité antioxydante puissante en piégeant les radicaux libres de DPPH et ABTS et en possédant un pouvoir réducteur puissant. En outre, les extraits ERF et EZV protègent l'ADN d'une façon dose dépendante contre les dommages oxydatifs induits par la photolyse de H₂O₂, et le traitement des souris par ces deux extraits entraîne une amélioration de la capacité antioxydante totale du sang contre l'hémolyse oxydative.

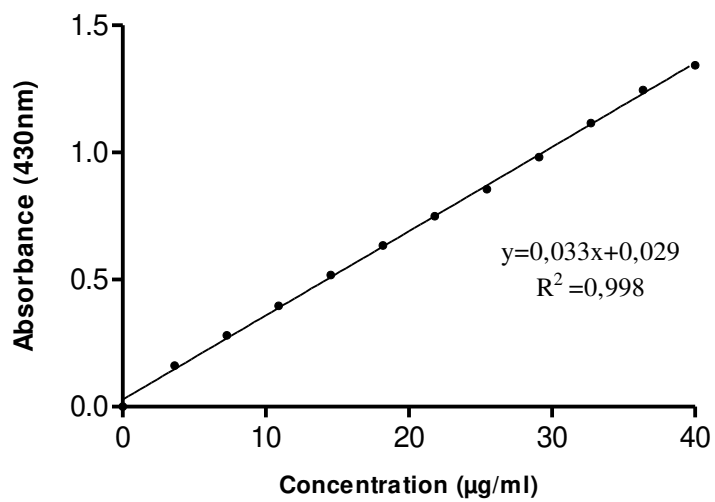
La présence relativement élevée de polyphénols et de flavonoïdes pourrait être à l'origine de ces activités. De tels résultats supportent l'usage traditionnel de ces plantes dans le soulagement de maladies inflammatoires.

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

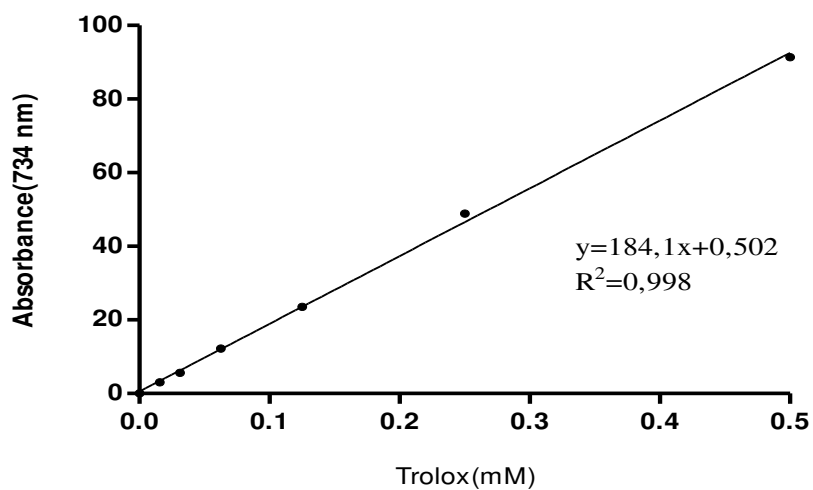
ANNEXE



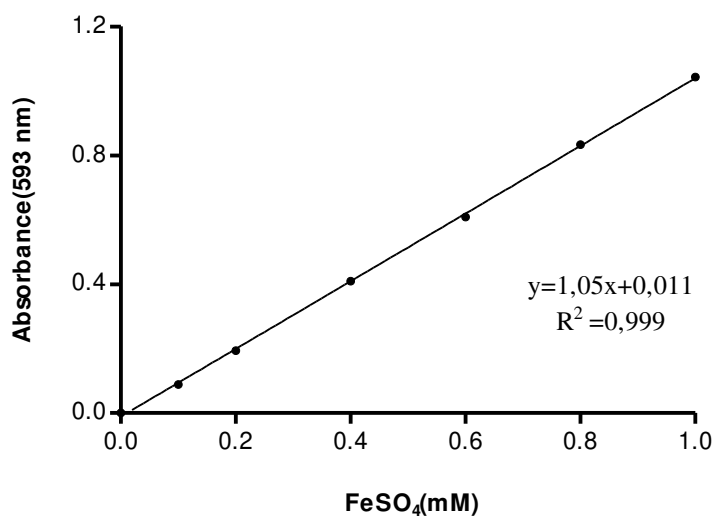
Droite d'étallonnage de l'acide gallique



Droite d'étallonnage de la quercetine



Droite d'étalonnage de trolox



Droite d'étalonnage de FeSO₄

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adcock IM, Ito K, Barnes PJ (2005). Histone deacetylation: An important mechanism in inflammatory lung diseases. *COPD*. 2:445-455.
- Araruna MKA, Saraiva RA, Nogara PA, Rocha JBT, Aline A, Boligon AA, Athayde ML, Rodrigues LB, da Costa RHS, Santana FRA, Costa JGM, Coutinho HDM, Pinheiro PG, Kerntopf MR, Wanderley AG, Menezes IRA (2014). Effect of pequi tree *Caryocar cororica ceum wittm.* leaf extracts on different mouse skin inflammation models: Inference with their phenolic compound content. *J Pharm Pharmacol*. 23:629-637.
- Attaguile G, Russo A, Campisi F, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol*. 16:83-90.
- Aymeric JL, Lefranc G (2009). Immunologie humaine. Bruxelles : De Boeck. p:59-65.
- Bahorun T, Gressier B, Troitin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimitt Forsch*. 46: 1086-1089.
- Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci IA, Boucherit Z (2014). Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of various *Punica granatum* l. Peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie*. 12(6):372-379.
- Benedek B, Kopp B, Melzig MF (2007). *Achillea millefolium* L. is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *J Ethnopharmacol* .113(2):312-317.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239:70-76.
- Bestwick CS, Milne L, Pirie L, Duthie SJ (2005). The effect of short term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HLA 60) leukaemic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1740:340-349.
- Bieth J, Spiess B, Wermuth CG (1974). The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med*. 11: 350-357. *Biochim Biophys Acta*. 1721(1-3):174-184.

- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Piatti E (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chem.* 104(4):1635-1640.
- Blétry O, Kahn JE, Somogyi A (2006). Immunopathologie, réaction inflammatoire. Paris:Masson. p:405-420.
- Bøhn SK, Myhrstad MC, Thoresen M, Holden M, Karlsen A, Tunheim SH, Erlund I, Svendsen M, Seljeflot I, Moskaug JO, Duttaroy AK, Laake P, Arnesen H, Tonstad S, Collins A, Drevon CA, Blomhoff R (2010). Blood cell gene expression associated with cellular stress defense is modulated by antioxidant-rich food in a randomised controlled clinical trial of male smokers. *BMC Med.* 8:54.
- Borgi W, Chouchane N (2006). Activité anti-inflammatoire des saponosides des écorces de racines de *Zizyphus lotus* (L.). *Revue des Régions Arides* ,283-286.
- Borregaard N (1997). Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci.* 832:62-68.
- Boufadi YM, Soubhye J, Riazi A, Rousseau A, Vanhaeverbeek M, Nève J, Boudjeltia K Z, Van Antwerpen P (2014). Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *Int J Mol Sci.* 15 (2):2327-2345.
- Bouriche H, Boudoukha C, Belambri SA, Boucif A, Senator A (2009). Implication of tyrosine kinase, PKC, P13kinase in signalling pathways of human neutrophil chemotaxis, respiratory burst and degranulation. *Sc Technol Devpt.* 5:89-1.
- Cabanis A, Gressier B, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC (1996). Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. *Gen Pharmacol.* 27(8):1409-1414.
- Callahan N, Yates M (2014). Basic Veterinary Immunology. University Press of Colorado p:67-109.
- Carlson RP, O'Neill-Davis L, Chang J, Lewis AJ (1985). Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and ipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions.* 17(2):197-204.
- Caughey GH (2011). Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol.* 716:212-234.

- Chagas-Paula DA, Oliveira RB, da Silva VC, Gobbo-Neto L, Gasparoto TH, Campanelli A P, Faccioli LH, Da Costa FB (2011). Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. *J Ethnopharmacol* .136(2):355-362.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol Macromol*. 41(1):42-48.
- Cheurfa M, Allem R (2016). Evaluation of antioxidant activity of different extracts of *Aloysia triphylla* leaves (L'Herit.) from Algeria *in vitro*. *Phytothérapie*. 14:181-187.
- Ciz M, Denev P, Kratchanova M, Vasicek O, Ambrozova G, Lojek A (2012). Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxid Med Cell Longev*.2012. Article ID181295.
- Clos J (2012). Immunité chez les animaux et les végétaux. Paris : Lavoisier. p:283-292.
- Cohen HJ, Chovanec ME (1978). Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. A basis for a continuous assay for monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. *J Clin Invest*.61: 1081-1087.
- Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H (2012). Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. *Cell Mol Biol Lett*. 17(1):77-88.
- Debuigne G, Couplant F (2013). Le petit Larousse des plantes qui guérissent. Paris : Larousse. p: 492-493.
- DeFranco AL, Robertson M, Locksley RM (2009). Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Bruxelles : De Boeck. p:83-85.
- Delaporte RH, Sarragiotto MH, Takemura OS, S´anchez GM, Filho BPD, Nakamura CV (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker–Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*. 95:229–233.
- Delves PJ, Burton DR, Martin SJ, Roitt IM (2008). Les fondements de l'immunologie. Paris : De Boeck. p:256-284

- Demirtas I, Erenler R, Elmastas M, Goktasoglu A (2013). Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. *Food Chem* .136:34-40.
- DeVargas FS, Almeida PD, de Boleti AP, Pereira MM, de Souza TP, de Vasconcellos M C, Nunez CV, Pohlit AM, Lima ES (2016). Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complement Altern Med*.16:1-8.
- Ding M, Feng R, Bowan L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X(2006). Cyanidin glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem*. 281:17359–17368.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*. 224(6): 801-809.
- Dudek K, Dudkowski M, Bazyłko A, Kazmierski SK, Kiss A (2016). Caffeic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Galinsoga parviflora* and their effect on inhibiting oxidative burst in human neutrophils. *Phytochem Lett*. 16:303-310.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*.127(3):514-525.
- Fauve RM, Hevin M (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. Eds, John LibbeyEurotext (France), p:10-19.
- Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R , Marrosu G, Saso L (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta*. 1721:174-184.
- Fournier PV(2010). Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuse de France. Paris: Omnibus. p:529-836.
- Fu R, Zhang YT, Guo YR, Huang QL, Peng T, Xu Y, Tang L, Chen F (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum*(L.)Roxb.leaves. *J Ethnopharmacol*.147(2):517-524.
- Furtado AA, Torres-Rêgo M, Lima MC, Bitencourt MA, Estrela AB, Souza da Silva N, da Silva Siqueira EM, Tomaz JC, Lopes NP, Silva-Júnior AA, Zucolotto SM, Fernandes-

- Pedrosa MF (2016). Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. *J Ethnopharmacol.* 192:225-235.
- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem.* 45:1-14.
- Geronikaki AA, Gavalas AM (2006). Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen.* 9(6):425-442.
- Ghazghazi H, Chedia A, Abderrazak M, Brahim H (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanolique de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol Hyg Alim.* 25(73):37-41.
- Ghedira K (2013). *Zizyphus lotus* (L.) Desf. (Rhamnaceae) : jujubier sauvage. *Phytothérapie.* 11:149-153.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J (2006). Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition.* 22:758-766.
- González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr.* 104:S15-S27.
- Gudej J, Tomczyk KM (2004). Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Arch Pharm Res.* 27(11):1114-1119.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth Edition. Oxford University Press.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 38(5):709-750.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.* 53(6):1841-1856.
- Huet O, Duranteau J (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Réanimation.* 17:387-392.

- Hurtado-Nedeleca M, Dang PMC, Monteiro RC, El Bennab J, Gougerot-Pocidaloa MA. (2014) Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. *R F L*. 462:25-38.
- Johansson S, Göransson U, Luijendijk T, Backlund A, Claeson P, Bohlin L (2002). A neutrophil multi target functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod*. 65(1):32-41.
- Kaennakam S, Sichaem J, Siripong P, Tip-pyang S (2013). Chemical constituents of the roots of *Zizyphus rugosa*. *Che Nat Compd*. 49(4):767-768.
- Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Bøhn SK, Sandvik L, Blomhoff R (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr*. 137(8):1951-1954.
- Kato Y, Nagao A, Terao J, Osawa T (2003). Inhibition of myeloperoxidase catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67(5):1136-1139.
- Kessel L, Tendal B, Jorgensen KJ, Erngaard D, Flesner P, Andresen JL, Hjortdal J (2014). Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops. *Ophthalmol*. 121:1915-1924.
- Kierszenbaum AL (2002). Histology and cell biology. An introduction to pathology. Mosby. 8: 201-255.
- Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S (2004). Inhibition effects of (+)-catechin aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 320(1):256-261.
- Kitagawa S, Sakamoto H, Tano H (2004). Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chem Pharm Bull*. 52(8):999-1001.
- Kou J, Si M, Dai G, Lin Y, Zhu D (2006). Anti-inflammatory activity of *Polygala japonica* extract. *Fitoterapia*. 77:411-415.
- Kumar T, Jain V (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Brideliaretusamethanolic fruit extract in experimental animals. *Sci World J*. Article ID 890151, 12 p.

- Lakhani S, Dilly S A, Finlayson CA (2009). Basic pathology: an introduction to the mechanisms of disease. London: Hodder. p:25-40.
- Le Crouéour G, Thèpenier P, Richard B, Petermann C, Ghédira K, Zéches-Hanrot M (2002). Lotusine G: a new cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus lotus*. *Fitoterapia*.73:63-68.
- Leite LM, Carvalho AG, Ferreira PL, Pessoa IX, Gonçalves DO, Lopes A, Góes JG, Alves VC, Leal LK, Brito GA, Viana GS (2011). Anti-inflammatory properties of doxycycline and minocycline in experimental models: an *in vivo* and *in vitro* comparative study. *Inflammopharmacology*. 19(2):99-110.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chem*. 102:771-776.
- Liao W, Chen L, Ma X, Jiao R, Li X, Wang Y (2016). Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *Eur J Med Chem*.114:24-32.
- Lim TK (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. *Springer*. 4: 544-554.
- Lima GPP, Vianello F, Corrêa CR, Da Silva Campos RA, Borguini MG(2014). Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food Nutr Sci* .5:1065-1082.
- MacNee W, Rahman I (2001). Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mole Med*. 7(2):55-62.
- Male DK, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (2007). Immunologie. Paris: Masson.p:6-17.
- Malle M, Gogny M (2014). Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. *EMC-Vétérinaire*. 0(0):1-12.
- Manga HM, Brkic D, Marie DEP, Quetin-Leclercq J (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 92:209-214.
- Manna C, D'angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J Agric Food Chem*. 50: 6521-6526.

- Marquina MA, Corao GM, Araujo L, Buitrago D, Sosa M (2006). Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Fitoterapia*. 73:727–729.
- Martin P, Leibovich SJ (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15(11):599-607.
- Maruyama N, Sekimoto Y, Ishibashi H, Inouye S, Oshima H, Yamaguchi H, Abe S (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J Inflamm.* 2:1-11.
- Mathews K, Boston S (2013). Nonsteroidal antiinflammatory analgesics. In: Chandler ML, Twedt DC, Steiner JM, Washa bau RJ, Syring RJ, Willard MD. Philadelphia: Canine and Feline Gastroenterology. p:463-70.
- Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 7(1):62-66.
- Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454 (7203): 428-435.
- Meotti FC, Senthilmohan R, Harwood DT, Missau FC, Pizzolatti MG, Kettle AJ (2008). Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 44(1):109-120.
- Migdal C, Serres M (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci.* 27:405-412.
- Milivojevic J, Maksimovic V, Nikolic M, Bogdanovic J, Maletic R, Milatovic D (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *fragaria* and *rubus* berries. *J Food Quality.* 34:1-9.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 20(7):1126-1167.
- Mo J, Panichayupakaranant P, Kaewnopparat N, Nitiruangjaras A, Reanmongkol W (2013). Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. *J Ethnopharmacol.* 148(3):901-908.

- Moran G, Folch H (2011). Recurrent airway obstruction in horses—an allergic inflammation: a review. *Vet Med.* 56(1):1–13.
- Morand C, Milenkovic D (2014). Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques.* 42:47-62.
- Muzamal I, Robert V, Korthout H, Mustafa N R (2013). Phytochemicals as a potential source for TNF- α inhibitors. *Phytochem Rev.*12:65–93.
- Nastasijević B, Lazarević-Pašti T, Dimitrijević-Branković S, Pašti I, Vujačić A, Joksić G, Vasić V (2012). Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of Gentiana lutea extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 66:191-196.
- OCDE (2001). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques toxicité orale aiguë - méthode par classe de toxicité aiguë, 14p.
- Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *J Ethnopharmacol.* 109(2):219-225.
- Olszowy M, Dawidowicz AL (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatsh Chem.* 147:2083-2091.
- Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol.*12(1):5-23.
- Pandey R, Pandey R, Shukla SS (2013). Anti-inflammatory potential of ethanol extract of *Rubus ulmifolius* (Schott). *Res J Pharm Technol.* 6(3):300-303.
- Parikh B, Patel VH (2017). Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *FSHW.*6(1):10-19.
- Paula FS, Kabeya LM, Kanashiro A, de Figueiredo AS, Azzolini AE, Uyemura SA, Lucisano-Valim YM (2009). Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food Chem Toxicol.* 47(1):163-170.

- Pavlova SI, Albegova DZ, Vorob'eva YS, Laptev OS, Kozlov I G (2016). Flavonoids as potential immunosuppressants affecting intracellular signaling pathways. *Pharm Chem J* 49(10):3-10.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 30(1):11-26.
- Piao MJ, Kim KC, Chae S, Keum YS, Kim HS, Hyun JW (2013). Protective Effect of Fisetin(3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone) against γ -Irradiation-Induced Oxidative Stress and Cell Damage. *Biomol Ther.* 21(3):210-215.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutr Clin Metabol.* 16: 233-239.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* .4:25-39.
- Précourt LP (2011). Rôles et régulation des enzymes antioxydantes paraoxonases au niveau intestinal et implication dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Thèse de Doctorat en nutrition. Université de Montréal.410 p.
- Radovanović BC, Anđelković AM, Radovanović AB, Anđelković MZ (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop J Pharm Res.*12 (5):813-819.
- Radu M, Chernoff J (2013). An *in vivo* assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp.* (73):e50062. doi: 10.3791/50062.
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Gauberville C, Bardat J, Bruno E, Keller R (2008) Flore forestière française: guide écologique illustré Région Méditerranéenne. Paris: Institut pour le développement forestier. p:1019-1020.
- Rameau JK, Mansion D, Dumé G, Gauberville C, Bardat J, Bruno E, Keller R (1993). Description de la flore forestière française: guide écologique illustré. Montagnes. Paris. :Institut pour le développement forestier. p:703-704.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, RiceEvans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 26:1231-1237.

- Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, Silva AM, Porto G, Fernandes E (2013). Modulation of human neutrophils' oxidative burst by flavonoids. *Eur J Med Chem.* 67:280-292.
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* 48:601-606.
- Ryu HW, Kim KO, Yuk HJ, Kwon OK, Kim JH, Kim DY, Na MK, Ahn KS, Oh SR (2016). The constituent, anti-inflammation, and human neutrophil elastase inhibitory activity of *Gnaphalium affine*. *J Funct Foods.*27:674-684.
- Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S (2007). Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: Its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 353(4):915-920.
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Rapisarda P, Dederen JC (1998). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of red orange extract. *Int J Cosmet Sci.*20:331-342.
- Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, Corella D, Fiol M, Gómez-Gracia E, Arós F, Flores G, Lapetra J, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutiérrez V, Bulló M, Basora J, Covas MI (2008). Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med.* 168(22):2449-2458.
- Sánchez A, Calpena AC, Clares B (2015). Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci.* 16:16981-17004.
- Sándor K, Helyes Z, Elekes K, Szolcsányi J (2009). Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in xylene induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosci Lett.* 451(3):204-207.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Totowa: Humana Press. pp: 27-37.
- Selloum L, Reichl S, Müller M, Sebihi L, Arnhold J (2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys.* 395(1):49-56.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophil chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol* 54, 313-318.

- Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press.p:1-4.
- Serhan CN, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 6(12):1191-1197.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-dupont G (2003). La myeloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de defense aux capacites oxydantes. *Ann Med Vet.* 147:79-93.
- Sesti F, Tsitsilonis OE, Kotsinas A, Trougakos IP (2012). Oxidative Stress-mediated Biomolecular Damage and Inflammation in Tumorigenesis. *In vivo.* 26: 395-402
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 77:12-21.
- SGH. 2003. système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques. Toxicité aiguë. Nations Unies New York et Genève, publication des Nations unies numéro de vente : F.03.II.E.25, 547p.
- Shiba Y, Kinoshita T, Chuman H, Taketani Y, Takeda E, Kato Y, Naito M, Kawabata K, Ishisaka A, Terao J, Kawai Y (2008). Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem Res Toxicol.* 21(8):1600-1609.
- Soehnlein O, Lindbom L (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 10(6):427-439.
- Srivastava A, Greenspan P, Hartle DK, Hargrove JL, Amarowicz R, Pegg RB (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of polyphenolics from Southeastern U.S. range blackberry cultivars. *J Agric Food Chem.* 58(10):6102-6109.
- Steinhubl SR (2007). Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 21:115-121.
- Stevenson DE, Hurst RD (2007). Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more?. *Cell Mol Life Sci.* 64:2900-2916
- Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, Chalier F, Prost M (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim Biophys Acta.* 1621(1):1-8.

- Strehl C, Spies CM, Buttgerit F (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clin Exp Rheumatol.* 29 (68):13–18.
- Suwalsky M, Colina J, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Manrique-Moreno M, Sepúlveda B (2016). Antioxidant capacity of gallic acid *in vitro* assayed on human erythrocytes. *J Membr Biol.* 249(6):769-779.
- Tadeg H, Mohammed A, Asres K, Gebre-Mariam T (2005). Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J Ethnopharmacol.* 100:168–175.
- Tangney CC, Rasmussen HE (2013). Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 15(324):2-10.
- Tian R, Ding Y, Peng YY, Lu N (2017). Inhibition of myeloperoxidase- and neutrophil mediated hypochlorous acid formation *in vitro* and endothelial cell injury by epigallocatechin gallate. *J Agric Food Chem.* 65(15):3198-3203.
- Turemis N, Kafkas E, Kafkas S, Kurkcuoglu M, Baser KHC (2003). Determination of aroma compounds in blackberry by GC/MS analysis. *Chem Nat Compd.* 39:174-176.
- Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, Barriga A, Silva X, de las Heras B, Hortelano S, Delporte C (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *J Ethnopharmacol.* 168:37-44.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell. B* 39: 44-84.
- Van Wyk B, Wink M (2004). Medicinal plants of the world. Pretoria: Briza Publications. p:480.
- Verzelloni E, Tagliacucchi D, Conte A (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* 105(2):564-571.
- Wang S, Wang H, Guo H, Kang L, Gao X, Hu L (2011). Neuroprotection of Scutellarin is mediated by inhibition of microglial inflammatory activation. *Neuroscience.* 185:150-160.

- Weill B, Batteux F(2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Bruxelles: De Boeck. p:12-15.
- Williams CMM, Galli SJ (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*.105:847-859.
- Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC (2005). Protection by quercetin and quercetin rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res*. 582(1-2):155-162.
- Winyard PG, Blake DR, Evans CH (2013).Free Radicals and Inflammation.Berlin: Springer Basel. p:3-15.
- Wollgast J, Anklam E (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int*. 33:423-447.
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int Jf Mol Sci*. 11:622-646.
- Xing X, Yang X, Cao Y (2016). Study of Ellagic Acid as a Natural Elastase Inhibitor by Spectroscopic Methods. *J Appl Spectrosc* .83(1):149-155.
- Yasmeen S, Gupta P (2016) .*In vitro* demonstration of *Dalber giasissoo*(indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for suncreening and DNA nick prevention .*Int J Pharm Pharm Sci*. 8(6):175-181.
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Mackinnon S, Kalt W, Joseph JA (2000). Polyphenolics enhances red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Acta*. 1523(1):117-122.
- Zeinalia M, Rezaeac SA, Hosseinzadeha H (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*. 92:998–1009.
- Zhang H, Tsao R (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*. 8:33-42.
- Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De-Feo V, Jaafar HZ, Moga M (2014). *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*.19 (8):10998-1029.

Original Article

ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *RUBUS FRUTICOSUS* AND *ZIZYPHUS VULGARIS* METHANOL EXTRACTS

ASMA MEZITI^{a*}, HAMAMA BOURICHE^a, MEZITI HICHEM^a, SEOUSSEN KADA^a, ABDERRAHMANE SENATOR^a,
IBRAHIM DIMERTAS^b

^aLaboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Turkey
Email: simsimamisa@yahoo.fr

Received: 27 Jul 2016 Revised and Accepted: 07 Dec 2016

ABSTRACT

Objective: This report is an attempt to study the phenolic composition of *Rubus fruticosus* (RFE) and *Zizyphus vulgaris* (ZVE) methanol extracts and evaluate their antioxidant and anti-inflammatory effects *in-vitro* and *in-vivo*.

Methods: Total phenolic and total flavonoids contents of extracts were determined by spectrophotometric methods. Phenolic compounds were identified by HPLC-TOF/MS. The antioxidant activities were evaluated *in vitro* using DPPH, ABTS and FRAP assays. The effect of RFE and ZVE on DNA cleavage induced by H₂O₂ UV-photolysis was also investigated. The antioxidant effect of RFE and ZVE was tested *in vivo* using the blood total antioxidant capacity test in mice. On the other hand, the anti-inflammatory activity was assessed *in vivo* using two models of acute inflammation ear edema and vascular permeability.

Results: The phytochemical analysis of these extracts showed that RFE possesses higher polyphenolic and flavonoid content than ZVE. In the same way RFE exerted the highest antioxidant capacity with IC₅₀ value of 14 µg/ml in DPPH assay, 1.58 mmol of Trolox E/mg extract and 3.39 of mmol FeSO₄/mg extract in ABTS, and FRAP assay respectively. The studied extracts showed a concentration-dependent protective effect on DNA cleavage induced by H₂O₂ UV-photolysis. The daily oral administration of 200 mg/kg of RFE or ZVE during three weeks showed an improvement of the blood total antioxidant capacity; the HT₅₀ values were 151.45 min and 146.72 min for the groups treated with RFE and ZVE, respectively versus 122.5 min for the control group. The topical application of 2 mg/ear of RFE inhibited the croton oil-induced ear edema by 75.72%, while the inhibition exerted by ZVE was 64.24%. These inhibitions were higher than that of indomethacin, used as a reference. Moreover, the oral administration of 400 mg/kg of RFE inhibited significantly (33.57%) acetic acid induced vascular permeability in mice. However, this effect was lower than that of indomethacin. The inhibition effect exerted by ZVE was not significant.

Conclusion: The results obtained in this investigation showed that RFE possesses strong antioxidant and anti-inflammatory potential in comparison with ZVE, which may be attributed to the presence of polyphenolic phytoconstituents.

Keywords: Antioxidant, Anti-inflammatory, Phenolic compounds, Photolysis, Hemolysis, Inflammation

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i2.14374>

INTRODUCTION

Oxidative stress is an important factor in the genesis of several pathologies, such as cancer, cardiovascular and degenerative diseases. In order to protect the body against the consequences of oxidative stress, an efficacious approach consists in improving the antioxidant nutrition. Antioxidants from natural sources have a higher bioavailability and therefore higher protective efficacy than synthetic antioxidants [1].

Inflammation is the response of living tissues to injury. It is typically a protective mechanism that is triggered in response to noxious stimuli, trauma or infection to protect the body and to facilitate the recovery process. However, the uncontrolled response leads to chronic inflammatory disorders. A large number of steroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs are available in the market for the treatment of inflammation. However, despite their great number, their therapeutic efficacy seems to be hampered because they are often associated with serious adverse side effects such as gastrointestinal irritation, ulcers, nephrotoxicity, and metabolic disorders [2].

It is therefore of utmost importance to search for less toxic anti-inflammatory and antioxidant drugs. Medicinal plants have been documented to have an advantage in toxicity considerations based on their long term use and one might expect bioactive compounds obtained from such plants to have low animal and human toxicity [3].

It has been reported that polyphenolic compounds significantly constitute the active substances in these plants having multiple biological activities both *in vitro* and *in vivo* [4]

In Algeria, more than 600 species of medicinal and aromatic plants are employed commonly in the practice of traditional medicine, and only a few have been studied phytochemically and evaluated for their biological activity. *Rubus fruticosus* (Rosaceae) and *Zizyphus vulgaris* (Rhamnaceae) are used in the Algerian folk medicine for hundreds of years as antidiarrheal, anti-inflammatory, local analgesic, warmer and urinary antiseptic [5, 6].

Despite the use of these plants in traditional medicine, no or not much pharmacological and phytochemical studies are reported assessing their therapeutic properties. The aim of the present study was to investigate the phenolic profile of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* methanol extracts and evaluate their antioxidant and anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Materiel

Chemicals

Indomethacin, *t*-BHP (*tert*-butyl hydroperoxide, Galic acid, Quercetin and Folin-Ciocalteu reagent DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazine-6-sulfonic acid (ABTS), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), ferric chloride, sodium acetate, potassium persulphate and Evans blue were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Plasmid miniprep kit was obtained from Qiagen (Valencia, CA). Xylene and croton oil were obtained from ProLabo (France). All other chemicals are from Sigma and were of analytical grade.

Plant material

Rubus fruticosus (leaves) and *Zizyphus vulgaris* (roots) were collected in September 2011 from Bordj Bou Arréridj, Algeria. They were identified by Pr. Houssine Laouar, University of Sétif. The voucher specimens (No R. F. 2012/57 and No Z. V. 2012/63), were deposited at the laboratory of botany in the University of Sétif Algeria. Plant material was washed, dried and powdered with an electric micronized.

Animals

Swiss albino mice are weighing 20–25 g were purchased from Pasteur Institute of Algiers, Algeria. The mice were divided into different groups each consist of 5-7 animals and were allowed to acclimatize to the animal room conditions for one week and had free access to food and water *ad libitum*. Animals fasted overnight prior the experiments. All procedures were performed in accordance with European Union Guidelines for Animals Experimentation (2007/526/EC).

METHODS

Preparation of plant extracts

One hundred grams of the powdered plant material were soaked in 80 % aqueous methanol (1/10, w/v) for 24 h with frequent agitation. After filtration and solvent evaporation in a rotary evaporator (Büchi) the crude methanol extracts were stored in darkness at 4 °C.

Determination of total phenolics

Total phenolic content was estimated by the Folin–Ciocalteu method [7]. Two hundred microliters of diluted sample (0.5-10 mg/ml) were added to 1 ml of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 µl of saturated sodium carbonate (75 g/l) was added. After 2 h of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid (0–160 µg/ml) was used for the standard calibration curve. The results were expressed as milligramme gallic acid equivalent (GAE)/g extract.

Determination of total flavonoids

The total flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method described by Bahorun *et al.* [8] Briefly, 1 ml of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) in methanol was mixed with the same volume of extracts (0.25-0.5 mg/ml), After 10 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 430 nm. Quercetin was used for the standard calibration curve. The data were expressed as milligram quercetin equivalents (QE)/g extract.

Analysis of phenolic compound by HPLC-TOF/MS

Dried crude extracts (200 µg) of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* were dissolved in methanol at room temperature. Samples were filtered through a PTFE (0.45 µm) filter by an injector to remove particulates. Injection volume was 10 µl. Phenolic compounds analysis was carried out as described by [9], using an Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System coupled with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector. The separation was carried out on ZORBAX SB-C18 (4.6 x100 mm, 3.5µm) column. Mobile phases A and B were ultra-pure water with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 ml min⁻¹ and column temperature was 35 °C. The solvent program was as follow: 0-1 min 10% B, 1-20 min 50% B, 20-23 min 80% B, 23-25 min 0% B; 25-30 min 10% B. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative and operated with a nitrogen gas temperature of 325 °C, nitrogen gas flow of 10.0 L min⁻¹, nebulizer of 40 psi, capillary voltage of 4000 V and finally, fragmentor voltage of 175 V. Phenolic compound were identified by the retention time of sample chromatographic peaks being compared with those of authentic standards using the same HPLC operating condition and also by the extract being spiked with the standard components.

DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging capacity of the studied extracts was tested as bleaching of the stable 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl

radical (DPPH) [10]. The reaction mixture contains 1.5 ml of DPPH solution (100 mmol) and 37.5 µl of different extracts concentration (5-50µg/ml). After 20 min at room temperature, the absorbance was recorded at 517 nm and the percentage of radical scavenging activity was calculated as follow:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}})] / \text{Abs}_{\text{Control}} \times 100}{100}$$

Where Abs control is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and Abs sample is the absorbance of the test compounds.

ABTS radical scavenging activity

The ability of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts to scavenge the ABTS radical was evaluated according to Re *et al.* [11]. The ABTS radical cation was produced by the oxidation of 1.7 mmol ABTS with potassium persulphate (4.3 mmol) in water. The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use, and then the ABTS solution was diluted with phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 to give an absorbance of 0.7±0.02 at 734 nm, 50 µl of the methanol solution containing different concentrations of the extract (0.03-0.5 mg/ml) were added to 2 ml of the ABTS preparation and the absorbance was recorded at 734 nm, after allowing the reaction to stand for 6 min in the dark at room temperature. The unit of total antioxidant activity was defined as the concentration of trolox having the equivalent antioxidant activity, expressed as mmol trolox equivalent/mg extract.

Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)

The ferric reducing ability of the extracts under study was evaluated according to the method described by Benzie and strain. [12] With minor modifications. The FRAP reagent contained 10 mmol of TPTZ solution in 40 mmol HCl, 20 mmol FeCl₃, and acetate buffer (300 mmol, pH 3.6) (1:1:10, v/v/v). 50 µl of a methanol solution containing different concentrations (0.03-1 mg/ml) of the extracts tested or of the vehicle (methanol) alone were added to 1 ml of the FRAP reagent. After incubation at 20 °C for 4 min, the absorbance was measured at 593 nm, using the FRAP reagent as a blank. Methanol solutions of known Fe(II) concentration, ranging from 100 to 1000 µM FeSO₄ were used for the preparation of the calibration curve and results are expressed in mmol Fe (II)/mg extract.

DNA oxidation induced by the photolysis of H₂O₂

DNA damage protective activity of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extract was checked on pBluescript M13 (+) plasmid DNA. Plasmid DNA was oxidized with H₂O₂+UV treatment in the presence of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts and checked on 1% agarose after modification [13]. In brief, the experiments were performed in a volume of 10 µl in a microcentrifuge tube containing 200 ng of plasmid DNA in phosphate buffer (7.14 mmol phosphate and 14.29 mmol NaCl), pH 7.4, H₂O₂ was added at a final concentration of 2.5 mmol/l with and without 1 µl of (100, 250, 350, 500 µg/ml) *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts. The reactions were initiated by UV irradiation and continued for 5 min on the surface of a UV transilluminator with intensity 8000 µW cm⁻¹ at 300 nm at room temperature. After irradiation, the reaction mixture (10 µl) with gel loading dye was placed on 1% agarose gel for electrophoresis. Electrophoresis was performed at 40 V for 3 h in the presence of ethidium bromide (10 mg/ml). Untreated pBluescript M13+plasmid DNA was used as a control in each run of gel electrophoresis along with partial treatment, i.e., only UV treatment and only H₂O₂. Gels were stained with ethidium bromide and photographed with the Gel documentation system (Gel-Doc-XR, BioRad, Hercules, CA). The intensity of each DNA band was quantified by means of densitometry.

Blood total antioxidant capacity

The effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts on the total antioxidant capacity of mice were accessed according to the method described by Girard *et al.* [14] with slight modifications by replacing the radical AAPH [2,2'-azo-bis azo-bis (2-amidinopropane) HCl] by the tert-butyl hydroperoxide (t-BHP). The Principle of the test is to submit whole blood to a thermo-controlled free radical aggression. All families of antioxidant present in the

blood are mobilised to fight off the oxidant attack and to protect the integrity of erythrocytes resulting in the delay of hemolysis.

Two groups of mice were given orally 200 mg/kg of *Rubus fruticosus* or *Zizyphus vulgaris* extracts. The control group received the same volume of normal saline solution. After twenty-one days of daily treatment, blood (0.5-1 ml) was collected by cardiac puncture after diethyl ether anaesthesia. A subsample of whole blood 100 µl was immediately diluted in 2.4 ml of PBS (NaCl 125 mmol, sodium phosphate 10 mmol, pH 7.4) and 80 µl of diluted blood was deposited in an a96-well microplate with 136 µl of t-BHP (166 µM in solution) and then incubated at 37 °C. The hemolysis kinetic was followed using a 96-well microplate reader (ELX 800 de Bio-TEK instruments) by measuring optical density decrease at 630 nm. The blood resistance to free radical attack is expressed by the time needed to hemolyse 50% of the red blood cells (half-hemolysis time, HT₅₀ in min).

Croton oil-induced ear edema in mice

To evaluate the topical effect of the studied extracts on acute inflammation, croton oil-induced ear edema was performed according to Manga et al. [15]. Cutaneous inflammation was induced to the inner surface of the right ear of mice by application of 15 µl of acetone containing 80 µg of croton oil as an irritant. Treated animals received topically 2 mg/ear of extract. Indomethacin as reference drug was applied topically (0.5 mg/ear). The thickness of ears was measured before and 6 h after induction of inflammation using a dial calliper. The edema was expressed as an increase in the ear thickness due to croton oil application.

Acetic acid-induced vascular permeability in mice

The effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus Vulgaris* extracts on vascular permeability was evaluated according to the method of Kou

et al. [16] with slight modifications. Mice were divided into four groups. They obtained orally 0.2 ml of either 400 mg/kg of *Rubus fruticosus* or *Zizyphus Vulgaris* or 50 mg/kg indomethacin; the control group received the same volume (0.2 ml) of normal saline solution. One hour later, 10 ml/kg of 1% solution of Evans Blue dissolved in normal saline solution was intravenously administered. Then 10 ml/kg of 0.7% acetic acid was intraperitoneally injected. Thirty minutes later, mice peritoneal exudates were collected after being washed with 3 ml of normal saline solution and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The absorbance of the supernatant was read at 610 nm. The dye content of the exudates, which refers to the rate of vascular permeability, was calculated according to the standard curve of Evans Blue.

Statistical analysis

Data obtained *in vitro* and *in vivo* are expressed as mean±SD and mean±SEM, respectively. The hemolysis sigmoides were fitted by computer analysis Software Graph Pad. Prism (V5.00). Differences between the control and the treatments in these experiments were tested for significance using analysis of variance followed by Dunnet's/tukey's test. A probability of (P<0.05) was considered significant

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic and flavonoid content

Several studies have focused on the biological activities of phenolic compounds and flavonoids, which are potential antioxidants and anti-inflammatory agent [17]. The obtained Results (table 1) showed that *Rubus fruticosus* extract contained higher amounts of total phenolic compounds and flavonoids than *Zizyphus vulgaris* extract. A very low quantity of flavonoids was observed in *Zizyphus vulgaris* extract.

Table 1: Polyphenols and flavonoids content of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* methanol extracts

	Phenolic compounds (µg GAE/mg extract) ^a	Flavonoids (µg QE/mg extract) ^a
<i>Rubus fruticosus</i>	227.15±46.35	24.27±0.46
<i>zizyphus vulgaris</i>	134.62±8.06	0.33±0.023

GAE: Galic Acid Equivalent; QE: Quercetine Equivalent. (^amean±SD, n = 3).

Identification of phenolic compound by HPLC-TOF/MS

According to the retention time of calibration standards (table 2), *Rubus fruticosus* extracts presented a chemical profile (fig. 1A) composed of several phenolic compounds; nine compounds were identified as phenolic acids and eight compounds as flavonoids belonging to different classes. Scutellarin as flavone was the most flavonoid and phenolic compound followed by chlorogenic acid; quercetin-3-β-D-

glucoside represented the major flavonol followed by fisetin. Hydroxybenzoic acid and kampferol can be considered as minor compounds in *Rubus fruticosus* extract. *Zizyphus Vulgaris* extract (fig. 1B) revealed the presence of only seven phenolic compounds, including four phenolic acid and three flavonoids (rutin, naringin, and catechin). In fact, Protocatechuic acid represents the major phenolic acid. catechin as flavanol represents the major flavonoid in *Zizyphus Vulgaris* extract.

Table 2: Phenolic compounds determined by HPLC-TOF/MS in *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts

Phenolic compound	Retention time (min)	<i>Rubus fruticosus</i> (µg/mg extract)	<i>Zizyphus vulgaris</i> (µg/mg extract)
Gentisic acid	4.55	74.46	93.39
Catechin	6.15	145.34	932.07
Chlorogenic acid	6.22	5918.51	—
Protocatechuic acid	6.93	131.48	219.49
4-hydroxybenzoic acid	7.69	4.13	44.19
Caffeic acid	7.70	420.93	—
Vanillic acid	8.04	61.06	106.73
Syringic acid	9.35	145.72	—
Rutin	9.49	35.34	18.23
Ellagic acid	9.97	1367.81	—
Quercetin-3-β-D-glucoside	10.07	2247.62	—
Naringin	10.63	53.44	39.41
Fisetin	11.02	179.34	—
Scutellarin	11.02	13 093.34	—
Neohesperidin	11.42	33.81	—
Cinnamic acid	16.31	71.81	—
kaempferol	16.84	13.95	—

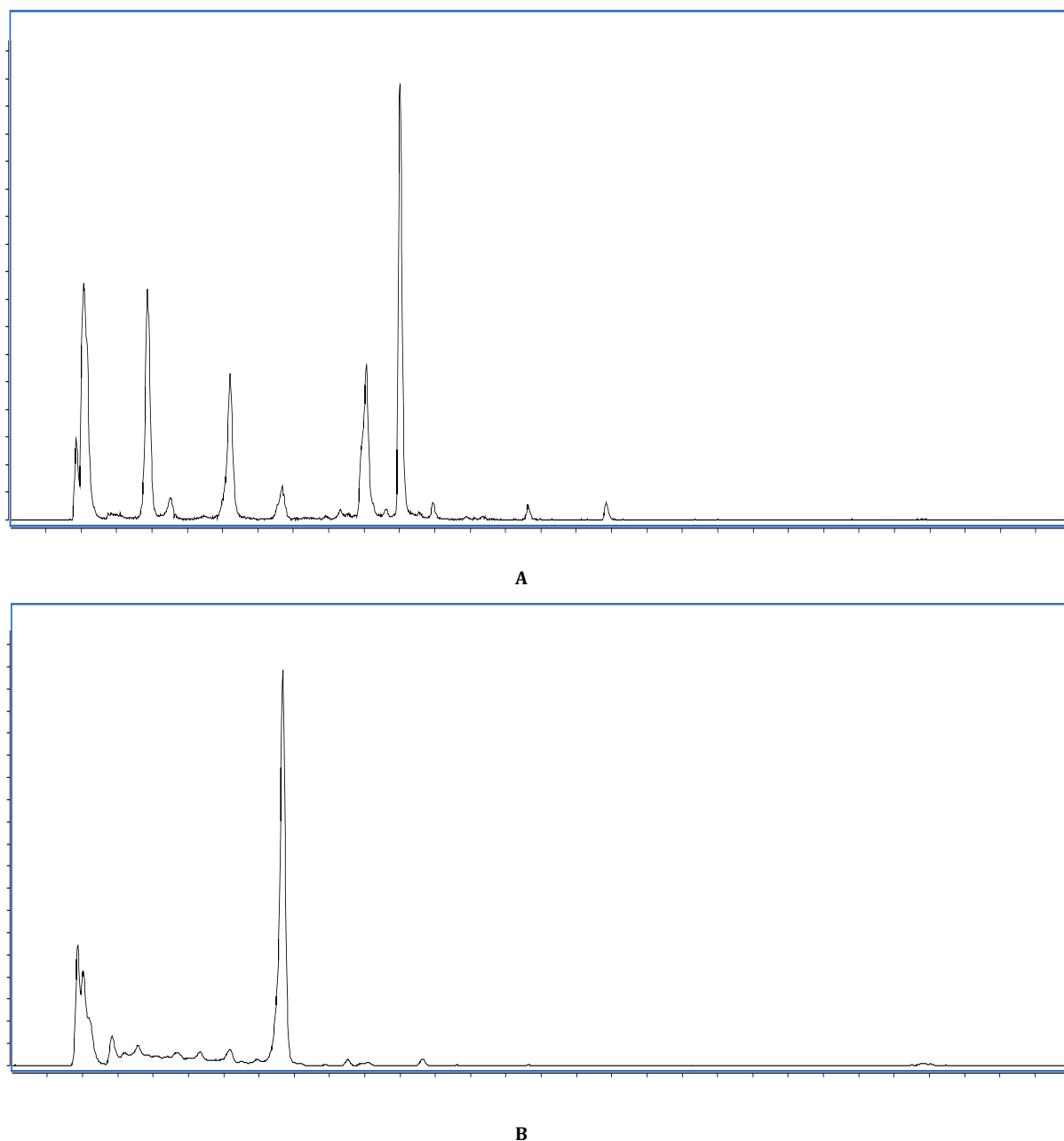


Fig. 1: HPLC chromatograms for *Rubus fruticosus* (A) and *Zizyphus vulgaris* (B) extracts

DPPH radical scavenging activity

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) is a stable radical with a maximum absorbance at 517 nm that can readily undergo reduction by an antioxidant. Because of the ease and convenience of this reaction, it has now widespread use in the free radical-scavenging activity assessment [18]. Both extracts exhibited antiradical activity (fig. 2). *Rubus fruticosus* extract shows a high radical scavenging activity with IC_{50} value (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$). However, *Zizyphus vulgaris* extract possesses the half radical scavenging activity exhibited by *Rubus fruticosus* extract with a value of IC_{50} (29.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

This difference of radical scavenging activity is attributed to the difference in phenolic and flavonoid content. Indeed, phenolic compounds, especially flavonoids are recognised as potentially antioxidant substances with the ability to scavenge free radical species, and reactive forms of oxygen, the scavenging effect of flavonoids(FLO) is attributed to their low potential redox making

them thermodynamically able of reducing free radicals by a transfer of hydrogen from hydroxyl groups.

This reaction gives rise to aroxyl radical (FLO•) and the stabilised radical; the (FLO•) subsequently undergo a structural rearrangement allowing redistributing the unpaired electron on the aromatic ring and the stabilisation of aroxyl radicals [19].

ABTS radical

Due to its operational simplicity, the ABTS assay has been used in many research laboratories, to measure the total antioxidant capacity in pure substances, in body fluids, and in plant material [20, 21]

The results of antioxidant activity were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values, as shown in table 3.

Similarly to the DPPH assay, ABTS assay revealed that *Rubus fruticosus* extract exerted the highest antioxidant capacity.

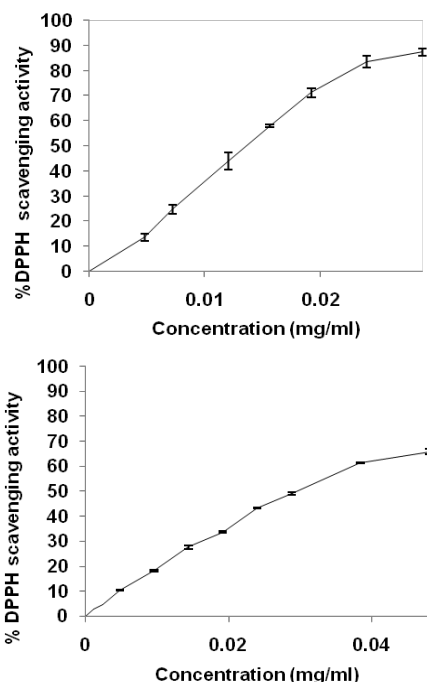


Fig. 2: DPPH radical scavenging activity of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts, The values are means \pm SD (n=3)

Table 3: Trolox equivalent antioxidant capacity of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts

	mM Trolox E/mg extract ^a
<i>Rubus fruticosus</i>	1.58 \pm 0.22
<i>Zizyphus vulgaris</i>	0.79 \pm 0.14

Trolox E: Trolox Equivalent. (^amean \pm SD, n = 3).

Ferric reducing/antioxidant power

Antioxidants can be explained as reductants, and inactivation of oxidants by reductants and can be described as redox reactions in which one reaction species (oxidant) is reduced at the expense of the oxidation of another antioxidant. The FRAP assay measures the antioxidant effect of any substance in the reaction medium as reducing ability [22].

The ferric reducing capacities of the studied extract are represented in table 4. *Rubus fruticosus* extract showed the highest antioxidant capacity as it has been recorded in Folin ciocalteu, DPPH and ABTS essays followed by *Zizyphus vulgaris*. These results are in agreement with previous studies [23] who found a strong relationship between phenolic contents and antioxidant activity.

Table 4: Ferric reducing the antioxidant power of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts.

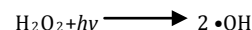
	mM FesO ₄ /mg extract ^a
<i>Rubus fruticosus</i>	3.39 \pm 0.079
<i>Zizyphus vulgaris</i>	1.04 \pm 0.089

^amean \pm SD, n = 3.

Effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts on DNA damage

The protective effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* on H₂O₂+UV-induced DNA damage was studied on pBluescript M13 (+) plasmid DNA. Photolysis of H₂O₂ can occur when it absorbs a

significant amount of light, which can be any wavelength less than 380 nm. This process can be described in general by the following reaction:



Due to the formation of highly reactive and strong oxidizing hydroxyl radical, the native supercoiled configuration of plasmid DNA changes to open circular and nicked linear forms, which cause a change in their electrophoretic mobility properties on the gel [24].

Fig. 3 A shows the electrophoretic pattern of DNA in the presence or absence of (100, 250, 350 and 500 μ g/ml) of *Rubus fruticosus* or *Zizyphus vulgaris* extract. The plasmid DNA showed two bands on agarose gel electrophoresis (lane 1) the faster moving prominent band corresponded to the native supercoiled circular DNA (sc DNA) and the slower moving very faint band was the open circular form (oc DNA). The UV irradiation of DNA in the presence of H₂O₂ (lane 2) resulting the cleavage of sc DNA to give prominent oc DNA and a faint linear (Lin) DNA indicating that OH \cdot generated from UV-photolysis of H₂O₂ produced DNA strand scission. It was noted that only UV treatment and only H₂O₂ treatment (lanes 3 and 4, respectively) could not induce damage as noted in combined treatment (lane 2).

The addition of *Rubus fruticosus* or *Zizyphus vulgaris* extracts (lanes 6-9) to the reaction mixture suppressed the formation of lin DNA and induced a significant protection to the damage of native supercoiled circular DNA in a dose-dependent manner. In fact, the intensity of sc DNA bands (fig. 3B) scanned from the agarose gel electrophoretic patterns was 81.64, 87.18, 91.07 and 93.31 % for plasmid DNA treated with H₂O₂ in the presence of (100, 250, 350 and 500 μ g/ml) *Rubus fruticosus* extract, and 59.87, 66.32, 72.45 and 69.17% in the presence of *Zizyphus vulgaris* extract, respectively as compared with the untreated plasmid DNA.

Hydroxyl radicals can be produced inside cells through various reactions as UV-induced decomposition of H₂O₂ used in the present study and can damage macromolecules such as lipids, proteins, and DNA, resulting in the onset of several diseases [25]. Hydroxyl radical is known to react with all components of the DNA molecule; the purine and pyrimidine bases as well as the deoxyribose backbone. It is well known that in various cancer tissues, hydroxyl radical-mediated DNA damage was observed [26].

DNA damage protecting the activity of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extract is corresponding to their antioxidant potential. These extracts might, therefore, be used to prevent cancer. Thus, the identification of natural products able to provide protection against UV radiation-induced inflammatory responses and the generation of oxidative stress may have important human health implications.

Blood total antioxidant capacity

The effect of the treatment with *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts on the total antioxidant status of mice was evaluated using an assay based on the whole blood resistance to free radical aggression, taking into account all the body reserves since blood contains every kind of enzymatic and molecular antioxidant [27]. These antioxidants are mobilised during a radical attack induced *ex vivo* by t-BHP, to protect erythrocytes integrity and then delay their hemolysis.

From the obtained sigmoid hemolysis curves (fig. 4), it appears that treatment with *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts caused a delay of hemolysis which is evident in a shift of the curves to the right. The calculated HT₅₀ values (fig. 5) reveal an extension of half hemolysis time in the two treated groups compared with controls. For the group treated with *Zizyphus vulgaris* extracts, the increase in half-hemolysis time (HT₅₀= 146.72 min) is statistically no significant compared with the control group (HT₅₀= 122.5 min). However, in the group treated with *Rubus fruticosus* the delay of hemolysis is more important and statistically significant (HT₅₀=151.45 min).

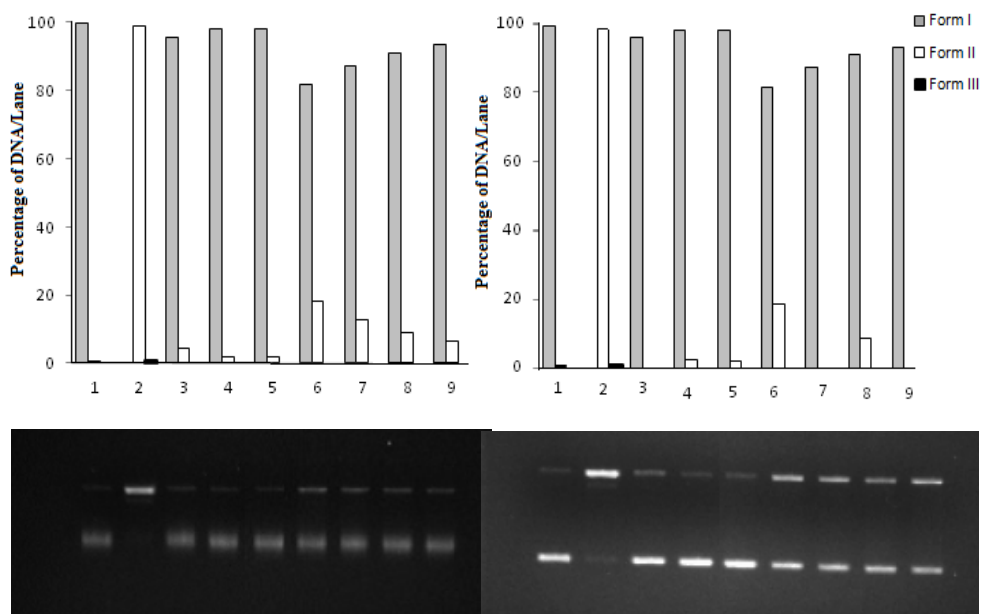


Fig. 3: (A) The quantified band intensity for the sc-DNA (form I), oc-DNA (form II) and lin-DNA (form III). (B) Electrophoretic pattern of pBluescript M13+DNA after UV-photolysis of H₂O₂ in the presence or absence of *Rubus fruticosus* (RFE) and *Zizyphus vulgaris* (ZVE) extract. Lane 1: control DNA; Lane 2: DNA+H₂O₂ (2.5 mmol)+UV; Lane 3: DNA+UV; Lane 4: DNA+H₂O₂ (2.5 mmol); Lane 5: DNA+extract+UV; Lane 6: DNA+extract (100 µg/ml)+H₂O₂ (2.5 mmol)+UV; Lane 7: DNA+extract (250 µg/ml)+H₂O₂ (2.5 mmol)+UV; Lane 8: DNA+extract (350 µg/ml)+H₂O₂ (2.5 mmol)+UV; Lane 9: DNA+extract (500 µg/ml)+H₂O₂ (2.5 mmol)+UV

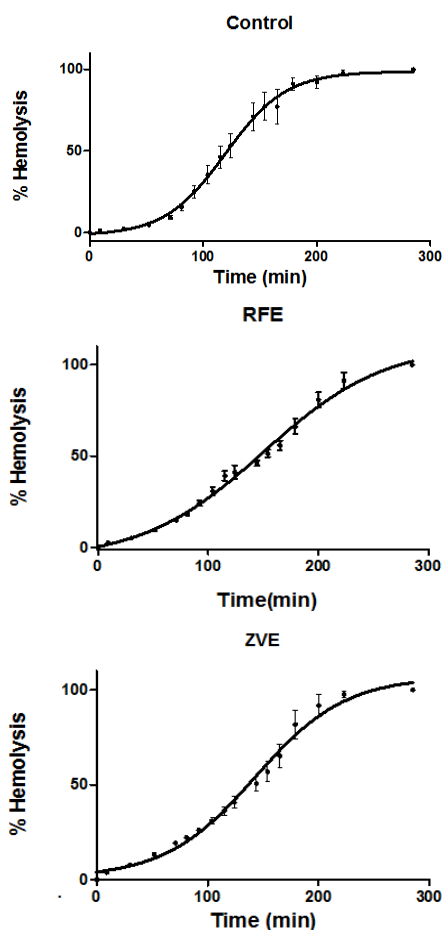


Fig. 4: Kinetics of the red blood cells hemolysis. Mice were given orally 200 mg/kg of *Rubus fruticosus* extract (RFE) and *Zizyphus vulgaris* extract (ZVE) extracts: The control group (control) received the same volume of vehicle. The values are means±SEM (n= 6)

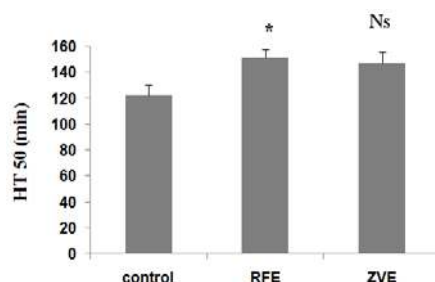


Fig. 5: Half-Hemolysis Time (HT50) for different groups. Values are expressed as means±SEM, *P<0.05. Ns: not significant versus the control

Indeed, the blood cell-like erythrocyte contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids, molecular oxygen, and ferrous ions and is believed to be highly vulnerable to oxygen radical formation. Erythrocytes are highly susceptible to oxidation; therefore erythrocytes are a suitable cellular model for investigation of the oxidative damage in biomembranes. Oxidant damage of cell films, which may be induced by TBH, can cause erythrocyte hemolysis [28].

The effectiveness of *Rubus fruticosus* extract in the increasing of HT50 could be attributed to its high phenolic and flavonoid contents. Dai et al. [29] have previously reported that flavonoids and their glycosides are effective antioxidants protecting human red blood cells from free radical-induced oxidative hemolysis. The protective effect of flavonoids can be linked to their binding to the plasma membrane and their ability to penetrate lipid bilayers [30]. In addition, these results showed that the anti-hemolysis effect could be linked not only to the polyphenols and flavonoid contents of the extract but also to the chemical structure of these compounds. It was demonstrated that binding of flavonoids to the red blood cell membranes significantly inhibits lipid peroxidation, and at the same time enhances their integrity against lysis [31].

Croton oil-induced ear edema in mice

Croton oil-induced inflammation is a model for evaluation of drugs and extracts against acute inflammation. Severe vasodilation, edematous changes of skin and inflammatory cell infiltration which are typical signs of acute inflammation are observed after topical

application of croton oil [32]. Therefore croton oil offers a model for the exudative type of inflammation [3].

The obtained results (fig. 6) showed that the topical application of 2 mg/ear of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts inhibited significantly ($P < 0.001$) the croton oil-induced ear edema.

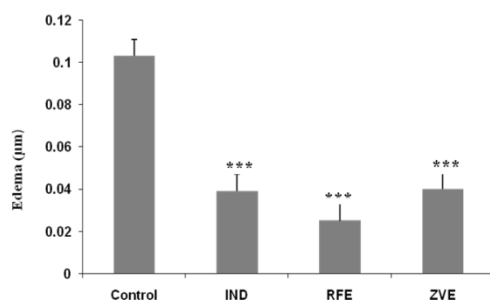


Fig. 6: Effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts on croton oil-induced ear edema. Mice were treated by topical application of 0.5 mg/kg of indomethacin (IND), 2 mg/kg of *Rubus fruticosus* extract (RFE), and *Zizyphus vulgaris* extract (ZVE). The control group received 0.2 ml of normal saline solution (Control). Values are expressed as means \pm SEM (n=6), *** $P < 0.001$

The inhibition was 75.72 % for *Rubus fruticosus* extract and 64.24% for *Zizyphus vulgaris* extract. These inhibitions were better than that obtained with indomethacin (62.24%), used as the standard anti-inflammatory agent. The topical anti-inflammatory effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extract may suggest that they have a lipophilic character, which enabled them to cross the skin barrier and exert antiphlogistic action [33].

In fact, Croton oil contains 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and other phorbol esters as main irritant agents. TPA is able to activate protein kinase C (PKC), which activates other enzymatic cascades in turn, such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and phospholipase A2 (PLA2), leading to the release of platelet activation factor (PAF) and arachidonic acid. This cascade of events stimulates vascular permeability, vasodilation, polymorphonuclear leukocytes migration, the release of histamine and serotonin and moderate synthesis of inflammatory eicosanoids by cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) enzymes [34]. The anti-inflammatory activity of the studied extract is probably attributed to COX and 5-LOX inhibitors, leukotriene B4 (LTB4) antagonists.

According to Saraiva et al. [35], plant extracts could produce their antioedematogenic effect by inhibiting the synthesis of eicosanoids and cytokines, in which PGE₂ and TNF- α would be the main oedematogenic mediators.

The high anti-inflammatory activity of *Rubus fruticosus* extract is probably attributed to its high phenolic and flavonoid content. Scutellarin is the major component. Identified in *Rubus fruticosus* extracts. Studies have shown that Scutellarin exerts anti-inflammatory action in several animal models. In addition, it can inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced production of pro-inflammatory mediators such as NO, TNF- α , IL-1 β and ROS in rat primary microglia or BV-2 mouse microglial cell line [36]. It decreases the number of activated microglia and reduces the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65 and inflammatory mediators [37].

Moreover, other flavonoids, such as quercetin and kaempferol, have demonstrated significant anti-inflammatory activity, which is attributed to the inhibition of PLA₂, COX and LOX enzymes and the inhibition of nitric oxide (NO) by modulating the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme [38].

Acetic acid-induced vascular permeability in mice

Chemical induced vascular permeability (acetic acid) causes an immediate stained reaction that is prolonged over 24 h [39]. As can

be seen in (fig. 7), the amount of dye passed across the vessel in the control group was 55.94 μ g/ml. The treatment with *Rubus fruticosus* extract (400 mg/kg) significantly reduced the dye leakage to 37.16 μ g/ml (inhibition 33.57%). However, a small reduction 41.67 μ g/ml of the dye leakage was observed in the treatment with 400 mg/ml of *Zizyphus vulgaris* extract. This inhibition (25.51%) was not significant. Indomethacin (50 mg/kg), as a standard drug strongly reduced the dye leakage to 31, 40 μ g/ml (inhibition 43, 86%).

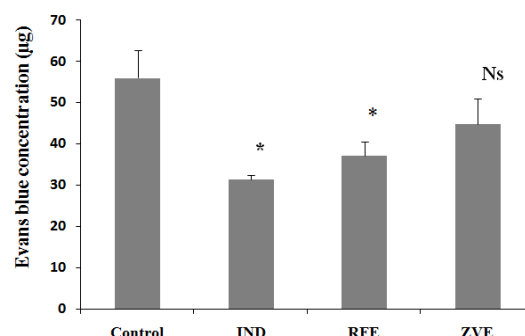


Fig. 7: Effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts on acetic acid-induced vascular permeability. Mice were given orally 400 mg/kg of *Rubus fruticosus* extract (RFE), *Zizyphus vulgaris* extract (ZVE) and 50 mg/kg of indomethacin (IND). Control group (Control) received 0.2 ml of normal saline solution. Values are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$. Ns: not significant versus the control

The inflammatory response is a physiological characteristic of vascularized tissues. The main features of acute inflammation are vasodilatation, the exudation of plasma, increase of vascular permeability and leukocyte migration into the site of inflammation [40]. Increased vascular permeability occurs as a result of contraction and separation of endothelial cells at their boundaries to expose the basement membrane, which is freely permeable to plasma proteins and fluid [41].

Phlogistic agents increase vascular permeability at various times after injury in inflammation condition. Acetic acid can cause the increase of chemical mediators such as prostaglandin E2 (PGE₂), histamine and serotonin in peritoneal fluids, leading to the increase in vascular permeability [42].

The positive effect of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts suggest that they exert an anti-acute inflammatory action by inhibiting the inflammatory mediators.

CONCLUSION

The results of this study showed that *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* possess significant anti-inflammatory and antioxidant activities *in vivo* and *in-vitro*, establishing the ethnopharmacological basis for the use of these plants in traditional medicine. However, more studies are required for the isolation and characterization of the active principles responsible for these activities.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MERS).

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

- Hyun TK, Kim HC, Ko YJ, Kim JS. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum var. japonicum*). Saudi J Biol Sci 2016;23:181-8.
- Siroka Z, Svobodova Z. The toxicity and adverse effects of selected drugs in animals. Pol J Vet Sci 2013;16:181-91.

3. Nwaehujor CO, Ezeja MI, Udeh NE, Okoye DN, Udegbumam RI. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Mallotus oppositifolius* (Geisel) methanol leaf extract. *Arabian J Chem* 2014;7:805-10.
4. Tukun ABN, Shaheen CP, Mohiduzzaman M, Islam S, Begum M. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med* 2014;7 Suppl 1:568-73.
5. Boullard B. *Plante médicinale du monde: croyances et réalités*. De Boeck Secundair. France; 2001.
6. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4^{ème} ed.) Lavoisier France; 2009.
7. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 2007;102:771-6.
8. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Drug Res* 1996;46:1086-9.
9. Abay G, Altun M, Kolda S, Tüfekçi AR, Demirtas I. Determination of antiproliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb Chem High Throughput Screening* 2015;18:1-11.
10. Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Rapisarda P, Dederen JC. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of red orange extract. *Int J Cosmet Sci* 1998;20:331-42.
11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1231-7.
12. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-6.
13. Attaguile G, Russo A, Campisi F, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, et al. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:83-90.
14. Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J. Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 2006;22:758-66.
15. Manga HM, Brkic D, Marie DEP, Quetin-Leclercq J. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. and Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2004;92:209-14.
16. Kou J, Si M, Dai G, Lin Y, Zhu D. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. *Fitoterapia* 2006;77:411-5.
17. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. Polyphenols in human health and disease. Academic Press in print of Elsevier; 2013.
18. Saani M, Lawrence R. Evaluation of pigments as antioxidant and antibacterial agents from *Beta vulgaris* linn. *Int J Curr Pharm Res* 2016;8:77-81.
19. Javanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MJ. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc* 1994;116:4846-51.
20. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841-56.
21. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol* 2010;57:139-42.
22. Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* 2006;94:550-7.
23. Fidrianny I, Harnovi M, Insanu M. Correlation evaluation of antioxidant activities from various extracts of sweet orange peels using DPPH, FRAP assays and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. *Asian J Pharm Clin Res* 2014;7:186-90.
24. Yasmeen S, Gupta P. *In vitro* demonstration of *Dalbergia sissoo* (Indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for sunscreens and DNA nick prevention. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8:175-81.
25. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *RE. Pharmacogn Rev* 2010;4:118-26.
26. Villamena FA. Molecular basis of oxidative stress: chemistry, mechanisms, and disease pathogenesis. John Wiley and Sons; 2013.
27. Losdat S, Helfenstein F, Gaude B, Richner H. Reproductive effort transiently reduces antioxidant capacity in a wild bird. *Behav Ecol* 2011;12:1218-26.
28. Sen S, De B, Devanna N, Chakraborty R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chin J Nat Med* 2013;11:149-57.
29. Dai F, Miao Q, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci* 2006;78:2488-93.
30. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Gonzalez-Paramas AM, Damiani E, Astolfi P, Martinez-Sanchez G, et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem Toxicol* 2012;50:1508-16.
31. Henneberg R, Otuki FM, Furman AEF, Hermann P, Nascimento AG, Leonart MSS. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35:52-5.
32. Ighodaro I, Ching F, Aigbe E. Anti-inflammatory activity of aqueous fruit pulp extract of *Hunteria umbellata* K. Schum in acute and chronic inflammation. *Acta Poloniae Pharm Drug Res* 2010;67:81-5.
33. Asuzu IU, Sosa S, Della LR. The anti-inflammatory activity of *Icacina trichantha* tuber. *Phytomedicine* 1999;6:267-72.
34. Leite GO, Leite LHI, Sampaio RS, Araruna MKA, Rodrigues FFG, Menezes IRA, et al. Modulation of topical inflammation and visceral nociception by *Vanillosmopsis arborea* essential oil in mice. *Biomed Preventive Nutr* 2011;1:216-22.
35. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 2011;136:504-10.
36. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2000;38:411-6.
37. Lucarini R, Tozatti MG, Silva MLA, Gimenez VMM, Pauletti PM, Groppo M, et al. Antibacterial and anti-inflammatory activities of an extract, fractions, and compounds isolated from *Gochnatia pulchra* aerial parts. *Braz J Med Biol Res* 2015;48:822-30.
38. Peters CA, Sgrott RAG, Peters RR, Moterle D, Madeir F, Emer AA, et al. Production of *Wilbrandia ebracteata* extract standardised in flavonoids and dihydrocurcubitacin and assessment of its topical anti-inflammatory activity. *Indian Crops Prod* 2015;69:123-8.
39. Handoussa H, Hanafi R, Eddiasty I, El-Gendy MC, Khatib A, Linscheid M, et al. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of dietary phenolics isolated from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera* f. *J Funct Foods* 2013;5:1204-16.
40. Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegunam IN, Erojikwe O. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *J Ethnopharmacol* 2007;109:219-25.
41. Kumar T, Jain V. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bridelia retusa* methanol fruit extract in experimental animals. *Sci World J* 2014;12. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/890151>.
42. Zhang CX, Dai ZR, Cai QX. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *J Ethnopharmacol* 2011;137:1177-82.

How to cite this article

- Asma Meziti, Hamama Bouriche, Meziti Hichem, Seoussen Kada, Abderrahmane Senator, Ibrahim Dimertas. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* methanol extracts. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(2):69-76.

ملخص

تستخدم نباتتا *Rubus fruticosus* و *Zizyphus vulgaris* بكثرة في الطب الشعبي لخصائصهما العلاجية في هذه الدراسة تم تقدير النشاط المضاد للالتهاب للمستخلص الميثانولي لأوراق *Rubus fruticosus* (ERF) وجذور *Zizyphus vulgaris* (EZV)، أظهر التحليل بواسطة HPLC /TOF/MS بأن ERF أكثر غنى بالبوليفينول و الفلافونويدات مقارنة بـ EZV. أدت معالجة الفئران عن طريق الفم بـ 400 مغ/كغ من مستخلصي ERF و EZV الى تثبيط معتبر لوذمة الأذن المحفزة بالغزيلان بنسبة 70.77% و 51.81% على التوالي، ولوحظ ان تأثير هذين المستخلصين مماثل لتأثير الاندوميثاسين الذي استعمل كمضاد التهاب نموذجي. كما أدت المعالجة الموضوعية لوذمة الأذن المحفزة بزيت كروتون بـ 2مغ من ERF و EZV الى تثبيط معتبر قدر بـ 75.72% و 64.24% على الترتيب. إضافة الى ذلك أدت معالجة الفئران عن طريق الفم بـ 400 مغ/كغ من ERF الى تثبيط معتبر (33.57%) لنفاذية الأوعية المحفزة بحمض الخل، بينما أبدى المستخلص EZV تأثير غير معتبر. كما تم أيضا دراسة تأثير المستخلصين على الاشتعال التنفسي وإنزيمات الكريات المتعادلة، أظهرت النتائج المتحصل عليها، بأن ERF و EZV (0.5-100 ميكروغرام/مل) يثبطان بصورة معتمدة على التركيز: Myeloperoxidase, Elastase وكذلك الاشتعال التنفسي.

من جهة أخرى، تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص ERF و EZV باستعمال عدة تقنيات في الكائن الحي وفي الزجاج. أظهرت النتائج المتحصل عليها بأن ERF يمتلك قدرة إزاحية عالية لجذر DPPH تقدر بـ $IC_{50} = 14$ ميكروغرام/مل، 1.58 مل مول مكافئ Trolox /مغ مستخلص و 3.39 مل مول مكافئ $FeSO_4$ /مل مستخلص في تقنيتي ABTS و FRAP على التوالي. كما أبدى هذين المستخلصين (100, 250, 300, 500 ميكروغرام / مغ) تأثير وقائي لـ ADN تجاه الهدم التأكسدي المحفز بـ H_2O_2/UV . كما أدت معالجة الفئران اليومية عن طريق الفم بـ 200مغ/كغ من ERF و EZV خلال ثلاث أسابيع إلى تحسين قدرة الدم المضادة للأكسدة، حيث قدر وقت نصف التحلل لكريات الدم الحمراء HT_{50} بـ: 151.45 دقيقة و 146.72 دقيقة عند الفئران المعالجة بـ ERF و EZV على الترتيب مقابل 122.5 دقيقة عند الفئران الغير معالجة. الختام وفي يمكن اعتبار *Rubus fruticosus* و *Zizyphus vulgaris* مصدرا واعداد المضادات الالتهاب

الكلمات المفتاحية: مضاد الأكسدة، مضاد الالتهاب، الخلايا المتعادلة، الوذمة، البوليفينول، *Rubus fruticosus*، *Zizyphus vulgaris*

Résumé

Rubus fruticosus et *Zizyphus vulgaris* sont deux plantes largement utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés thérapeutiques. Le but de la présente étude est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanolique des feuilles de *Rubus fruticosus* (ERF) et des racines de *Zizyphus vulgaris* (EZV). L'analyse phytochimique de ces extraits par HPLC/TOF/MS a révélé la richesse de ERF en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport à EZV. L'administration par voie orale de 400 mg/kg de ERF ou de EZV montre une inhibition significative de 70,77 % et 51,81% respectivement de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. L'effet de ERF est comparable à celui de l'indométacine, utilisé comme anti-inflammatoire standard. De même, le traitement local des souris par 2 mg de ERF ou de EZV montre un effet significatif sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, avec des inhibitions de 75.72% et 64.24% respectivement. En outre, l'administration orale de 400 mg/kg de ERF exerce une inhibition significative de 33.57 % sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. Par contre, l'inhibition exercée par EZV et non significative. L'effet des extraits étudiés sur la flambée respiratoires et les enzymes des neutrophiles humains a été également investigué. Les résultats obtenus montrent que l'ERF et l'EZV (0,5-100 µg/ml) inhibent d'une façon dose dépendante l'élastase, la myeloperoxydase et la flambée respiratoire.

D'autre part, l'effet antioxydant des extraits ERF et EZV a été évalué en utilisant plusieurs tests *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus révèlent que ERF possède une meilleure capacité antioxydante avec IC_{50} de 14 µg/ml dans l'essai de DPPH, 1,58 mmol E trolox/mg extrait et 3,39 mmol $FeSO_4$ /mg extrait dans les essais ABTS et FRAP respectivement. En outre, les deux extraits étudiés (100, 250, 350 et 500 µg/ml) montrent un effet protecteur dose dépendant de l'ADN contre la dégradation oxydative induite par H_2O_2/UV . L'administration quotidienne par voie orale de 200 mg/kg de ERF ou de EZV durant trois semaines chez la souris entraîne une amélioration de la capacité antioxydante totale du sang avec le temps de demi-hémolyse (HT_{50}) de 151,45 min et 146,72 min pour les groupes traités par RFE et ZVE respectivement *versus* 122,5 min pour le groupe contrôle. En conclusion, cette étude a permis de dévoiler des propriétés anti-inflammatoires très prometteuses des extraits de *Rubus fruticosus* (ERF) et *Zizyphus vulgaris* (EZV).

Mots clés : Antioxydant, Anti-inflammatoire, Inflammation, Neutrophile, Oedème, Polyphenols, *Rubus fruticosus*, *Zizyphus vulgaris*.

Abstract

Rubus fruticosus and *Zizyphus vulgaris* are two plants widely used in the folkmedicine for their therapeutic properties. The aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Rubus fruticosus* leaves (RFE) and *Zizyphus vulgaris* roots (ZVE). The phytochemical analysis by HPLC/TOF/MS revealed that RFE possesses higher polyphenolic and flavonoid content than ZVE. The oral administration of 400 mg/kg of RFE and ZVE exerted 70.77 % and 51.81% of inhibition, respectively in the xylene induced ear edema test in mice. These effects were statistically similar to the effect of indomethacin which is a standard anti-inflammatory. The topical application of 2 mg/ear of RFE and ZVE inhibited the croton oil-induced ear edema by 75.72% and 64.24% respectively. Moreover, the oral administration of 400 mg/kg of RFE inhibited significantly (33.57%) acetic acid induced vascular permeability in mice. However, the inhibition effect exerted by ZVE was not significant. The effect of the studied extracts (0.5-100µg/ml) was also investigated on human neutrophil enzymes and respiratory burst and the obtained results showed that RFE and ZVE inhibited in dose dependent manner elastase, myeloperoxydase and respiratory burst.

On the other hand, the antioxidant effect of RFE and ZVE was evaluated using different assays *in vitro* and *in vivo*. The obtained results showed that RFE possesses the highest antioxidant capacity with IC_{50} value of 14 µg/ml in DPPH assay, 1.58 mmol of Trolox E/mg extract and 3.39 of mmol $FeSO_4$ /mg extract in ABTS, and FRAP assay respectively. The studied extracts showed a concentration-dependent (100, 250, 350 and 500 µg/ml) protective effect on DNA cleavage induced by H_2O_2/UV -photolysis. The daily oral administration of 200 mg/kg of RFE or ZVE during three weeks showed an improvement of the blood total antioxidant capacity; the half time hemolysis (HT_{50}) values were 151.45 min and 146.72 min for the groups treated with RFE and ZVE, respectively *versus* 122.5 min for the control group. In conclusion, this study revealed a very promising anti-inflammatory properties of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* extracts.

Keywords: Antioxidant, Anti-inflammatory, Neutrophil, Edema, Polyphenols, *Rubus fruticosus*, *Zizyphus vulgaris*