

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie

**Laboratoire des Produits Naturels
(LAPRONA)**

MÉMOIRE

Présenté par :

DJEFFAL Rania Farah

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences alimentaires
Option : Nutrition et diététique

Thème

**Activités anti-inflammatoires de
Rubus ulmifolius Schott.**

Soutenu le : 29/06/2022.Devant le jury composé de :

Mme SOUALEM-MAMI Zoubida	MCA	Université Tlemcen	Présidente
Mme DIB-BENAMAR Hanane	MCA	Université Tlemcen	Examinatrice
SELADJI BEKKARA Meryem	MCA	Université d'Oran	Encadrante

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu aboutir à des résultats satisfaisants sans l'aide et les encouragements de plusieurs personnes que je remercie.

Je tiens à remercier «**Allah**», Le Grand, Le Tout Puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon encadreur **Mme SELADJI BEKKARA Meryem** pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps et l'attention qu'elle m'a consacrée.

Je remercie par ailleurs, les membres du jury **Mme DIB-BENAMAR Hananeet Mme SOUALEM-MAMI Zoubida** » de m'avoir fait l'honneur de juger ce modeste travail et d'assister à la soutenance.

Je remercie également tous les enseignants de la faculté SNV-Stde l'Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen pour le savoir qu'ils nous ont transmis durant tout notre cursus universitaire.

Finalement, je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Rania

Dédicaces

À mes très chers parents «Yahia et Yamina», sans eux je n'aurai pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leur amour et leurs encouragements durant toutes mes études.

A ma chère grand-mère, que Dieu la protège.

À mes chères sœurs Mounia et Radjaa «Melouka» et à mon cher frère Youssef qui ont toujours été là pour moi.

À mon amie, et sœur Rabia, sans ta présence je ne serai que la moitié de moi-même.

À mes amies wafaa et Sanaa, Sabrine et soumia et mes petites princesses Bouchra et aicha.

À mes amis (es) de l'université, avec lesquels j'ai partagé des moments inoubliables.

À tous les étudiants de la promotion nutrition et diététique 2017/2022.

Rania

Résumé :

Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'évaluation des propriétés antiinflammatoires des extraits de *Rubus ulmifolius* Schott. De la famille des rosacées. Une espèce végétale largement utilisée pour ses propriétés biologiques.

Le but de notre travail été d'évaluer l'effet antiinflammatoire des extraits de *R. ulmifolius* à travers l'analyse d'articles scientifiques.

Dans le premier article, Les rendements de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante étudiée (Fruit, racine et plante entière) sont compris entre 9,20 et 13,25 %. Le screening phytochimique de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux de la plante entière a révélé la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stéroïdes et des saponines. Dans les études de toxicité aiguë, les extraits n'ont montré aucune mortalité à la dose de 2000 mg/kg P.C. En ce qui concerne l'activité antiinflammatoire, l'extrait éthanolique de *R. ulmifolius* a montré qu'il avait un effet antiinflammatoire comparable à celui du médicament standard (Diclofénac).

Dans le deuxième article, deux plantes ont été sélectionnées à savoir : *Sambucus nigra* L. et *Rubus ulmifolius* Schott.. Les auteurs ont analysé les graines de ces deux espèces. Ils ont déterminé aussi teneur en huile, afin d'évaluer le profil en acides gras et la teneur en tocophérols. De plus, les extraits méthanoliques des graines ont été analysés pour leurs teneurs phénoliques totales et leurs capacités Antioxydantes. Les polyphénols ont été identifiés par analyse HPLC-ESI-MS/MS. De plus, des extraits ont été évalués pour leurs effets inhibiteurs sur la production de médiateurs inflammatoires induits par le LPS (NO, CCL-20) dans les cellules RAW 264.7. Les résultats montrent que les extraits méthanoliques des graines de *Rubus ulmifolius* ont de fortes propriétés Antioxydantes et anti-inflammatoires et pourraient donc représenter une source intéressante de composés bioactifs.

Mots clés : *Rubus ulmifolius* Schott., Activités antiinflammatoires, métabolites secondaires.

Abstract :

As part of the discovery of new active molecules from natural sources, we were interested in this work to evaluate the anti-inflammatory properties of extracts of *Rubus ulmifolius* Schott. From the Rosaceae family. A plant species widely used for its biological properties.

The aim of our work was to evaluate the anti-inflammatory effect of *R. ulmifolius* extracts through the analysis of scientific articles.

In the first article, the yields of the ethanolic extract and the aqueous extract of the different parts of the plant studied (Fruit, root and whole plant) are between 9.20 and 13.25%. The phytochemical screening of the ethanolic extract and the aqueous extract of the whole plant revealed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids and saponins. In acute toxicity studies, the extracts did not show any mortality at the dose of 2000 mg/kg B.C. Regarding the anti-inflammatory activity, the ethanolic extract of *R. ulmifolius* showed that it had an anti-inflammatory effect comparable to that of the standard (Diclofenac).

In the second article, two plants were selected, namely: *Sambucus nigra* L. and *Rubus ulmifolius* Schott. The authors analyzed the seeds of these two species. They also determined oil content, in order to assess the fatty acid profile and the tocopherol content. In addition, the methanolic extracts of the seeds were analyzed for their total phenolic contents and their Antioxidant capacities. The polyphenols were identified by HPLC-ESI-MS/MS analysis. In addition, extracts were evaluated for their inhibitory effects on the production of LPS-induced inflammatory mediators (NO, CCL-20) in RAW 264.7 cells. The results show that the methanolic extracts of the seeds of *Rubus ulmifolius* have strong antioxidant and anti-inflammatory properties and could therefore represent an interesting source of bioactive compounds.

Keywords: *Rubus ulmifolius* Schott., Anti-inflammatory activities, secondary metabolites.

ملخص

لاكتشاف جزيئات جديدة من مصادر طبيعية، كنا مهتمين بهذا العمل لتقييم الخصائص المضادة للالتهابات لمستخلصات *Rubus ulmifolius* Schott من عائلة الوردية. نوع من النباتات يستخدم على نطاق واسع لخصائصه البيولوجية.

كان الهدف من عملنا هو تقييم التأثير المضاد للالتهابات لمستخلصات *R. ulmifolius* من خلال تحليل المقالات .

في المقال الأول ، تراوحت غلة المستخلص الإيثانولي والمستخلص المائي لأجزاء مختلفة من النبات المدروسة (الفاكهة والجزر والنبات الكامل) بين 9.20 و 13.25٪. كشف الفحص الكيميائي النباتي للمستخلص الإيثانولي والمستخلص المائي للنبات بأكمله عن وجود قلويدات وفلافونويدوسسترويدات وصابونين. في دراسات السمية الحادة ، لم تظهر المستخلصات أي وفيات بجرعة 2000 مجم / كجم قبل الميلاد. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للالتهابات ، أظهر المستخلص الإيثانولي لـ (*R. ulmifolius*) أن له تأثيرًا مضادًا للالتهابات يضاهي تأثير المعيار (Diclofenac).

في المقال الثاني تم اختيار نباتين هما: *Sambucus nigra* L. و *Rubus ulmifolius* Schott حلل المؤلفون بذور هذين النوعين. قاموا أيضًا بتحديد محتوى الزيت ، من أجل تقييم ملف تعريف الأحماض الدهنية ومحتوى توكوفيرول. بالإضافة إلى ذلك ، تم تحليل المستخلصات الميثانولية للبذور لمعرفة محتواها الكلي من الفينول وقدراتها المضادة للأكسدة. تم تحديد البوليفينول بواسطة تحليل HPLC-ESI-MS / MS. بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم المقطعات لتأثيرها المثبط على إنتاج وسطاء التهابات المستحثة بـ LPS (NO)، (CCL-20) في خلايا RAW 264.7. أظهرت النتائج أن المستخلصات الميثانولية لبذور *Rubus ulmifolius* لها خصائص قوية مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات ، وبالتالي يمكن أن تمثل مصدرًا مثيّرًا للاهتمام للمركبات النشطة بيولوجيًا.

الكلمات المفتاحية *Rubus ulmifolius* Schott . الأنشطة المضادة للالتهابات ، الجزيئات الثانوية

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction générale.....	2

Partie1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante sélectionnée *Rubus ulmifolius* Schott

I. Historique.....	5
II. La phytothérapie	5
II.1. Définition	5
II.2. Les types de phytothérapie.....	5
III. Les plantes médicinales :.....	6
III.1. Définition.....	6
III.2. Fonctionnement des plantes médicinales.....	6
IV. <i>Rubus ulmifolius</i>	6
IV.1. Généralités.....	6
IV.3. Description botanique.....	7
IV.4. La systématique.....	9
IV.5. Nom vernaculaire	9
IV.6. Les organes utilisés	9
IV.7. Mode de traitement	10

IV.8. Composition de <i>Rubus Ulmifolius</i>	10
IV.9. Les propriétés thérapeutiques de <i>Rubus ulmifolius</i>	11

Chapitre II : L'inflammation

I.L'inflammation.....	12
1. Généralités	12
2. Types d'inflammation.....	13
II. Les anti-inflammatoires :	13
II.1. Définition :.....	13
II.2. Types des anti-inflammatoires	13
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :	13
Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	13

Chapitre III : Métabolites secondaires

I. Les anti-inflammatoire naturel.....	15
II. Les polyphénols	15
Les acides phénoliques.....	16
Les flavonoïdes	17
Les tanins.....	17
Les tanins hydrolysables.....	17
Les tannins condensés.....	18
III. Les polyphénols comme anti-inflammatoires naturels.....	18

Partie 2 : Analyse des articles

Article 1	22
-----------------	----

I. Résumé	22
II. Matériels et méthodes.....	22
1. Extraction de matières végétales	22
1.1 Extrait éthanolique	22
1.2 Macération à l'eau froide.....	22
2. Criblage phytochimique de <i>Rubus ulmifolius</i> Schott. : (plante entière).....	23
▪ Alcaloïdes	23
▪ Flavonoïdes	23
▪ Stéroïdes	23
▪ Saponines	23
3. Détermination de la toxicité aiguë Méthode (ALD₅₀).....	23
4. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique.....	23
5. Œdème de l'oreille induit par l'huile de Croton	24
III. Résultats :.....	24
A. Calcul du rendement en pourcentage des extraits	24
B. Criblage phytochimique.....	24
C. Étude de toxicité aiguë	25
V. Discussions	26
Article2	27
I. Résumé	27
II. Matérielles et méthodes.....	27

1. Baies	27
2. Produits chimiques et réactifs	28
3. Teneur en huile	28
4. Composition en acides gras	28
4.1. Direct trans-estérification	28
4.2. Analyse HRGC-FID	28
5. Tocophérols	28
6. Extraction des polyphénols des résidus de graines dégraissées	28
6.1. Détermination de la teneur phénolique totale.....	29
6.2. Détermination de l'activité de radical 2,2,0-diphényl-1-picrylhydrazyle-activité de récupération.....	29
6.3. Détermination des valeurs EC50	29
III. Résultats et Discussion	30
A. Teneur en huile des graines	30
B. Composition en acides gras des huiles.....	31
C. Teneur en tocophérol.....	32
D. Activité antioxydante des extraits de résidus de graines.....	32
E. Teneur phénolique totale (TPC) et teneur en acide ellagique des graines.....	34
F. Identification des composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de graine	
La méthode.....	35
G. Effet des extraits sur la production de NO et de CCL20.....	36
V. Discussion générale	39
Conclusion générale	42

Références bibliographiques.....43

Annexes.....50

Liste des abréviations

- AGMI** : acides gras mono-insaturés.
- COX-2** : cyclooxygenase-2.
- LOX-5** : 5-lipooxygénase.
- LPS** : lipopolysaccharide.
- MCP-1** : monocyte chemoattractant protein-1
- MeOH**: méthanol
- MIP** : macrophage inflammatory protéine.
- NO** :Oxyde d'azote.
- NO₂** : Dioxyde d'azote.
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- PUFA** : Polyinsaturés Les acides gras.
- Rpm**: Rotations par minute.
- SAFA** : acides gras saturés.
- PC** : poids corporel.
- DPPH** :2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- SD** : Déviation standard
- ET** : Ecart type
- HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

Liste des figures

Figure 01 :	Le Fruit de <i>Rubus ulmifolius</i>	07
Figure 02 :	Les Feuilles de <i>Rubus ulmifolius</i>	08
Figure03 :	La fleur de <i>Rubus ulmifolius</i>	08
Figure04 :	Le Turion de <i>Rubus ulmifolius</i>	08
Figure05	La Structure chimique du phénol simple	15
Figure 06:	. Classification des polyphénols	16
Figure07 :	Les Valeurs EC50 de l'activité du piégeage des radicaux DPPH des extraits méthanoliques de graines de <i>Sambucus et de Rubus</i> .	33
Figure08 :	La Réduction dépendante de la concentration de la libération de NO induite par le lipopolysaccharide (LPS) des macrophages RAW264.7 par des extraits méthanoliques.	36
Figure09 :	La Réduction dépendante de la concentration de la libération de protéine inflammatoire macrophage-3 α /CCL20 induite par le lipopolysaccharide (LPS) à partir des macrophages RAW264.7 par extraits méthanoliques préparés à partir de graines de mûre et de sureau.	37

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Systématique de la plante étudiée (<i>Rubus ulmifolius</i>)	09
Tableau 02 :	Activités biologiques des composés phénoliques	19
Tableau 03 :	Rendement en éthanol et extrait aqueux	24
Tableau 04 :	Criblage phytochimique	25
Tableau 05 :	Œdème de l'oreille induit par l'huile de Croton	26
Tableau 06:	Teneur en huile et en tocophérols et composition en acides gras des farines de graines (g/100 _{ghuile}).	31
Tableau 07 :	Teneur en phénols totaux, teneur en acide ellagique et pouvoir anti-radicalaire des extraits de Rubus et Sambucus	33
Tableau 08 :	Détection HPLC–ESI–MS/MS de composés phénoliques dans des extraits de graines de Rubus et Sambucus sauvages	34

Introduction générale

Les plantes médicinales sont une source importante de nouveaux agents thérapeutiques dans le cadre de ce qu'on appelle depuis l'Antiquité la phytothérapie qui connaît un engouement extraordinaire à travers le monde (**Edrah et al., 2013**).

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles pour traiter les affections. Tisanes et décoctions ont été utilisés avec succès. En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle (**Ferradji, 2011**).

Il a également été rapporté que plus de 50 % de tous les médicaments modernes utilisés en clinique sont des produits naturels, il est urgent de développer des médicaments beaucoup plus efficaces et moins toxique (**Rosangkima, 2020**).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (**Ferradji, 2011**).

Les anti-inflammatoires sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation (**Orliaguet et al., 2013 ; Hajjaj, 2017**).

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 inflammatoires sans effets négatifs (**Meziti, 2017**).

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 (**Lima et al., 2014**). *Rubus ulmifolius* Schott. est une espèce végétale de la famille des Rosacées qui constitue la 19^{ème} plus grande famille de plante, Cette plante est souvent utilisée pour ses multiples propriétés biologiques (**Sumaira et Rahman, 2013 ; Pandey et al., 2013 ; Akkari et al., 2016**).

L'objectif du présent travail est l'étude de l'activité anti-inflammatoire de *Rubus ulmifolius* en analysant deux articles scientifiques.

La première partie qui est sous forme d'une synthèse bibliographique qui traite les caractéristiques de la plante, sa description botanique, son historique, sa composition nutritionnelle, ses propriétés thérapeutiques ainsi que l'inflammation et les métabolites secondaires.

La deuxième partie est consacrée à l'analyse de deux articles scientifiques qui traitent l'activité anti inflammatoire de *Rubus ulmifolius*.

Enfin, les résultats des différentes recherches sont discutés. Ce document est achevé par une conclusion générale et des perspectives.

Partie 1 :
Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante étudiée

I. Historique:

L'homme a toujours utilisé les plantes à des fins thérapeutiques. L'emploi de ces plantes est très valorisé dans toutes les traditions médicales, il y a deux cents ans encore les moyens thérapeutiques naturels étaient les seuls remèdes dont disposait l'humanité. Leur utilisation et leurs effets ont donc été minutieusement étudiés, documentés et développés (**Grunwald et Janick, 2006**).

Les plantes médicinales comme les autres thérapeutiques ont toujours été intégrés à la culture d'une époque, ou d'une civilisation donnée (**Grunwald et Janick, 2006**).

L'histoire moderne nous apprend que l'art de se soigner par les plantes, aussi appelées « les simples », est aussi vieux que l'humanité elle-même (**Grunwald et Janick, 2006**).

II. La phytothérapie :

Définition :

Le terme “phyto” de phytothérapie provient du grec ancien avec le terme plus précis de “phyton” et signifie “végétal”. La phytothérapie est donc destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de végétaux, de certaines parties de ces derniers ou de préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées par voie externe (**Wichtl et Anton, 2003**).

Aujourd'hui elle est définie comme la “thérapie par les plantes”. C'est le traitement médical le plus utilisé au monde, selon l'OMS (**Creapharma, 2018**).

Les types de phytothérapie :

On distingue deux types de phytothérapie, une traditionnelle et l'autre clinique.

- **La phytothérapie traditionnelle :**

C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Elle concerne notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques (**Llerc, 1999**).

- **La phytothérapie clinique :**

C'est une approche globale du patient. Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Dans ce type les indications sont liées à une thérapie de complémentarité. Elle vient compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour certaines pathologies (**Moreau, 2003**).

III. Les plantes médicinales :

Définition :

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties peut être employée dans le but de se soigner. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, et qui présentent des effets thérapeutiques différents (**Futura santé, 2017**).

Selon l'OMS, sur plus de 20000 plantes utilisées dans le monde pour leurs propriétés médicinales, seulement 2000 à 3000 sont étudiées sur le plan scientifique (**Doctissimo, 2017 ; Top sante, 2018**).

Fonctionnement des plantes médicinales :

La recherche pharmaceutique a décrypté la composition chimique des propriétés de nombreuses plantes médicinales, et l'industrie pharmaceutique a réussi à découvrir de nouvelles combinaisons, pour le bénéfice des patients et celui de la protection des ressources naturelles (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**). Chaque plante est composée de milliers de substances actives, lorsqu'ils sont prélevés avec d'autres substances de la plante, ils révèlent leur aspect pharmacologique (**Cleur et Carillon, 2012**).

IV. *Rubus ulmifolius* Schott. :

Généralités :

Rubus ulmifolius Schott. est une espèce végétale de la famille des Rosacées qui constitue la 19^{ème} plus grande famille de plante, et qui comprend environ 90 à 125 genres et 3370 à 3500 espèces d'arbres, arbustes et herbes. Cette plante est souvent utilisée en médecine traditionnelle du fait de ses diverses propriétés biologiques (**Patel, 2004 ; Guarrera, 2005 ; Sumaira et Rahman, 2013 ; Akkari et al., 2016 ; Reidel et al., 2016 ; Kant, 2018**).

Présentation de la plante :

Rubus ulmifolius est un arbuste vivace couramment connu sous le nom de mûre sauvage ou de mûre à feuilles d'orme (**Martins et al., 2014 ; Emilia et Accame, 2016 ; Reidel et al., 2016**), qui pousse en Italie en lisière de forêt depuis le niveau de la mer jusqu'à 1100 m d'altitude. Les

feuilles de mûre ont été utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoire, antivirale et antimicrobienne (Panizzi et al., 2002).

Description botanique :

Rubus ulmifolius est arbustive formant des fourrés épineux impénétrables, Les tiges développées biannuel et les tiges de la seconde année donnent au cours de l'été les inflorescences, ensuite, la production du fruit (Masson et al., 2014). Les feuilles ont une face supérieure verte avec une face inférieure blanche, la plupart à 5 folioles (très rarement 4 ou 3 folioles) pédalées ou digitées (Figure 2). La couleur des fleurs est rose. Les aiguillons de l'inflorescence sont abondantes (5-10 pour 5 cm), disposés sur les angles du turion, parfois absents ou très épars robustes, courbés à crochus (au moins quelques-uns) ((Yorick Ferrez et Royer, 2015). Avec un pétiole, moyen (61-66 % de la foliole terminale, pétiolule inclus) égalant ou dépassant les folioles basales (Figure 3 et figure 4) (Ferrez et Royer, 2015).



Figure 1 : Fruit de *Rubus ulmifolius* (Ruiz- Rodríguez et al., 2014).



Figure 2 : Feuilles de *Rubus ulmifolius* (Ferrez et al., 2016).



Figure 3 : Fleur de *Rubus ulmifolius* (Aliouat et al., 2014).

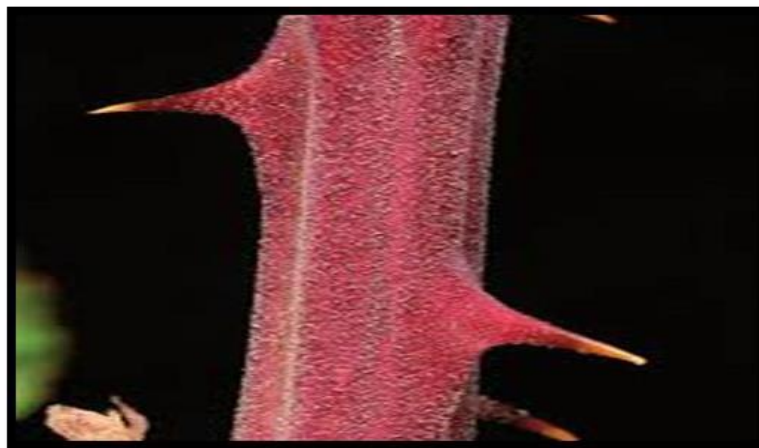


Figure 4 : Le Turion de *Rubus ulmifolius* (Ferrez et al., 2016).

La systématique botanique :

Rubus ulmifolius Schott. appartient à la Famille des Rosacées (Silva et al., 2021), la systématique est comme indiquée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Systématique botanique de la plante étudiée (*Rubus ulmifolius*). (Silva, et al., 2021).

Règne	Planta
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermatophyta
Classe	Magnoliopsida, dicotylédones
Sous classe	Lédones
Ordre	Rosidae
Famille	Rosaceae
Genre	Rubus
Espèce	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott

Nom vernaculaire :

- Nom vernaculaire algérien : Âlaieg (Ounaissia et al., 2019).
- Nom français : La ronce (Lazli et al., 2019).

Les organes utilisés :

Les parties utilisées de la plante sont : les feuilles, les fruits, les fleurs en boutons, jeune pousse (turion) (baba aissa, 2000), et les racines (Bouayyadi, 2015).

Mode de traitement :

Il existe des recettes simples, rapides et faciles à base de *Rubus ulmifolius* Schott. utilisées par les anciens pour traiter plusieurs problèmes de santé, notamment :

- Les feuilles sont utilisées :
 - Pour traiter le diabète, extrait de 1 tasse de feuilles en infusion. 2 fois / Jour. (Allali et al., 2008).

- Pour les brûlures, les feuilles en poudre à usage externe. (Sarr et al., 2012).
 - Pour les céphalées, décocter les feuilles de *Rubus Ulmifolius* (Bouayyadi, 2015).
 - Pour raffermir la peau du visage, le décocté des feuilles est utilisé par rinçage local, (Bouayyadi, 2015).
- Les fruits :
- Utilisés pour le traitement des diarrhées (Sarri et al., 2012).
- Les bourgeons jeunes :
- Sont cueillis durant les mois de printemps, sont mis dans un conteneur ensuite on les expose au soleil, la ronce excrète un liquide utilisé pour guérir et cicatriser les plaies.

Composition de *Rubus Ulmifolius* :

Cette plante contient des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les principaux composés de ce dernier sont l'acide caféique, acide férulique, laquercétine-3-O-glucuronide, le kaempférol-3-O-β-D-glucuronide, l'acide gallique, et le tiliroside (Panizzi et al., 2002), et aussi l'acide ellagique (Martini et al., 2009). Et en plus, il contient des acides organiques, de l'acide ascorbique, des tanins et des huiles volatiles (Wada et Ou, 2002). Le kaempférol 3-O-rutinoside et la naringénine sont des composés phénoliques dominants dans les feuilles de *R. ulmifolius* (Tabarki et al., 2017).

En plus, cette espèce est un élément important pour fournir les composants essentiels d'une alimentation saine (Schulz et al., 2019). elle fournit un large éventail de substances telles que :

- Les fibres alimentaires.
- Les minéraux (potassium, sodium, calcium, magnésium, manganèse).
- Les Vitamines, l'acide ascorbique « vit C », (Da Silva et al., 2019). Vitamine K, acide folique, vitamine B, (Pandey et al., 2013).

Les propriétés thérapeutiques de *Rubus ulmifolius* :

La plupart des gens dans le monde utilisent des plantes médicinales pour le traitement de différentes affections. Ces plantes sont une riche source de médicaments provenant de sources naturelles.

Les utilisations des espèces de *Rubus* en médecine traditionnelle sont basées sur ses utilisations ethno-médicinales. Différentes espèces de *Rubus* synthétisent plusieurs variétés de composé phytochimiques médicalement actifs (Souilah, 2018).

Rubus Ulmifolius a été utilisé dans la médecine traditionnelle italienne, pour le traitement des ulcères, abcès, furoncles, yeux rouges, troubles vaginaux, inflammations intestinales, diarrhée et hémorroïdes (calment les hémorroïdes) .Les feuilles de *R. ulmifolius* sont très astringentes et peuvent être employées pour traiter les aphtes et fortifier les gencives. On l'utilisé aussi pour la toux, les maux de gorge et les affections buccales comme tisane ou en gargarisme, et en infusion pour leucorrhées, diabète, hémorragies et lithiase. Et pour traiter les aphtes gingivites, les pharyngites et les plaies en application externe (**Souilah, 2018**).

Le thé fabriqué à partir de ses racines et ses feuilles est utilisé pour soulager la douleur et dans divers problèmes respiratoires, Le jus de fruit est recommandé pour traiter l'asthme et la colite (**Zia-Ul-Haq et al., 2014**).

Rubus ulmifolius, actuellement nommé (super fruits) pour ses effets thérapeutiques, notamment par ce qu'il est comme sources potentielles de composés bioactifs comme les composés phénoliques, les tanins, et les flavonoïdes les anthocyanes et les ellagitanins, Dans la médecine populaire chilienne, *Rubus Ulmifolius* est utilisé pour plusieurs propriétés :

- Activité hypoglycémique (**Ali et al., 2017**).
- Activité antioxydante (**Schulz et al., 2019**).
- Activité microbienne (**Ibba et al., 2021**).
- Activité antipyrétique ((**Ali et al., 2017**).
- Activité antifongique (**Couso et al., 2021**)
- Activité anti inflammatoire (**pandey et al., 2013**).

Chapitre II : L'inflammation

I. Généralités :

L'inflammation est un phénomène affectant des millions de personnes à travers le monde (Heifetz, 2020). Il existe une grande variété de médiateurs inflammatoires impliqués dans différentes fonctions biologiques (Lagrade, 2014).

II. Types d'inflammation :

L'inflammation, est une réponse naturelle contre les agents pathogènes nocifs et les stimuli qui se produisent en deux étapes, à savoir aiguë et inflammation chronique.

- Aiguë fait partie de l'immunité innée initiée par les cellules immunitaires qui ne persiste que pendant une courte période (Kunnumakkara et al., 2018).
- Chronique, elle provoque divers types de maladies chroniques, y compris l'arthrite, le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurologiques par dérèglement de diverses voies de signalisation telles que le nucléaire facteur kappa-B (NF-κB), transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) etc.... (Kunnumakkara et al., 2018).

La réaction inflammatoire se fait par l'intervention des cellules immunitaires (phagocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, et des molécules telles que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Youbare-Ziebrou, 2015).

III. Les anti-inflammatoires :

1. Définition :

Les anti-inflammatoires constituent une importante classe de médicaments qui présentent différentes activités pharmacologiques :

- Type anti-inflammatoire : réduisant les symptômes de l'inflammation.
- Analgésique : réduction de certains types de douleurs
- Antipyrétique : abaissement de la température corporelle lorsque celle-ci est élevée.
- Antiplaquettaire : réduction de l'athérosclérose. (Lucido et al., 2016).

Selon leur mode d'action, ils sont classés en deux catégories, les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). De nombreux anti-inflammatoires sont disponibles dans une variété de formulations différentes telles que des comprimés, des

injections, des gels et plusieurs sont disponibles dans les pharmacies « en vente libre » sans ordonnance (**Lucido et al., 2016**).

2. Types des anti-inflammatoires :

Il existe différentes familles d'anti-inflammatoires.

❖ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde (**Gaussian, et al., 2009**).

Les AINS regroupent un ensemble de molécules présentant des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques, mais qui peuvent également engendrer des effets secondaires parfois graves. Leur efficacité, comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principal qui est une inhibition de La cyclo-oxygénase (COX), enzyme responsable de la biosynthèse des prostaglandines et du thromboxane. En plus ces AINS classiques, c'est-à-dire non sélectifs, inhibent les deux iso formes de la COX (COX-1 et COX-2), contrairement aux AINS sélectifs de la COX-2 (coxib) (**Orliaguet et al., 2013**).

❖ Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) :

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol) ou hémi-synthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et immunosuppressives. (**Gaussian, et al., 2009**).

Les AIS empêchent l'activation de la phospholipase A2 (PLA2), en bloquant à la fois la voie des prostaglandines et celles des leucotriènes. Les glucocorticoïdes représentent le traitement le plus efficace des maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (**Gaussian et al., 2009**).

En outre, ils diminuent fortement la migration des polynucléaires et des monocytes/macrophages vers le site inflammatoire ainsi que la production des médiateurs inflammatoires, comme l'histamine, la sérotonine, les bradykinines, les cytokines et les ions superoxydes. Ils sont également responsables de la diminution de la perméabilité capillaire et de l'augmentation de l'activité des ostéoclastes, ce qui conduit à la fragilisation des os.

Cependant, on ne l'oublie pas, ils ont l'inconvénient de réduire les défenses de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (hypertension artérielle, libération de la

composition normale des glucocorticoïdes, ulcères gastriques et intestinaux, etc.) ou chroniques comme l'ostéoporose, les cataractes et la perte de poids (**Gaussian et al., 2009**).

Chapitre III : Les métabolites secondaires

Le terme « métabolite secondaire », qui a éventuellement été introduit par Albrecht Kossel en 1891 (**Hartmann, 2007**), est employé pour décrire une large gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphériques indirectement indispensables à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (**guillaume, 2008**).

Ces métabolites jouent un rôle très important dans de nombreuses fonctions biologiques. Ils sont connus non seulement pour leur rôle protecteur contre les effets néfastes de la lumière UV ou d'autres facteurs abiotiques, mais également en tant que défenseurs contre les herbivores et les microorganismes pathogènes. De plus, ils sont reconnus pour collaborer au processus de pollinisation et comme des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement (**Graglia et al., 2001**).

Jusqu'à aujourd'hui plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés chez les végétaux. Ils ont tous la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

I. Les polyphénols :

Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires. Ils sont très largement représentés dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Nous les consommons sous forme de fruits ou de légumes, Leur structure comporte un ou plusieurs groupes phénoliques. Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé (**Haleng, 2007**).

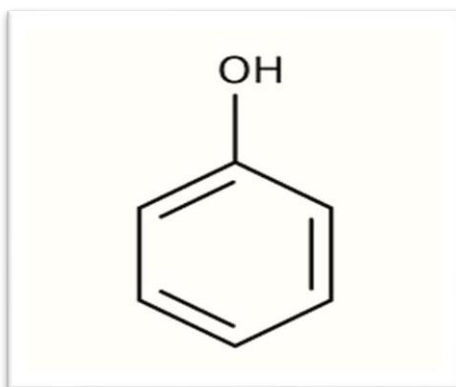


Figure 5. Structure chimique du phénol simple (Desmier, 2016).

A ce jour, environ 9 000 structures connues se regroupent dans cette famille de molécules, allant des substances phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques (Manallah, 2012) à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh *et al.*, 2004). Ils sont assez présents dans l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ces composés peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques et des éléments structuraux qui lient ces anneaux les uns aux autres. Ainsi, on distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tanins (Figure 6).

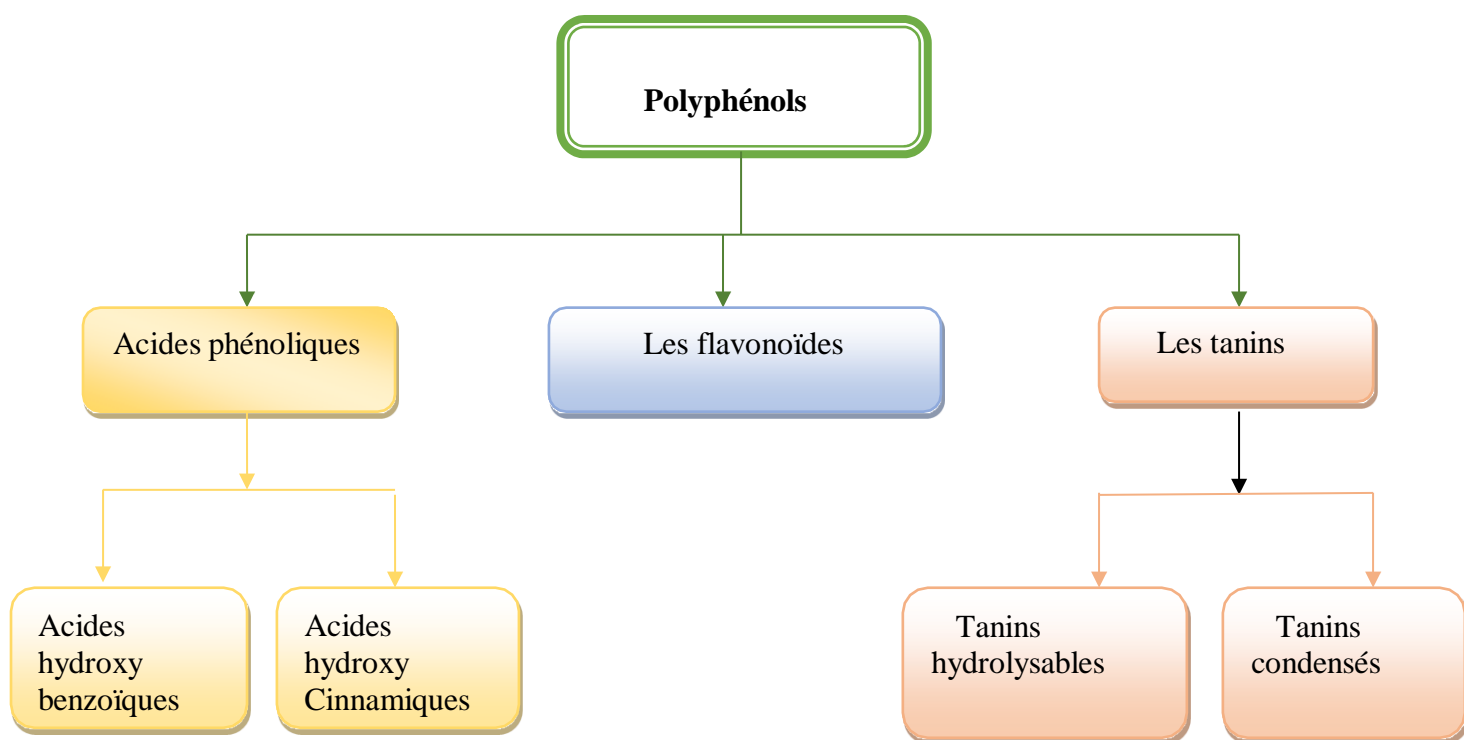


Figure 6. Classification des polyphénols (Kumar *et al.*, 2019)

1. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux groupes principaux, les acides hydroxybenzoïques (acide gallique, acide salicylique, acide vanillique et l'acide protocatéchique) et les acides hydroxycinnamiques (acide coumarique, acide cinnamique, acide

caféique, acide férulique) (Kozarski *et al.*, 2015) dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Manach *et al.*, 2004 ; Choi *et al.*, 2012).

2. Les flavonoïdes :

Sont des molécules phénoliques et représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (Muanda, 2010). Ils sont responsables de la coloration des fruits, des fleurs et des feuilles. Ils sont dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Muanda, 2010). La structure de base des flavonoïdes est un noyau de 15 atomes de carbone formé par deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné C, hexa- ou pentagonal (De Rijke *et al.*, 2006 ; Muanda, 2010). Les six sous-classes communes de flavonoïdes sont les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanidines et les flavanols (Manach *et al.*, 2004 ; Farkas *et al.*, 2004 ; Perez-Vizcaino et Duarte, 2010).

3. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques d'origine végétale, largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légume, thé, dattes, ...) (Hemingway, 1989 ; Muanda, 2010). Ils ont la propriété de se lier à des macromolécules, notamment des protéines. En contact avec la salive, les tanins provoquent une sensation désagréable pour la bouche en développant un goût âpre et dissuasif (le goût astringent). Ce qui fait qu'ils sont considérés comme un moyen de défense vis-à-vis des prédateurs (Foley *et al.*, 1999).

La structure chimique des tanins est variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique, Ils constituent un groupe complexe hétérogène de polymères naturels (Permal, 2017).

Les tanins sont divisés essentiellement en deux groupes, qui sont : les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (polymères de flavan-3-ols) et les tanins hydrolysables (esters des acides galliques et ellagique) (Hemingway, 1989 ; Zucker, 1983).

Les tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont constitués par une molécule de sucre généralement le glucose estérifié par l'acide gallique ou l'un de ses dérivés (acide ellagique, chebulique valonique). Comme leur nom l'indique, ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (Zeghad, 2018).

Les tannins condensés :

Appelés aussi proanthocyanidines, sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes par chauffage en milieu acide (**Heller et Forkmann, 1994**). En se fixant aux parois végétales, les tanins condensés jouent le rôle de défense au niveau des membranes cellulaires contre les attaques des pathogènes et empêchent ou retardent la décomposition des tissus. Parmi eux, on peut citer les catéchines (dihydroxylées) et les gallocatéchines (trihydroxylées) (**Zucker, 1983**).

II. Les polyphénols comme anti-inflammatoires naturels :

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans les plantes médicinales est très vaste, et leurs spectres d'activité est tout aussi grand (**Barnes, 1998**).

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (OH, alcoolique, carboxyle...). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances :

Les noyaux simples en C6-C1 et C6-C3, les noyaux dérivant de l'extension du phénylpropane, en C6-C3-C6, comme les chalcones, les flavones, les flavonols ou les dérivés du flavane ou du flavane-3-ol (Catéchines et proanthocyanidines). Toutes ces substances ont une voie de biosynthèse commune et sont appelées flavonoïdes, au sens large du terme (**Alibert et al., 1977**).

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : Croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits mûrs. Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits : les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les Flavonones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée. Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale (**Nitsch et al., 1961**).

Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans (**le Tableau 2**).

Tableau 2 : Activités biologiques des composés phénoliques.

POLYPHENOLS	ACTIVITES	AUTEURS
Acides Phénols (cinnamiques etbenzoïques)	<ul style="list-style-type: none"> • Antibactériennes • Antifongiques • Antioxydante 	<p>Didry et al. 1982</p> <p>Ravn et al. 1984</p> <p>Hayase et Kato (1984)</p>
Coumarines	<ul style="list-style-type: none"> • Protectrices vasculaires Etantioedémateuses 	Mabry et Ulubelen (1980)
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Antitumorales • Anticarcinogènes • Anti-inflammatoires • Antioxydante • Hypotenseursetdiurétiques 	<p>Stavric et Matula (1992)</p> <p>Das et al. 1994</p> <p>Bidet et al. 1987</p> <p>Bruneton, 1993</p> <p>Aruoma et al. 1995</p>
Proanthocyanidines	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxydants • Antitumorales • Antifongiques • Anti-inflammatoires • Effets stabilisants sur le collagène 	<p>Masquelier et al. 1979</p> <p>Bahorun et al. 1994, 1996</p> <p>D'Oliveira et al. (1972)</p> <p>Brownlee et al. 1992</p> <p>Kreofsky et al. 1992</p>
Tannins galliques et catéchiques	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxydante 	<p>Okuda et al. 1983</p> <p>Okamura et al. 1993</p>

Les polyphénols peuvent moduler l'inflammation par plusieurs mécanismes, notamment :

- En incluant la modulation des voies de signalisation,
- L'inhibition des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique ;
- Cyclooxygenase-2 (COX-2) et 5-lipooxygénase (5-LOX) ainsi que les enzymes qui
- Générer les ERO/ERN, le piégeage direct des ERO/ERN,
- Réduction de l'expression MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) et de MIP (macrophage inflammatory protéine)

- 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**).

Analyse des articles

Article 1 :

Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Rubus ulmifolius* Schott. (Pandey et al., 2013).

Résumé :

L'inflammation est une maladie des plus gênantes, et a un effet substantiel en termes de coût, invalidité, et faible productivité. Elle touche 1 % de la population mondiale et est associée à une morbidité et une mortalité importante. *Rubus ulmifolius* est présent dans presque toute l'Europe, l'Afrique du Nord et le sud de l'Asie. La plante est utilisée pour la fonction défensive du corps. Dans cet article, un potentiel anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Rubus ulmifolius* a été étudié par la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique et l'œdème de l'oreille induit par l'huile de Croton sur des modèles animaux (Pandey et al., 2013).

Matériels et méthodes :

La plante entière de *Rubus ulmifolius* Schott a été achetée dans l'Indore (M.P.) (Pandey et al., 2013).

1. Extraction de matières végétales :

Les matières végétales séchées ont été réduites en poudre à l'aide d'un mélangeur, ensuite, cette poudre a été conditionnée dans une colonne Soxhlet et extraite avec de l'éthanol et une macération à froid avec de l'eau (Pandey et al., 2013).

▪ **Extrait éthanolique :**

La poudre de fruits séchés à l'air, les racines et la plante entière de *Rubus ulmifolius* Schott ont été extraits dans l'assemblage Soxhlet avec de l'éther de pétrole, et l'extrait reçu a été concentré dans un évaporateur sous vide. Avec la même procédure le médicament a été extrait avec de l'éthanol après séchage dans l'air et l'extrait obtenu a été pesé et le pourcentage de rendement a été calculé (Pandey et al., 2013).

▪ **Macération à froid :**

Dans ce processus, l'extraction est effectuée par mise en contact du solide avec de l'eau distillée dans un récipient clos pendant 3 jours avec agitation occasionnelle. Le liquide est égoutté et pressé, en ajoutant le liquide exprès au liquide filtré les liquides combinés sont clarifiés par filtration. Après évaporation du solvant, le rendement en % del a été calculé. (Pandey et al., 2013).

2. Criblage phytochimiques de *Rubus ulmifolius* Schott : (plante entière). (Kokate et al., 1999).

L'éthanol et les extraits aqueux ont été soumis à des tests qualitatifs :

▪ **Alcaloïdes :**

Une petite quantité d'extrait a été agitée avec quelques gouttes d'HCl dilué et filtré, le filtrat a été testé avec un certain nombre de réactifs alcaloïdes comme le réactif de Dragendorf.

▪ **Flavonoïdes :**

Une petite quantité d'extrait d'éthanol a été dissoute dans de l'éthanol puis ajouter une pincée de mg en tournant lentement, une couleur rose a été obtenue.

▪ **Stéroïdes :**

L'extrait éthanolique est porté au reflux séparément avec une solution de l'hydroxyde de potassium alcoolique, puis il a été dilué avec de l'eau distillée, et extrait avec de l'éther, l'extrait étheré est évaporé et le résidu a été soumis au test de Burchard de Liebermann.

▪ **Saponines :**

Environ 1 ml d'éthanol et d'extrait aqueux a été dilué avec de l'eau distillée à 20 ml et agité dans un cylindre gradué pendant 15 minutes. Une couche de mousse de 1 cm a été obtenue.

3. Détermination de la toxicité aiguë (ALD₅₀) :

La toxicité aiguë a été effectuée par un groupe de procédures standard de trois souris de chaque sexe (18-25 g) à dose fixe (méthode OCDE Annexe-2 d (lignes directrices n° 420 du CPCSEA). Les animaux ont été mis à jeun pendant la nuit avant l'expérience. Les animaux ont été divisé en 4 groupes de 3 animaux chacun ; l'extrait a été administré par voie orale à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel et la mortalité a été observée pendant une période de 24 heures (Veeraraghavan; 1999).

4. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique (Pandey *et al.*, 2013).

0,2 ml de solution d'acide acétique à 0,6 % administrée pour perméabilité.

Étapes utilisées lors de l'expérience sont comme suit :

- Quatre groupes de 24 souris ont été prélevés, groupes :

A) pour la comparaison (Témoins)

B) pour l'extrait 200 mg/kg

C) pour l'extrait 400 mg/kg,

D) Le diclofénac sodique a été utilisé comme médicament de référence.

L'acide acétique a été administré en intra-péritonéale une heure plus tard suivie de l'administration de 10ml/kg de bleu Evans à 10 % poids/volume a été effectué. Les animaux ont été sacrifiés après 30 minutes et les viscères exposés. Le liquide péritonéal (exsudats) été collecté et le volume a été créé jusqu'à 10 ml en utilisant une solution saline normale. Il a été centrifugé à 200 tr/min pendant 10 minutes. L'absorbance a été notée à 610 nm.

5. Œdème de l'oreille induit par l'huile de Croton :

Dans ce protocole, 2 µg/20µl d'huile de croton sont utilisés dans de l'acétone pour l'œdème de l'oreille.

Les étapes de l'expérience :

- Quatre groupes de 24 souris, groupes :

A) Témoins

B) pour extrait 200mg/kg

C) pour extrait 400mg/ kg

D) Diclofénac sodium ont été utilisés comme médicaments de référence. Les doses sont administrées par voie orale dans une intervalle de 15minutes.

- L'huile de croton a été appliquée une heure plus tard dans l'oreille droite des souris.
- Les deux oreilles (droite et gauche) ont été coupées et pesées après 3 heures. **(Tubaro et bal ; 1986, Drug et al ., 2002).**

Résultats :

1. Calcul du rendement en pourcentage des extraits :

Le rendement en pourcentage d'éthanol et de l'extrait aqueux de la plante entière s'est avéré être de 10,25 % et 9,20 respectivement (**tableau 3**).

Tableau 3. Rendement en éthanol et extrait aqueux

Partie de plante	Extrait d'éthanol (%)	Extrait aqueux (%)
Fruit	12.50	9.20
Racine	10.50	9.35
Plante entière	13.25	9.20

2. Criblage phytochimique :

Le screening phytochimique préliminaire de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux de la plante entière de *Rubus ulmifolius* Schott. a révélé la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stéroïdes et des saponines.

Tableau 4. Criblage phytochimique

Extraits	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Stéroïdes	Saponines
Extrait éthanolique des fruits	+	+	+	+
Extrait aqueux de fruit	+	-	+	+
Extrait éthanolique de racine	+	+	-	+
Extrait aqueux de racine	+	+	+	+
Extrait éthanolique de plante entière	+	+	+	+
Extrait aqueux de plante entière	+	+	+	+

(+) Présent, (-) Absent

3. Étude de toxicité aiguë :

Dans les études de toxicité aiguë, les extraits n'ont montré aucune mortalité à la dose de 2000 mg/kg P.C. Par conséquent 2000 mg/kg b. w. dose a été considérée comme la dose seuil ALD50 (dose sûre) donc 1/10e et 1/5e de ceux-ci ont été sélectionnés (200 mg/kg P.C.) et (400 mg/kg P.C.) pour toutes les expériences *in vivo*. Les résultats sont cités dans ce tableau :

Tableau 3. Étude de toxicité.

Groupe De traitement	Dose mg/kg	Nombre d'animaux utilisés	Nombre de morts d'animaux	%Mortalité
Extrait d'éthanol (Plante entière)	2000	0	0	0

Discussion :

Les études de toxicité montrent que l'extrait éthanolique ne présentait aucun signe de toxicité Jusqu'à la dose de 2000 mg/kg, ce qui été considérée comme la dose tolérable maximale pour

La présente étude. Ainsi, les doses choisies étaient de 200 mg/kg et 400 mg/kg, le 1/10^{ème} et Le 1/20^{ème} de 2000 mg/kg.

L'extrait de *Rubus ulmifolius* a été testé pour son activité anti-inflammatoire. L'extrait a montré d'importants effets anti-inflammatoires.

Lorsque l'extrait a été étudié pour son effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, il a été constaté que dans le groupe traité par le véhicule la variation de poids dans l'oreille était de 23,5±4,03, ce qui n'a pas diminué significativement ($p>0,05$) dans l'extrait 200 mg/kg (26,66±8,75a) et 400 mg/kg (25,16±5,77 a).

Lorsque les extraits ont été comparés au groupe standard traité par le médicament (**tableau 5**), Les extraits sont significatifs et efficaces. Lorsque l'extrait a été traité pour son effet sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique, il a été constaté que dans le groupe des témoins, l'absorbance était (0,169±0,068), ça n'a pas diminué de manière significative ($p>0.05$) (**Tableau5**).

L'extrait 200mg/kg ainsi que le groupe traité à 400 mg/kg a montré une bonne inhibition de l'inflammation par rapport au médicament standard (**Pandey et al., 2013**).

Tableau 5. Œdème de l'oreille induit par l'huile de Croton

Groupe de traitement*	Nb de différence de poids**
Véhicule	23.5±4.03
Extrait 200mg/kg	26.66±8.75 ^a
Extrait 400mg/kg	25.16±5.77 ^a
Standard	24.23±2.11

*Nombre d'animaux dans chaque groupe -6.

**Données présentées en moyenne ±SD.

Article2 :

Analyses comparatives de graines de fruits sauvages des espèces *Rubus* et *Sambucus* du sud de l'Italie : Composition en acides gras de l'huile, contenu phénolique total, propriétés antioxydant et anti-inflammatoires des extraits méthanoliques (**Fazio et al.,2012**).

Résumé :

Les graines de fruits sont des sous-produits de la transformation des fruits. La caractérisation des composés bioactifs présents dans ces graines et l'évaluation de leurs propriétés biologiques potentielles revêt donc une importance particulière en vue d'une éventuelle valorisation des graines comme source de composants bénéfiques pour la santé. Dans ce travail, Les auteurs ont analysé les graines des espèces *Sambucus* et *Rubus* afin d'identifier leurs composants bioactifs et de déterminer les activités Antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits. Ils ont d'abord analysé leur teneur en huile, afin d'évaluer le profil en acides gras et la teneur en tocophérols. De plus, les extraits méthanoliques des graines ont été analysés pour leurs teneurs phénoliques totales et leurs capacités Antioxydantes. Les polyphénols ont été identifiés par analyse HPLC-ESI-MS/MS. De plus, des extraits ont été évalués pour leurs effets inhibiteurs sur la production de médiateurs inflammatoires induits par le LPS (NO, CCL-20) dans les cellules RAW 264.7. Les résultats montrent que les extraits méthanoliques des graines de *Rubus ulmifolius* ont de fortes propriétés Antioxydantes et anti-inflammatoires et pourraient donc représenter une source intéressante de composés bioactifs pour des applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Matériel et méthodes :

1. Baies :

Les fruits mûrs de *R. ulmifolius* et *S. nigra* ont été choisis au hasard dans les buissons sauvages sur les pentes des montagnes à une altitude de 1000 m au-dessus du niveau de la mer (Contrada Pallone, Cosenza). Les fruits lyophilisés ont été broyés dans un mortier et ont été tamisés à l'aide d'un tamis pour réaliser la séparation des graines de la pulpe. Les pigments sur les graines ont été lavés avec de l'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau de lavage soit claire. Les graines ont été étalées pour leur permettre de sécher dans des conditions ambiantes pendant environ 24 h. Les graines ont été broyées avec un broyeur à immersion électrique et séchées dans un four à T = 110 °C jusqu'à poids constant (t = 2 h). Les échantillons de farine de graines ont été stockés à -20 °C avant l'analyse. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'échantillons en triple ; les résultats sont exprimés sur matière sèche.

2. Teneur en huile :

La farine des graines séchées (10 g) a été extraite avec de l'éther de pétrole (150 mL) à l'aide d'un appareil Soxhlet à 80 °C pendant 24h. L'extraction du résidu de graine a été répétée deux fois en utilisant de l'hexane comme solvant (150 mL) à 90°C pendant 2h. Les extraits ont été recueillis, le solvant a été évaporées dans un évaporateur rotatif à 35 °C, et le résidu a été séché sous vide. La teneur en huile a été exprimée sur une farine de poids sec de graine. Les données sont rapportées sous forme de valeur moyenne \pm écart type (ET) de trois échantillons de chaque espèce (*R. ulmifolius* et *S. nigra*). Les lipides sans solvant ont été transférés dans des récipients hermétiques bruns, rincés à l'azote et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse.

3. Composition en acides gras :

La composition en acides gras a été déterminée en triple par gaz chromatographie (HRGC) des huiles après trans-estérification.

Analyse HRGC-FID :

Les analyses GLC ont été réalisées sur un système Shimadzu GC-2010 équipé d'un échantillonneur automatique AOC-20i, injecteur split/splitless, et un détecteur FID (Shimadzu, Milan, Italie). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur. Les acides gras (FA) ont été identifiés par comparaison des temps de rétention observés avec ceux des esters méthyliques d'acides gras commerciaux (FAME). La détermination quantitative a été obtenue par la méthode de l'étalon externe et les résultats sont rapportés en mg pour 100 g d'huile extraite. Les données sont rapportées sous la forme d'une valeur moyenne \pm SD de trois échantillons de chaque espèce (*R. ulmifolius* et *S. nigra*), analysés individuellement en triple exemplaire.

4. Tocophérols :

Les tocophérols ont été extraits des huiles selon une méthode connue (**Bushman et al., 2004 ; Kim et al., 2002**).

Les tocophérols ont été analysés à l'aide d'un système HPLC, Les courbes standards externes ont été à base d'a- et de c-tocophérol purs. Le tocophérol standard était dilué à des concentrations de 100 à 10 μ g/mL de méthanol.

5. Extraction des polyphénols des résidus de graines dégraissées :

La farines de graines dégraissées (3 g) a été extraite trois fois pendant 16 h à température ambiante en agitant avec du méthanol (10 mL de solvant/g de farine). Entre les extractions, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min avec une vitesse de 2000 rpm. Les surnageants combinés ont été recueillis, filtrés sur papier filtre Whatman et évaporé à sec. L'extrait résiduel

brut méthanolique des graines a été pesé et stocké dans des récipients hermétiques bruns à -20°C sous un courant d'azote gazeux. Les extractions ont été réalisées en triple exemplaire.

Détermination de la teneur phénolique totale :

Le contenu phénolique total de chaque fraction a été déterminé en utilisant la méthode Folin-Ciocalteu avec quelques modifications (**Liu Yao, 2007**). L'absorbance à 760 nm a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis. Les résultats de la teneur phénolique totale ont été estimés à l'aide d'une courbe standard préparée à l'aide d'acide gallique et exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

Détermination de l'activité du piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl :

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH a été déterminée à trois concentrations différentes selon **Butsat et Siriamornpun, (2010) ; Jayaprakasha et Bhimanagouda (2007)** avec quelques modifications. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaires. Le Trolox a été utilisé comme antioxydant de référence positif. Les résultats de piégeage des radicaux libres DPPH sont exprimé en % d'inhibition.

Détermination des valeurs IC₅₀ :

Les valeurs IC₅₀ (valeurs de concentration de piégeage des radicaux libres à 50 %) des extraits ont été déterminées en utilisant la corrélation et la régression programmeur du programme Graph Pad Prism, (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). En bref, les valeurs ont été transformées en log et normalisée. Une analyse de régression et non linéaire a été utilisé pour générer une courbe dose-réponse sigmoïdale pour calculer les valeurs de IC₅₀. Les résultats sont donnés en valeurs moyennes ± SD (n = 3).

- **Analyses d'acide ellagique**

Cinq grammes de graines broyées ont été extraits trois fois avec méthanol à l'aide d'un appareil Soxhlet à 100 °C pendant 24 h (**Bushman et al., 2004**). Les extraits combinés ont ensuite été évaporés et hydrolysé dans l'acide trifluoroacétique 2 N dans le méthanol à 100 °C pendant 2 h (contenant de l'acide ellagique total). Ensuite, l'hydrolysat a été séchée sous vide et repris dans 3 mL de méthanol 1:1 : DMSO (v/v).

Identification et quantification de l'acide ellagique dans les extraits ont été réalisées à l'aide d'un système HPLC.

Caractérisation des polyphénols par HPLC–ESI–MS/MS

La caractérisation des polyphénols dans les extraits méthanoliques de graines a été réalisée par HPLC-ESI-MS. Des extraits secs de mûre ont été dissous dans du méthanol (100µg/mL) tandis que des extraits aqueux de graines ont été solubilisés dans du DMSO (100 µg/mL). Les analyses

ont été acquises sur un spectromètre de masse ABSciex API 2000 équipé d'un électro spray interface d'ionisation (ESI) et couplé à un JASCO PU-2080PLUS HPLC.

- **Culture cellulaire :**

Les macrophages RAW264.7 (origine murine) ont été obtenus à partir de l'American Typ Culture Collection (Teddington, Royaume-Uni). Ils étaient cultivés et maintenus dans du DMEM additionné de 10 % de sérum bovin, streptomycine et pénicilline à 37 °C dans une solution à 5% de CO₂ atmosphère d'air humidifié. Effets des extraits sur la viabilité des cellules RAW264.7 ont été évalués à l'aide d'un XTT Cell Prolifération Kit II (Roche Applied Science, Almere, Pays-Bas) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules étaient d'abord incubées avec les extraits d'essai. Après 48 h, la viabilité cellulaire a été évaluée par dosage du sel de tétrazolium (ZTT), mesurant la capacité des cellules à métaboliser le XTT en formazan. Les conditions ont été considérées toxiques si l'activité métabolique pour former le formazan a été diminuée de >20 %. Comme témoin négatif, du Triton X100 a été ajouté aux cellules, donnant une lyse cellulaire totale.

- **Effets des extraits sur la libération d'oxyde nitrique et la production de CCL-20 :**

Les macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans une culture cellulaire à plaques de 48 puits (2,5 10⁵ cellules/mL) pour les mesures de nitrite et ELISA, ou dans des plaques à 96 puits pour les tests de viabilité cellulaire et incubés pendant la nuit. (Green et al., 1982). Brièvement, 100 µL du milieu de culture cellulaire ont été mélangés avec 100 µL de réactifs de Grises et incubés à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un ELISA lecteur de plaque. Les niveaux de CCL20 ont été évalués par ELISA selon les instructions du fabricant, après 24 h d'incubation.

- **Analyse statistique :**

Trois expériences indépendantes (chacune réalisée en double) ont été réalisées avec des macrophages RAW264.7. Les données de ces expériences sont exprimées en pourcentage des cellules traitées au LPS. Contrôles (réglé à 100%). Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (ET). Différences statistiques entre les traitements et les contrôles ont été évalués par un test t non apparié. A p value < 0,05 a été considéré comme statistiquement significatif.

Résultats et Discussion :

Teneur en huile des graines

La teneur en huile des graines de fruits sauvages des espèces étudiées sont rapportées dans le tableau 5 et sont exprimées sur une base de matière sèche (10 g). Les rendements, rapportés à la semence de départ sont exprimées en % p/p, ne varient pas significativement au sein des

espèces analysées (10,5–15,9%). Comme le montre le **tableau 6**, la teneur en huile des graines de mûre (15,9 %) était supérieure à celle des graines de sureau (10,5 %).

Tableau 6 : Teneur en huile et en tocophérols et composition en acides gras des farines de graines (g/100g_{huile})^a

	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott.	<i>Sambucus nigra</i> L.
Teneur en huile^b	1.05 ± 0.04	1.59 ± 0.02
C14:0	0.0	0.04 ± 0.002
C16:0	2.45 ± 0.07	4.07 ± 0.17
C16:1	0.07 ± 0.003	0.05 ± 0.001
C18:0	0.94 ± 0.07	0.64 ± 0.02
C18:1	8.33 ± 0,58	4.12 ± 0.07
C18:2	15.34 ± 0,08	11.73 ± 0.05
C18:3	4.22 ± 0.01	9.81 ± 0.17
C20:0	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.001
C20:1	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.001
C22:0	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.001
SAFA	3.47	4.81
MUFA	8.43	4.21
PUFA	19.56	21.54
n-6/n-3	3.63	1.19
α-Tocopherol^c	0.36 ± 0.02	0.49 ± 0.05
γ-Tocopherol^c	43.35 ± 0.29	2.63 ± 0.06

^a Les valeurs sont la moyenne ± ET de trois échantillons de chaque espèce, analysés individuellement en triple. Chaque valeur est exprimée en g/100 g d'huile extraite.

^b La teneur en huile est exprimée en g par rapport à la farine de graines de départ (10 g).

SAFA : acides gras saturés. AGMI : acides gras mono-insaturés.

PUFA : Polyinsaturés Les acides gras. n-6/n-3 est le rapport des acides gras n-6 sur n-3

Composition en acides gras des huiles

Les compositions en acides gras des huiles sont rapportées dans le **tableau 5**. Les profils en acides gras des huiles de graines des deux espèces (*Rubus ulmifolius* et *Sambucus nigra*) ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant du méthyl tridécanoate comme étalon interne. Il n'y avait pas de différence qualitative dans les profils d'acides gras de l'huile dans les deux espèces, à l'exception de l'acide myristique, absent de l'huile de pépins de mûres. Les acides gras les plus représentés étaient les acides linoléique, oléique et linoléique (84,0–88,6 %) dans les graines oléagineuses des deux espèces. Le pourcentage d'acide oléique dans l'huile de graines de *Rubus ulmifolius* a été de 26,5 % ; c'était environ deux fois plus élevé que cela dans l'huile de graines de *Sambucus nigra* (13,5%), qui à son tour avait une teneur plus élevée d'acide linoléique (32,1%) par rapport à celui de la mûre noir (13,4%). Les différences dans les teneurs individuelles en acides gras sont reflétées dans les acides gras saturés totaux

(AGAS), mono-insaturés totaux, acides gras classés (MUFA) et acides gras polyinsaturés totaux (PUFA) contenus, qui sont également indiqués dans **le tableau 5**. Le contenu des acides gras saturés (AGSA) représentait moins de 11 % (3,47 mg/100 mg d'huile) des EMAG totaux détectés chez les espèces de *Rubus*, alors qu'il était supérieur à 15 % dans l'huile de graines de sureau (4,81 mg/100 mg d'huile).

Teneur en tocophérol

La teneur en tocophérols des huiles de graines est indiquée dans (**le tableau 5**). Les principaux isomères de tocophérol étaient les α - et β -tocophérols, tandis que β -, et les γ -tocophérols n'ont été détectés dans aucun des échantillons. c- Le tocophérol était le composé de vitamine E prédominant dans l'huile de la graine des espèces *Rubus ulmifolius* et *Sambucus nigra*. Les plus grandes quantités des tocophérols ont été trouvées dans l'huile de pépins de mûre (43,71 $\mu\text{g/g}_{\text{oil}}$). Les tocophérols des huiles végétales protègent les acides gras polyinsaturés de l'oxydation. Il a été rapporté que le tocophérols inhibent les lipide oxydation dans les tests ORAC (**Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan & Deemer, 2007**) et dans le paramètre antioxydant de piégeage des radicaux (**Cabrini et al., 2001**), l' α -tocophérol a le taux de vitamine E le plus élevé, tandis que le c-tocophérol montre une meilleure capacité antioxydante.

Activité antioxydante des extraits de résidus de graines

L'activité antiradicalaire des extraits a été évaluée selon la méthode DPPH. 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) un radical libre stable, et lorsqu'il réagit avec un radical piégeur, son absorbance maximale à 517 nm s'estompe rapidement. L'effet antioxydant est proportionnel à la disparition du DPPH dans les échantillons d'essai. Les extraits méthanoliques de graines de *Rubus ulmifolius* et de *Sambucus nigra* ont été examinés et comparées pour leurs radicales libres activités de piégeage du DPPH (**Espín, Soler-Rivas, & Wichers, 2000**). Il est important de souligner que le test DPPH a également été utilisé pour prédire la stabilité oxydative des huiles comestibles (**Lee, Chung, Chang et Lee, 2007**).

Les résultats de piégeage des radicaux sont présentés dans **le tableau 6**. Les extraits de tous les résidus de graines de fruits présentaient un pouvoir antioxydant significatif. Comme on peut le voir, les effets de piégeage de l'extrait méthanolique des graines de *Sambucus nigra* sur les radicaux DPPH augmentent avec la concentration. Le piégeage des radicaux libres DPPH de l'extrait à une concentration plus élevée (167 $\mu\text{g mL}^{-1}$) était comparable à ceux du Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tétrahydro-2H-chromène-2-carboxylique) utilisé comme référence externe (97,0% et 97,7 %, respectivement). En utilisant les résultats obtenus, la valeur de concentration efficace (EC50) a été déterminée (**Figure. 6**). Cela représente le montant de l'extrait qui provoque une diminution d'une concentration initiale de DPPH par 50% (**Brand-William et**

Cuvelier, 1995). Une valeur EC_{50} plus faible donc fait référence à une activité antioxydante plus élevée. Il peut être facile de constater que les graines de *Rubus ulmifolius* montraient un piégeage des radicaux libres plus élevé ($CE_{50} = 1,21 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mL}$) par rapport à celle du de graines de *Sambucus nigra* ($CE_{50} = 82,21 \pm 7,98 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tableau 6 : Teneur en phénols totaux, teneur en acide ellagique et pouvoir anti-radicalaire des extraits de *Rubus ulmifolius* et *Sambucus nigra*.

Extraits méthanoliques	Acide ellagique (mg/g _{graine})	Teneur totale en phénols (mg GAE/g _{extrait})	Activité antiradicalaire (%)	
Résidus de graines de <i>Sambucus nigra</i> L.	0.04 ± 0.001	54.2 ± 0.2	42.3 ± 1.6 55.0 ± 1.9 82.4 ± 0.9	42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Résidus de graines de <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	4.7 ± 0.2	171.4 ± 0.3	93.0 ± 1.6 95.6 ± 1.2 97.6 ± 1.1	42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$

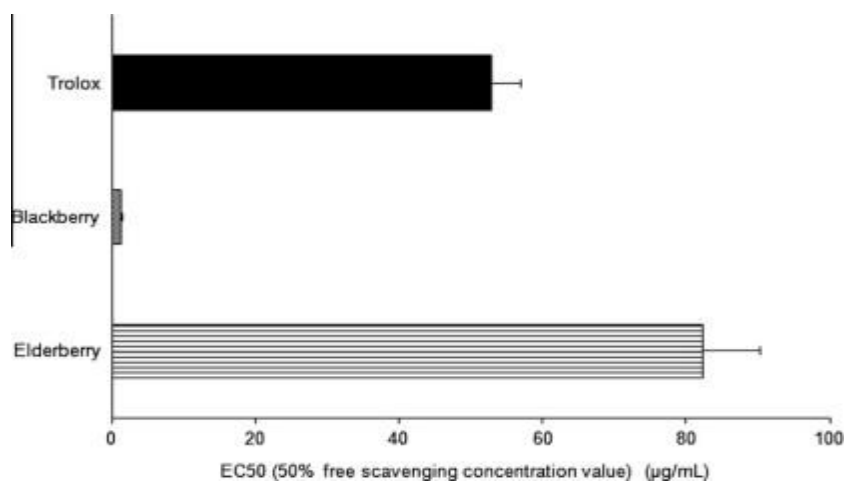


Figure 6. Valeurs EC_{50} des activités de piégeage des radicaux DPPH des extraits méthanoliques de graines de *Sambucus* et de *Rubus* (une barre plus courte indique une activité de piégeage des radicaux plus élevée).

Teneur phénolique totale (TPC) et teneur en acide ellagique des graines

La teneur phénolique totale (TPC) des extraits méthanoliques de la farine des graines dégraissée a été déterminé avec la méthode de Folin-Ciocalteu, et les résultats obtenus exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique par g d'extrait (**tableau 6**). Les valeurs de l'activité de piégeage des radicaux ont été directement rapporté à la quantité totale de composés phénoliques détectés dans les extraits méthanoliques de graines (**tableau 6**). Le contenu phénolique total de pépins de mûre (171,4 mg GAE/_gextrait) était plus élevé que celle de graines de sureau (54,2 mg GAE/_gextrait). Ces valeurs montrent que la teneur totale en composés phénoliques des extraits de résidus de graines était fortement corrélée activité antioxydante, suggérant que les composés phénoliques contribuent à leurs capacités antioxydantes. Ces données indiquent que ces graines de fruits peuvent potentiellement servir de sources de composés phénoliques alimentaires. Il a été rapporté que l'acide ellagique et les ellagitanins sont abondants. Dans les mûres noirs (**Hager, Howard, Liyanage, Lay et Ronald, 2008**). Les auteurs de cet article ont estimé la teneur totale en acide ellagique des graines après hydrolyse acide de manière à inclure les ellagitanins dans l'estimation. Là les résultats ont montré une différence frappante dans la teneur totale en acide ellagique des espèces *Rubus ulmifolius* et *Sambucus nigra* (**tableau 6**).

Identification des composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de graines :

L'analyse HPLC LC-MS utilisée dans la présente étude a permis l'identification des principaux composés phénoliques (**tableau 7**).

Tableau 7 : Détection HPLC–ESI–MS/MS de composés phénoliques dans des extraits de graines de Rubus et Sambucus sauvages

Extraits méthanoliques	Affectation provisoire des pics	[M+H] ⁺ m/z	MS/MS fragment	[MH] ⁻ m/z	MS/MS fragment
Sambucus nigra L.	Cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside	743	581 287		
	Pelargonidin-3-rutinoside	579	271		
	Quercetin-3-rutinoside			609	301
	Quercetin-3-glucoside			463	301
Rubus ulmifolius Schott	Cyanidin 3-glucoside	449	287		
	Ellagic acid			301	

	Galloyl-HHDP glucose			633	301
	Galloyl-bis- HHDP glucose			935	783,433,301

Parmi les composés phénoliques identifiés dans les résidus de graines de *Sambucus nigra* : deux anthocyanes : la cyanidine 3-sambubioside-5-glucoside, précédemment identifié dans les fruits et tiges de *S. nigra* (Veberic, Jakopic, Stampar et Schmitzer, 2009) et pélargonidine-3-rutinoside. Deux flavonols ont été identifiés comme glucoside et rutinoside de quercétine : la rutine (quercétine-3-rutinoside) et la quercétine- 3-glucoside. L'ion à m/z 609 [MH]⁺ était identifié comme quercétine-3-rutinoside sur la base d'études comparatives fragmentation (Lin, Chen, Ozcan et Harnly, 2008). Le fragment MS₂mentation de l'ion parent à m/z 463 correspond à la neutre perte d'un fragment glucose, identifiant ainsi le pic comme étant la quercétine hexoside. Les analyses HPLC–ESI–MS de l'extrait de graines de *Rubus ulmifolius* ont permis l'identification d'une anthocyanine, la cyanidine 3-glucoside ([M+H]⁺ à m/z 449), acide ellagique ([MH] à m/z 301) et deux ellagitanins (Hager et al., 2008) : glucose galloyl-HHDP ([MH] à m/z 633) et glucose galloyl-bis-HHDP ([MH] à m/z 935). Le composé avec un m/z de 633 était supposé être un isomère de galloyl-HHDP glucose, avec un seul groupe hexahydroxydiphénolique attaché au fragment glucose. Il n'y avait qu'un seul ion fragment observé à m/z 301. Sur la base d'études antérieures, le composé avec un m/z de 935 était très probablement un isomère de la structure couramment appelé glucose galloyl-bis-HHDP ou casuarictine/potentilline. Le modèle de fragmentation, y compris m/z 783 et 301, était probablement dû à la perte de fragments HHDP de l'unité glycolyse.

Effet des extraits sur la production de NO et de CCL20

Plusieurs études ont montré que les baies peuvent posséder des propriétés anti-inflammatoires (Juranic, 2005 ; Lau et al 2007 ; Seeram, 2008; Szajdek et Borowska, 2008). En revanche, l'activité anti-inflammatoire des extraits de graines de baies a reçu peu d'attention. Un seul travail rapportant les effets anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* des extraits de graines de muscadine (*Vitis rotundifolia*) a signalé à ce jour (Bralley et al., 2007). Dans ce travail, les extraits méthanoliques des graines de sauvage de la mûre (*R. Ulmifolius* Schott) et le sureau (*S. nigra*) ont été comparés pour leurs propriétés anti-inflammatoires *in vitro*. Dans ce travail, les chercheurs ont d'abord évalué les capacités à inhiber la production d'oxyde nitrique induite par le LPS dans les macrophages RAW264.7. Le NO est un marqueur inflammatoire tardif formé

par l'activation de l'oxyde nitrique synthèse inductible (iNOS)(**Stampler et al., 1992**). L'effet sur la production de NO a été déterminé à 48 h. Comme le montre **la Figure. 7**, l'extrait de mûre diminue la libération de NO d'une manière dépendante de la concentration avec une inhibition de près de 60 % d'inhibition à la dose la plus élevée (50 µg/mL). En revanche, l'extrait de sureau n'a pas eu d'effet significatif sur le NO. Par ailleurs, ils ont étudié les effets des deux extraits sur l'inflammation du macrophage protéine motrice-3a/CCL20. CCL20 est une chimio kiné importante pour réponse immunitaire et inflammatoire (**Varesio, Battaglia, Raggi, Ledda et Bosco, 2010**). Les résultats de cette étude montrent que les extraits méthanoliques des mûres sont capables de diminuer l'inflammation *in vitro* en inhibant le NO et le CCL20 induits par le LPS dans les macrophages. Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'activité de piégeage des radicaux (**Figure. 8**), confirmant ainsi que le contenu de l'extrait phénolique est principalement responsable du piégeage des radicaux libres et des capacités anti-inflammatoires.

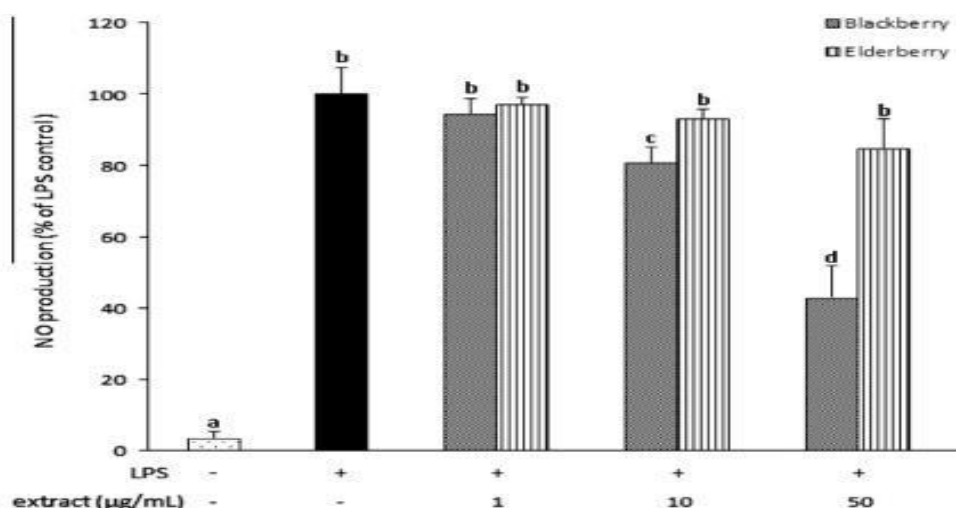


Figure 7. Réduction dépendante de la concentration de la libération de NO induite par le lipopolysaccharide (LPS) des macrophages RAW264.7 par des extraits méthanoliques préparés à partir de graines de mûre et de sureau.

Les macrophages RAW264.7 ont étéensemencés à une densité de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL et incubés pendant 48 h avec du LPS (0,5 µg/mL) et en augmentant concentrations d'extraits. Le surnageant des cellules a été analysé pour la production de nitrite par la méthode de Grises. Les données sont exprimées en pourcentage, où la stimulation LPS (avec véhicule uniquement) a été fixée à 100 %. Les valeurs sont des moyennes de trois expériences distinctes (chacune réalisée en double) et les écarts types sont représentés par des barres verticales. Partagé les lettres au-dessus des barres n'indiquent aucune différence statistiquement significative ($p > 0,05$), tandis que des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

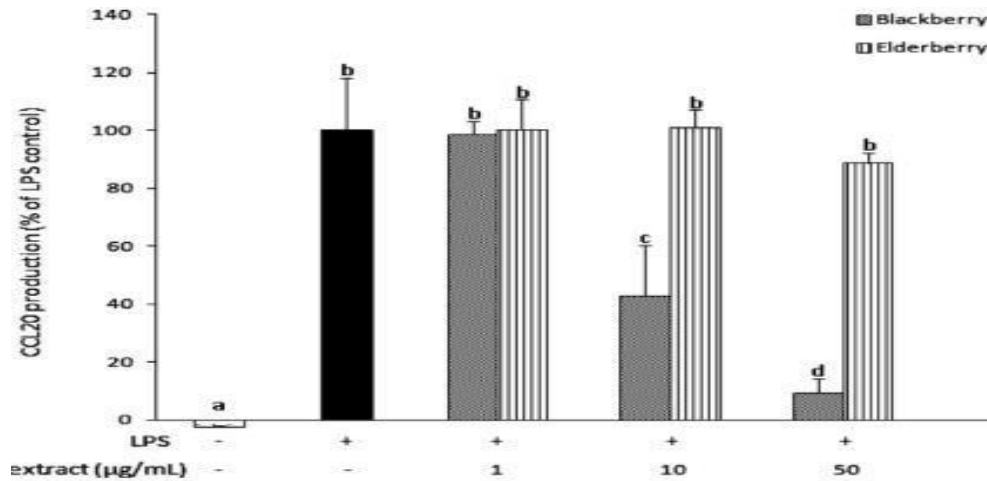


Figure 8. Réduction dépendante de la concentration de la libération de protéine inflammatoire macrophage-3 α /CCL20 induite par le lipopolysaccharide (LPS) à partir des macrophages RAW264.7 par extraits méthanoliques préparés à partir de graines de mûre et de sureau.

Les macrophages RAW264.7 ont étéensemencés à une densité de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL et incubés pendant 24 h avec du LPS ($0,5 \mu\text{g/mL}$) et des concentrations croissantes d'extraits. Le surnageant des cellules a été analysé pour la production de CCL20 par ELISA. Les données sont exprimées en pourcentage, où LPS la stimulation (avec véhicule uniquement) a été fixée à 100 %. Les valeurs sont des moyennes de trois expériences distinctes (chacune effectuée en double) et les écarts types sont représentés par des barres. Les lettres partagées au-dessus des barres n'indiquent aucune différence statistiquement significative ($p > 0,05$), tandis que des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$)

Discussion générale

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire de l'organisme qui se met en place suite à une menace, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (**Geng et al., 2014 ; Haioun et Zohra, 2015 ; Du et al., 2018**). Elle est souvent suivie par une dilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration de cellules et de certaines molécules du sang vers les tissus où l'agression a été localisée, favorisant ainsi rougeur, chaleur, œdème et douleur (**Pacheco-Sanchez et al., 2006 ; Geng et al., 2014**). C'est la première ligne de défense de l'organisme.

Le processus inflammatoire implique une diversité de molécules appelée médiateurs inflammatoires. Parmi elles, on peut citer : les cytokines, l'oxyde nitrique, les médiateurs lipidiques et même des radicaux libres oxygénés (**Diallo, 2019**).

Face à l'émergence de nouvelles maladies chroniques notamment les maladies inflammatoires et aux multiples effets indésirables de certains traitements chimiques médicamenteux plusieurs chercheurs se sont intéressés à de nouvelles alternatives thérapeutiques comme la phytothérapie, l'aromathérapie, la supplémentation alimentaire et la mycothérapie (**Diallo, 2019**).

Compte tenu du grand nombre de molécules biologiquement actives que contiennent les plantes médicinales et qui font actuellement l'objet d'une large attention. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de l'espèce *Rubus ulmifolius*.

Dans le 1^{er} article analysé, **Pandey et al. (2013)** ont étudié l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Rubus ulmifolius*. L'extrait a montré d'importants effets anti-inflammatoires. Lorsque l'extrait a été étudié pour son effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, Le groupe traité à 200mg/kg ainsi que le groupe traité à 400 mg/kg a montré une bonne inhibition de l'inflammation par rapport au médicament standard. Les extraits sont significatifs et efficaces. (**Pandey et al., 2013**).

Par ailleurs, **Fazio et al. (2012)** ont analysé les graines des espèces de *Sambucus nigra* et *Rubus ulmifolius* afin d'identifier leurs composants bioactifs et de déterminer les activités Antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits. Les résultats ont démontré que l'huile de graines de *Rubus ulmifolius* est riche en acides gras mono-insaturés (MUFAs), qui consistent principalement en acide oléique. Il convient de noter que les sociétés de nutrition recommandent un apport d'AG n-6/n-3 de 5:1 pour une alimentation saine (**Dach, 2002**). IL convient de mentionner que des études antérieures ont fait état des propriétés anti-inflammatoires des extraits de mûre. **Pergola et al. 2006** ont rapporté des effets inhibiteurs de l'extrait de mûre sur le NO biosynthèse dans la lignée cellulaire murine monocyte/macrophage J774 stimulée par le lipo-polysaccharide. De plus, il a été rapporté que des extraits phénoliques de mûres inhibent

les voies iNOS/NO et COX-2/PGE2 induites par le LPS dans les macrophages RAW 264.7 (Cuevas-Rodriguez *et al.*, 2010). Cependant, dans les articles sélectionnés dans ce présent travail, les auteurs ont montré pour la première fois que les graines de mûre inhibent la production de NO induite par le LPS *in vitro*. De plus, l'effet inhibiteur sur CCL20 de l'extrait de mûre est rapporté pour la première fois aussi (Fazio *et al.*, 2012). Les résultats ont montré que les extraits méthanoliques des graines de *Rubus ulmifolius* ont de fortes propriétés Antioxydantes et anti-inflammatoires et pourraient représenter une source intéressante de composés bioactifs pour des applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Des études antérieures menées sur l'espèce du même genre *Rubus fruticosus* ont démontré que son activité anti-inflammatoire est fort probablement attribuée à sa richesse en composés phénoliques (Tangney et Rasmussen, 2013 ; Zeinalia *et al.*, 2017).

D'autres 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).

Conclusion générale

À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments pour traiter les inflammations, les leucorrhées, les œdèmes, l'hypertension...

Les composés phytochimiques issus du règne végétal et fongique sont très nombreux avec une gamme variée d'activités biologiques. Certains parmi eux, possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles particulières la COX-1 et -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2), etc. Ces molécules présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires.

Rubus ulmifolius Schott., qui appartient à la famille des Rosacées et présente dans presque toute l'Europe, l'Afrique du Nord et le sud de l'Asie. Les différentes parties de la plante sont d'une importance primordiale. Ayant des vertus médicinales, elles sont utilisées pour le traitement de certaines maladies.

Cette étude avait pour but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de *R. ulmifolius* à travers l'analyse de deux articles scientifiques qui traitent l'activité anti-inflammatoire de cette espèce. Dans l'article 1, l'extrait éthanolique a montré une importante activité anti-inflammatoire.

Par ailleurs, les auteurs du 2^{ème} article analysé ont étudié les graines des espèces de *Sambucus nigra* et *Rubus ulmifolius* et ont identifié leurs composants bioactifs par HPLC et prouvé les potentiels Antioxydants et anti-inflammatoires des extraits méthanoliques des deux espèces.

Nous pouvons conclure après cette analyse que l'espèce *Rubus ulmifolius* Schott. a plusieurs fonctions biologiques, notamment : l'anti-inflammatoire, grâce à la présence de composants bioactifs dans ces différents organes.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires poussées sur d'autres composés par d'autres techniques, afin d'établir une relation structure-activité.

Références bibliographiques

A

Allali, H, Benmehdi, H, Dib, M. A, Tabti, B, Ghalem, S, Benabadji, N, (2008). Phototherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry*. 20: 2701- 2710

Akowauh GA, Zhari I, Norgyati I, Sadikun A, Khamsah SM (2004). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*. 87: 559—566.

B

BABA AISSA, (2000). Effets des plantes médicinales sur les maladies cardiovasculaire, par Messaouda Hireche Université de SENIA - Oran - Diplôme d'études supérieures en biochimie (2004)

Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.

Bouayyadi L., M. El Hafian, L. Zidane (2015)., Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc *Journal of Applied Biosciences*. 93:8760 v93i1.10

Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. L., & Hartle, D. K. (2007). Inhibition of hyaluronidase activity by *Vitis rotundifolia* (Muscadine) berry seeds and skins. *Pharmaceutical Biology*, 45, 667–673.

Brand-William, W., & Cuvelier, M. E. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.

C

Cabrini, L., Barzanti, V., Cipollone, M., Fiorentini, D., Grossi, G., Tolomelli, B., et al. (2001). Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6026–6032.

Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*;99(2):381—387.

Cuevas-Rodriguez, E. O., Dia, V. P., Yousef, G. G., Garcia-Saucedo, P. A., Lopez-Medina, J., Paredes-Lopez, O., et al. (2010). Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9542–9548.

D

DA SILVA, Liliana Primo, PEREIRA, Eliana, PIRES, Tânia CSP, et al. (2019). *Rubus ulmifolius Schott* fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food research international*, vol. 119, p. 34-43).

DACH (2002). Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series no. 724. Geneva: WHO.

De Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT.(2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*;1112(1- 2):31—63.

Desmier T (2016). Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de doctorat d'état, université de Limoges, France, 88 p.

Diallo I(2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture. *Médecine humaine et pathologie*. Université Montpellier, (2019). Français. ffNNT : MONTG042ff. fftel-02481192

E

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total freeradical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648–656.

F

Farkas O, Jakus J, Heberger K(1999). Quantitative structure–antioxidant activity relationships of flavonoid compounds. *Molecules*.(200)4;9(12):1079—1088.

Foley WJ, Iason GR, Mcarthur C. Rôle of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores - how far have we come in 25 years? In: *Nutritional ecology of herbivores: Proceedings of the 5th International Symposium on the Nutrition of Herbivores*. In: Jung, H-JG, Fahey, GC, editors, American Society of Animal Science. Savoy,. 130- 209 p

G

Gaussian, Frisch, M. J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.;Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.;Nakatsuji, H. et al. (2009).Gaussian, Inc., Wallingford CT,

Gerhard Vogel H (2002). *Drug Discovery of Evaluation Pharmacological Assays*. Springer, 2nd ed: 757).

H

Hager, J. T., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O., & Ronald, L. P. (2008). Ellagitanins composition of blackberry as determined by HPLC–ESI–MS and MALDI–TOF–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 661–669.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P (2007). Le stress oxydant. 62 (10) : 628-638.

Heifetz, A. «Quantum Mechanics in Drug Discovery: Methods in Molecular Biology», Ed; Springer US: New York, NY, 2020.

Hemingway RW (1989). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. In *Chemistry and significance of condensed tannins*. Springer, Boston, MA.. 83-107 p.

Hu, F. B. (2001). The balance between n-6 and n-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Nutrition*, 17, 741–742.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., & Deemer, E. K. (2007). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1815–1821.

I

IBBA, Antonella, PIRAS, Alessandra, ROSA, Antonella, et al. (2021). Fatty Acid Profile and Antimicrobial Activity of *Rubus ulmifolius* Schott Extracts Against Cariogenic Bacterium *Streptococcus mutans*.

J

Juranic, Z. (2005). Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, 23, 207–211.

K

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.

Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, J Vunduk J, Petrovic P, Niksic M, Vrvic MM, Griensven LV (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*.

Kumar V, Sharma A, Kohli SK, Bali S, Sharma M, Kumar R, Bhardwaj R, Thukral AK. (2019); Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnology Research and Innovation*. 3(1):1—21.

Kunnumakkara A.B., Sushovan G., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovane J., Bhart B.

(2007). Curcumin potentielles antitumor Activity of Gencitabine in an orthotopic model of Pencreatic cancer through. *Suppr*, 67 (8) : 3853- 61.b;20:19489—19525.

L

Lagrade, N(2014)., Thèse « Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine », Ecole doctorale Abbé Grégoire .

Lau, F., Bielinski, D., & Joseph, J. (2007). Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 1010–1017.

Lazli. A, Beldi. M, Ghouri. L, Nouri. N. E. H (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala,- Nord-est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 88 : 22 – 43.

Leclerc H (1999). Traité de phytothérapie - Thérapeutique par les plantes, Ed. Masson, 1999. *Medicinal Plants Research*. 7(11): 987-951.

Lucido, M. J.; Orlando, B. J.; Vecchio, A. J.; Malkowski, M. G. J. Biochemistry 2016, 55,1226–1238.

M

Manallah A. ,(2012) Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas-Sétif, Algérie. 132

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: .(2004); Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727—747.

Martin S, Andriantsitohaina R. (2002); Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51(6):304—315.

Martini. S, D'Addario. C, Colacevich.A, Focardi. S, Borghini. F, Santucci.A, Rossi.C, (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus Ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34(1), 50-59).

P

Pandey R, Pandey Ra et Shukla, S. S (2013). Anti-inflammatory potential of ethanol extract of *Rubus ulmifolius* (Schott). *Research Journal of Pharmacy and Technology*, , vol. 6, no 3, p. 300-303).

Panizzi. L, Caponi. C, Catalano. S, Cioni. P, Morelli. I, (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus Ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacol*, 79(2), 165–168).

Paul Iserin.(2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins. 2eme édition. Hong Kong. édition Larousse VUEF.

Perez-Vizcaino F, Duarte J. (2010). Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*.;31(6):478—494

Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., & Sautebin, L. (2006). Inhibition of nitric-oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide*,15, 30–39. *Res4(2):15-52* .

Permal A. (2017). Validation d'une méthode de dosage des tanins condensés dans les matières végétales. Pp : 9-13.

S

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.

Sarri, M., N. Hendel, A. Boudjelal and D. Sarri, (2012). Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in the region of Hodna (MSila-Algeria), *GJRMI*, Volume 1, Issue4, 97 - 100.

Seeram, N. P. (2008). Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627–629.

Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365–379.

Souilah. N, Madjroubi. K, (2018). Etude de la composition chimique et des propriétés thérapeutiques traditionnelles et modernes des huiles essentielles et des composés phénoliques de quelques espèces du Nord-est algérien. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, 95.

Stamper, J. S., Single, D., & Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898–1902.

R

Ruslan M. (2008). Origin and physiological roles of inflammation *Nature*, 454: 428- 435).

T

Tabarki. S, Aouadhi. C, Mechergui. K, Hammi. K. M, Ksouri. R, Raies. A, Toumi. L, (2017). Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus*

Tangney CC, Rasmussen HE (2013). Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 15(324):2-10.

Ulmifolius extracts originating from four regions of Tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(1).

Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, Della Loggia R. (1986). In the croton oil ear test the effects of nonsteroidal anti inflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*. 19(5-61);:371–373.

Varesio, L., Battaglia, F., Raggi, F., Ledda, B., & Bosco, M. C. (2010). Macrophage-inflammatory protein-3a/CCL-20 is transcriptionally induced by the ironchelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclearfactor (NF)-kB. *Molecular Immunology*, 47, 685–693.

Veberic,R.,Jakopic, J., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2009). European elderberry(*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selectedpolyphenols. *Food Chemistry*, 114, 511–515.

Veeraraghavan Prema. (2012). Expert consultant, CPCSEA, OEC guideline No. 420. Volume 1, Issue4, 97 – 100.

W

Wada. L, Ou. B, (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3495–3500).

Y

Yougbare-Ziebrou, M.N, Ouedraogo, N, Lompo, M, et al.(2015). Activités anti inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, vol. 14, p 213–21.

Z

Zeghad N(2009).. Etude de contenu polyphenolique de deux plante medicinale d interet économique (thymus vulgarisé, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne.

Magister. Université Constantine.

Zeghad N(2018).. Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de *vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *opuntia ficus-indica*. Thèse.

Zeinalia M, Rezaeic SA, Hosseinzadeha H (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*. 92:998–1009.

Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V., Jaafar H Z., Moga M. (2014). *Rubus fruticosus* L: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*. 19(8): 10998-11029

Annexes

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts

Alessia Fazio^{a,*}, Pierluigi Plastina^{a,b}, Jocelijn Meijerink^b, Renger F. Witkamp^b, Bartolo Gabriele^{a,*}^a Department of Pharmaceutical Sciences, University of Calabria, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy^b Division of Human Nutrition, Wageningen University, 6700 EV Wageningen, Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Rubus and *Sambucus* fruit seeds
Fatty acid profile
Tocopherol composition
DPPH radical scavenging activity
Total phenolic content
Ellagic acid content
Anti-inflammatory
Nitric oxide
CCL20

ABSTRACT

Fruit seeds are byproducts from fruit processing. Characterisation of the bioactive compounds present in seeds and evaluation of their potential biological properties is therefore of particular importance in view of a possible valorisation of seeds as a source of health beneficial components. In this work, we have analysed the seeds of *Sambucus* and *Rubus* species in order to identify their bioactive components and to determine the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts. We first analysed their oil content, in order to assess the fatty acid profile and tocopherol content. Moreover, the methanolic extracts of the seeds were analysed for their total phenolic contents and antioxidant capacities. Polyphenols were identified by HPLC–ESI–MS/MS analysis. Furthermore, extracts were evaluated for their inhibitory effects on the production of LPS-induced inflammatory mediators (NO, CCL-20) in RAW 264.7 cells.

Our findings show that the methanolic extracts from *Rubus* seeds have strong antioxidant and anti-inflammatory properties and could therefore represent an attractive source of bioactive compounds for food, cosmetic, or pharmaceutical applications.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rubus ulmifolius Schott is a trailing perennial shrub of the *Rosa-ceae* family that grows in dry or sandy soil. It is commonly known as elm-leaf blackberry in English and zarzamora in Spanish. It has been introduced widely in Europe and North Africa, and tends to colonise both natural and semi-natural ecosystems. It is distributed in Italy from the sea level to ca. 1100 m (Pignatti, 1982). The fruit is not a true berry; botanically it is termed as an aggregate fruit, composed of small drupelets. Fresh bruised leaves are used in Italian folk medicine for the treatment of abscesses, furuncles and ulcers, while decoctions of leaves are used externally for reddened eyes, vaginal lavages and aphtha and internally for diarrhoea, haemorrhoids and intestinal inflammations (Uncini Manganelli & Tomei, 1999). In Chilean folk medicine, *R. ulmifolius* is used for its hypoglycaemic activity experimentally demonstrated in rats (Lemus, Garcia, Delvillar, & Knop, 1999). Pure compounds, isolated from the plant, such as ursane, oleanane triterpenes and flavonoid glycosides, exert antimicrobial activity on several microorganisms and particularly on *Staphylococcus aureus*, a multidrug resistant bacterium (Panizzi, Caponi, Catalano, Cioni, & Morelli, 2002).

Sambucus nigra L., also called elderberry, is a widespread species of the *Caprifoliaceae* family, which grows on sunlight-exposed locations in many zones of Europe, Asia, North Africa and the USA. It is a deciduous shrub reaching up to 6 m in height, developing small, white hermaphrodite flowers in large corymbs, and flowering in early summer. Umbels consist of dark purple individual berries, with a diameter up to 6 mm; the fruits ripen in late summer.

Elderberry leaves are utilised for medicinal preparation for cutaneous use (Dawidowicz, Wianowska, & Baraniak, 2006; Lee & Finn, 2007). The dried flowers are used to flavour alcoholic beverages, bitter and white wine. The fresh fruits are seldom used for fresh consumption; mostly they are processed to concentrates and juices.

Elderberry cultivars contain high concentrations of anthocyanins and flavonoids, which exhibit antioxidant, anticarcinogenic, immune-stimulating, antibacterial, antiallergic and antiviral properties. Therefore, elderberry fruit consumption may contribute to the prevention of several degenerative diseases, such as cardiovascular disease, cancer, inflammatory disease and diabetes (Bonertz, Würth, & Dietrich, 2006; Brambilla, Lo Scalzo, Bertolo, & Torreggiani, 2008; Lata & Tomala, 2007; Nakajima, Tanaka, Seo, Yamazaki, & Saito, 2004).

Fruit seeds are byproducts of fruit processing, and the seed residue is the primary byproduct of seed oil production. It is a source of valuable food ingredients and beneficial compounds (Parry et al., 2005). Recent studies have shown that berry seed residues may

* Corresponding authors. Tel.: +39 984 492812/13; fax: +39 984 492044.

E-mail addresses: a.fazio@unical.it (A. Fazio), b.gabriele@unical.it (B. Gabriele).

contain significant levels of compounds with antioxidants and anti-proliferative components (Parry et al., 2006). Characterisation of bioactive components in the fruit seed flours and demonstration of their potential beneficial properties may lead to value-added utilisation of these fruit seed flours and enhance the profitability of the fruit production and processing industries and of the fruit seed oil manufacturers.

The objects of the present study were to compare the berry seed oil of Southern Italy blackberries (*R. ulmifolius* Schott) and elderberries (*S. nigra* L.) growing wild in Calabria (Southern Italy) and to investigate the seed flours of these berries for their total phenolic content, total fat and fatty acid composition, free radical scavenging capacities, tocopherol and ellagic acid content. In addition, the anti-inflammatory properties were evaluated in vitro using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages by investigating the production of nitric oxide and CCL20. The data obtained from this study will be useful in view of the potential utilisation of these edible seed flours in food products for improving human health.

2. Materials and methods

2.1. Berries

The ripe fruits of *R. ulmifolius* and *S. nigra* L. were picked randomly from different parts of wild bushes on mountain slopes at an altitude of 1000 m above sea level (Contrada Pallone, Cosenza). The freeze-dried fruits were crushed in a mortar and were sieved using a 60 mesh screen to achieve the separation of seeds from the pulp. Pigments on the seeds were washed off with tap water until the washing water was clear. The seeds were spread onto a sieve to allow them to dry at room conditions for approximately 24 h. The seeds were ground with an electric immersion grinder and dried in an oven at $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight ($t = 2\text{ h}$). The seed flour samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to analysis. All analyses were performed using triplicate samples; the results are expressed on a dry matter basis.

2.2. Chemicals and reagents

Petroleum ether, methanol, ethanol, benzene, hexane, DMSO (ACS grade), acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), sodium hydroxide, anhydrous sodium sulphate and potassium carbonate were purchased from Carlo Erba Reagenti (Milan, Italy). Pyrogallol, trifluoroacetic acid and the methyl esters of miristic (C14:0), palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2), linolenic (C18:3), arachidic (C20:0), gadoleic (C20:1), behenic acids (C22:0) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Milan, Italy). Methyl tridecanoate (C13:0, Sigma-Aldrich Co., Italy) was used as the internal standard. Acetyl chloride, purchased from Sigma-Aldrich, was re-distilled before use. 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), the Folin-Ciocalteu reagent, standards of gallic and ellagic acids and α -tocopherol and γ -tocopherol were also purchased from Sigma-Aldrich. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, streptomycin and penicillin were acquired from Lonza (Verviers SPRL, Belgium). LPS (*E. coli* O111:B4) was obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Griess reagents and nitrite standard were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). The ELISA kit to determine CCL20 was purchased from R&D Systems (Abingdon, UK).

2.3. Oil content

The dried seed flour (10 g) was extracted with petroleum ether (150 mL, boiling range 30–60 °C) using a Soxhlet apparatus at 80 °C

for 24 h. The extraction of the seed residue was repeated twice using hexane as the solvent (150 mL, boiling point = 69 °C) at 90 °C for 2 h. The extracts were collected, the solvent was evaporated in a rotary evaporator at 35 °C to dryness, and the residue was dried under vacuum. The oil content was expressed on a dry seed weight flour. Data are reported as a mean value \pm standard deviation (SD) of three samples of each species (*R. ulmifolius* and *S. nigra* L.). Solventless lipids were transferred to brown airtight containers, flushed with nitrogen and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.4. Fatty acid composition

The fatty acid composition was determined in triplicate by gas chromatography (HRGC) of the oils after transesterification.

2.4.1. Direct transesterification

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared from the oils according to the previously described method using acetyl chloride in MeOH and benzene (Lepage & Roy, 1986). 100 mg of dried oil were precisely weighed in a borosilicate glass tubes. 50 μg of tridecanoic acid (C13:0), as internal standard, dissolved in 2 mL of methanol–benzene 4:1 (v/v) were added to the sample. To the mixture 200 μL of acetyl chloride were slowly added, with stirring, over a period of 1 min. The tube was tightly closed with Teflon-lined caps. After stirring at 100 °C for 1 h, the mixture was cooled to room temperature and 5 mL of a 6% K_2CO_3 solution were slowly added with stirring to stop the reaction and neutralize the mixture. The esters were extracted with hexane ($4 \times 2\text{ mL}$). The supernatants containing the fatty acid methyl esters were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residual oil was then transferred to a vial under nitrogen gas. The dried extracts were analysed immediately.

2.4.2. HRGC–FID analysis

GLC analyses were carried out on a Shimadzu GC-2010 system equipped with an AOC-20i autosampler, split/splitless injector, and a FID detector (Shimadzu, Milan, Italy), and were performed at the following experimental conditions: the column used was a fused-silica capillary column (Supelcowax™ 10) (30 m \times 0.32 mm id \times 0.25 μm); the oven temperature was programmed from an initial temperature of 80 °C (5 min hold), raising to 230 °C at a rate of 3.0 °C/min; the injection volume was 1.0 μL , in the split mode (17:1). Helium was used as carrier gas. The detector temperature was set at 250 °C. The hydrogen flow rate was 47.0 mL min^{-1} ; the air flow rate was 400 mL min^{-1} ; the make-up flow rate (N_2/Air) was 30 mL min^{-1} . All samples were dissolved in *n*-hexane for injection (1/10 v/v). Fatty acids (FA) were identified by comparison of the retention times observed with those of the commercial fatty acid methyl esters (FAMES). The quantitative determination was obtained by the external standard method and the results are reported as mg per 100 g of extracted oil. Data are reported as a mean value \pm SD of three samples of each species (*R. ulmifolius* and *S. nigra* L.), analysed individually in triplicate.

2.5. Tocopherols

Tocopherols were extracted from the oils according to a known method (Bushman et al., 2004; Kim et al., 2002). The oil (0.1 g) was mixed with ethanolic pyrogallol (5%, 4 mL) in a 25 mL round-bottomed flask fitted with a reflux condenser, and saponified with 1.5 mL of saturated aqueous KOH for 30 min in an oil bath at 80 °C. Samples were cooled to room temperature, then 8 mL of water were added. Unsaponifiables were extracted three times with 5 mL of hexane, vacuum dried and re-suspended in 1:1 methanol:ethanol (v/v).

Tocopherols were analysed using a Shimadzu HPLC system, equipped with two SCL-10-AVP pumps, an SLC-10-AVP controller, and an SPD-20A UV/vis detector: the column used was a discovery HS C18 (Supelco) (250 mm × 4.6 mm id, 5 µm particle size). The HPLC was operated in isocratic mode at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was methanol/acetonitrile (75:25, v/v). The peaks were detected at 292 nm. The external standard curves were made with pure α- and γ-tocopherol. The standard tocopherol was diluted to concentrations of 100–10 µg/mL of methanol.

2.6. Extraction of polyphenols from defatted seed residues

Defatted seed flour (3 g) was extracted three times for 16 h at room temperature by stirring with methanol (10 mL solvent/g of flour). Between extractions, the samples were centrifuged for 10 min with a speed of 2000 rpm. The combined supernatants were collected, filtered through Whatman No. 1 filter paper and evaporated to dryness. The residual crude methanolic seed extract was weighed and stored in brown airtight containers at –20 °C under a nitrogen gas stream. Extractions were performed in triplicate.

2.6.1. Determination of total phenolic content

The total phenolic content of each fraction was determined using the Folin–Ciocalteu method with some modification (Liu & Yao, 2007). Briefly, 100 µL of extract solution (1 mg mL⁻¹ MeOH) was shaken for 1 min with 1 mL of diluted (1:10) Folin–Ciocalteu reagent. Then 800 µL of 10% Na₂CO₃ was added and the final volume was made up to 5.0 mL with distilled water. After the mixture was left to stand for 2 h at room temperature, the absorbance at 760 nm was measured by using a UV–vis spectrophotometer (model V-550, Jasco, Europe). The results of total phenolic content were estimated using a standard curve prepared using gallic acid and expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of extract.

2.6.2. Determination of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging activity

The free radical scavenging activity against DPPH was determined at three different concentrations according to a known protocol (Butsat & Siriamornpun, 2010; Jayaprakasha & Bhimanagouda, 2007) with some modifications. Thus, MeOH solutions containing known amounts of the extract and of DPPH were prepared, and the colorimetric decrease in absorbance of DPPH was measured at 517 nm after a period of 20 min since preparation. More specifically, standard MeOH solutions of the extract (1.0 mg mL⁻¹ MeOH) and DPPH (3.9 mg in 10 mL of MeOH, corresponding to 1 mM) were prepared. Different volumes of the extract solution (125, 250, and 500 µL) were mixed with 100 µL of the DPPH solution, and the final volume adjusted to 3 mL by the addition of the necessary amount of MeOH. In this way, three different solutions with extract concentration of 42, 83, and 167 µg of extract per mL of solution were obtained for each extract (the extract solution was prepared with an extract concentration of 1.0 mg of extract per mL of MeOH, so 125, 250, and 500 µL of the extract solution corresponded to 125, 250, and 500 µg of extract, respectively; considering that the volume of the final solutions, after the addition of DPPH and MeOH, was 3 mL, the concentrations of the final solutions were 42, 83, and 167 µg of extract per mL of solution, respectively). The mixtures were shaken vigorously and left standing at room temperature in the dark for 20 min. The absorbance of each sample was then measured against blank (the DPPH solution obtained by diluting 100 µL of the DPPH standard solution with MeOH to give a final volume of 3 mL) at 517 nm using a UV–vis spectrophotometer (model V-550, Jasco Europe). Experiments were carried out in triplicate, and Trolox was used as the positive reference antioxidant. The % of scavenging activity on DPPH was calculated according to the formula:

$$\text{DPPH scavenging ability(\%)} = \frac{(\text{Absorbance}_{517\text{nm of control}} - \text{Absorbance}_{517\text{nm of sample}}) / \text{Absorbance}_{517\text{nm of control}}}{\times 100}$$

2.6.3. Determination of EC₅₀ values

The EC₅₀ values (50% free scavenging concentration values) of the extracts were determined using the correlation and regression programmer of the Graph Pad Prism program, (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Briefly, values were log-transformed and normalised, and nonlinear regression analysis was used to generate a sigmoidal dose–response curve to calculate EC₅₀ values. The results are given as mean values ± SD (n = 3).

2.7. Ellagic acid analyses

Five grams of the ground seeds were extracted three times with methanol using a Soxhlet apparatus at 100 °C for 24 h (Bushman et al., 2004). The combined extracts were then evaporated to dryness and hydrolysed in 2 N trifluoroacetic acid in methanol at 100 °C for 2 h (containing total ellagic acid). Then, the idrolysate was dried under vacuum and redissolved in 3 mL of 1:1 methanol:DMSO (v/v).

Identification and quantification of ellagic acid in the extracts were performed using a Shimadzu HPLC system, equipped with two SCL-10-AVP pumps, an SLC-10-AVP controller, and an SPD-20A UV/vis detector: the column used was a discovery HS C18 (Supelco) (250 mm × 4.6 mm id, 5 µm particle size) at the wavelength of 280 nm. The binary mobile phase consisted of (A) water, acetonitrile, and acetic acid (89:9:2, v/v) and (B) water and acetonitrile (20:80, v/v) at a flow rate of 1 mL/min.: from 0 to 25 min, 0% solvent B; from 25 to 60 min 100% linear gradient from 0% to 100% solvent B; from 60 to 70 min, 100% solvent B; from 70 to 80 min, linear gradient from 100% to 0% solvent B. The detector was set at 280 nm. Quantitative determination was carried out by the external calibration method, using ellagic acid as external standard.

2.8. Characterisation of polyphenols by HPLC–ESI–MS/MS

The characterisation of polyphenols in seed methanolic extracts was performed using HPLC–ESI–MS. Blackberry dry extracts were dissolved in methanol (100 µg/mL) while elderberry seed extracts were solubilised in DMSO (100 µg/mL). Analyses were acquired on an ABSciex API 2000 mass spectrometer fitted with an electrospray ionisation (ESI) interface and coupled with a JASCO PU-2080PLUS HPLC. Polyphenols were analysed using an RP C18 column (Supelco) (150 mm × 4.6 mm id, 5 µm particle size). The compounds were separated with gradient elution using 0.5% aqueous formic acid (A) and acetonitrile containing 0.5% of formic acid (B) as eluents. Samples were eluted over a gradient programmed as follows: 0–10 min, 5% B; 10–60 min, 55% B; 60–80 min, 100% B, 80–90 min, 5% B. The injected volume was 20 µL at a flow rate of 300 µL/min. The samples were analysed in positive-ion and negative-ion modes scanning from m/z 200 to m/z 1800 at a scan rate of 5.2 s/cycle. MS parameters were as follows: ionspray voltage (IS) 5000 V; temperature, 350 °C; ion source gas (GS1) 50 psi; ion source gas (GS2) 55 psi; curtain gas (CUR), 20 psi; declustering (DP) and focusing potentials (FP), 30 and 400 V, respectively.

2.9. Cell culture

RAW264.7 macrophages (murine origin) were obtained from the American Type Culture Collection (Teddington, UK). They were grown and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, streptomycin and penicillin at 37 °C in a 5% CO₂

humidified air atmosphere. Effects of the extracts on the viability of the RAW264.7 cells were assessed using an XTT Cell Proliferation Kit II (Roche Applied Science, Almere, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were first incubated with the test extracts. After 48 h, the cell viability was evaluated by tetrazolium salt (ZTT) assay, measuring cells' ability to metabolise XTT to formazan. Conditions were considered toxic if metabolic activity to form formazan was decreased by >20%. As a negative control, Triton X100 was added to the cells, yielding total cell lysis.

2.10. Effects of extracts on nitric oxide release, and CCL-20 production

RAW264.7 macrophages were seeded into 48-well cell culture plates (2.5×10^5 cells/mL) for nitrite and ELISA measurements, or into 96-well plates for cell viability tests, and incubated overnight. Adherent cells were incubated with the test extracts or vehicle in duplicate, with or without LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$). Ethanol was used as the solvent and final solvent concentration never exceeded 0.1%, v/v. Incubation times were different on the basis of the specific properties of different inflammatory mediators. After incubating for 48 h, nitrite accumulated in the culture medium was measured as an indication of NO production using the Griess method (Green et al., 1982). Briefly, 100 μL of the cell culture medium were mixed with 100 μL of Griess reagents and incubated at room temperature for 10 min. Absorbance was measured at 540 nm using an ELISA plate reader. CCL20 levels were assessed by using ELISA according to the manufacturer's instructions, after 24 h incubation.

2.11. Statistical analysis

Three independent experiments (each performed in duplicate) were carried out with RAW264.7 macrophages. Data from these experiments are expressed as percentage of the LPS-treated controls (set at 100%). Data are presented as means \pm standard deviation (see legends of the figures). Statistical differences between treatments and controls were evaluated by unpaired *t*-test. A *p* value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Oil content of seeds

The oil contents of the seeds from wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species are reported in Table 1 and are expressed on a dry seed weight flour (10 g). The yields, referred to the starting seed flour and expressed in % w/w, do not vary significantly within the species analysed (10.5–15.9%).

As shown in Table 1, the oil content of blackberry seeds (15.9%) was higher than that of elderberry seeds (10.5%).

3.2. Fatty acid composition of the oils

The fatty acid compositions of the oils are reported in Table 1. The fatty acid profiles of the seed oils of both species (*Rubus* and *Sambucus*) were determined by gas chromatography using methyl tridecanoate as internal standard. There were no qualitative differences in the fatty acid profiles of the oil in both species, except for the myristic acid, which is absent in the oil of blackberry seeds. The most represented fatty acids were linoleic, oleic and linolenic acids (84.0–88.6%) in oil seed of both species. In *Rubus* and *Sambucus* seed oils, linoleic acid was the main component among all FAs (38.4–48.8%). The oleic acid percentage in *Rubus* seed oil resulted to be 26.5%; this was approximately two times higher than that

Table 1
Oil and tocopherol content and fatty acid composition of seed flours (g/100 g_{oil})^a.

	<i>Rubus ulmifolius</i> S.	<i>Sambucus nigra</i> L.
Oil content ^b	1.05 \pm 0.04	1.59 \pm 0.02
C14:0	0.0	0.04 \pm 0.002
C16:0	2.45 \pm 0.07	4.07 \pm 0.17
C16:1	0.07 \pm 0.003	0.05 \pm 0.001
C18:0	0.94 \pm 0.07	0.64 \pm 0.02
C18:1	8.33 \pm 0.58	4.12 \pm 0.07
C18:2	15.34 \pm 0.08	11.73 \pm 0.05
C18:3	4.22 \pm 0.01	9.81 \pm 0.17
C20:0	0.04 \pm 0.001	0.03 \pm 0.001
C20:1	0.03 \pm 0.001	0.04 \pm 0.001
C22:0	0.04 \pm 0.001	0.03 \pm 0.001
SAFA	3.47	4.81
MUFA	8.43	4.21
PUFA	19.56	21.54
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	3.63	1.19
α -Tocopherol ^c	0.36 \pm 0.02	0.49 \pm 0.05
γ -Tocopherol ^c	43.35 \pm 0.29	2.63 \pm 0.06

^a Values are mean \pm SD of three samples of each species, analysed individually in triplicate. Each value is expressed as g/100 g of extracted oil.

^b Oil content is expressed in g referred to the starting seed flour (10 g). SAFA: saturated fatty acids. MUFA: monounsaturated fatty acids. PUFA: polyunsaturated fatty acids. *n*-6/*n*-3 is the ratio of *n*-6 to *n*-3 fatty acids.

^c Values are expressed as $\mu\text{g/g}_{\text{oil}}$.

in *Sambucus* seed oil (13.5%), which in its turn had a higher content of linolenic acid (32.1%) with respect to that of the blackberry seed oil (13.4%). The differences in individual fatty acid contents are reflected in the total saturated fatty acid (SAFA), total monounsaturated fatty acid (MUFA), and total polyunsaturated fatty acids (PUFA) contents, which are also shown in Table 1. The content of saturated fatty acids (SAFAs) amounted for less than 11% (3.47 mg/100 mg_{oil}) of the total FAME detected in *Rubus* species, while it was higher than 15% in elderberry seed oil (4.81 mg/100 mg_{oil}). *Rubus* seed oil was richer in monounsaturated fatty acids (MUFAs), which mainly consisted of oleic acid, than *Sambucus* seed oil. The oil of both species had a fairly good content in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ranging from 19.56 mg/100 mg_{oil} (*Rubus* seeds) to 21.54 mg/100 mg_{oil} (*Sambucus* seeds); among the PUFAs, linoleic acid was the predominant fatty acid (66.4% on average). The ratio of *n*-6 to *n*-3 fatty acids in blackberry seed oil (3.63) was three times higher than that in elderberry seed oil (1.19). It is worth noting that nutrition societies recommend an *n*-6/*n*-3 FA ratio of 5:1 for a healthy diet (DACH, 2002). There is increasing evidence that lowering the *n*-6 to *n*-3 ratio may be beneficial in reducing the risk of cancer and cardiovascular disease and enhancing bone health (Aronson et al., 2001; Hu, 2001). Therefore an optimal ratio can improve the average human diet in western countries, since the *n*-6/*n*-3 ratio in most industrialised countries is generally as high as 15:1 (Simopoulos, 2002).

3.3. Tocopherol content

The tocopherol content of the seed oils is shown in Table 1. The main tocopherol isomers were α - and γ -tocopherols, whereas β - and δ -tocopherols were not detected in any of the samples. γ -Tocopherol was the predominant vitamin E compound in the seed oils of *Rubus* and *Sambucus* species. The largest amounts of tocopherols were found in blackberry seed oil (43.71 $\mu\text{g/g}_{\text{oil}}$). Tocopherols in vegetable oils protect polyunsaturated fatty acids from oxidation. Tocopherols have been reported to inhibit lipid oxidation in ORAC assays (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2007) and in radical trapping antioxidant parameter assays (Cabrini et al., 2001), α -Tocopherol has the highest vitamin E bioactivity, while γ -tocopherol shows a better antioxidant ability.

Table 2Total phenolic content, ellagic acid content and radical scavenging ability of the *Rubus* and *Sambucus* extracts.

Methanolic extracts	Ellagic acid (mg/g _{seed})	Total phenolic content (mg GAE/g _{extract})	Radical scavenging activity (%)		
			42 µg/mL	83 µg/mL	167 µg/mL
<i>Sambucus nigra</i> L. seed residue	0.04 ± 0.001	54.2 ± 0.2	42.3 ± 1.6	55.0 ± 1.9	82.4 ± 0.9
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott seed residue	4.7 ± 0.2	171.4 ± 0.3	93.0 ± 1.6	95.6 ± 1.2	97.6 ± 1.1

3.4. Antioxidant activity of seed residue extracts

The free-radical scavenging activity of the extracts was evaluated using the DPPH method. 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) is a stable free radical, and when it reacts with a radical scavenger, its maximum absorbance at 517 nm fades rapidly. The antioxidant effect is proportional to the disappearance of DPPH in test samples. The methanolic seed extracts of *Rubus* and *Sambucus* species were examined and compared for their free radical scavenging activities against DPPH. DPPH assay has been largely used for determining the antioxidant capacities of various compounds including vegetable oils (Espín, Soler-Rivas, & Wichers, 2000). It is important to highlight that the DPPH assay has also been used to predict the oxidative stability of edible oils (Lee, Chung, Chang, & Lee, 2007).

The radical scavenging results are shown in Table 2. The extracts of all fruit seed residues exhibited a significant antioxidant capacity. As can be seen, the scavenging effects of the methanolic extract of *Sambucus* seed residue on DPPH radicals increased with the concentration: it varied from 42.3% at 42 µg mL⁻¹ to 82.4% at 167 µg mL⁻¹. In contrast, the methanolic extract of *Rubus* seed residue exhibits a high value of antioxidant ability even at lower concentration (93% at 42 µg mL⁻¹). The DPPH free radical scavenging activity of the extract at a higher concentration (167 µg mL⁻¹) was comparable to that of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-

thylchroman-2-carboxylic acid) used as external reference (97.0% and 97.7%, respectively).

Using the results obtained, the efficient concentration value (EC₅₀) was determined (Fig. 1). This represents the amount of the extract that causes a decrease in an initial DPPH concentration by 50% (Brand-William & Cuvelier, 1995). A lower EC₅₀ value therefore refers to a higher antioxidant activity. From Fig. 1, it can be easily seen that *Rubus* seed residue showed a higher radical scavenging activity (EC₅₀ = 1.21 ± 0.11 µg mL⁻¹) compared to that of the *Sambucus* seed residue (EC₅₀ = 82.21 ± 7.98 µg mL⁻¹). It is worth noting that *Rubus* extract had a lower EC₅₀ with respect to Trolox (52.81 ± 4.03 µg mL⁻¹). These data suggest that black currant seed residues are good dietary sources for phenolic antioxidants.

3.5. Total phenolic content (TPC) and ellagic acid content of seed methanolic extracts

The total phenolic content (TPC) of defatted seed flour was determined with the Folin–Ciocalteu method, and the results obtained are expressed as mg gallic acid equivalents per g extract (Table 2). The values of radical scavenging activity were directly related to the total amount of phenolic compounds detected in the methanolic seed extracts (Table 2). The total phenolic content of blackberry seeds (171.4 mg GAE/g_{extract}) was higher than that of elderberry seeds (54.2 mg GAE/g_{extract}). These values show that the

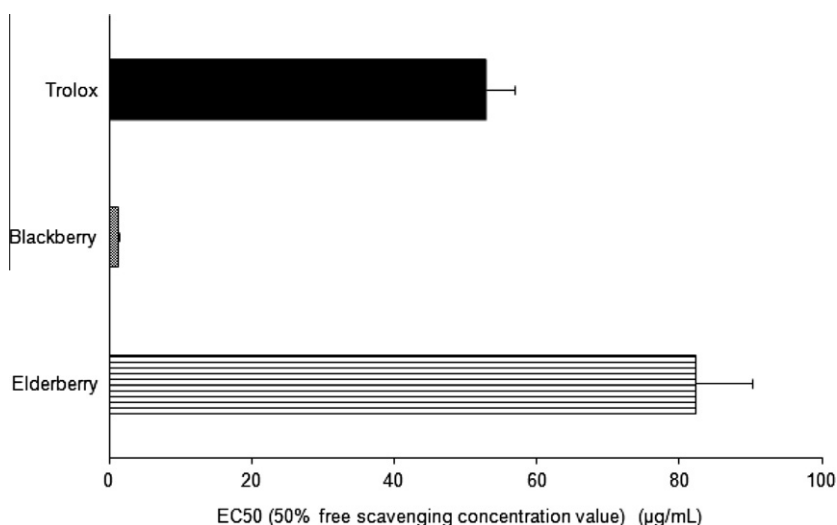


Fig. 1. EC₅₀ values of the DPPH radical scavenging activities of methanolic extracts of *Sambucus* and *Rubus* seeds (a shorter bar indicates a higher radical scavenging activity).

Table 3HPLC–ESI–MS/MS detection of phenolic compounds in wild *Rubus* and *Sambucus* seed extracts.

Methanolic extracts	Tentative peak assignment	[M+H] ⁺ m/z	MS/MS fragment	[M–H] [–] m/z	MS/MS fragment
<i>Sambucus nigra</i> L.	Cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside	743	581, 287		
	Pelargonidin-3-rutinoside	579	271		
	Quercetin-3-rutinoside			609	301
	Quercetin-3-glucoside	465	303	463	301
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Cyanidin 3-glucoside	449	287		
	Ellagic acid			301	
	Galloyl-HHDP glucose			633	301
	Galloyl-bis-HHDP glucose			935	783, 433, 301

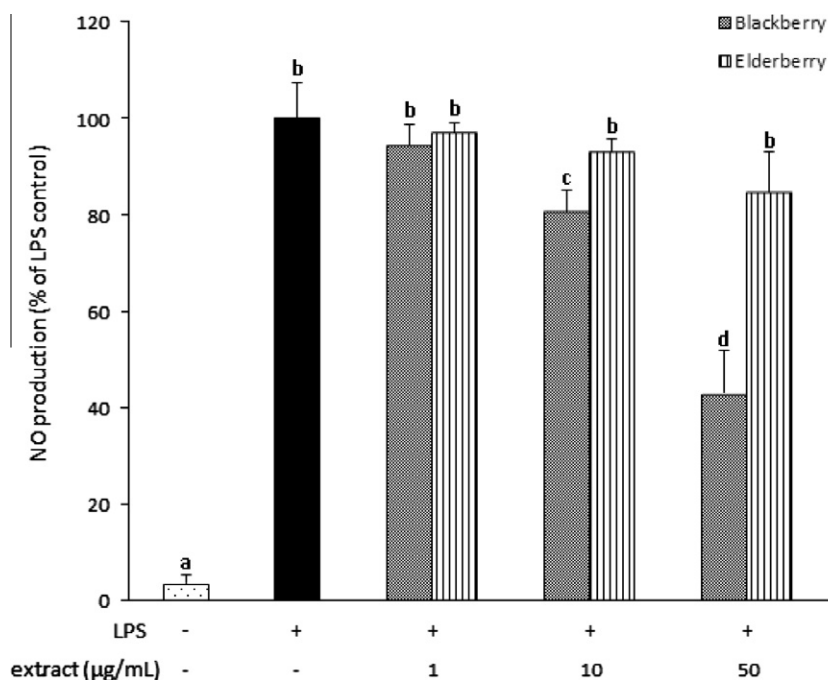


Fig. 2. Concentration dependent reduction of the lipopolysaccharide (LPS)-induced NO release from RAW264.7 macrophages by methanolic extracts prepared from blackberry and elderberry seeds. RAW264.7 macrophages were seeded at a density of 2.5×10^5 cells/mL and incubated for 48 h with LPS (0.5 µg/mL) and increasing concentrations of extracts. The supernatant of the cells was analysed for nitrite production by Griess method. Data are expressed as percentage, where LPS stimulation (with vehicle only) was set at 100%. Values are means of three separate experiments (each done in duplicate), and standard deviations are represented by vertical bars. Shared letters above the bars indicate no statistically significant difference ($p > 0.05$), whereas different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

total phenolic content in seed residue extracts was strongly correlated with antioxidant activity, suggesting that phenolic compounds contribute to their antioxidant capacities. These data indicate that these fruit seeds may potentially serve as natural sources for diet phenolic compounds.

Ellagic acid and ellagitannins have been reported to be abundant in blackberry (Hager, Howard, Liyanage, Lay, & Ronald, 2008). We estimated the total ellagic acid content in the seeds after acid hydrolysis so as to include ellagitannins in the estimation. The results showed a striking difference in the total ellagic acid content of *Rubus* and *Sambucus* species (Table 2): blackberry seed residue contained 4.7 mg/g seed of ellagic acid, while the content of the acid in elderberry seed flour was very low (0.04 mg/g seed).

3.6. Identification of phenolic compounds in seed methanolic extracts

The LC–MS method used in the present study allowed the identification of the main phenolic compounds (Table 3). Among the phenolic compounds identified in *Sambucus* seed residues were detected two anthocyanins: cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside ($[M+H]^+$ at m/z 743), previously identified in *S. nigra* fruit and stalks (Veberic, Jakopic, Stampar, & Schmitzer, 2009), and pelargonidin-3-rutinoside ($[M+H]^+$ at m/z 579). The MS/MS fragmentation pattern of the peak at m/z 743 showed ions at m/z 581, which would correspond to the loss of a glucose moiety, and at m/z 287 which is characteristic of cyanidin. The MS² fragmentation pattern of the ion at m/z 579 showed only signals at m/z 271 (M-308 amu, loss of rutinose). The MS² fragments, which showed an ion at m/z 271, would correspond to a pelargonidin aglycone moiety. Two flavonols were identified as glucoside and rutinoside of quercetin: rutin (quercetin-3-rutinoside) ($[M-H]^-$ at m/z 609), and quercetin-3-glucoside ($[M+H]^+$ at m/z 463). The ion at m/z 609 $[M-H]^-$ was identified as quercetin-3-rutinoside on the basis of comparative fragmentation (Lin, Chen, Ozcan, & Harnly, 2008). The MS² frag-

mentation of the parent ion at m/z 463 corresponds to the neutral loss of a glucose moiety, thus identifying the peak as quercetin hexoside.

HPLC–ESI–MS analyses of *Rubus* seed extract allowed the identification of one anthocyanin, the cyanidin 3-glucoside ($[M+H]^+$ at m/z 449), ellagic acid ($[M-H]^-$ at m/z 301) and two ellagitannins (Hager et al., 2008): galloyl-HHDP glucose ($[M-H]^-$ at m/z 633) and galloyl-bis-HHDP glucose ($[M-H]^-$ at m/z 935). The compound with an m/z of 633 was presumed to be an isomer of galloyl-HHDP glucose, with only one hexahydroxydiphenolic group attached to the glucose moiety. There was only one fragment ion observed at m/z 301. On the basis of previous studies, the compound with an m/z of 935 was most likely an isomer of the structure commonly called galloyl-bis-HHDP glucose or casuarictin/potentillin. The fragmentation pattern, including m/z 783 and 301, was likely due to the loss of HHDP moieties from the glucosyl unit.

3.7. Effect of extracts on NO and CCL20 production

Several studies have shown that berries may possess anti-inflammatory properties (Juranic, 2005; Lau, Bielinski, & Joseph, 2007; Seeram, 2008; Szajdek & Borowska, 2008). By contrast, the anti-inflammatory activity of berry seed extracts has received little attention. Only one work reporting in vitro and in vivo anti-inflammatory activities of muscadine (*Vitis rotundifolia*) seed extracts has been reported to date (Bralley, Greenspan, Hargrove, & Hartle, 2007). In this work, the methanolic extracts from the seeds of wild blackberry (*R. Ulmifolius* Schott) and elderberry (*S. nigra*) were compared for their in vitro anti-inflammatory properties. We first evaluated their abilities to inhibit LPS-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. NO is a late inflammatory marker formed through activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Stampler, Single, & Loscalzo, 1992). The effect on NO production was determined at 48 h. As shown in Fig. 2, blackberry extract

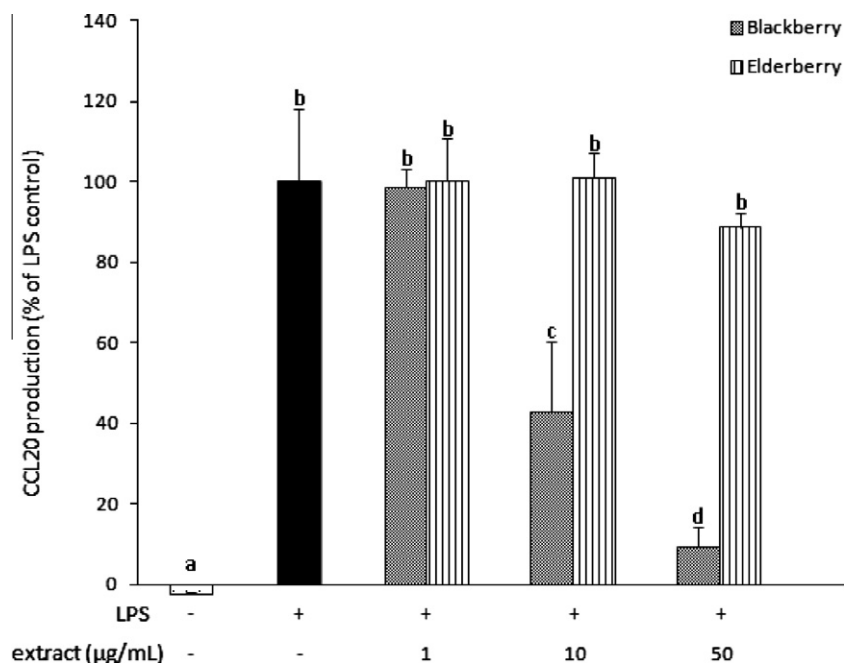


Fig. 3. Concentration dependent reduction of the lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage-inflammatory protein-3 α /CCL20 release from RAW264.7 macrophages by methanolic extracts prepared from blackberry and elderberry seeds. RAW264.7 macrophages were seeded at a density of 2.5×10^5 cells/mL and incubated for 24 h with LPS (0.5 μ g/mL) and increasing concentrations of extracts. The supernatant of the cells was analysed for CCL20 production by ELISA. Data are expressed as percentage, where LPS stimulation (with vehicle only) was set at 100%. Values are means of three separate experiments (each done in duplicate), and standard deviations are represented by vertical bars. Shared letters above the bars indicate no statistically significant difference ($p > 0.05$), whereas different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

decreased NO release in a concentration-dependent way with almost 60% inhibition at the highest dose (50 μ g/mL). In contrast, elderberry extract did not significantly affect NO. Furthermore, we investigated the effects of both extracts on macrophage-inflammatory protein-3 α /CCL20. CCL20 is an important chemokine for immune and inflammatory response (Varesio, Battaglia, Raggi, Ledda, & Bosco, 2010). CCL20 production induced by LPS stimulation in RAW264.7 macrophages was determined at 24 h. The blackberry extract decreased CCL20 production in a concentration-dependent way, producing more than 90% inhibition at the highest dose (50 μ g/mL). By contrast, CCL20 was not affected by elderberry extract (Fig. 3). The results of this study show that the methanolic extracts from blackberry are able to decrease inflammation in vitro by inhibiting LPS-induced NO and CCL20 in macrophages. These results are in agreement with the radical scavenging activity results seen above (Fig. 1), thus confirming that the phenolic contents of the extracts are mainly responsible for their free radical scavenging and anti-inflammatory abilities.

It is worth mentioning that previous studies reported on the anti-inflammatory properties of blackberry extracts. Pergola et al. reported inhibitory effects of blackberry extract on NO biosynthesis in the murine monocyte/macrophage J774 cell line stimulated with lipopolysaccharide (Pergola, Rossi, Dugo, Cuzzocrea, & Sautebin, 2006). Moreover, phenolic extracts from blackberries were reported to inhibit LPS-induced iNOS/NO and COX-2/PGE2 pathways in RAW 264.7 macrophages (Cuevas-Rodriguez et al., 2010). However, in the present work, we have shown for the first time that blackberry seeds inhibit LPS-induced NO production in vitro. Moreover, the inhibitory effect on CCL20 of blackberry extract is reported here for the first time.

4. Conclusions

In conclusion, in this study we have investigated the composition of seeds of *Sambucus* and *Rubus* species from Southern Italy in order to identify their bioactive components and determine

the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts. The results of our study have shown that, in particular, the *Rubus* seed extract possess significant free radical scavenging activity and concentration dependent inhibition of nitric oxide and CCL20 production in vitro. These effects have been correlated to the total phenolic content of the seeds. These findings suggest that *Rubus* seeds are a valuable source of natural antioxidant and anti-inflammatory agents for optimal human health and could be useful as additives for food, cosmetic, or pharmaceutical applications.

Acknowledgements

Thanks are due to Giuseppe Scalzo (Azienda agricola Scalzo, Marzi (CS), Italy) for the fruit supply. P.P. thanks the European Commission, FSE (Fondo Sociale Europeo) and Calabria Region for his fellowship grant.

References

- Aronson, W. J., Glaspy, J. A., Reddy, S. T., Reese, D., Heber, D., & Bagga, D. (2001). Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology*, 58, 283–288.
- Bonerz, D., Würth, K., & Dietrich, H. (2006). Analytical characterization and the impact of ageing in anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *European Food Research and Technology*, 224, 355–364.
- Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. L., & Hartle, D. K. (2007). Inhibition of hyaluronidase activity by *Vitis rotundifolia* (Muscadine) berry seeds and skins. *Pharmaceutical Biology*, 45, 667–673.
- Brambilla, A., Lo Scalzo, R., Bertolo, G., & Torreggiani, D. (2008). Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: Phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2643–2648.
- Brand-William, W., & Cuvelier, M. E. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Bushman, B. S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J. M., & Knapp, S. J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7982–7987.
- Butsat, S., & Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119, 606–613.
- Cabrini, L., Barzanti, V., Cipollone, M., Fiorentini, D., Grossi, G., Tolomelli, B., et al. (2001). Antioxidants and total peroxylradical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6026–6032.

- Cuevas-Rodríguez, E. O., Dia, V. P., Yousef, G. G., Garcia-Saucedo, P. A., Lopez-Medina, J., Paredes-Lopez, O., et al. (2010). Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9542–9548.
- DACH (2002). *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr* (1st ed.). Umschau/Braus GmbH.
- FAO/WHO/UNU (1985). Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series no. 724. Geneva: WHO.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Baraniak, B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidative properties of extracts). *Food Science Technology*, *39*, 308–315.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 648–656.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*, 131–138.
- Hager, J. T., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O., & Ronald, L. P. (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC–ESI–MS and MALDI–TOF–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 661–669.
- Hu, F. B. (2001). The balance between n-6 and n-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Nutrition*, *17*, 741–742.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2007). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1815–1821.
- Jayaprakasha, G. K., & Bhimanagouda, S. P. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, *101*, 410–418.
- Juranic, Z. (2005). Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, *23*, 207–211.
- Kim, I. H., Kim, C. J., You, J. M., Lee, K. W., Kim, C. T., & Chung, S. H. (2002). Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*, 413–418.
- Lata, B., & Tomala, K. (2007). Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potential healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 10795–10802.
- Lau, F., Bielski, D., & Joseph, J. (2007). Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of Neuroscience Research*, *85*, 1010–1017.
- Lee, J. M., Chung, H., Chang, P.-S., & Lee, J. H. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*, *103*, 662–669.
- Lee, J., & Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of Science of Food and Agriculture*, *87*, 2665–2675.
- Lemus, I., Garcia, R., Delvillar, E., & Knop, G. (1999). Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*, *13*, 91–94.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, *27*, 114–120.
- Lin, L., Chen, P., Ozcan, M., & Harnly, J. M. (2008). Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of *Ginkgo biloba* leaves and selected products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 6671–6679.
- Liu, Q., & Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, *102*, 732–737.
- Nakajima, J. I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI–MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *5*, 241–247.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*, 165–168.
- Parry, J. W., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., et al. (2005). Fatty acid content and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 566–573.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J. N., et al. (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3773–3778.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., & Sautebin, L. (2006). Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide*, *15*, 30–39.
- Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia* (Vol. 1, pp. 543–543). Edagricole, Bologna.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 627–629.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *56*, 365–379.
- Stamper, J. S., Single, D., & Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, *258*, 1898–1902.
- Szajdek, A., & Borowska, E. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, *63*, 147–156.
- Uncini Manganelli, R. E., & Tomei, P. E. (1999). Ethnopharmabotanical studies of the Tuscan archipelago. *Journal of Ethnopharmacology*, *65*, 181–202.
- Varesio, L., Battaglia, F., Raggi, F., Ledda, B., & Bosco, M. C. (2010). Macrophage-inflammatory protein-3 α /CCL-20 is transcriptionally induced by the iron chelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)- κ B. *Molecular Immunology*, *47*, 685–693.
- Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, *114*, 511–515.

Anti-inflammatory potential of ethanol extract of *Rubus ulmifolius* (Schott).

Rupesh Pandey^{1*}, Ravindra Pandey² and SS Shukla²

¹Swami Vivekanand College of Pharmacy, Indore (M.P.)

²Columbia Institute of Pharmacy, Raipur (C.G.)

*Corresponding Author E-mail: ranu.rupeshpandey@gmail.com

ABSTRACT:

Inflammation is a most troublesome disease, and has a substantial effect in terms of cost, disability, and low productivity. It affects 1% of world population and is associated with significant morbidity and mortality. *Rubus ulmifolius* is occurred almost all of the Europe, North Africa and the south of the Asia. The plant is used for the body defensive function. In this paper An anti inflammatory potential of ethanolic extract of *Rubus ulmifolius* was studied by Acetic acid induced vascular permeability and Croton oil induced ear edema on animal models.

KEYWORDS: *Rubus ulmifolius*, inflammation, Ayurveda, Siddha, Unani.

1. INTRODUCTION:

Nature is defined as the space outside the spectacle. We live in an era when more and more emphasis is being placed on the importance of natural substances. Drugs of natural origin play a significant role in the public health care system of any nation. Indian Materia Medica includes about 2000 drugs of natural origin of which approximately 400 are of mineral and animal origin while the rest are of vegetable origin. Ayurveda, Siddha and Unani system of medicine use 600-700 herbs for medicinal use. Plants are the most exclusive sources of drugs for the majority of world's population¹.

Inflammation is caused by release of chemicals from tissues and migrating cells. Most strongly implicated are the prostaglandins (PGs), leukotrienes (LTs), histamine, bradykinin, and, more recently, platelet-activating factor (PAF) and interleukin-1². Evidence for their involvement comes from studies with competitive antagonists for their receptors and inhibitors of their synthesis³. H1 histamine antagonists are effective for hay fever and some skin allergies such as urticaria, which indicates the importance of histamine in these conditions. Other herbs known to reduce inflammation include ginger, turmeric, pokeroor, cleavers, devil's claw, licorice, autumn saffron, boswellin, curcumin, arnica, bromelain, German chamomile, licorice, white willow, witch hazel, and capsaicin. Inflammatory arthritis, is a most troublesome inflammatory disease, and has a substantial societal effect in terms of cost, disability, and lost productivity.

It affects 1% of world population and is associated with significant morbidity and mortality⁴.

Rubus ulmifolius is occurred almost all of the Europe, the North Africa and the south of the Asia. It was introduced also in America and Oceania. The plant is indicative of deep grounds and slightly damp. The plant is used to delimit property and estates with main function body defensive. Other functions are the production of the honey, in the parasites of antagonists species of association of the cultivations the wine-growing.

The aerial part of *Rubus ulmifolius* contains viz. rubeantrone B and C, vitamin C, vitamin K, folic acid - a vitamin B, and the essential mineral manganese.

The aim of this work was to develop an anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Rubus ulmifolius* by Acetic acid induced vascular permeability and Croton oil induced ear edema on animal models.

2. MATERIAL AND METHODS:

Collection and Identification of Plant materials

Whole plant of *Rubus ulmifolius* Schott were procured from the Indore (M.P.). The whole plant were Identified by Prof. H. S. Rai Department of agriculture, Govt. Agriculture Research Institute, Mandla. A voucher specimen has been deposited at the museum of our college.

Table-1 % Yield of ethanol and aqueous extract

Plant part	Ethanol extract (%)	Aqueous extract (%)
Fruit	12.50	9.20
Root	10.50	9.35
Whole plant	13.25	9.20

Table-2 Phytochemical screening

Extracts	Alkaloids	Flavonoids	Steroids	Saponins
Ethanol extract of fruit	Present	Present	Present	Present
Aqueous extract of fruit	Present	Absent	Present	Absent
Ethanol extract of root	Present	Present	Absent	Present
Aqueous extract of root	Present	Present	Present	Present
Ethanol extract of whole plant	Present	Present	Present	Present
Aqueous extract of whole plant	Present	Present	Present	Present

Table. 3 Toxicity study

Treatment Group	Dose mg/kg	No. of animals used	No. of death of animals	%Mortality
Ethanol Extract(whole plant)	2000	10	0	0

2.1 Extraction of plant materials

The dried plant materials were powdered by using mixer, to coarse powder and this powder was packed into soxhlet column and extracted with ethanol and cold maceration with water.

Ethanolic extract

The air-dried powdered fruits, roots and whole plant of *Rubus ulmifolius* Schott were extracted in Soxhlet assembly with Petroleum ether, and the received extract was concentrated in vacuum evaporator and. With the same procedure the drug was extracted with ethanol after drying in air and obtained extract was weighed and % yield was calculated. Result is cited in table 4.

Table No.4 Croton oil induced ear edema

Treatment Group *	No. of difference in weight **
Vehicle	23.5±4.03
Extract 200 mg/kg	26.66±8.75 ^a
Extract 400 mg/kg	25.16±5.77 ^a
Standard	24.23±2.11

*No of animals in each group -6

**Data presented in mean ±SD

^a- Significant variation as compared to vehicle treated group

Cold water maceration:-

In this process the extraction of drug is carried out by placing the solid in contact with distil water in a closed vessels for 3 days with occasional stirring. The liquid is strained and marc pressed, adding the express liquid to the strained liquid the combined liquids are clarified by filtration. After evaporation of solvent % yield of Aq. Extract was calculated. Result is cited in table -1.

2.2. Phytochemical screening of *Rubus ulmifolius* Schott (whole plant).⁵

Ethanol and aqueous extracts were subjected to qualitative chemical test for the following phyto chemical identification tests;

Alkaloids;

Small amount of extract was stirred with few drops of dil.HCl and filtered the filtrate was tested with a number of alkaloid reagent like Dragendorf's reagent then orange brown ppt. was found.

Flavonoids;

Small amount of ethanol extract was dissolved in ethanol then added pinch of mg turning slowly added conc. Hcl pink colour was obtained.

Steroids:

The ethanol extract is refluxed separately with solution of alcoholic potassium hydroxide, then it was diluted with distilled water, and extracted with ether, ethereal extract is evaporated and the residue was subjected to Liebermann's Burchard's test.

Saponins;

About 1ml of ethanol and aqueous extract was diluted with distilled water to 20ml, and shaken in graduated cylinder for 15min. 1cm layer of foam was obtained. Results are cited in table-2

2.3 Determination of acute toxicity (ALD₅₀) Method⁶:

Acute toxicity has been done by standard procedure group of three mice of either sex (18-25 g) by fixed dose (OECD) method Annexure-2 d (guide line no. 420 of CPCSEA). The animals were fasted over night prior to experiment.

Animals were divided in to 4 groups of 3 animals in each; extracts were administrated orally at the dose of 1000 mg/kg body weight and observed mortality for the period of 24 hours if any. Results cited in table 3.

2.4 Acetic acid induced vascular permeability

0.2 ml of 0.6% acetic acid Solution given for vascular permeability

Steps of procedure as follows used

Four groups of 24 mice's were taken , groups A) for vehicle B) for extract 200mg/kg C) for extract 400mg/kg ,D) Diclofenac sodium were employed as reference drugs. Dose of vehicle/ extract 200mg/kg/ extract 400mg/kg/ in interval of 30 minutes orally. Acetic acid was administered intra peritoneally one hour later followed by administration of 10 ml/kg of 10% weight/volume Evans blue was done. The animals were sacrificed after 30 minutes & viscera exposed. Peritoneal fluid (exudates) was collected & volume made up to 10 ml using normal saline. It was centrifuged at 2000 r.p.m for 10 minutes. The absorbance was noted at 610 n.m.

Table No5. Acetic acid induced vascular permeability

Treatment Group *	Absorbance of leaked dye**
Vehicle	0.169±0.068
Extract 200 mg/kg	0.26±0.06 ^a
Extract 400 mg/kg	0.294±0.027 ^a
Standard	0.18.23±1.01

*No of animals in each group -6

**Data presented in mean ±SD

^a- Significant variation as compared to vehicle treated group

Figure -1 - Significant variation as compared to vehicle treated group in croton oil induced ear edema

Figure -2 significant variations as compared to vehicle treated group Acetic acid induced vascular permeability

2.5 Croton oil induced ear edema^{7,8}

In this protocol 2 µg/20µl croton oil is used in acetone Solution given for ear edema.

Steps of procedure as follows

1. Four groups of 24 mice's, groups A) for vehicle B) for extract 200mg/kg C) for extract 400mg/ , D) Diclofenac sodium were employed as reference drugs. Dose of vehicle/ extract 200mg/kg/ extract 400mg/kg/ in interval of 15 minutes orally.

2. Croton oil was applied one hour later in right ear of mice.

3. Both (right and left) ear was cut & weighed after 3 hour.

3. RESULTS:

3.1 Calculation of percentage yield of extracts

Percentage yield of ethanol and aqueous extract of whole plant were found to be 10.25% and 9.20 respectively.

3.2 Phytochemical screening

Preliminary phyto chemical screening of ethanol and aqueous extract of whole plant of *Rubus ulmifolius* Schott. Alkaloids, flavonoids, steroids and saponins were present.

3.3 Acute Toxicity Study

In acute toxicity studies, extracts showed no mortality at the dose of 2000 mg/kg b.w. Therefore 2000mg/kg b.w. dose was considered as ALD₅₀ cutoff dose (safe dose) so 1/10th & 1/5th of that were selected (200 mg/kg b.w.) & (400 mg/kg b.w.) for all in vivo experiments. Results are cited in table no.3.

4. DISCUSSION:

Toxicity studies shows that the ethanol extract was not having any signs of toxicity up to the dose of 2000 mg/kg, which was considered as maximum tolerable dose for present study. Thus the dose selected were 200 mg/kg and 400 mg/kg, the 1/10th and 1/20th of 2000 mg/kg.

The *Rubus ulmifolius* extract was tested for its anti-inflammatory activity. Extract showed significant anti-inflammatory activity.

When extract was investigated for its effect on croton oil induced ear edema, it was found that in Vehicle treated group the weight variation in ear was 23.5±4.03 which not decreased significantly ($p>0.05$) in extract 200 mg/kg (26.66±8.75^a) and 400 mg/kg (25.16±5.77^a)

When the extracts were compared with the Standard drug treated group (Table No4 and figure no.1) the extracts sound significant and effective.

When extract was treated for its effect on acetic acid induced vascular permeability, it was found that in vehicle treated group the absorbance of leaked dye was (0.169±0.068) which not decreased significantly ($p>0.05$) in extract 200 mg/kg (0.26±0.06^a) and 400 mg/kg(0.294±0.027^a) treated group (Table No. 5 and figure no.2). the extract 200mg/kg as well as 400mg/kg Treated Group showed good inhibition of inflammation as compared to standard drug.

5. CONCLUSION:

In our present study we, concluded that ethanol extract of *Robus ulmifolius* Schott (whole plant) has inflammatory property may attributed due to the potential of the extract when performed on animal models e.g croton oil induced ear edema & acetic acid induced vascular permeability as compared to standard diclofenac.

Since our study is indicated the usefulness of *Rubus ulmifolius* Schott as anti inflammatory agent. There is a room for further study to identify, isolate characterized and evaluate the active principal (s) responsible for anti inflammatory activity. In addition other toxicological aspects of the plant may be under taken for the toxicological point of view.

6. REFERENCE:

1. Nadkarni, K. M.: The Indian Materia Medica. 3rd ed., Vol. 1, Popular Prakashan, Mumbai, 1976.
2. Telang RS, Chatterjee S, Varshneya C. Studies on analgesic and anti-inflammatory activities of *Vitex negundo* linn. Indian Journal of Pharmacology, 31; 1999 : 363-366.
3. Kumar A, Chomwal R, Kumar P, S Renu. Anti inflammatory and wound healing activity of *Curcuma aromatica* salisb extract and its formulation; Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 1(1); 2009: 304-310.
4. Kilimozhi D., Parthasarathy V. and Manavalan P. A Review on Arthritis ;Research Journal of Pharmacy and Technology, 4 (1); 2011:29
5. Kokate, C. K. "Practical Pharmacognosy". 4th Edition, New Delhi, Vallabh Prakashan 1999: 149-56.
6. Veeraraghavan Prema. Expert consultant, CPCSEA, OECD guideline No. 420.
7. Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, Della Loggia R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal anti inflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. Agents Actions. 19(5-61); 1986:371–373.
8. Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays H. Gerhard Vogel. Springer, 2002; 2nd ed: 757.

Received on 12.01.2013 Modified on 20.01.2013
Accepted on 28.02.2013 © RJPT All right reserved
Research J. Pharm. and Tech. 6(3): March 2013; Page 300-303