

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université ABDERAHMANE MIRA – Bejaia  
Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie physico-chimique

## *Mémoire de Master*

**Filière :** Biologie

**Option :** Biochimie Appliquée

### *Thème*

Activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine  
oxydoréductase *in vivo* de l'extrait éthanolique des  
feuilles de *Fraxinus angustifolia*

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup>BOUGUELLID Ghania

M<sup>elle</sup>CHEBTA Fatouma

**Membre de jury:**

**Président :** M<sup>r</sup>OUCHMOUKHE S.

**Promotrice :** M<sup>me</sup>DEBBACHE N.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup>ATMANI D.

**Examinatrice :** M<sup>elle</sup>CHERAFT N.

**Grade et lieu :**

M.C.B (U.A.M.B)

M.A.A (U.A.M.B)

M.C.B (U.A.M.B)

M.A.B (U.A.M.B)

2012/2013

# Remerciements

*Au terme de ce travail nous remercions Dieu le tout puissant de nos avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement et très particulièrement notre promotrice M<sup>me</sup> Debbache N., pour son aide, ses conseils, son orientation et sa grande gentillesse. Qu'elle sache que sa disponibilité, ses qualités humaines exceptionnelles et sa rigueur scientifique ne nous ont pas laissés indifférents. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance.*

*Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury :*

*Mr Ochemoukhe S. Pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury  
M<sup>me</sup> Atmani et M<sup>lle</sup> Cheraft qui ont accepté de faire partie du jury et de consacrer de leur temps pour examiner ce travail.*

*On tient particulièrement à exprimer nos vives reconnaissances au Pr. Atmani D. de nous avoir accueillis au sein de son laboratoire.*

*Nos remerciements sont également exprimés à tous le personnel du laboratoire génétique,*

*M<sup>lle</sup> Ayouni K, M<sup>me</sup> Rahmani M. Kenza, Naima, wahiba, lila et saliha.*

*Nos reconnaissances vont également au Chef de Département de Biochimie appliquée*

*M<sup>r</sup>. Hammoum, et à tout les enseignants de ce Département.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Ghania & Fatouma*



# Dédicaces

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :*

*Allah unique, éternel, le tout puissant et son prophète Mohamed (SAW)*

*✎ A mes très chers parents pour leur amour, leur sacrifice, leur encouragement, Pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées Pour leur soutien et leur confiance notamment durant mes études.*

*Que DIEU leur procure bonheur, santé et longue vie, merci papa et maman*

*✎ A la mémoire de mon adorable grand père que dieu puisse t'accueillir dans son vaste Paradis, Amène. Repose en paix,*

*✎ A ma très chère grand-mère.*

*✎ A mes sœurs kenza, sissa et nina ainsi qu'à mon adorable frère toufiké*

*✎ Toutes mes tantes, mes oncles, cousins et cousines*

*✎ A ma Tata Ounissa KHIMA et son fils yazide*

*✎ Toute la famille CHEBTA et AINE*

*✎ A mon amie et binome Ghania que j'admire beaucoup et a toutes sa famille.*

*✎ A tous mes amis (es), et à tous ceux qui me sont chers: mériem, faty, sally clover, yassmina, warda, hoda, selma, lydia, lila, hamza, massi, massina, athmane et amazigh*

*✎ A toute la promotion Biochimie appliquée et toute l'équipe du laboratoire*

*✎ Une dédicace spéciale à cher hocino pour son soutien et sa présence à mes coté*

*fatouma*

*Je dédie ce mémoire :*

*A l'Eternel Dieu Tout Puissant*

*De qui, par qui et pour qui se réalisent toutes choses.*

*✠ A mon père*

*Ô Papa... si tu avais été là pour voir se réaliser l'un des vœux que tu chérissais tant! Que les efforts et les sacrifices fournis soient gratifiés.*

*✠ A ma mère*

*Tu m'as toujours soutenue; ta bénédiction et tes conseils ont été pour moi une source de réconfort et de force. Que ce travail soit pour toi un motif de fierté et de satisfaction.*

*✠ A mon cher petit frère et adorable petite sœur.*

*✠ A mon Grand-père*

*✠ A mes oncles Nabil et Lyes (la petite famille)*

*✠ A mes tantes, cousins, cousines*

*✠ A toutes ma grande famille*

*✠ A mes amies Soraya, Houda, Lydia et surtout à ma compagne de route ma très chère Kahina Fatouma et à toutes sa famille*

*✠ Sans oublier mes voisins de paillasse Fatima, Selma, Leila, Hameza, Masinissa, Athmane, Massina, Amazigh.*

*✠ Et surtout à ma très chère Warda .*

*Vos contributions à ma réussite et à ma formation sont incommensurables. Que ce mémoire soit à vos yeux comme une marque de reconnaissance et de gratitude.*

## *Liste des Abréviations*

CMC : Carboxymethyl cellulose

Da: Dalton

DO: Densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EOR : Espèces réactifs de l'oxygène

F.angustifolia : Fraxinus angustifolia

HCl :Acide chlorhydrique

KCl :Chlorure de potassium

Mo: Molybdène

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide adénine dinucléotide

NaOH :Hydroxyde de sodium

OAT 1-3: Organic anion transporter 1-3

OCT 1-2: Organic cation transporter 1-2

OCTNs: Organic carnitine transporter

SEM: Standard error of the mean

SD: Standard deviation

UAT: Uric acid transporter

URAT1: Urate transporter 1

XDH:Xanthine déshydrogénase

XO: Xanthine oxydase

XOR: Xanthine oxydoréductase

# *liste des figures*

<b>Figure 1:</b> La structure de la xanthine oxydoréductase bovine.....	3
<b>Figure 2:</b> Production d'acide urique à partir de nucléosides purique.....	4
<b>Figure 3:</b> Oxydation de l'acide urique en allantoïne.....	5
<b>Figure 4:</b> Structure chimique d'allopurinol, hypoxanthine et la xanthine .....	7
<b>Figure 5:</b> La liaison de l'allopurinol au site actif de la xanthine oxydas.....	7
<b>Figure 6:</b> Structure chimique de feboxostat .....	8
<b>Figure 7:</b> Exemples d'acide phénoliques.....	9
<b>Figure 8:</b> Structure chimique de flavonoïde .....	10
<b>Figure 9:</b> Relation structure activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la XO.....	15
<b>Figure 10:</b> Photo de feuille de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	17
<b>Figure 11 :</b> Cage de souris.....	18
<b>Figure 12:</b> Représentation de l'administration intra-gastrique et de l'injection .....	21

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I:</b> Structure chimique des flavonoïdes et quelques exemples.....	11
<b>Tableau II:</b> Structure de quelques coumarines.....	12
<b>Tableau III:</b> Repartitions des groupes et différents traitements .....	21
<b>Tableau IV:</b> Effet des extraits éthanolique de <i>F. angustifolia</i> sur l'uricémie.....	25
<b>Tableau V:</b> Effet des extraits éthanolique de <i>F.angustifolia</i> sur l'activité XOR.....	27



# SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

## *Partie I: Etude bibliographique*

### I. Origine de l'acide urique

I.1. Xanthine oxydoréductase (XOR).....	2
I.1.1. Structure moléculaire de la XOR .....	2
I.1.2. Distribution et localisation de la XOR.....	3
I.1.3. Rôle physiologique de la XOR.....	4
I.1.4. Rôle pathologique de la XOR.....	5

### II. Les traitements anti-hyperuricémique

II.1. Les uricolytiques.....	5
II.2. Les uricosuriques.....	5
II.3. Les inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase.....	6
II.3.1. Les inhibiteurs de synthèse.....	6
II.3.2. Les inhibiteurs naturel d'origine végétale.....	8
II.3.2.1. Généralités sur les polyphénols.....	8
III. Mécanisme anti-hyperuricémique des composés phénolique.....	12
III.1. Inhibition de la XO.....	12
III.1.1. Les flavonoïdes.....	13
III.1.2. Les coumarines.....	14
III.1.3. Les tannins.....	15
III.2. Diurèse.....	16

## *Partie II: Etude expérimentale*

### I. Matériel

I.1. Matériel végétal.....	17
I.1.1. Description de la plante.....	17
I.1.2. Classification.....	17
I.1.3. Constituants chimiques.....	18
I.1.4. Effets thérapeutiques.....	18
I.2. Matériels animale et condition d'élevage.....	18
I.3. Produits chimiques et appareillage.....	19

### II. Méthode

II.1. Préparation des extraits.....	19
II.2. Evaluation de l'activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydase.....	20
II.2.1. Le principe.....	20
II.2.2. Protocole expérimental.....	20
II.2.3. Dosage de l'acide urique.....	22
II.2.4. Evaluation de l'activité XO/XDH.....	23
II.2.5. Dosage des protéines.....	24
II.3. Analyse des résultats.....	24

### III. Résultats et discussion

III.1. Resultats.....	25
III.2. Discussion.....	28
Conclusion.....	31
Références bibliographique.....	32
Annexes.....	I

# Introduction

---

L'acide urique est le produit final du métabolisme des purines, dont l'enzyme clé est la xanthine oxydoréductase qui catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Parks et *al.*, 1986). Son accumulation dans le sang engendre l'hyperuricémie, facteur principal de la maladie de la goutte (Chalèse, 2011; Okamoto and Nishino, 1995)

Une des approches thérapeutique de cette maladie, est l'utilisation d'inhibiteur de la xanthine oxydoréductase (Owen and Jonhs, 1999; Okamoto and Nishino, 1995). L'allopurinol, est un puissant inhibiteur chimique cliniquement très utilisé, cependant, son administration à long terme, s'accompagne d'un certain nombre d'effets secondaires (Lin et *al* 2002; Massey et *al.*, 1970).

L'implication de cette enzyme dans plusieurs cas pathologiques ainsi que la toxicité provoquée par son inhibiteur chimique, a incité les chercheurs à trouver des substituts qui ne retiennent que l'efficacité thérapeutique souhaitée. L'une de ces sources sont les plantes médicinales. Plusieurs études ont été entreprises dans le but d'évaluer l'activité hypouricémiant des extraits de plante dans un but préventif ou curatif de la maladie de la goutte et les pathologies qui lui sont associées (Huang, 2011; Zhao et *al.*, 2006; Cos et *al.*, 1998)

Notre étude a pour objectif de tester l'effet de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur les niveaux d'acide urique et les activités xanthine oxydoréductase chez des souris non traitées et des souris hyperuricémiques induite par l'oxonate de potassium. A notre connaissance aucune investigation n'a été déjà réalisée sur l'activité anti-hyperuricémique des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

### I. Origine de l'acide urique

La production de l'acide urique est liée au catabolisme des acides nucléiques, et à la purinosynthèse de novo à partir des substances organiques (Chazerain and Ziza, 1999). Les deux réactions finale d'oxydation des purines sont catalysées par la xanthine oxydoréductase (XOR) (Parks et *al.*, 1986).

#### I.1. La xanthine oxydoréductase (XOR)

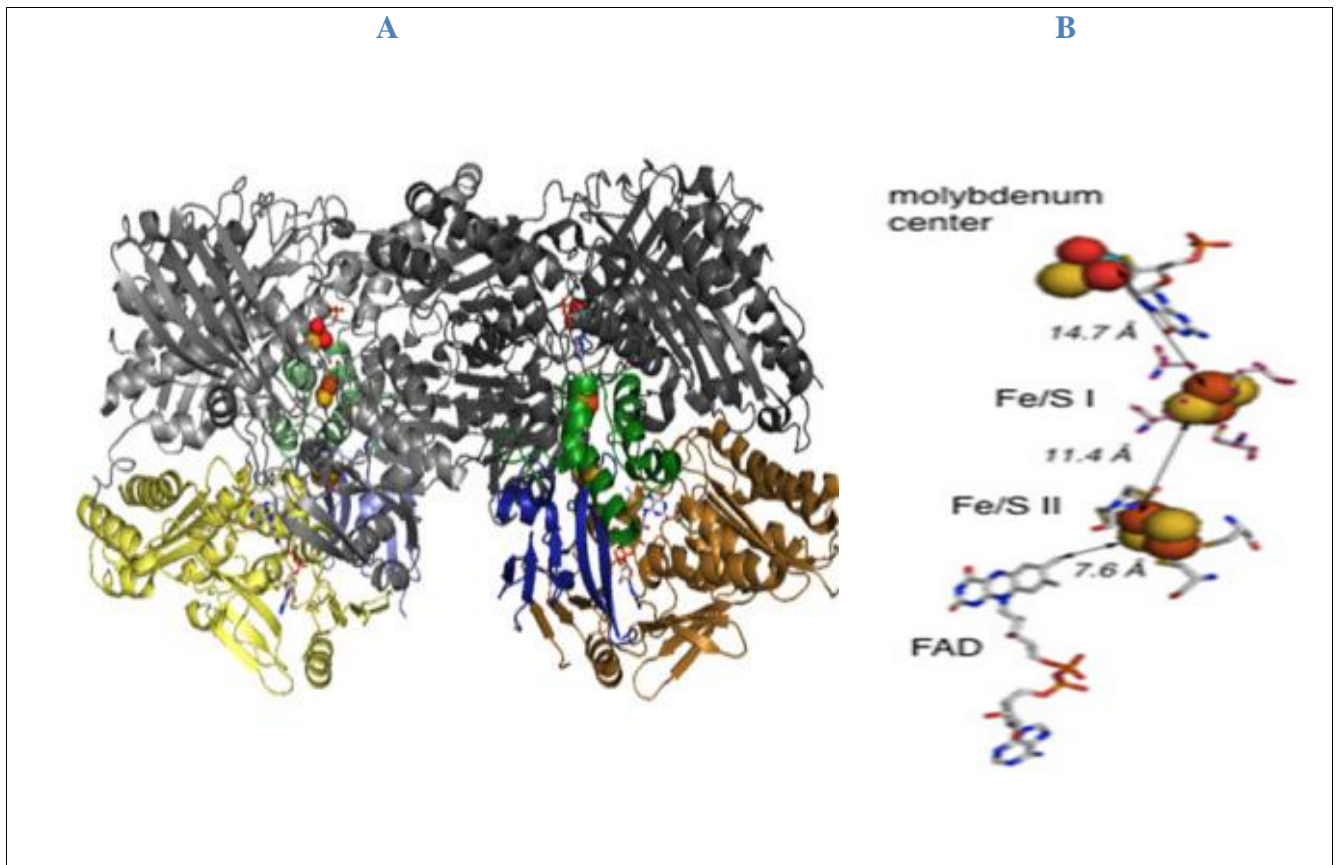
La XOR est une molybdoflavoprotéine, existant sous deux formes interconvertibles :

- La xanthine déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (XDH; EC 1.1.1.204) qui est la forme dominante *in vivo*.
- la xanthine oxydase O<sub>2</sub>-dépendante (XO; EC 1.1.3.22) peut être formée sous certaines conditions pathologique (Komal et *al.*, 2013).

La conversion de la XDH en XO génératrice de radicaux libres se fait par des modifications qui sont soit réversibles (par oxydation des résidus sulfidryl) ou irréversibles (par protéolyse) (Corpas et *al.*, 2008).

##### I.1.1. Structure moléculaire XOR

XOR est un homodimère d'environ 300kd formé de deux sous unités, chaque sous unité est organisée en 3 domaines associés avec un cofacteur spécifique; le domaine N-terminal (aa 1-165) est composée de deux sous domaines chacun avec un centre Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> coordonné à quatre résidus cystéine. Un peptide linker le connecte au domaine intermédiaire (aa 226-531) qui détient une profonde poche de liaison pour le FAD et qui positionne le cycle de la flavine à proximité d'un centre Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. Un autre peptide de liaison joint le domaine FAD avec le domaine C-terminal (aa 590 -1332) qui est le domaine le plus large, qui permet la liaison du cofacteur Molybdoptérine (Mo) (Berry et *al.*, 2004) (figure 1).



**Figure 1:** La structure de la xanthine oxydoréductase bovine. (A) Les domaines contenant les centres fer-soufre sont représentés en bleu et vert, Le domaine contenant le FAD en jaune, et les deux domaines molybdoptérines sont indiqués en gris. (B) un gros plan d'un monomère, avec l'agencement linéaire des quatre centres redox-actifs indiqués à droite. Les distances entre les centres redox-centres sont données en angströms (Hille et *al.*, 2011).

## I.1.2. Distribution et localisation de la XOR

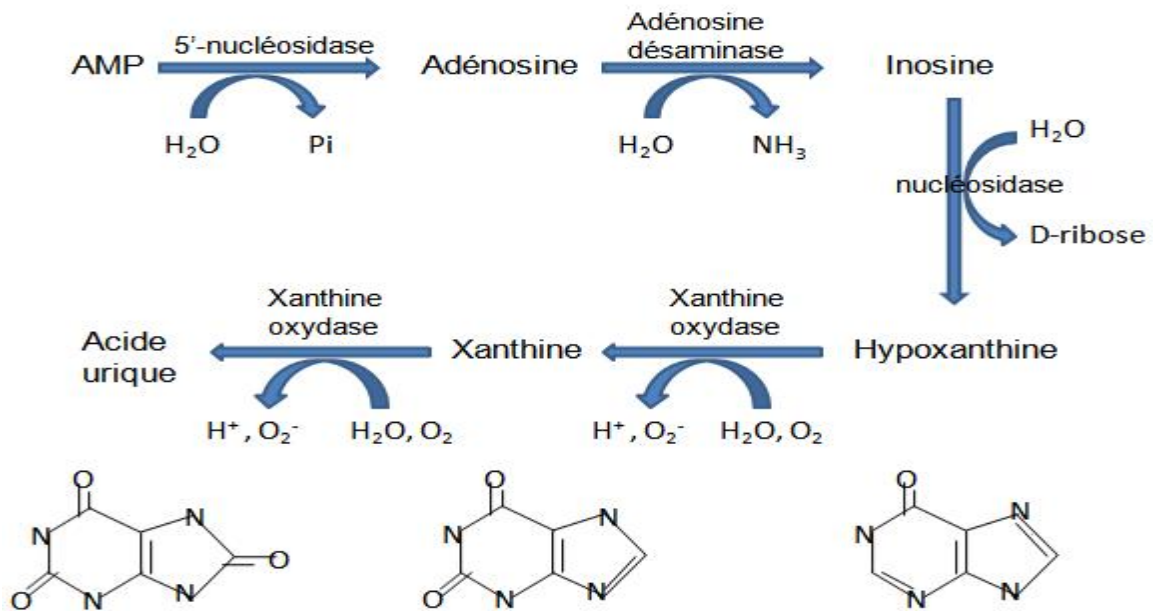
La XOR est une enzyme qui existe chez la plus part des êtres vivants, les bactéries (Woolfolk and Downard, 1977), les végétaux et l'Homme (Kooij et *al.*, 1992).

Le gène de la XOR est hautement exprimé dans le foie, l'intestin grêle et le lait où l'activité XOR est très élevée (Parks and Granger, 1986; Wright et *al.*, 1993).

Les méthodes de localisation intracellulaire montrent que la XOR se trouve à fortes concentrations dans le cytoplasme (Jarasch et *al.*, 1981) au niveau de la membrane cellulaire (Rouquette et *al.*, 1998).

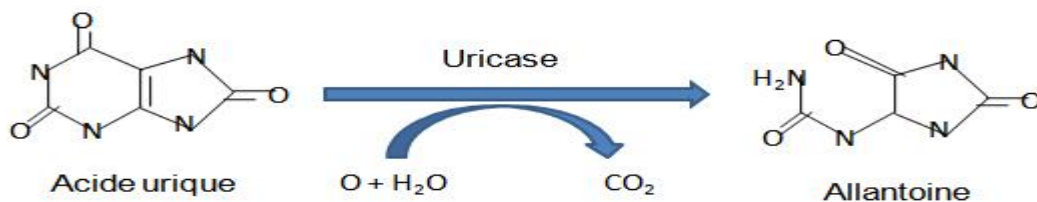
### I.1.3.Rôle physiologique

La XOR catalyse les deux dernières étapes de la dégradation des purines: l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique (Figure 2).



**Figure2:** Production d'acide urique à partir de nucléosides puriques (Parks et *al.*, 1986).

La plupart des mammifères excepté l'Homme dégradent l'acide urique en ouvrant le cycle grâce à l'uricase pour donner l'allantoïne qui sera éliminé (Figure 3).



**Figure 3:** Oxydation de l'acide urique en allantoïne (Harper et *al.*, 1982)

### I.1.4. Rôle pathologique

L'accumulation de l'acide urique produit par la XOR conduit à l'hyperuricémie et à toutes les pathologies secondaires à ce désordre métabolique.

L'hyperuricémie représente le facteur de risque majeur dans l'apparition de la maladie de la goutte (Chalès, 2011), elle est définie par un taux plasmatique d'urate supérieure à 420  $\mu\text{M}$  (7 mg/dl) qui correspond au seuil de solubilité de l'urate de sodium dans les conditions physiologiques de pH et Température (Kornig, 2011) conduisant ainsi à la formation des cristaux d'urates monosodique dans les articulations (Mirriman and Dalbeth, 2010).

## II. Les traitements anti-hyperuricémique

Il existe trois catégories d'hypo-uricémiants: Les uricolytiques, les uricosuriques et enfin les inhibiteurs de la synthèse de l'acide urique (inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase).

### II.1. Les uricolytiques

Les uricolytiques correspondent à l'urate oxydase (Uricase); qui transforme l'acide urique en allantoïne, enzyme inactive chez l'Homme suite à une mutation (Dubost et *al.*, 2011). Son administration par voie intraveineuse montre un puissant effet hypouricémiant, cependant sa demi vie est brève moins de 24h.

La fréquence des réactions allergiques, ainsi que le développement d'anticorps dirigés contre l'urate oxydase limitent fortement l'usage de cette molécule (Richette et *al.*, 2011).

### II.2. Les uricosuriques

Les uricosuriques sont des acides organiques fortement fixés aux protéines plasmatiques (probenicid, benzbromarone). Ils exercent leurs effets hypouricémiant en inhibant le transporteur d'anions (URAT1) (Dubost et *al.*, 2011).

### II.3. Les inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase

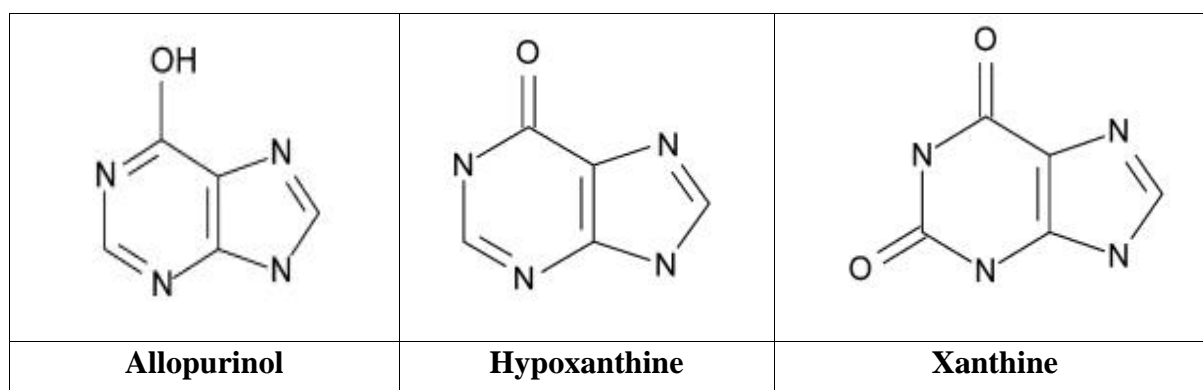
Comme la XOR est impliquée dans les étapes finales de production d'acide urique des inhibiteurs de cette dernière sont utilisés pour prévenir l'hyperuricémie et traiter la maladie de la goutte (Okamoto and Nishino, 1995).

#### II.3.1. Les inhibiteurs de synthèses

Les inhibiteurs de la XOR peuvent être des analogues de substrats puriniques ou des molécules n'ayant aucune relation structurale avec les substrats biologiques de l'enzyme, ils réagissent au niveau du site Mo.

##### ➤ Allopurinol

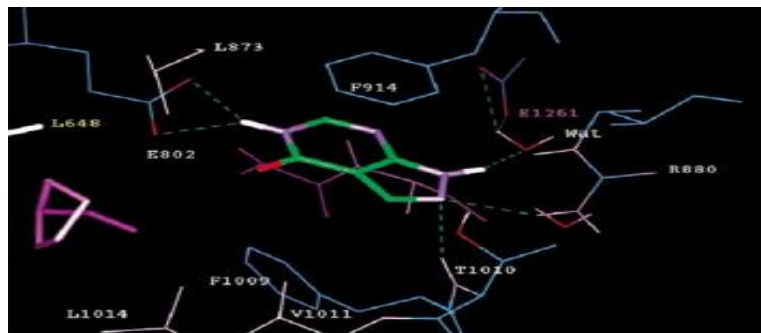
L'allopurinol ou 4-hydroxypurazolo [3,4-d] pyrimidine est l'inhibiteur le plus prescrit pour la prévention des crises d'arthrite goutteuse. C'est un analogue de structure vue son analogie avec la xanthine et l'hypoxanthine (Figure 4), et est donc un inhibiteur compétitif de cette dernière, à des concentrations élevées il agit comme étant un inhibiteur non compétitif (Owen and Johns, 1999).



**Figure 4 :** Structure chimique d'allopurinol, hypoxanthine et de la xanthine (Takano et *al.*, 2005).

L'allopurinol agit au niveau du site molybdène de l'enzyme, sa fixation à ce dernier empêche la liaison de l'enzyme avec les purines et forment un complexe abortif ayant une longue demi vie (Pelmont, 1993) (figure5).





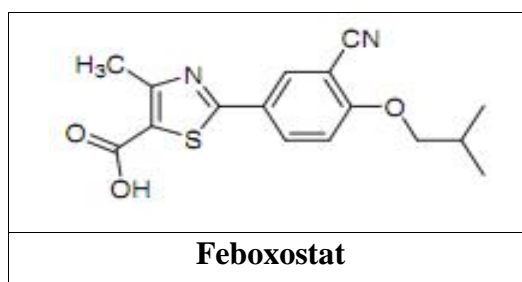
**Figure 5:** Modèle moléculaire de la liaison de l'allopurinol (en vert) au site actif de la xanthine oxydase (Lin et *al.*, 2002).

Cependant cette substance engendre de sévères effets secondaires comme les hépatites, les néphropathies et les réactions allergiques (Takano et *al.*, 2005).

### ➤ **Febuxostat (TEI 6270)**

Un nouvel hypouricémiant le febuxostat (figure 6), est un inhibiteur sélectif non purinique de la xanthine oxydoréductase récemment mis sur le marché (Peng et *al.*, 2013).

Les effets indésirables liés au febuxostat les plus fréquemment rapportés sont les désordres métaboliques montrés notamment par une augmentation de la concentration des enzymes hépatiques (les transaminases), des diarrhées, des céphalées, des nausées et des éruptions cutanées (Pascal et *al.*, 2011).



**Figure 6 :** Structure chimique du febuxostat (Burns and Robert, 2011).

Malheureusement, la médication conventionnelle pour la goutte n'est pas toujours efficace et peut causer des effets secondaires inconfortables, ceci en a poussé les chercheurs à trouver d'autres alternatives qui retiennent la même efficacité que leur homologues synthétiques mais exempt d'effet secondaires.

### II.3.2. Les inhibiteurs naturels d'origine végétale

Depuis des siècles l'Homme cherche inlassablement à étudier les extraordinaires vertus des plantes, incluant entre autre des activités antioxydantes, antivirales, antibactériennes et plusieurs effets sur différentes enzymes tel que la XO (Huang, 2011). Ces différents effets thérapeutiques ont été attribués aux composés phénoliques (Owen and John, 1999).

#### II.3.2.1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ils constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (Ali et *al.*, 2001; Huang and Ferraw, 1991).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl coenzyme A et de phénylalanine par deux voies d'aromagenèse qui permettent la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulier...

#### ➤ Classification des polyphénols

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (Harborne, 1980).

Parmi les composés phénoliques dont plus de 8000 structures sont connus :

- les acides phénoliques,
- les flavonoïdes,
- les tannins
- les coumarines et d'autres classes existent en nombres considérables.

#### a- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (Figure 7) :

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique,
  - Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.
- (Bruneton, 2008).

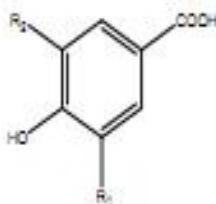
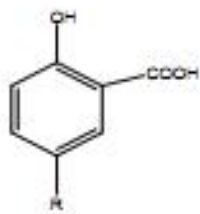
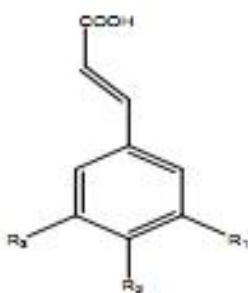
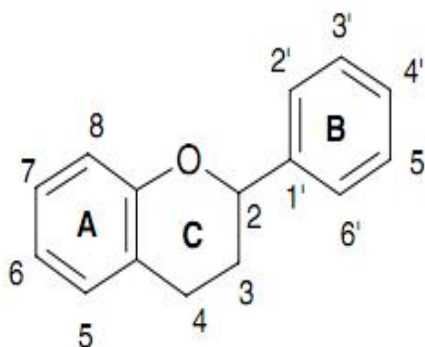
	$R_1 = R_2 = H$	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
	$R_1 = OH, R_2 = H$	Acide protocatéchique
	$R_1 = OCH_3, R_2 = H$	Acide vanillique
	$R_1 = R_2 = OH$	Acide gallique
	$R_1 = R_2 = OCH_3$	Acide syringique
	$R = H$	Acide salicylique
	$R = OH$	Acide gentisique
	$R_1 = R_2 = R_3 = H$	Acide cinnamique
	$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$	Acide <i>p</i> -coumarique
	$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$	Acide caféique
	$R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$	Acide férulique
	$R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$	Acide sinapique

Figure 7: Exemples d'acide phénoliques (Ribereau, 1968).

### b- Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent un groupe de substances caractérisés par un squelette carboné à 15 atomes de carbones repartis selon la séquence  $C_6C_3C_6$  (Balasundram et *al.*, 2006) (figure 8).



**Figure 8:** Structure chimique d'un flavonoïde (Balasundram et *al.*, 2006)

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultats les principales classes des flavonoïdes, c'est-à-dire les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, et les anthocyanidines, dans les quelles : les flavones et les flavonols sont les plus réponsus et structuralement diverses (tableau I).

Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieures de chaque classe de flavonoïdes. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, alkylation, la glycolysation, l'acylation et la sulfatation (Balasandram et *al.*, 2006).

# Synthèse bibliographique

**Tableau I:** Structure chimique des flavonoïdes et quelques exemples (Aruoma *et al.*, 2003)

Classe	Structure chimique	Exemple
Flavanones		R=R <sup>1</sup> =H, R <sup>11</sup> =R <sup>111</sup> =OH; Naringenin R=OH, R <sup>1</sup> =H, R <sup>11</sup> =R <sup>111</sup> =OH; Eriodictyol R=R <sup>1</sup> =OH, R <sup>11</sup> =R <sup>111</sup> =OH; 5'-OH-Eriodictyol
Flavones		R=R <sup>1</sup> =H; Apigenin R=OH, R <sup>1</sup> =H; Luteolin R=R <sup>1</sup> =OCH <sub>3</sub> ; Tricetin
Isoflavones		R=OH; Genistein R=H; Daidzein
Flavonols		R=R <sup>1</sup> =H; Kaempferol R=OH, R <sup>1</sup> =H; Quercetin R=R <sup>1</sup> =OH; Myricetin
Flavanols		R=OH, R <sup>1</sup> =H; (-)-Epicatechin R=R <sup>1</sup> =OH; (-)-Epigallocatechin R=OH, R <sup>1</sup> =H; (+)-Catechin R=R <sup>1</sup> =OH; (+)-Gallocatechin
Anthocyanidins		R=OH, R <sup>1</sup> =H; (+)-Epicatechin R=R <sup>1</sup> =OH; (+)-Epigallocatechin R=OH, R <sup>1</sup> =H; (-)-Catechin R=R <sup>1</sup> =OH; (-)-Gallocatechin
		R=OH, R <sup>1</sup> =H; Cyanidin R=R <sup>1</sup> =OH; Delphinidin R=R <sup>1</sup> =OCH <sub>3</sub> ; Malvidin R=R <sup>1</sup> =H; Pelargonidin
		R=H; Peonidin R=OH; Petunidin

### c- Les tannins

Ils représentent un groupe hétérogène, on se réfère souvent à une distinction entre tannins hydrolysables et tannins condensés.

- Tannins hydrolysables: ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

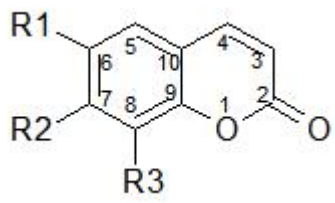
- Tannins condensés: ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (Catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines).

Ils sont aussi désignés sous le nom de « tannins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acide (Macheix, 1996).

### d-Les coumarines

Les coumarines sont des substances phénoliques issues de la fusion du benzène et du noyau -pyrone. Rattachée aux acides cinnamiques, ils sont constitués par un élément C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, dans lequel la chaîne C<sub>3</sub> est sous forme d'hétérocycle oxygéné (Li et *al.*, 2011) (Tableau II).

**Tableau II** : Structure de quelques coumarines (Chang and Chiang, 1995).

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>Ombelliférone</b>	H	OH	H
<b>Esculétine</b>	OH	OH	H
<b>Scopolétine</b>	O-CH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Fraxétine</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
<b>Fraxine</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	O-Glu
<b>Esculine</b>	O-Glu	OH	H

### III. Mécanisme anti-hyperuricémique des composés phénoliques

L'hyperuricémie peut être secondaire à une production endogène accrue de l'acide urique au cours de certaines enzymopathies. Elle est habituellement secondaire à une diminution de l'excrétion rénale. Les agents hypo-uricémiants, agissent par diurèse ou par l'inhibition de la xanthine oxydoréductase.

#### II.1. Inhibition de la xanthine oxydase

Les phénomènes d'interactions polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes, tannins, coumarines (Havesteen, 2002).

Outres les effets antioxydants, ces interactions, qui sont encore à valider *in vivo*, sont vraisemblablement à la base des effets bénéfiques de ces métabolites secondaires (Monien, 2006).

L'inhibition de la production des EOR (espèces oxygénées réactives) par les polyphénols, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR (Dargles and Dufour, 2008).

Cette action est bien illustrée dans le cas de la xanthine oxydase, cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Hansaki et ses collaborateurs ont montré que les polyphénols peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent prévenir la maladie de la goutte; en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Karmella et *al.*, 2011; Hansaki et *al.*, 1994).

Plusieurs études ont confirmé les résultats de Hansaki, et ont établi les relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à inhiber la formation du superoxyde par inhibition de la xanthine oxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur).

##### III.1.1.les flavonoïdes

Les études relation structure-activité anti-xanthine oxydase ont montré que la structure du cycle C est importante.

1. Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols n'ont aucun effet sur l'activité xanthine oxydase (cycle C non plan).

2. Les flavonols comme la quercétine et les flavones comme l'apégénine ont la capacité d'inhiber la XO grâce au groupement C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> qui maintiennent la structure plane des flavonoïdes ainsi qu'aux groupements hydroxyles C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub> et au groupement carbonyle en C<sub>4</sub> qui contribuent favorablement aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif molybdoptérine de la XO (Middleton et *al.*, 2000; Lin et *al.*, 2002).

3. Les groupements hydroxyles en C<sub>5</sub> et/ou C<sub>7</sub> sont essentiels pour l'inhibition de la XO (Da Silva et *al.*, 2004), l'hydroxyle en C<sub>3</sub> n'est pas important pour cette activité car les flavones ne possèdent pas d'activité anti-XO.

4. Les flavonoïdes glycosylés sont moins actifs que leurs homologues glycosylés (Lin et *al.*, 2002) (Figure 9).

### III.1.2. Les coumarines

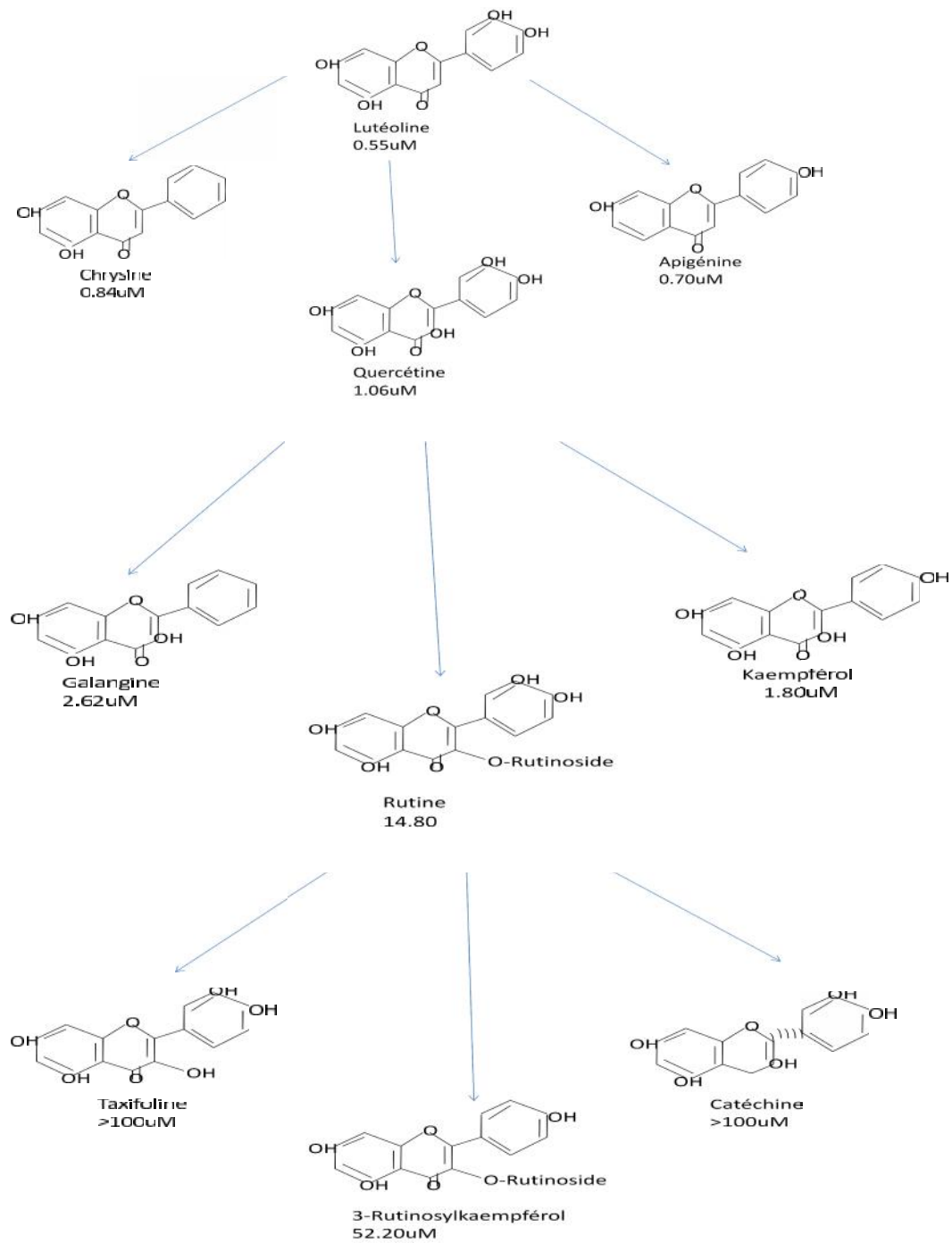
La présence de groupement 7-hydroxyle ainsi que la double liaison dans la structure des coumarines jouent un rôle prépondérant dans l'activité inhibitrice de ces composées sur la XO alors que le groupement 6-hydroxyle amplifie cet effet, et toute substitution en position C<sub>6</sub> ou C<sub>7</sub> réduit cette activité inhibitrice, cette réduction dépend de la nature des substitutions (méthyle ou glycosyle) (chang et *al.*, 1995).

Le groupement OH sur le C<sub>6</sub> du 7-hydroxycoumarine donne naissance à l'esculetine (6,7-dihydroxycoumarine) qui montre une inhibition plus forte vis-à-vis de la XO, tandis que la méthylation du groupement OH en C<sub>6</sub> qui donne la scopoletine, réduit l'action inhibitrice. L'inhibition de la XO est influencée par le type de substitutions à la position C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, du 7-hydroxycoumarine qui réduit cette activité inhibitrice (Lin et *al.*, 2008).

L'esculetine est un inhibiteur compétitif ; sa fixation au niveau du centre Mo lui confère la forte action inhibitrice sur la XO (Chan et *al.*, 1995).



## Synthèse bibliographique



**Figure 9:** Relation structure activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la XO (IC50)

(Cos *et al.*, 1998)

### III.1.3. Les tannins

Les tannins possèdent une activité inhibitrice de la XOR, qui varie selon le type de tannin ; les tannins hydrolysables monomériques inhibent fortement l'activité de la XO et cette inhibition augmente proportionnellement avec l'augmentation de leurs poids moléculaire, qui est accompagnée d'une augmentation dans le nombre des groupements hydroxyles portés par le noyau phénolique (Maicheix, 2005). Par ailleurs l'absence d'activité inhibitrice des tannins dimériques ne est étroitement liée à l'augmentation de la rigidité de la molécule en raison des substitutions (Shemeda-Hirshemann et *al.*, 1996).

### III.2. Diurèse

Les polyphénols peuvent aussi agir sur les paramètres de la diurèse, en augmentant la sécrétion de l'acide urique, selon différents mécanismes :

- Par l'amélioration des conditions hémodynamiques (Li et *al.*, 2011).
- Augmentation de la filtration glomérulaire.
- Inhibition de la réabsorption tubulaire distale (Enomoto and Endou, 2005)
- Augmentation du volume urinaire qui rehausse la solubilité de l'urate de sodium et autres sels de cristallisation, ce qui va faciliter l'élimination des cristaux et réduire le risque d'agrégation (Arafat et *al.*, 2008).

Aucune investigation expérimentale *in vivo* n'a été entreprise, sur l'effet anti-hyperuricémique des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, d'où l'objectif de notre travail qui consiste en l'évaluation de l'activité anti-hyperuricémique de l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia* (frêne).

## I. Matériel

### I.1. Matériel végétal

#### I.1.1. Description

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été choisies pour cette étude. *Fraxinus angustifolia* communément appelée frêne ou aslen en kabyle est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle locale.

Cette espèce appartient à la famille des Oléacées commune des régions humides de toute l'Algérie septentrionale (Bruneton, 2005). C'est un grand arbre majestueux qui peut atteindre 20 mètre de hauteur, ses feuilles sont imparipennées 7 à 13 folioles (Bernard, 1997) (figure10).



**Figure 10:** Feuilles de l'espèce *Fraxinus angustifolia*

#### I.1.2. Classification

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Oléacée
<b>Genre</b>	Fraxinus
<b>Espèce</b>	<i>Fraxinus angustifolia</i>

# Matériel et méthodes

---

## I.1.3. Constituants chimiques

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* contiennent des flavonoïdes, des tannins, des coumarines (fraxine, esculétine...) et des sucres (Kostova and Iossifova, 2007).

## I.1.4. Effets thérapeutiques

Le frêne est utilisé en médecine populaire, les feuilles en décoction sont efficaces contre les parasites intestinaux, elles possèdent des propriétés antirhumatismales et antigoutteuses, elles ont aussi un effet laxatif et diurétique (Beloued, 2001).

## I.2. Matériel animal et conditions d'élevage

Pour évaluer l'activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase, *in vivo* des extraits de la plante sélectionnée, nous avons utilisé des souris albinos mâles, d'un poids qui varie entre (22-28) g avec une moyenne d'âge (06) semaines.

Ces animaux proviennent du centre d'élevage de l'institut Pasteur d'Alger et l'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire d'expérimentation animale de l'université de Bejaia.

Pour respecter leur cycle biologique, les animaux ont été mis sous des conditions de température ambiante de (23-25) °C et d'humidité de (60-70)%. Ils subissent un rythme d'éclairage et d'obscurité 12h/12h. Les souris ont été nourries à volonté avec l'aliment à bouchon et l'eau de robinet (Figure 11).



**Figure 11** : Cage de souris

## I.3. Produits chimiques et appareillages

Allopurinol, Oxonate de potassium, Xanthine, EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), NaOH,  $NAD^+$ , HCl, Ethanol, Bleu de coomassi, KCl, kits de dosage de l'acide urique, CMC ( $C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$ ) et Chloroforme. Tous les réactifs utilisés sont de type sigma.

### Autres matériel

- ❖ Tamiseuse de type RETSCH.
- ❖ Une centrifugeuse de marque SIGMA.
- ❖ Un agitateur de marque VELP.
- ❖ Spectrophotomètre de type SHIMACTZU relié à un ordinateur HP.
- ❖ Une balance de type RADWAG.
- ❖ Une étuve de marque ECOCELL.
- ❖ Un broyeur de marque KIKA.
- ❖ Un pH mètre de type HANNA.
- ❖ Sonicateur de marque RAYPA.
- ❖ Vortex de marque VELP.

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des extraits

#### ✓ Récolte

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en juillet 2012 dans la forêt Chemini Sidi aiche, wilaya Bejaia.

#### ✓ Broyage et Tamisage

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées à une température ambiante dans un endroit ombragé et aéré, elles ont été ensuite broyées et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre 63um.

## ✓ Extraction

L'extraction des constituants des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été réalisée selon les étapes suivantes :

1. 200g de poudre des feuilles *Fraxinus angustifolia* ont été macérés dans de l'éthanol avec un rapport de 1:4 (P/V).
2. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 24heures, puis transféré dans une éprouvette pour décantation pendant 24 heures.
3. Le surnageant récupéré a été centrifugé à 1500g durant 10min, puis transféré dans un cristalliseur et laissé sous hôte pour évaporation totale du solvant.

## II.2. Evaluation de l'activité anti-hyperuricémique et anti-Xanthine oxydase

### II.2.1.Le principe

Pour mettre en évidence l'activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase de l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia*, un modèle expérimental d'hyperuricémie induit par l'injection intrapéritonéale d'oxonate de potassium a été sélectionné. L'oxonate de potassium est un inhibiteur de l'uricase (enzyme qui dégrade l'acide urique) ce qui provoque une hyperuricémie chez les animaux d'expérience.

L'extrait à effet anti-hyperuricémique va réduire les niveaux d'acide urique chez les animaux hyperuricémiques, l'un des mécanismes d'action de l'extrait testé est l'inhibition de la xanthine oxydase.

### II.2.2.Protocol expérimental

La technique utilisée est inspirée de la méthode décrite par De Souza et ces collaborateurs (2012). Une solution d'oxonate de potassium (250mg/ml) fraîchement préparée était injectée par voie intra-péritonéale 1 heure avant l'administration intra-gastrique (à l'aide d'une sonde gastro-œsophagienne) de la solution extrait (100, 200, 400 mg/Kg) ou la solution standard (10mg/Kg). Les solutions tests sont dissoutes dans du CMC à 0,8%.

## Matériel et méthodes

Un effectif de 60 souris mâles ont été répartis en 10 groupes de 6 souris, mis à jeun 1h30 avant le début de l'expérimentation et traités quotidiennement pendant 3 jours comme suit : (Tableau III).

**Tableau III** : Repartitions des groupes et différents traitements.

	<i>Groupes</i>	<i>1ère administration IP</i>	<i>2ème administration IG</i>
<i>Normal</i>	<b>Normal</b>	<b>Eau distillé</b>	<b>CMC 0, 8%</b>
	<b>+ extrait 100</b>	<b>Eau distillé</b>	<b>Extrait 100</b>
	<b>+ extrait 200</b>	<b>Eau distillé</b>	<b>Extrait 200</b>
	<b>+ extrait 400</b>	<b>Eau distillé</b>	<b>Extrait 400</b>
	<b>+ allopurinol</b>	<b>Eau distillé</b>	<b>Allopurinol</b>
<i>Hyperuricémique</i>	<b>Hyperuricémique</b>	<b>Oxonate de potassium</b>	<b>CMC 0, 8%</b>
	<b>+ extrait 100</b>	<b>Oxonate de potassium</b>	<b>Extrait 100</b>
	<b>+ extrait 200</b>	<b>Oxonate de potassium</b>	<b>Extrait 200</b>
	<b>+ extrait 400</b>	<b>Oxonate de potassium</b>	<b>Extrait 400</b>
	<b>+ allopurinol</b>	<b>Oxonate de potassium</b>	<b>Allopurinol</b>

IG : intra-gastrique, IP : intra-péritonéal



Injection intra-péritonéale



Administration intra-gastrique

**Figure 12**: Représentation des voies d'administration des solutions.

## Matériel et méthodes

---

Au troisième jour du test et 1 heure après le dernier traitement, les animaux ont été sacrifiés sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme. Le sang collecté à partir de la jugulaire et laissé pour coaguler pendant 1heure a été centrifugé à 5000 g pendant 10 min et le sérum est stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Le foie prélevé était lavé avec du KCl, et stocké à -80°C jusqu'à la préparation des homogénats de foie pour les tests d'activité XO/XDH et le dosage des protéines totales.

### II.2.3. Dosage de l'acide urique

#### a) Principe

Le dosage de l'acide urique a été effectué en utilisant un kit commercial dont le principe est basé sur la méthode Kabasakalian (1973) et Trivedi (1976).

L'acide urique est oxydé en allantoiné par l'uricase avec production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagit avec la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et l'acide 2, 4,6-Tribromo-3-hydroxybenzoïque (TBHB) en présence de la peroxydase pour produire un composé coloré appelé quinoneimine, la modification de l'absorbance à 560 nm qui en résulte est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon (mg/dl).

#### b) Mode opératoire

Le mélange contenant 20µl d'étalon (standard) ou d'échantillon à analyser et 1000µl de réactif est incubé pendant 10min à température ambiante.

L'absorbance de l'échantillon contre le blanc réactif a été lue à 560nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration de l'acide urique est déterminée :

$$[\text{Acide urique}] \text{ mg/dl} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} * 8$$

$$[\text{Standard acide urique}] = 8 \text{ mg/dl}$$



## II.2.4. Evaluation de l'activité XO/XDH

### a) Principe

La méthode est basée sur la production de l'acide urique en présence de la xanthine comme substrat par la XOR présente dans l'homogénat de foie. L'apparition de ce produit était suivie à 290nm par spectrophotométrie.

### b) Mode Opérateur

Le foie des souris a été broyé à l'aide d'un mortier en porcelaine, homogénéisé dans 10% (poids/volume) du tampon phosphate de 0,05M pH=7,5 ensuite centrifugé à 5000g pendant 10min.

La couche lipidique a été enlevée soigneusement, le surnageant récupéré a été centrifugé à 5000g pendant 10min, le surnageant final était stocké à -80°C jusqu'à la réalisation des tests d'activité XO/XDH.

### c) Procédure

Le mélange réactionnel contient 3,5 ml de tampon phosphate (0,05M; pH=7.5), 0,1 ml d'homogénat de foie et 1 ml d'oxonate de potassium pour éviter l'oxydation de l'acide urique en allantoïne (pour le dosage XDH, 0,5 ml NAD<sup>+</sup> est ajouté en plus au mélange précédent). La réaction a été initiée par l'addition de 1 ml de xanthine. Après 10min d'incubation, la réaction a été stoppée par l'addition de 0,5 ml de HCl. Après centrifugation à 5000g pendant 5min, l'absorbance a été lu à 290 nm caractéristique de l'absorbance de l'acide urique, produit par la xanthine oxydoréductase.

Une unité d'activité XO/XDH est définie comme 1 nmole d'acide urique formée par min par mg de protéine

## II.2.5. Dosage des protéines totales

### a) Principe

Le dosage est réalisé en utilisant une méthode colorimétrique (la méthode de Bradford, 1976) basé sur le changement d'absorbance (465 – 595 nm) provoqué par le changement de la couleur du bleu de coomassi après interaction pigment-protéine qui s'effectue essentiellement avec les résidus d'acides aminés hydrophobes et basiques présents dans la protéine.

### b) Mode opératoire

10µl d'une solution d'homogénat de foie dilué ont été mélangé avec 90 µl d'eau distillée et 5 ml de réactif Bradford. Le mélange est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 min, la densité optique est lue à 595 nm. La serum albumine bovine (BSA) a été utilisée comme standard.

## II.3. Analyse des résultats

Les résultats des tests ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Statistica, les moyennes ont été comparées par l'analyse de la variance (ANOVA-MANOVA). Une différence significative est représentée par un p  $\leq$  0,001.

# Résultats

## II. Résultats

Les effets de l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur les niveaux d'acide urique et les activités XO/XDH hépatiques chez des souris non traitées et des souris hyperuricémiques ont été déterminés en utilisant un modèle animal chez lequel une hyperuricémie a été provoquée par l'injection intrapéritonéale de 250 mg/kg d'oxonate de potassium, un inhibiteur de l'uricase.

### II.1 Dosage d'acide urique

L'acide urique sérique est l'indicateur d'une hyperuricémie, ainsi les niveaux d'acide urique chez les différents groupes ont été mesurés en utilisant un kit de dosage. Le tableau suivant représente les résultats obtenus.

**Tableau IV:** Effet de l'extrait éthanolique de *F. angustifolia* et de l'allopurinol sur les niveaux d'acide urique chez des souris normales et des souris hyperuricémiques.

Groupes	Taux d'acide urique (mg/dl)
Normal	3,34 ± 0,38*
Normal + extrait 100mg/Kg	4,1 ± 0,27 <sup>#</sup>
Normal + extrait 200mg/Kg	3,57 ± 0,40 <sup>#</sup>
Normal + extrait 400mg/Kg	3,56 ± 0,5 <sup>#</sup>
Normal + allopurinol 10mg/Kg	0,30 ± 0,026 <sup>#</sup>
Hyperurécémique	4,84 ± 0,20 <sup>#</sup>
Hyperurécémique + extrait 100 mg/Kg	4,27 ± 0,20*
Hyperurécémique + extrait 200 mg/Kg	3 ± 0,27*
Hyperurécémique + extrait 400mg/Kg	2,51 ± 0,32*
Hyperurécémique + allopurinol 10mg/Kg	0,34 ± 0,026 <sup>*#</sup>

Les valeurs sont la moyenne ± SEM, n=6 dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA (ANOVA-MANOVA) suivie d'un test LSD. # indique P < 0,001 par rapport au groupe Normal, \* indique P < 0,001 par rapport au groupe hyperuricémique.

# Résultats

---

Le prétraitement des souris pendant 3 jours avec l'oxonate de potassium a significativement ( $P < 0,001$ ) augmenté la concentration de l'acide urique ( $4,84 \pm 0,20$  mg/dl), par rapport au groupe normal ayant reçu de l'eau distillée ( $3,34 \pm 0,38$  mg/dl).

L'extrait testé à 100, 200 et 400 mg/kg n'a montré aucun effet sur les niveaux d'acide urique chez le groupe normal, contrairement à l'allopurinol qui a significativement ( $P < 0,001$ ) diminué la concentration sérique de l'acide urique ( $0,30 \pm 0,026$  mg/dl) comparativement au groupe normal ( $3,34 \pm 0,38$  mg/dl).

Par ailleurs, on a observé une réduction significative ( $P < 0,001$ ) du taux d'acide urique chez les groupes hyperuricémiques traités avec l'extrait à 100, 200 et 400 mg/Kg ( $4,27 \pm 0,20$ ;  $3 \pm 0,27$  et  $2,51 \pm 0,32$  mg/dl), respectivement, comparativement au groupe hyperuricémique ( $4,84 \pm 0,20$  mg/dl). Aussi l'allopurinol a exercé une action hypouricémiant plus efficace que celle enregistrée au niveau des extraits du frêne.

## II.2. Test d'activité XO/XDH

Le foie représente une source importante de la XO/XDH, enzyme clé qui catalyse les deux dernières réactions du catabolisme des purines, générant l'acide urique. L'une des approches thérapeutiques pour le traitement de l'hyperuricémie est l'utilisation des inhibiteurs de la XOR, en bloquant la biosynthèse de l'urate.

L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de *F.angustifolia* sur l'activité XO/XDH hépatique a été réalisée en suivant l'apparition de l'acide urique, spectrophotométriquement à 290 nm. Les résultats obtenus ont montré qu'aux doses 200, 400 mg/kg l'extrait a significativement ( $P < 0,001$ ) inhibé l'activité XO/XDH, comparé avec le groupe normal et hyperuricémique, d'une manière dose dépendante comme le montre le tableau V.

De plus, l'allopurinol a efficacement inhibé les enzymes XO ( $5,66 \pm 0,0005$  ;  $8,97 \pm 0,001$ ) et XDH ( $5,99 \pm 0,003$  ;  $8,90 \pm 0,001$ ) chez les groupes non traités et les groupes hyperuricémiques, respectivement. Cette activité exhibée par l'allopurinol était significativement ( $P < 0,001$ ) plus importante que celles enregistrées au niveau de l'extrait de *F.angustifolia* à différentes concentrations.

## Résultats

**Tableau V:** Effet inhibiteur de l'extrait *F.angustifolia* et de l'allopurinol sur l'activité XO/XDH hépatique chez les souris normales et les souris hyperuricémiques.

Groupes	Activité (U/mg protéines)		% d'inhibition	
	XO	XDH	XO	XDH
Normal	25,54±0,9*	25,19±0,6*	—	—
Normal + extrait (100mg/kg)	21,64±0,004#	22,6±0,004#	16	11
Normal + extrait (200mg/kg)	19,00±0,001#	21,1±0,002#	26	17
Normal + extrait (400mg/kg)	15,67±0,001#	17,73±0,002#	39	30
Normal + allopurinol (10mg/kg)	5,66±0,0005#	5,99±0,003#	78	77
Hyperurécémique	25,13±0,001#	28,9±0,002#	—	—
Hyperurécémique + extrait (100mg/kg)	22,25±0,004*	17,5±0,001*	12	31
Hyperurécémique + extrait (200mg/kg)	15,26±0,0007*	13,3±0,0009*	40	54
Hyperurécémique + extrait (400mg/kg)	16,52±0,002*	12,1±0,003*	37	57
Hyperurécémique+ allopurinol (10mg/kg)	8,97±0,001**	8,90±0,001**	65	70

Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM, n =6 dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA (ANOVA-MANOVA) suivie d'un test LSD, # indique  $P < 0,001$  par rapport au groupe Normal, \* indique  $P < 0,001$  par rapport au groupe Hyperuricémique.

## Discussion

---

L'hyperuricémie caractérisée par des niveaux élevés d'acide urique dans le sang qui est à l'origine de la maladie de la goutte, résulte d'un certain nombre de troubles provoquant une surproduction ou dépréciés excrétion de l'acide urique (Hua et *al.*, 2012; Hang, 2011 ; Kramer and Curhan 2002). Le risque de la goutte augmente avec le degré et la durée de l'hyperuricémie (Raju et *al.*, 2012).

L'approche thérapeutique principale de la goutte est l'utilisation de l'inhibiteur de la XO comme l'allopurinol, un analogue de substrat, bloquant la dernière étape de la synthèse de l'acide urique à partir des purines (Sathisha et *al.*, 2011; Massey et *al.*, 1970). Cependant, il a été observé que l'allopurinol induit des effets secondaires tels que l'allergie cutanée, les hépatites et néphropathies (Takano et *al.*, 2005).

Une alternative à l'allopurinol est l'utilisation des plantes médicinales, les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de la goutte et les rhumatismes, ainsi dans le but de trouver une base scientifique à l'utilisation traditionnelle de la plante sélectionnée, nous avons évalué l'activité hypouricémiant d'un extrait préparé à partir de *F.angustifolia* en utilisant un modèle animal. L'hyperuricémie provoquée par l'oxonate de potassium chez les rongeurs est devenue un modèle excellent pour l'évaluation de l'activité anti-hyperuricémique de plusieurs substances (De Souza et *al.*, 2012 ; Chen et *al.*, 2011; Umamaheswari et *al.*, 2007; Zhao et *al.*, 2006; Kong et *al.*, 2004; Wang et *al.*, 2004; Zhu et *al.*, 2004).

Dans notre étude l'hyperuricémie est induite par l'injection intrapéritonéale de 250mg/kg d'oxonate de potassium, agissant par inhibition de l'uricase, une enzyme présente chez les mammifères exceptée l'Homme ou deux mutations faux sens ont eu lieu au début hominidé qui a rendu le gène uricase inactif (Supriya et *al.*, 2012) et/ou par blocage du transporteur d'acide urique (UAT) (Zhao et *al.*, 2006).

Les résultats ont montré que l'administration de l'inhibiteur de l'uricase a entraîné une élévation significative ( $P < 0.001$ ) de l'uricémie ( $4.84 \pm 0,20$  mg/dl) comparé au groupe normal ( $3,34 \pm 0,38$ ). L'allopurinol à une dose de 10mg/Kg avait significativement ( $P < 0,001$ ) réduit la concentration de l'acide urique ( $0,30 \pm 0,026$  mg/dl) chez les lots normaux. Nos résultats

## Discussion

---

s'accordent avec ceux rapportés par plusieurs études ayant montré que l'allopurinol est un puissant hypouricémiant (Massey *et al.*, 1970; Owen and Johns, 1999).

L'absence de diminution significative ( $P < 0,001$ ) de l'uricémie chez les animaux traités avec différentes concentrations (100 mg/Kg, 200 mg/Kg et 400mg/Kg) d'extraits de *F. angustifolia*, ( $4,1 \pm 0,2$ ;  $3,57 \pm 0,4$ ;  $3,56 \pm 0,5$ ), respectivement, ont montré que les extraits n'ont pas d'effet sur les niveaux d'acide urique ce qui est un avantage pour l'utilisation de cette plante médicinale. Cette suggestion est soutenue par les travaux de plusieurs auteurs (Haidari *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2004). Cette propriété exhibée par l'extrait, révèle que ce dernier pourrait apporter moins d'effets secondaires que les traitements chimiques, car le niveau basal d'acide urique est physiologiquement important.

Il a été montré que l'acide urique est un puissant antioxydant, il empêche l'oxydation de l'acide ascorbique dans le sang (Ames *et al.*, 1981; Davies *et al.*, 1985), il réduit l'anion superoxyde et le peroxyde (Becker, 1993) et il chélate le fer (Davies *et al.*, 1985). De plus c'est un inhibiteur allostérique de la xanthine oxydase réduisant ainsi la formation des espèces réactives de l'oxygène (Radi *et al.*, 1992). Des études récentes ont montré que l'acide urique est un neuroprotecteur et peut prévenir la maladie de Parkinson (Morelli *et al.*, 2010; Chamorro *et al.*, 2004). De ce fait l'abaissement excessif du taux d'acide urique dans la circulation sanguine pourrait être contre-productif (Wang *et al.*, 2004).

L'activité montrée par les extraits pourrait être dû à leur composition en polyphénols (Kuo *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2011; Cos *et al.*, 1998). Il a été rapporté dans la littérature que certains composés phénoliques existants dans les différentes espèces du frêne notamment la fraxine et l'esculetine ont un potentiel antioxydant élevé en inhibant la xanthine oxydase. Certains flavonoïdes tel que la rutine présente dans le frêne (Kostova et Iossifova, 2007) a exercé une activité anti-hyperuricémique, selon deux mécanismes, par inhibition de la XO et par augmentation de l'adsorption de l'acide urique (Arafat *et al.*, 2008). Cependant l'activité anti-hyperuricémique de *F. angustifolia* qui demeure la plus exploitée dans la médecine traditionnelle, n'a pas encore fait l'objet d'étude.

Ces résultats suggèrent que l'extrait testé était capable de réduire l'accumulation des purines dans le sang après une induction à l'oxonate. Il est probable que l'extrait réduisait la concentration d'acide urique en inhibant l'activité XO/XDH.

## Discussion

---

Bien que l'inhibition *in vitro* de la XO par *F.angustifolia* a été déjà rapportée par Berboucha et ces collaborateurs (2009), la fraction aqueuse de l'extrait éthyle acétate a inhibé la XO de façon dose dépendante ( $IC_{50}=58,83\mu\text{g/ml}$ ). A notre connaissance, la présente étude est la première démontrant l'action anti-hyperuricémique *in vivo* ainsi que la capacité à diminuer les taux hépatiques de XO/XDH de l'extrait de *F.angustifolia*.

Ainsi plusieurs études *in vitro* ont suggéré que l'activité inhibitrice XO/XDH est due à la composition phytochimique des extraits, essentiellement aux flavonoïdes (Da silva, 2004; Lin et al., 2002 ; Cos, 1998 ; Hansiki et al., 1994) ; composés structurellement similaires aux substrats de la XOR.

Par conséquent, la propriété hypouricémiant des feuilles de frêne exhibée dans cette étude pourrait être expliquée au moins en partie par l'action inhibitrice XO/XDH.

D'autres mécanismes possibles, tels que l'inhibition du transporteur URAT1 peut être suggérée, car il est responsable de la réabsorption d'acide urique au niveau du tubule rénal (Hua et al., 2012; Shi et al., 2012;).

Li et ses collaborateurs (2011), ont suggéré que *F.angustifolia* aurait un effet uricosurique, des molécules présentes dans les espèces de *Fraxinus* ont été testées sur un modèle hyperuricémique. Ces auteurs ont montré que l'esculetine et l'esculine ont exhibé une activation de l'expression du transporteur d'anion organique rénal 1 (OAT1) et les transporteurs organiques cationique et de carnitine (OCT1-2 et OCTN1-2), alors que la fraxétine et la fraxine ont augmenté l'excrétion de l'urate en partie par l'inhibition de l'URAT1.

De plus des actions sur d'autres enzymes métabolisant les purines attendent des investigations complémentaires. En fait, il a été rapporté que certains composés phénoliques hypouricémiants sont dépourvus de l'activité inhibitrice XO/XDH (Kong et al. 2004). La réduction de l'acide urique s'opère par l'augmentation de l'activité de l'uricase ou en améliorant la dégradation de l'acide urique (Kuo et al., 2012).

L'ampleur de la réduction d'activité XO/XDH provoquée par allopurinol était beaucoup plus élevée que celle observée avec *F.angustifolia* à la fois chez les groupes normaux et hyperuricémiques suggérant que *F. angustifolia* ne pourrait être une alternative à l'allopurinol mais au moins être dans une thérapie de combinaison afin de diminuer les effets secondaire de l'allopurinol.



## Conclusion et perspectives

---

Au terme de ce travail qui avait pour but d'évaluer les propriétés anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase de l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia*, il ressort que l'administration intra-gastrique de cet extrait à différentes doses a montré un effet hypouricémiant chez des souris hyperuricémiques induite par l'injection intrapéritonéale d'oxonate de potassium d'une manière dépendante de la concentration.

L'extrait du frêne a arboré une activité inhibitrice sur la XOR qui n'est pas en relation avec son action hypouricémiante cela a postulé que d'autres mécanismes sont impliqués tel que, l'inhibition de transporteur d'urate au niveau rénal, ou encore l'action sur d'autres enzymes métabolisant les purines.

Tenant compte de l'efficacité moindre de l'extrait testé par rapport à l'allopurinol nous a permis de suggérer que *F. angustifolia* ne pourrait être une alternative à l'allopurinol mais au moins être dans une thérapie de combinaison afin de diminuer les effets secondaire de l'allopurinol.

Les résultats obtenus nous ont permis d'envisager :

- Le fractionnement de l'extrait qui permettra de purifier des molécules qui à faible concentration pourrait montrer une plus grande efficacité.
- De tester l'extrait *Fraxinus angustifolia* sur un model animal d'hyperuricémie avec un temps de traitement plus long afin de préciser le mécanisme d'action au niveau des reins.
- De déterminer le mécanisme d'action des composés actifs responsables de l'activité testée.

## Références bibliographiques

---

- Ali, N., Julish,W., Kusumick,C. and Lindsequet, U. (2001). Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxie activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 173-179.
- Ames, B., Cathcart, R., Schwiers, E and Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. NatL Acad. Sci. USA*. 78: 6858-6862.
- Arafat, O., Tham, Y., Sadicum, A and Zhari, I. (2008). Studies on diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. *Journal of ethnopharmacology* 118: 354-360.
- Aruoma, O.I., Bahorun, T and Jen,L.-S.(2003). Neuroprotection by bioactive components in médicinal and Food plant extracts. *Mutation Research*, 544 :203-215.
- Balasundram, N.,Sundrum, K and Sammam,S.(2006). Phenolique compounds in plants and agri-industrial by products: antioxidant activity, occurrence, and potentiel uses. *Food chemistry*, 99: 191-203.
- Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, Dj and Benboubetra, M. (2010). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally usedf for the traitement of inflammatory diseases. *Journal of Medicinal Food*. Vol.13, pp.1-9.
- Bernad, B. (1997). Dictionnaire : Plantes et champignons. Edition *ESTEM*, 190-345.
- Berry, C,E and Hare, J,M. (2004). Xanthine oxydoreductase and cardio vascular desease: Molécular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology* 555: 589-606.
- Bloued, A. (2001). Plantes médicinale d'algerie. Office des publications universitaires. Algerie. 368p
- Bruneton, J. (2005). Plante toxique, végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. Tec et Doc (Lavoisier), *Médicales internationales*.425-426.
- Bruneton, J. (2008). Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales.Edition. *Tec et Doc*, P: 199-339.
- Chalès, G. (2011). De l'hyperuricémie à la goutte: Epidémiologie de la goutte. *Revue de Rhumatisme* 78: 109-115.

## Références bibliographiques

---

- Chamorroa, A., Planasb,M., Soy Munerc and Ramon Deulofeud. (2004). Uric acid administration for neuroprotection in patients with acute brain ischemia. *Medical Hypotheses* 62, 173–176
- Chan, W., Wen, P and Chiang, H. (1995). Structure activity relationship of caffeic acid analogue on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Researche*. 15: 703-708.
- Chazeris,P etn Ziza, J.M.(1999). Goutte. *Revue*. 48 :1453-1456 .
- Chen, L., Yin, H., Lan, Z., Shuwei, M., Zhang, S., Yang, S., Li, P and Lin, B. (2011). Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 135: 399–405
- Christopher, M Burns and Robert Wortman. (2013). Gout therapeutics: *New. Druags for an old disease*. *Lancet* 377: 165-177.
- Corpas Francisco, J., José, M,Palma.; Luisa, M, Sandalio and Raquel Valderraura. (2008). Peroxisomal xanthine oxidoréductase : characterization of the enzyme from pea (*Piscum sativuml*) leaves. *Journal of Plant Physiology* 165 :1319-1330.
- Cos, P., Clomme, M. ; Yang, L., Van Poel, B., Pieters, L and Beryghe, D.K. (1998). Structure activity relationship and classifisation of flavonoïds as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural and products*. 61:71-76.
- Dangles, O and Dufour, C. (2008). *Recent advances in Polyphenol Research*. 3 : 67-87.
- Da Silva, S.L., Honorio, K.M., Marangoni, S and Toyama, M.H. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoïd compounds in the tinhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure*. 684: 1-7
- Davies, J., Sevanian, A., Muakkassah, S and Hochstein, P. (1986). Uric acid-iron ion complexes. *Journal Biochem*. 235: 747-754
- De Souza, M., De Paula, C and De Resende, P. (2012). Pharmacological basis for use of *lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effect. *Journal of ethnopharmacology* 142: 845-850.
- Dubost, J and Mathieu, S. Soubrier. (2011). Traitement de la goutte. *Revue de médecine interne* 32: 751-757.

## Références bibliographiques

---

- Enomoto, A and Endou, H. (2005). Roles of organic anion transporteur (OATs) and urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 9: 195-205.
- Haidari, F., Keshavarz, S.,Shahi,M and Rashidi,M. (2011). Effects of Parsley (*Petroselinum crispum*) and its Flavonol Constituents, Kaempferol and Quercetin, on Serum Uric Acid Levels, Biomarkers of Oxidative Stress and Liver Xanthine Oxidoreductase Aactivity in Oxonate-Induced Hyperuricemic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 10: 811-819
- Haidari, F., Shahi, M., Keshavarz, S and Rashid, M. (2009). Inhibitory effects of tart charray (*Punus cerasus*) juice on xanthine oxidoreductase activity and is hypouricémic and antioxidant effets on rats. *Mal J Nutr* 15:53-64.
- Hang korng, Ea. (2011). De l'hyperuricémie a la goutte : *Physiopatologie. Revue du Rhumatisme* 78: 103-108.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S and Fukui,S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids.*Free Radic Biol Med* 16:845–850.
- Harper, HA. (1982). Précis de biochimie .Ed. *Les presses de l'universsité laval, Quebec (cannada)*: 519-541.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96:67–202
- Hille, R., Nishino, T and Bittner, F. (2011). Molybdenum enzymes in higher organism's coordination chemistery. *Reviews* 255:1179-1205.
- Hua, J., Huang, P., Zhu, S and Chen,Y. (2012). Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of Modified Simiao Decoction in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 142: 248–252
- Huang, J., Wang, S., Zhu, M., Chen, J and Zhu, X. (2011). Effets of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxydase activities in normal and hyperuricémic mice. *Food and Chemical Toxicology* 49 : 1943-1947.

## Références bibliographiques

---

- Jarasch, E., Grund C., Bruder G., Heid, W., Keenan T. and Franke W. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. 25: 67-82.
- Karmella, L.A and Christine, L.H. (2011). Xanthine oxidase inhibition of selected philippine medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 289-292.
- Komal, B., Sandeep, B., Pranay, S and Ashishk. (2013). Lead optimization of isocytosine derived xanthine oxidase inhibitor. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 23:834-838.
- Kong, D., Chen, Y., Fei, G., Wang, D and Guo, S. (2004). A chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibition liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 325-330.
- Kooij, A., Bosch, K.S., Frederiks W.M. and Van Noorden C.J.F. (1992). High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* 62: 143-150.
- Kostova, T and Iossifova, T.(2007). Chemical components of Fraxinus species. *Filoterapia* 78 :85-106.
- Kuo, Y., Kao, S., Chane, K., Lee, H., Huang, T and Wang, C. (2012). *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of functional foods*. 4: 375-381
- Li, J.M., Zhang, X., Wang, X., Chang, Y., Ling, X and Kong, D.(2011). Protective effects of *cortex fraxini* coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *European Journal of Pharmacology*. 666 : 96–204.
- Lin, C., Chen, C.S., Chen, C., Liang, Y.C and Lin, J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoïds that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Rechearch communication*. 294: 167-172.
- Lin, C., Tsei, S.H., Chen, S., Chang, Y.C and Lee, C.M., (2008). Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical scavengin activities. *Biochemical Pharmacology*. 75: 1416-1425.
- Linder, N., Rapola, J and Raivio K.O. (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Invest*. 79, 967-974.

## Références bibliographiques

---

- Macheix, J., Fleuriot, A and Allamand, C.J. (2005). Les composés phénoliques végétaux : en exemple de métabolites secondaire d'importance économique. P192.
- Massey, V., Kromai, H and Palmer, G. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxydase by allopurinol and other pyrazol [3,4-d] pyrimidines. *Journal of biological chemistry*. 245: 2837-2844.
- Middleton, E.J., Kandaswam, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*. 52: 673-751.
- Miriman, TR and Dalbeth, N. (2010). Bases Génétique de l'hyperuricémie et de la goutte. *Revue du Rhumatisme* 77: 328-334.
- Monien, B.H., Henry, B.L., Raghuraman, A., Hindle, M and Desai, U. M. (2006). *J. Bioorg. Med. Chem.* 14: 7988-7998.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Takahashi S., Agbedana, E., Hada T and Higashino, K. (1993). Purification and immunohistochemical localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta*. 1164: 327-330.
- Morelli, M., Carta, A., Anil Kachroo and Schwarzschild, M. (2010). Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Progress in Brain Research*. 183: 865-870
- Okamoto, K and Nishino, T. (1995). Mécanisme of inhibition of xanthine oxydoréductase with a new tight binding inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 270: 7816-7821.
- Owen, PL and Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethno Pharmacology* 64: 149-160.
- Parks, DA and Granger, DN. (1986). Xanthine oxydase : *Biochemistry distribution and physiology*. Scand Acta 548 : 87-99.
- Pelmont, J. (1993). Enzyme, *Edition OPU* : 365
- Peng, MD., Shumin yarg, MD., Zhang, MD., Qiong Lv, MD., Quing feng cheng, MD., Mei Mei, MD., Ting Luo, MD., Lulu, MD., Shumei Chen, MD and Qifu Li, MD. (2013). Efficacy and Tolerability of febuxostat in hyperuricemic patients with or without Gout: A Systematic. Review and Meta-analysis. *Clinical therapeutic*. 35: 49-55

## Références bibliographiques

---

- Richette, P., Ottaviani, S and Bardin Thomas. (2011). Nouveaux traitement de la goutte. *Presse Med* 40: 844-849.
- Rouquette, M., Page, S., Bryant, R., Benboubetra, M., Stevens, C.R., Blake, D.R., Whish W.D., Harrison and Tosh D. (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localized on the outer surface of human endothelial cells in culture. *FEBS Lett.* 426, 397-401.
- Sathisha, K., Shaukath, A., Khanum, J. N., Ayisha, F., Balaji, S and Shubha Gopal K. (2011). Synthesis and xanthine oxidase inhibitory activity of 7-methyl-2-(phenoxyethyl)-5H-[1,3,4] thiadiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-one derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 19 : 211–220.
- Schmeda-Hirschmann, G., Zuniga, J. ; Dutra-Behrens, M and Habermehl, G.(1996). Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoïds and Tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). *Phytotherapy Research* 10 :260-262.
- Shi, Y., Wang, P., Wang, X., LiZhang, Y., Liu, L and Wang, R. (2012). Uricosuric and nephroprotective properties of *Ramulus Mori* ethanol extract in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 143: 896–904
- Supriya, D., Khobragade, C., Bodade, R and Arunas, S. (2012). Comparative structural modeling and docking studies of uricase: Possible implication in enzyme supplementation therapy for hyperuricemic disorders. *Computers in Biology and Medicine.* 42: 657-666.
- Takano, Y., Kumiko, H., Hideki, H., Lin Zhao., Yoshinori, K., Shiro, K and Michael, A. Becker. (2005). Selectivity of feboxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxydase / xanthine dehydrogenase. *Life sciences* 76: 1835-1847.
- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Somasundaram, A., Thirumalaisamy, S and Subhadradevi, A. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 109: 547–551
- Wang, Y., Zhu, X., Kong, D., Yang, C and Xin Zhang. (2004). Administration of Procyanidins from Grape Seeds Reduces Serum Uric Acid Levels and Decreases Hepatic Xanthine Dehydrogenase/Oxidase Activities in Oxonate-Treated Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 94: 232–237.
- Woolfolk, C.A and Dawnard J.S. (1977). Distribution of xanthine oxidase and xanthine

## Références bibliographiques

---

dehydrogenase specificity among bacteria. *Journal of Bacteriology* 130: 1175-1191.

Wright, M., Vaitailis, M., Wilson, C.M., Repine, B., Terada, S. and Repine, E. (1993).

cDNA cloning, characterization and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 10690-10694.

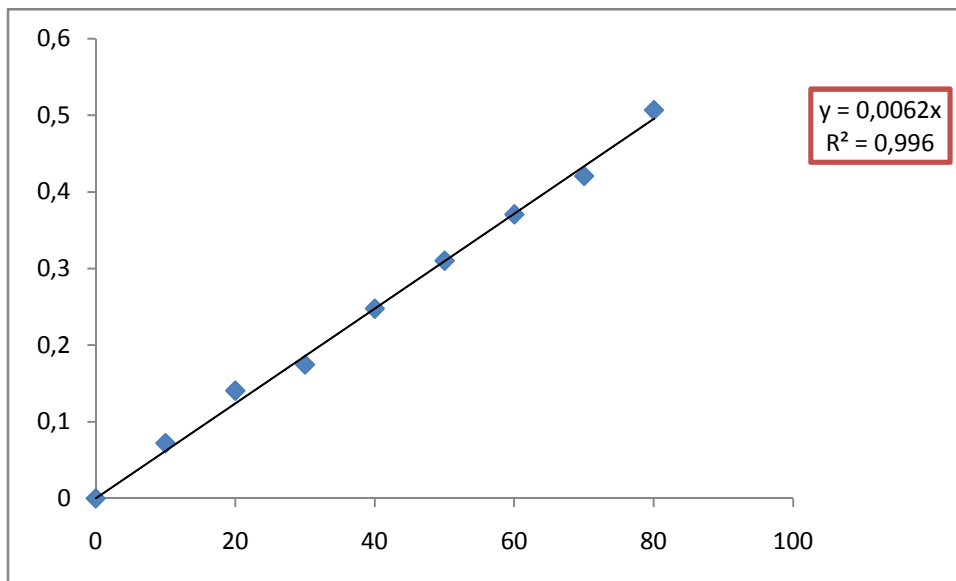
Zhao, X., Zhu, S.F., Pan, Y and Kong, D. (2006). Effects of *cassia oil* on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology* 103 : 357–365.

Zhu, J., Wang, Y., Kong, D., Yang, C and Zhang, X. (2004). Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*. 93 : 133–140



# Annexes

---



**Figure 1:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

# *INTRODUCTION*

*SYNTHÈSE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

*MATÉRIELS ET  
MÉTHODES*

*RÉSULTATS ET  
DISCUSSION*

# *CONCLUSION*

*RÉFÉRENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*

# *ANNEXES*



### -Résumé -

Le but de cette étude est d'étudier l'effet de l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur les niveaux d'acide urique sérique et de l'activité xanthine oxydoréductase hépatique chez les souris normales et hyperuricémiques. Les données ont montré que le prétraitement par voie orale avec l'extrait n'a pas provoqué une réduction significative des niveaux d'acide urique sérique chez les souris normales, mais a significativement réduit ( $p < 0,001$ ) le taux d'acide urique sérique chez les souris hyperuricémiques d'une manière dose-dépendante. Le traitement avec l'extrait à 400 mg/kg pendant 3 jours, a réduit l'uricémie ainsi que l'activité XO/XDH chez les souris hyperuricémiques. Bien que l'effet hypo-uricémiant de l'allopurinol, un inhibiteur potentiel de la xanthine oxydoréductase était beaucoup plus élevé ( $P < 0,001$ ) que celui de l'extrait. Par ailleurs, aucune corrélation n'a été observée entre les activités XO/XDH hépatiques avec les niveaux d'acide urique sérique. Cependant, le mécanisme d'action de l'extrait de *F. angustifolia* a été proposé par l'inhibition de la xanthine oxydase et une augmentation de l'excrétion de l'acide urique. Ces caractéristiques de l'extrait testé font de lui un candidat intéressant pour le traitement prophylactique de l'hyperuricémie, à long terme. D'autres investigations pour définir son efficacité clinique seraient importantes.

**Mots clés:** xanthine oxydoréductase, acide urique, hyperuricémie, *Fraxinus angustifolia*.

### -Abstract -

The aim of this study was to investigate the effect of *Fraxinus angustifolia* leaves extract on serum uric acid levels and hepatic xanthine oxidoreductase activity in normal and hyperuricemic mice. Data showed that the oral pretreatment with extract did not cause any significant reduction in the serum uric acid levels in normal mice, but significantly reduced ( $P < 0.001$ ) the serum uric acid levels of hyperuricemic mice in a dose-dependent manner. Extract treatment at dose of 400 mg/kg for 3 days, reduce the serum urate levels as well as XO/XDH activity in hyperuricemic mice. Although the hypouricemic effect of allopurinol, as a putative inhibitor of xanthine oxidoreductase was much higher ( $P < 0,001$ ) than that of extract. Moreover, no correlation was observed for liver XO/XDH activities with serum uric acid levels. However, mechanism of action of *F. angustifolia* extract as an antihyperuricemia has been proposed by inhibition of xanthine oxidase and increased the excretion uric acid. These features of tested extract make it an attractive candidate for the prophylactic treatment of hyperuricaemia, particularly if it is to be taken on a long-term basis. Further investigations to define its clinical efficacy would be highly desirable.

**Keywords:** xanthine oxidoreductase, uric acid, hyperuricemia, *Fraxinus angustifolia*.