

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de la Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

Activités anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase *in vivo* de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Présenté par : M^{elle} Messili Katia

M^{elle} Oulefki Naouel

Membre de jury :

Présidente : M^{me} Ouahmed H.

Promotrice : M^{elle} Ayouni K.

Examinatrice : M^{me} Berboucha M.

Examinatrice : M^{elle} Tahiri O.

Grade et lieu

M.A.A. (UAMB)

M.A.A. (UAMB)

M.A.A. (UAMB)

M.A.A. (UMAB)

Année : 2012-2013



Dédicaces

Au nom du Dieu tout puissant

Je dédie ce travail

A la mémoire de mes très chers grand-parents que Dieu ait leurs âmes et les accueille dans son vaste paradis.

A mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenue, et à l'intérêt qu'ils ont toujours porté pour mes études, que Dieu me les protège.

A mes très chers frères: Cherif, Farid, Yacine, Nabil, Ghanou, Saleh.

A mes adorables et très chères sœurs : Farida, Yasmina, Salima, Zakia

Rachida, Khouloude.

A ma grande famille petits et grands.

A toutes mes amies : Hannane, Faiza, Hanouna, Tita, Djamila, Zina, Souad, Dahbia, Hassan et surtout à Chrif.

A ma copine de chambre : Thassadit.

A tous les étudiants de la promotion Pharmacologie surtout à Sarra et Merbouha et à tous les amis de l'université et de la cité universitaire Berchiche 2.

Et à mon cher binôme Nawel avec laquelle j'ai partagé ce travail.

Enfin, à toute personne qui m'est chère au cœur.

Katia



Dédicaces



*Je dédie ce
modeste travail*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour
A ceux qui m'ont encouragée et soutenue dans les moments les
plus difficiles et ceux à qui je dois tant.*

*A mes chers parents pour leur amour et leur support continu
Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma
profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour
moi.*

A ma chère sœurs : Aldjia

*A mes très chers frères : Md Arezki, Sofiane, Smail, Hichem
A toute ma famille.*

A toi Katia

*A mes adorables amies : Meriem, Nouria, Feroudja , Sarra,
Aldja, Samira, wassila, yasmina, Tassaadite,
Nora ,Merbouha, Sabrina, Sounia .*

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aime

Naouel





Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice M^{lle} Ayouni K. pour avoir dirigé ce travail, pour ces précieux conseils, son orientation, ses encouragements, sa disponibilité, son aide et sa patience avec nous.

Nos remerciements vont également à M^{me} Ouahmed H. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions également M^{me} Berboucha-Rahmani M. et M^{lle} Tahiri O. pour avoir accepté d'examiner ce mémoire, et pour leur aide durant le travail pratique.

Nous tenons à remercier vivement toute l'équipe de laboratoire de Biochimie appliquée 2013, Enseignants, Doctorantes, Ingénieurs et étudiants avec qui il nous été agréable de partager cette période.

Nous témoignons notre reconnaissance à toute personne ayant Contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

M^{lle} : Oulefki Naouel.

M^{lle} : Messili Katia.

Liste des abréviations

ABCG2: ATP-binding cassette subfamily G2.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AMP : Adénine-monophosphate ou acide adénylique.

APRT: Adénine phosphoribosyl-transférase.

ASC: Apoptosis associated speck-like protein

ATP: Adénosine triphosphate.

cas-1 : Caspase-1.

EtOAc : Extrait acétate d'éthyle.

FAD : Flavine adénine dinucléotide.

Fe₂/S₂ : Sites fer-soufre

FE : Fraxinus Ecorce

Glut9 : Transporteur du glucose.

GMP : Guanosine-monophosphate ou acide guanylique

HGPRT : Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL-1 : Interleukine-1

IMP : Inosine-monophosphate ou Acide Inosinique

Mo OU MPT : Molybdoptérine

Mo-Co : Cofacteur du molybdène.

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NLRP3: NOD-like receptor (NLR) superfamily, pyrin domain containing 3.

NPT1 : Co-transporteurs sodium/phosphate.

OAT: Organic anion transporters.

O₂⁻ : Superoxyde

PRPP: Phosphoribosyl-pyrophosphate

ROS: Reactive oxygen species.

SEM : Standard error of the mean .

SH: Sulfhydriles

SMCT 1 et 2: Sodium-coupled mono carboxylase transporters 1 et 2.

UI: unité internationale

UMS : Urate monosodique

URAT 1 : Urate acide Transporteur.

XDH : Xanthine déshydrogénase.

XMP : Xanthine-monophosphate ou acide xanthylque.

XO : Xanthine oxydase.

XOR : Xanthine oxydoréductase.

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
I	Les différentes classes de goutte et ses principales causes.	11
II	Activité inhibitrice des extraits des plantes médicinales sur la XOR	21
III	L'ensemble des lots et leurs traitements	25
IV	Taux d'extraction (%) à partir de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	28
VI	L'effet de l'extrait aqueux de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur l'activité XO/XDH chez les souris normales et hyperuricémiques	34

Liste des figures

N°	Titres	pages
1	Structure de l'acide urique	02
2	Biosynthèse et élimination des purines	03
3	Purinosynthèse <i>de novo</i> et voie de sauvetage de la synthèse de l'acide urique	04
4	Régulation de l'acide urique	05
5	Schéma de la XOR	07
6	Réaction catalysée par la XOR	07
7	Modèle structural de la conversion de la XDH en XO	08
8	Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie/ réperfusion	09
9	Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire	11
10	A) Goutte aigue du gros orteil B) Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille	12
11	Structure de la colchicine	14
12	Mode d'action d'anakinra	15
13	Structure montrant les différences entre l'hypoxanthine, l'allopurinol et l'oxypurinol	15
14	Mécanisme d'action de l'allopurinol.	16
15	Structure du probénécide	17
16	Action de l'uricase sur l'acide urique	17
17	Structure des coumarines	19
18	Structure des flavonoïdes	19
19	Photographie de l'arbre et de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	22
20	Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction	24
21	L'effet de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> à différentes concentrations sur le taux d'acide urique dans le sang chez les souris normales	29
22	L'effet de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> à différentes concentrations sur le taux d'acide urique dans le sang chez les souris hyperuricémiques	31

23	Les activités anti-XO (A) et anti XDH (B) de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> à différentes concentrations chez les souris normales	32
24	Les activités anti-XO (A) et anti XDH (B) de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> à différentes concentrations chez les souris hyperuricémiques	33

SOMMAIRE

Introduction	01
--------------------	----

I. Synthèse bibliographique

I.1.L'uricémie.....	02
I.1.1.Définition.....	02
I.1.2.régulation physiologique de l'uricémie	02
I.1.2.1. Formation de l'acide urique.....	02
I.1.2.1.1. Purinosynthèse de <i>novo</i>	03
I.1.2.1.2. Les purines alimentaires	04
I.1.2.2. Elimination de l'acide urique.....	04
I.2.Relation entre la xanthine oxydoréductase et la goutte	06
1. La xanthine oxydoréductase	06
2. Mécanismes d'action de la XOR	07
3. La conversion de la XDH en XO	08
4. Rôles physiologiques de la XOR	09
5. Rôles pathologique de la XOR	09
5.1. Ischémie reperfusion	09
5.2. L'hyperuricémie et la maladie de la goutte	10
5.2.1. Facteurs potentiellement associés à une augmentation du risque de goutte.....	10
5.2.2. Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire.....	11
5.2.3. Symptômes de la maladie	12
I.3. Les Traitements de la goutte et les hypouricémiant (anti-hyperuricémiques).....	13
1. Traitements non pharmacologiques	13
2. Traitements pharmacologiques	13
2.1. Le traitement du calcul d'acide urique.....	13
2.2. Les anti-inflammatoires	14
2.2.1. La colchicine.....	14
2.2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	14
2.2.3. L'inhibiteur d'IL-1 (<i>L'anakinra</i>) ou (IL-1Ra)	15

2.3. Les traitement hypouricémiant.....	15
2.3.1. Les inhibiteurs de synthèse de l'acide urique.....	15
2.3.2. Les uricosuriques.....	16
2.3.3. Les uricolytiques	17
3. Les inhibiteurs naturels	18
3.1. Les composés phénoliques	18
3.3.1. Les coumarines.....	18
3.3.2. Les flavonoïdes.....	19
3.3.3. Les tannins.....	20

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels	22
II.1.1. Matériel végétal	22
II.1.2. Animaux d'expérimentation	23
II.1.3. Appareillages et réactifs	23
II.2. Méthodes	24
II.2.1. Préparation des extraits.....	24
II.2.2. Evaluation de l'activité anti-hyperuricémique <i>in vivo</i>	25
II.2.2.1. Traitement des animaux.....	25
II.2.2.2. Prélèvement et préparation des échantillons biologiques	26
II.2.2.3. Tests biochimiques	26
II.2.2.3.1. Dosage de l'acide urique.....	26
II.2.2.3.2. Dosage de l'activité XOR	27
II.3. L'analyse statistique	27

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'extraction	28
III.2. Résultats de l'effet hypouricémiant de l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i>	29
III.2.1.Effet sur les souris normales	29
III.2.1.Effet sur les souris hyperuricémiques	30
III.3. Résultats de l'effet de l'extrait sur les activités de XO et XDH.....	32
III.3.1.Activité de la XO et XDH chez les souris normales et hyperuricémiques.....	32
Conclusion.....	36
Références bibliographiques	37
Annexes	I

L'Homme a utilisé pour très longtemps des remèdes traditionnels à base de plantes dites médicinales sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Une plante est dite médicinale lorsqu'un de ses organes renferme des substances actives, qui confèrent à cette dernière une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques **(Mouhammedi, 2006)**.

Malgré qu'au XX^{ème} siècle la chimie de synthèse a provoqué le déclin de la médecine traditionnelle **(Paris et al., 1981)**, on connaît actuellement un grand retour vers cette dernière, ce qui a permis de reconnaître les valeurs des plantes médicinales et de s'orienter vers l'emploi des végétaux comme remède doux, lent, naturel et mieux toléré par l'organisme, ce qui marque la renaissance de la phytothérapie.

Ces plantes sont utilisées pour inhiber certaines enzymes qui participent dans des processus pathologiques, parmi ces enzymes la xanthine oxydoréductase (XOR) responsable de la production de l'acide urique dont sa surproduction provoque l'hyperuricémie, conduisant à certaines pathologies secondaires inflammatoires tels que les rhumatismes, la goutte et l'insuffisance rénale.

Dans la présente étude, on s'est intéressé à l'évaluation des activités hypouricémiantes et inhibitrices de la XOR *in vivo*, chez des souris normales et hyperuricémiques, de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, connue pour sa richesse en composés phénoliques antioxydants **(Atmani et al., 2009)** et inhibiteurs de la xanthine oxydase *in vitro* **(Berboucha et al., 2009)**.

I.1.L'uricémie

I.1.1.Définition

L'uricémie est le taux d'acide urique dans le sang compris, chez l'homme entre 50 et 60 mg/l et chez la femme entre 40 et 50 mg/l (**Bennesser et al., 2010**). L'acide urique (ou 2-6-8 trihydroxypurine) (**Figure N°1**) est le produit final du catabolisme des purines par la xanthine oxydoréductase (XOR) chez l'Homme, les primates, les oiseaux et certains reptiles, alors qu'il est oxydé en allantoiné chez d'autres mammifères (**Many et al., 1996**). C'est un acide faible dont la constante de dissociation (pKa) est de 5,5. Il est principalement sous forme non dissociée, peu soluble et susceptible de précipiter pour former des calculs (**Deray et Bitker, 2012**). En effet ; une concentration d'acide urique supérieure à 68 mg/l (408 $\mu\text{mol/l}$) conduit à la formation des microcristaux d'urate monosodique (UMS) dans les liquides biologiques (**Hang Korng, 2010**).

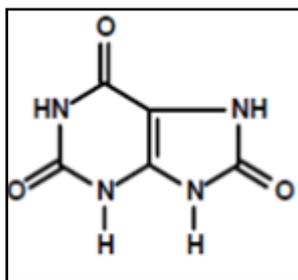


Figure N°1 : Structure de l'acide urique

I.1.2.La régulation physiologique de l'uricémie

La concentration plasmatique de l'urate de sodium résulte d'un équilibre entre, d'une part, l'acide urique apporté par l'alimentation et formé de façon endogène, et d'autre part, son élimination rénale et digestive (**Hang Korng, 2011**)

I.1.2.1. Formation de l'acide urique

L'acide urique est produit par le foie après le catabolisme des purines endogènes ou alimentaires (2/3 et 1/3 de l'acide urique formé), le métabolisme des acides nucléiques cellulaires et la purinosynthèse de *ново*. L'ensemble de ces voies alimentent le pool miscible de l'acide urique (**Figure N°2**) (**Nolfi, 1970 ; Deray et Bitker, 2012**).

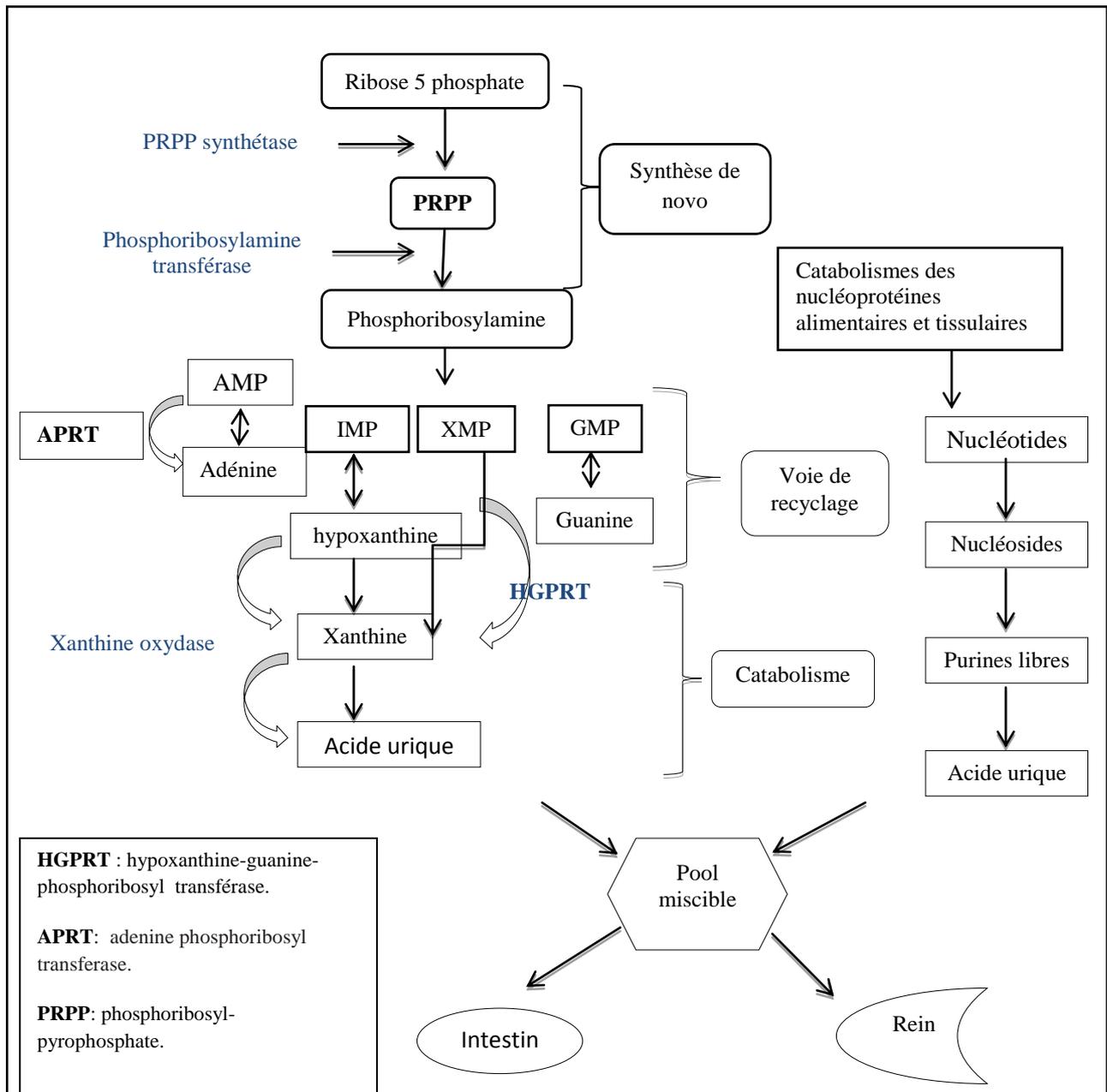


Figure N° 2 : Les voies de biosynthèse et élimination des purines (Chalés, 2011)

I.1.2.1.1. Purinosynthèse de novo

C'est la synthèse de molécules puriniques (IMP, XMP, GMP) à partir de composés non puriniques (Ribose5phosphate, PRPP,...), qui a principalement lieu dans les cellules hépatiques avec pour objectif la création d'acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques (Figure N°3) (Golovinsky et Spassova, 1981 ; Deray et Bitker, 2012).

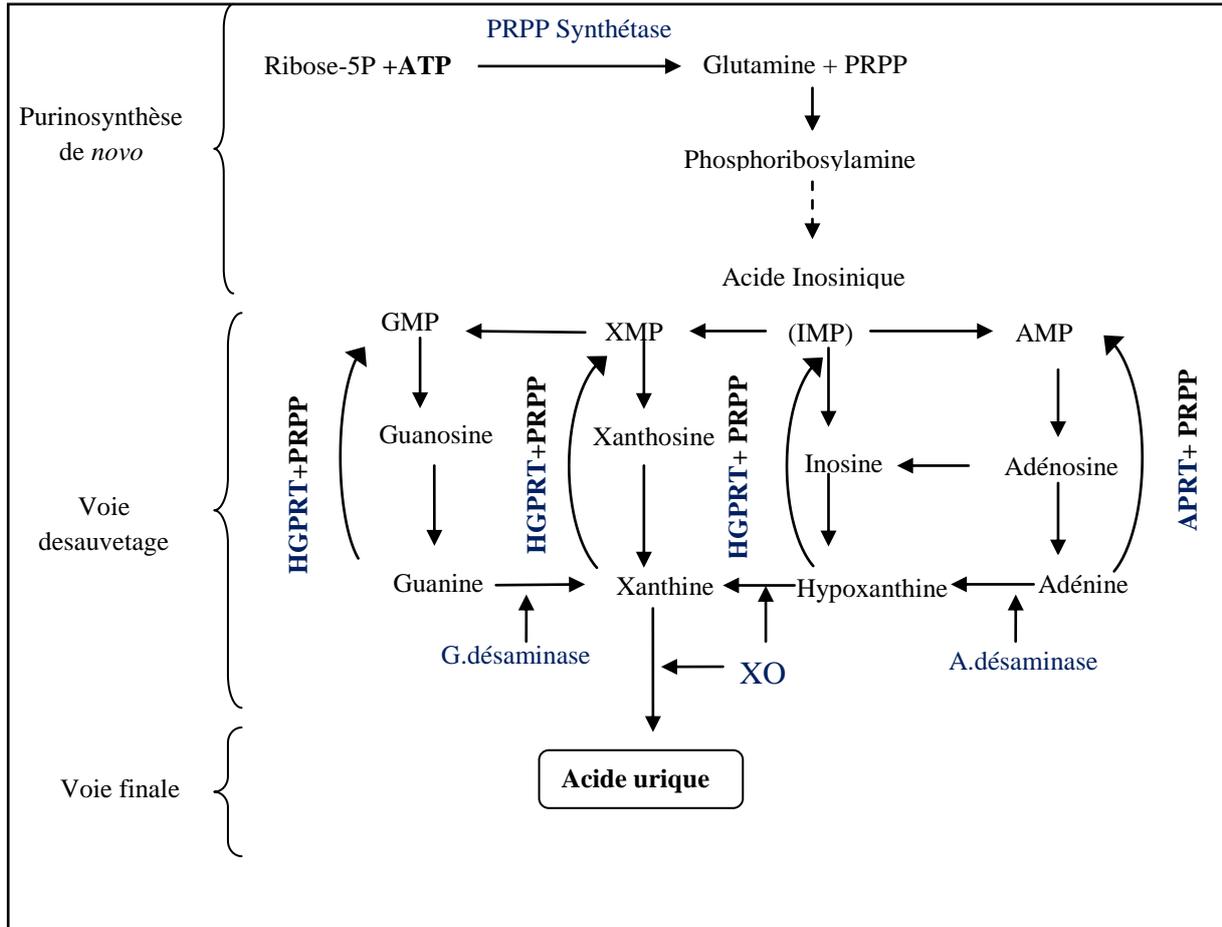


Figure N°3 : Purinosynthèse de *novo* et voie de sauvetage de la synthèse de l'acide urique (Hang Korng, 2011).

I.1.2.1.2. Les purines alimentaires

Les facteurs alimentaires pouvant moduler l'uricémie en apportant des précurseurs de l'acide urique sont la consommation de bière (y compris sans alcool qui contient de la guanosine), d'alcool fort, de sodas sucrés contenant du fructose, de viande ou de fruits de mer de façon excessive (Beneytout, 2008). Le fructose augmente l'uricémie au cours de sa phosphorylation par la fructokinase qui génère de l'AMP précurseur de l'acide urique. Le métabolisme de l'alcool augmente également la production d'AMP, mais il augmente en outre l'acide lactique qui a une activité anti-uricosurique. Les apports alimentaires sont à l'origine de la synthèse d'environ 1/3 de l'acide urique (Johnson, 1999; Deray et Bitker, 2012).

I.1.2.2. Elimination de l'acide urique

L'acide urique entrant dans le pool miscible est éliminé pour environ 70 % par le rein et pour 30% par voie digestive (Hang Korng, 2011).

I.1.2.2.1. Elimination rénale

La régulation rénale de l'urate est complexe et résulte d'un équilibre entre sa filtration glomérulaire, sa réabsorption et sa sécrétion dans le tube proximal (**Figure N°4**) (**Nakamura et al., 1997**).

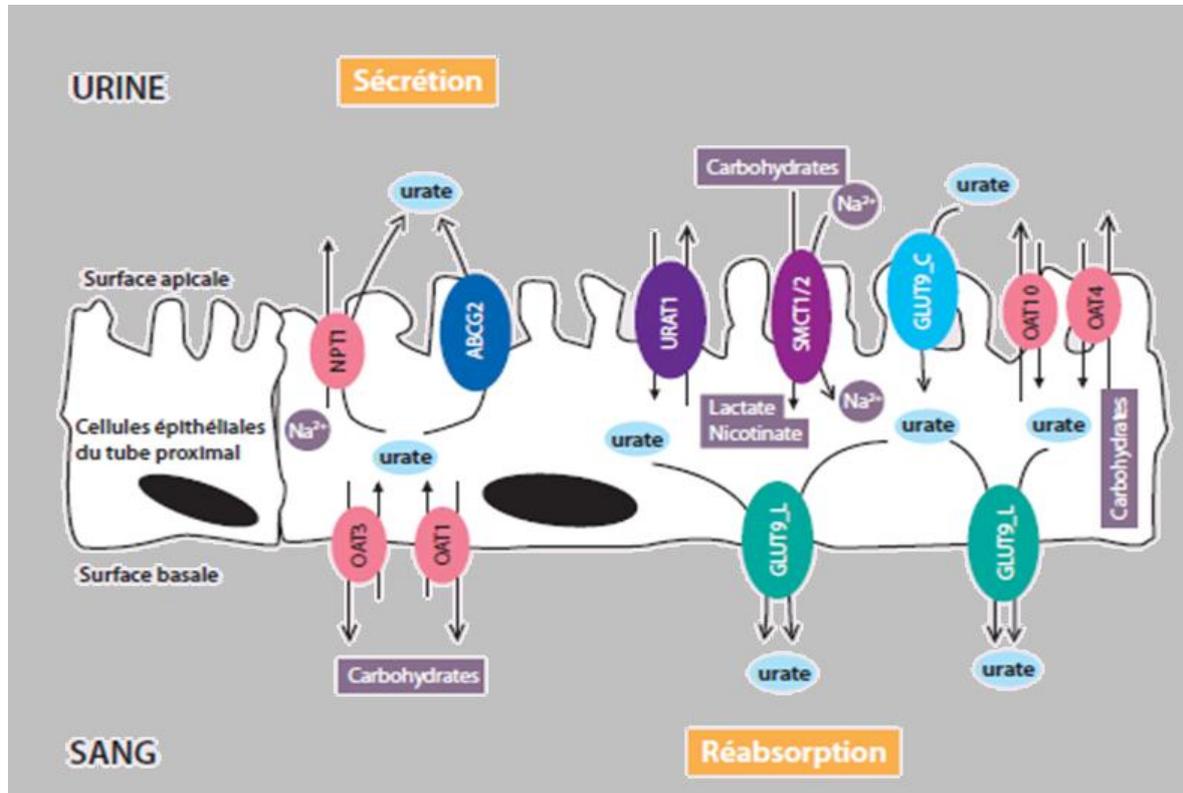


Figure N°4 : Régulation rénale de l'acide urique (**Hang Korng, 2011**).

La réabsorption de l'urate est assurée par des transporteurs anioniques de la famille des transporteurs organique anioniques (OAT) et le transporteur Glut9 situé à la surface apicale et basale des cellules épithéliales. La sécrétion de l'urate est due à l'action conjuguée des OAT et des transporteurs ABCG2 (ATP-binding cassette subfamily G2) et NTP1 (les co-transporteurs sodium/phosphate) (**Hosomi et al., 2012**).

La réabsorption apicale de l'urate est en grande partie due à l'action du transporteur membranaire, exprimé par les cellules épithéliales de la membrane apicale du tube proximal URAT1, qui réabsorbe l'acide urique en échange d'un ion chlore ou d'un autre anion organique, tel que le lactate, le butyrate, le pyrazinoate (métabolite de la pyrazynamide) et le nicotinate (**Richette et Bardin, 2009**).

Il agit en synergie avec les transporteurs SMCT1 et 2 (Sodium-coupled mono carboxylase transporters) qui réabsorbent les anions organiques de l'urine, l'augmentation du taux intracellulaire des anions organiques stimule URAT1 et augmente la réabsorption de l'urate. Ce dernier passe dans le sang du côté de la membrane basale via le transporteur Glut9 (famille des transporteurs de glucose), dont la principale fonction est de transporter l'urate de façon plus efficace que le transporteur anionique URAT1 (**Merriman et Dalbeth, 2010**).

Le transporteur Glut9 a deux isoformes : l'isoforme longue de 540 acides aminés est exprimée sur la membrane basale du tube proximal présenté par de nombreux tissus (foie, rein, tube digestif, leucocytes et chondrocytes) ou son expression peut être stimulée par des cytokines, alors que l'isoforme courte de 512 acides aminés est située sur le versant apical et exprimée uniquement dans le rein et le foie (**Olivier, 2004**).

L'urate est transporté du côté basal vers l'intérieur des cellules épithéliales via OAT1 et OAT3 en échange d'un carbohydrate. L'urate intracellulaire est secrété dans les urines par les transporteurs ABCG2 et NPT 1 (**Hang Korng, 2011**).

I.1.2.2.2. Elimination digestive

L'acide urique entre dans l'intestin par voie passive où les bactéries intestinales peuvent le dégrader. Cette uricolyse intestinale est responsable d'environ 1/3 de l'élimination d'urate. Dans les conditions normales, l'acide urique est totalement dégradé dans les selles (**Hurtes et Meria, 2011**).

I.2.Relation entre la xanthine oxydoréductase et la maladie de la goutte

Plusieurs travaux ont évoqué la relation entre la XOR, l'hyperuricémie et la goutte (**Owen et Johns, 1999 ; Havlik et al., 2010**).

1. La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoprotéique qui a été identifié pour la première fois dans le lait bovin (**Da Silva et al., 1996**) (**Harrison, 2006**). La xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) et la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC1.1.1.204) sont des formes interconvertibles de la même enzyme (**Corpas et al., 2008**). Structurellement c'est un homodimère composée de deux sous-unités identiques, d'environ 145 kDa.

Chaque sous unité est organisée en trois domaines (**Figure N°5**), chacun est associé à un cofacteur spécifique: le domaine N-terminal (20kDa), contient deux centres Fe_2/S_2 , le domaine central FAD (40 kDa) et le domaine C-terminal (85 kDa) contient un centre molybdoptérine (Mo) (**Ichida et al., 1993**).

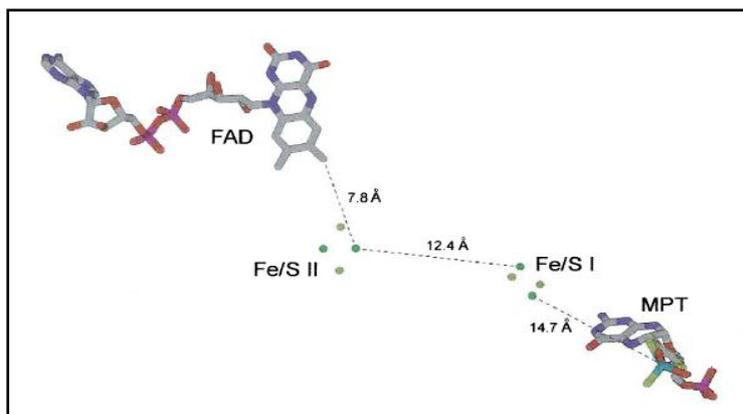


Figure N°5 : Schéma de l'organisation des centres de la XOR (Harrison, 2002)

Le gène de la XOR a plus de 60 kb est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 chez la humaine (Harrison, 2002). C'est une enzyme ubiquitaire, qui est hautement exprimé dans le foie et l'intestin grêle où elle a une forte activité (Moriwaki et al., 1996). D'autres études ont montré que l'enzyme est localisée dans les différents tissus des mammifères, en particulier les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Battelli et al., 1999 ; Silanikove et Shapiro, 2007).

2. Mécanismes d'action de la XOR

La xanthine oxydoréductase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique. Quand la réaction est catalysée par la XO, elle est accompagnée par une génération de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Harrison, 2002), selon la réaction dans la figure suivante :

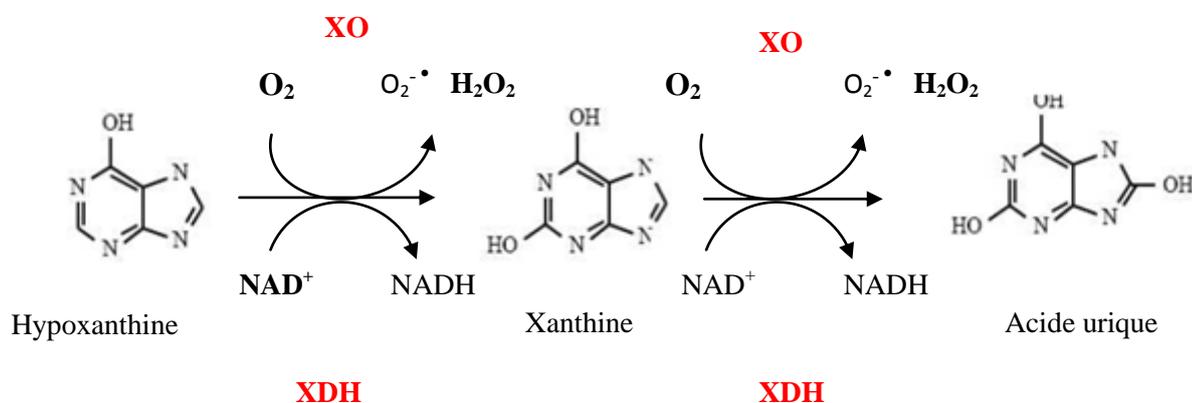


Figure N° 6 : Réaction catalysée par la XOR

Le mécanisme réactionnel de la XOR est constitué de deux demi-réactions indépendantes; réductive et oxydative (**Harrison, 2002**). La demi-réaction réductive a eu lieu au site Mo où la XOR accepte deux électrons à partir de la xanthine, réduisant ainsi le Mo(VI) en Mo(IV) (**Berry et Hare, 2004**). Contrairement à la réaction demi-réductive, la réaction demi-oxydative aura lieu au site FAD (**Pritsos, 2000**) où s'effectue un transfert intramoléculaire d'électrons entre les sites Mo et FAD via le site Fe_2/S_2 , pour réoxyder le Mo(IV) en Mo(VI) avec une libération du produit (acide urique), suivie d'une réduction du FAD en $FADH_2$ (**Hille et al., 2011**). Si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XDH, le NAD^+ est fixé sur le $FADH_2$ et donc subit une réduction bivalente par les deux électrons du $FADH_2$ (**Harrison, 2002**). Par contre, si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XO le substrat oxydant est O_2 qui sera réduit soit d'une manière univalente pour donner $O_2^{\bullet-}$, ou bien d'une manière bivalente pour donner H_2O_2 (**Berry et Hare, 2004**).

3. La conversion de la XDH en XO

La XOR est présente dans la plupart des tissus des mammifères sous forme déshydrogénase (D) (**Cighetti et al., 1994 ; Berry et Hare, 2004**), qui préfère le NAD^+ comme accepteur final d'électrons, contrairement à la forme oxydase (O) qui préfère la réduction de O_2 (**Nishino et al., 2000 ; Harrison, 2002**). La conversion de la forme D à la forme O de l'enzyme se fait par deux mécanismes enzymatiques : le traitement de la XOR par des protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine, ou la pancréatine conduit à la forme O irréversible. La conversion réversible se produit par l'oxydation des groupements sulfhydryles (SH) (**Bindoli et al. 1988**).

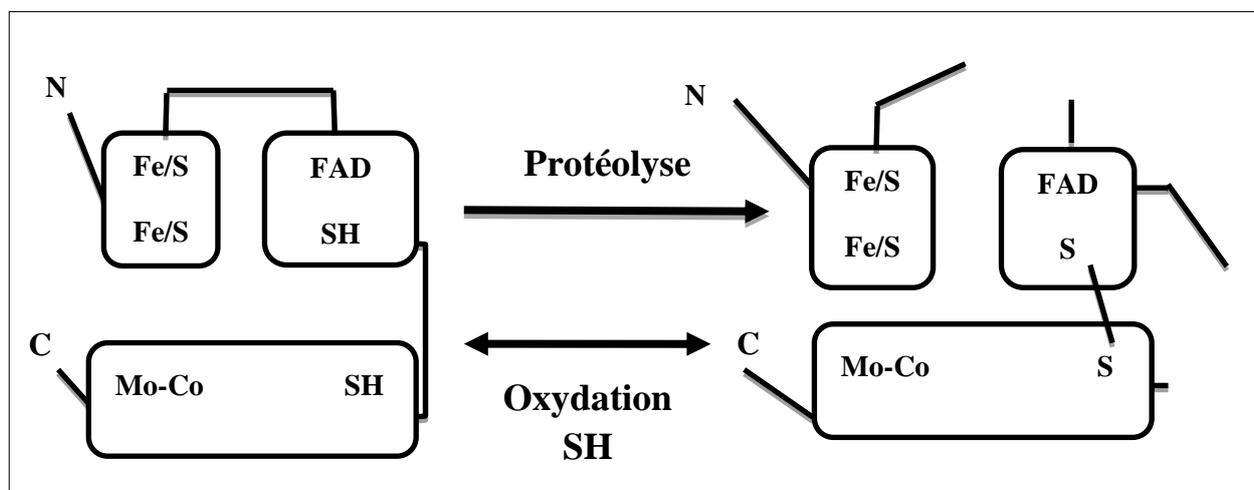


Figure N° 7: Modèle structural de la conversion de la XDH en XO (**Boumefrag, 2010**).

4. Rôles physiologiques de la XOR

La XOR est impliquée dans plusieurs rôles physiologiques à savoir : la transduction du signal (Finkel, 1998), la participation dans un système de défense antioxydant dans le foie et le sang (Wilma et Vreeling-Sindelárová, 2002), la sécrétion du lait (Silanikove et Shapiro, 2007) et la défense antibactérienne dans ce dernier (Harrison, 2006).

5. Rôles pathologiques de la XOR

5.1. Ischémie reperfusion

La XO est une source importante des espèces oxygénées réactives (ROS) dans l'ischémie reperfusion (Cighetti et al., 1994). C'est un phénomène où la lésion du tissu peut être causée suite à la reperfusion d'un organe par le sang oxygéné après une période d'ischémie (Marti et al., 2001). Cette lésion peut être localisée au niveau de différents tissus tels que : l'intestin grêle, le cœur, le cerveau, le rein et au niveau des cellules hépatiques. Une grande partie des lésions apparaissent pendant la reperfusion, parce que l'hypoxanthine s'accumule au cours de l'ischémie, ce qui est la conséquence du catabolisme de l'ATP, l'hypoxanthine accumulée sera oxydée au début de la reperfusion, et la XO réduit l'oxygène. Suite à ces réactions, il y a production des radicaux oxygénés, qui induisent des lésions tissulaires (Figure N°7) (Berry et Hare, 2004).

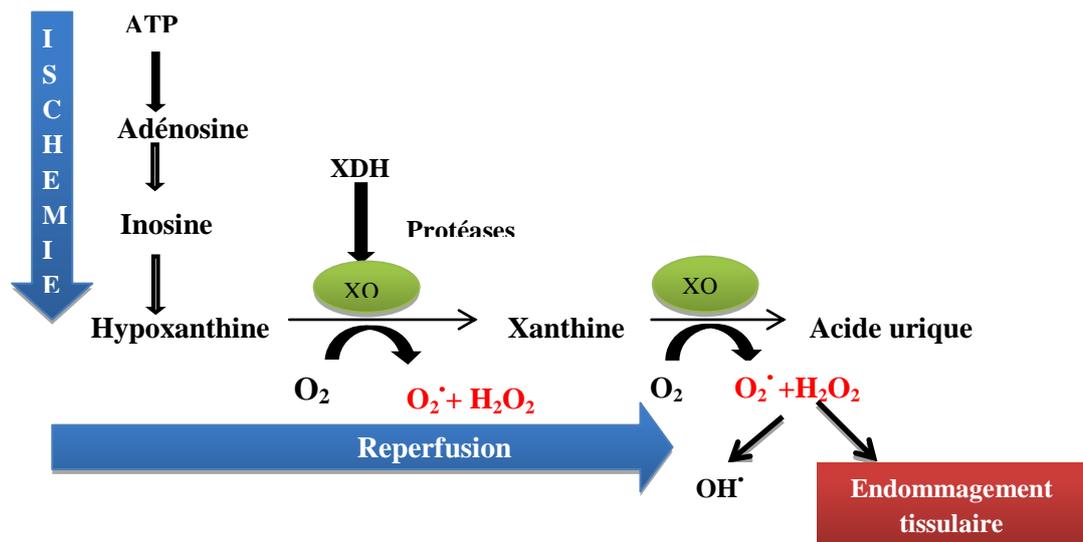


Figure N° 8: Mécanisme de génération des ROS) par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie/reperfusion (Berry et Hare, 2004).

5.2. L'hyperuricémie et la maladie de la goutte

L'hyperuricémie correspond à la limite supérieure de l'uricémie (70 mg/l correspond à 420 $\mu\text{mol/l}$) (Bennesser et al., 2010), au-delà de laquelle divers troubles peuvent être développés dont le plus spectaculaire est maladie la goutte.

La goutte est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique, causé par l'accumulation de cristaux d'urate de sodium (UMS) associée à une hyperuricémie chronique (Lioté et al., 2012).

5.2.1. Facteurs potentiellement associés à une augmentation du risque de goutte

Bien que l'hyperuricémie représente le facteur de risque majeur dans le développement de la goutte (Merriman et Dalbeth, 2010), d'autres nombreux facteurs de risque ont été identifiés :

-Les facteurs génétiques ; comme l'action régulatrice des concentrations sériques d'urates, par les gènes SLC2A9 et ABCG2, qui codent pour les transporteurs rénaux d'acide urique (Chalès, 2011).

-L'âge ; la prévalence de la goutte augmente avec l'âge (lenteur de formation des dépôts cristallins pathogènes d'urate monosodique) (Bardin et Richette, 2011)

-Le sexe ; les œstrogènes ont un effet uricosurique qui protège la femme jusqu'à la ménopause, ce qui rend l'uricémie est plus faible chez la femme adulte non ménopausée que chez l'homme (Lioté, 2010).

-L'alimentation ; l'incidence de la goutte augmente avec l'apport journalier de viande ou de produits de la mer, et la consommation de boisson tel que : l'alcool tandis que les produits laitiers avaient un effet protecteur en favorisant l'excrétion de l'acide urique (Chalès, 2011).

- La prise des Médicaments ; comme les diurétiques, l'aspirine à faible dose, en diminuant l'excrétion de l'acide urique, particulièrement chez les sujets âgés (Chalès, 2011).

-La masse corporelle ; où le risque de goutte augmente avec le poids corporel (Bardin et Richette, 2011).

Dépendant des facteurs cités ci-dessus, on distingue deux types de gouttes : primitives et secondaires récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau I : Les différents types de goutte et leurs principales causes (Hang korng, 2011).

<p>Goutte primitive</p> <p>-Goutte enzymopathique Déficit en HGPRT (maladie de lesch-Nyhan) Activité de la PRPP synthétase Glycogénose de type I (maladie de Von Gierke)</p> <p>-Néphropathie uratique familiale Néphropathie médullaire kystique autosomique dominante de type 2</p> <p>-Défaut d'excrétion urinaire de l'acide urique impliquant de nombreux transporteurs (90% des gouttes primitives).</p>
<p>Gouttes secondaires</p> <p>Hémopathie chroniques Insuffisance rénale Médicament : diurétiques, cyclosporines, tacrolimus, aspirine, pyrazinamide, ethambutol. Causes rares : néphropathie saturnine, maladie de gaucher, trisomie 21</p>

L'hyperproduction d'acide urique et/ou sa sous excrétion conduisent à l'hyperuricémie, ceci finit par provoquer des dépôts de cristaux d'UMS dans les tissus, ce qui active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, qui déclenchent une réaction inflammatoire (Pétrilli et Martinon, 2007).

5.2.2. Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire

Les cellules phagocytaires de l'immunité innée telle que les monocytes et les macrophages, reconnaissent UMS comme un signal de « danger » qui est capable de stimuler la maturation des cellules dendritiques et l'activation de l'inflamasome (Figure N°8) (Pétrilli et Martinon, 2007).

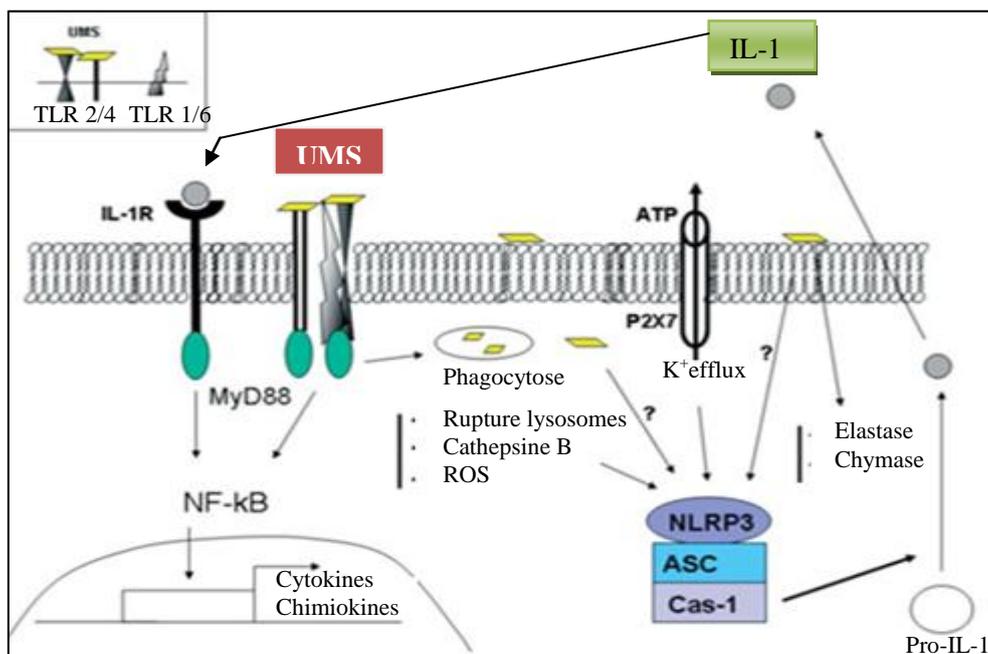


Figure N° 9 : Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire (HangKorng, 2010)

Ces cristaux induisent la production et l'activation de l'IL-1, qui se fait en 3 étapes :

La production de précurseur pro-IL1, la maturation de celui-ci, puis sa sécrétion. Cette maturation s'effectue par l'intervention d'élastase, la chymase ou la caspase-1 (cas-1). La cas-1 est activée via le récepteur P2X7 après un éfflux de potassium, induit par l'ATP (**Richette 2010**) ou via l'inflammasome NLRP3 activé après libération des enzymes lysosomales, telle que la cathepsine B et libération des ROS (après désorganisation des phagolysosomes) (**Mathieu et Guimezanes., 2011**). L'IL1 sécrété se lierait ensuite à ses récepteurs pour stimuler la production de cytokines inflammatoires et des chimiokines, via MyD88 et la voie de NF- κ B (**Richette, 2010**).

5.2.3. Symptômes de la maladie

La goutte se traduit par des manifestations aiguë et chronique :

La goutte aiguë est la conséquence d'une réaction inflammatoire consécutive à la précipitation d'UMS dans l'articulation, c'est une arthrite microcristalline qui entraîne une douleur, une inflammation et un œdème important (**McDonald-Blumer et al., 2010**). Au fil du temps, l'inflammation risque de causer une destruction articulaire surtout au niveau du gros orteil (**Figure N°9A**) (**Rozenberg, 2007**).

La goutte chronique est la conséquence d'une surcharge uratique chronique et prolongée. Ses signes sont principalement cutanées (les tophus qui se localisent plus particulièrement sur le pourtour de l'oreille) (**Figure N°9 B**), articulaire et urinaire (**Kim et al., 2003**).



Figure N° 10: A) Goutte aiguë du gros orteil , B) Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille (**Richette et Bardin, 2010**)

I.3. Les Traitements de l'hyperuricémie et la goutte

Le contrôle de l'hyperuricémie est fondamental dans le traitement de la goutte, en effet des études ont démontré qu'un régime pauvre en purine ne suffisait pas, à lui seul, pour maîtriser le taux plasmatique d'acide urique. Le recours à une thérapeutique hypouricémiante adaptée est indispensable (**Valleix et Guillot, 2013**).

1. Traitements non pharmacologiques

- Arrêt d'un médicament ; en particulier les diurétiques ou l'aspirine à petite dose, car elles provoquent une insuffisance rénale et par conséquent un effet hyperuricémiant (**Bardin, 2004**).

- Règles hygiéno-diététiques ; Consiste en une perte de poids par une restriction calorique en cas d'obésité (**Leder, 1978**), où une perte de poids de plus de 10kg diminue l'uricémie d'environ 35 $\mu\text{mol/l}$, mais cette perte doit être progressive, car l'amaigrissement rapide peut générer une cétose et augmenter ainsi l'uricémie (**Richette, 2011**). Il est même conseillé de modifier les habitudes alimentaires par un arrêt définitif de la bière, des alcools forts, et de sodas riches en fructose (**Lederer, 1978**) ainsi que la diminution de la consommation des aliments riches en purines (la viande, les abats, les poissons gras et les crustacés) (**Simon, 1975 ; Dubost et al., 2011**).

2. Traitements pharmacologiques

Le but du traitement consiste en une alcalinisation des urines, de soulager la douleur par des anti-inflammatoires (la colchicine, AINS) et de diminuer l'uricémie en dessous de 50–60 mg/L (300–360 $\mu\text{mol/L}$) par la prise des hypo-uricémiants (**Reach, 2011**) comme les inhibiteurs de la xanthine oxydase (allopurinol, fébuxostat), et les agents uricosuriques (probenécide, benzbromarone) (**Garay et al., 2011**).

2.1. Le traitement du calcul d'acide urique

Celui-ci s'effectue par la prise de citrate de potassium sur une période prolongée, dépendant du volume des calculs à dissoudre. Il est indispensable de surveiller le pH urinaire et d'augmenter les apports hydriques pour atteindre une diurèse au moins égale à 2 litres par jour (**Hurtes et Meria, 2011**).

2.2. Les anti-inflammatoires

2.2.1. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde extrait de la colchique (**Le Bellec et al., 2009 ; Valeix et Guillot, 2013**), de structure chimique est $C_{22}H_{25}NO_6$ (**Figure N°10**) (**King et al., 1952**), douée de propriétés anti-inflammatoires (**Faure, 2010**), dont un des mécanismes d'action est l'inhibition du recrutement des leucocytes sur le site d'inflammation (**Pétrilli et Martinon, 2007**).

La colchicine est un traitement habituel de la crise aiguë de la goutte, sa posologie doit être adaptée à la fonction rénale et à l'âge (**Dubost et al., 2011**). Prescrite par voie orale à une dose de 0,5 à 1 mg toutes les 2 à 4 heures, sans dépasser 4 mg/j le premier jour (**Lioté et Hang-Korng, 2007**). Elle est contre-indiquée en cas d'insuffisance rénale ou hépatique sévère (**Faure, 2010**), Sa toxicité dépend de la dose et peut être toxique à faible dose lorsqu'elle est prescrite avec la ciclosporine ou un macrolide, qui entravent son élimination hépatique en inhibant la P-glycoprotéine, qui intervient dans le transport membranaire de la colchicine (**Bardin, 2007**).

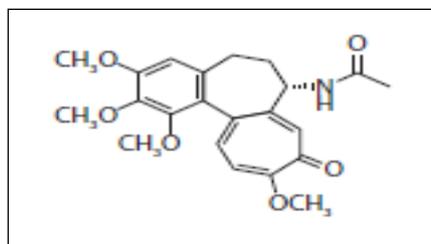


Figure N° 11 : Structure de la colchicine

2.2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont utilisés pour soulager la douleur comme l'indométacine à la dose de 200mg par jour, et la phénylbutazone, à la dose quotidienne de 500mg, durant 5 à 10 jours, puis diminuée ensuite à la moitié de la dose suivant l'évolution clinique (**Simon, 1975**). Ils sont efficaces mais moins spécifiques de la goutte que la colchicine (**Valeix et Guillot, 2013**) et ils sont formellement contre-indiqués en cas d'accès goutteux chez un greffé d'organe, rein et cœur en particulier (**Lioté et Hang-Korng, 2007 ; Deray et Bitker, 2012**). L'aspirine également doit être évitée car elle interfère avec l'élimination urinaire de l'acide urique (**Bardin, 2004**).

2.2.3. L'inhibiteur d'IL-1 (*L'anakinra*) ou (IL-1Ra)

Les cristaux d'urate de sodium stimulent la sécrétion d'IL-1 par les macrophages et les monocytes (**Mbouiti, 2008**). L'anakinra antagoniste de récepteur de l'IL-1, Bloque l'activité de l'interleukine-1 β (IL-1 β) par sa liaison avec une grande affinité au récepteur membranaire de l'IL-1, mais ne transmet aucun signal d'activation cellulaire (**Hang-Korng, 2012**). Sa posologie est de 100 mg par jour, injectée par voie sous-cutanée, pendant 3 jours. (**Richette, 2011**). L'inconvénient de l'anakinra est une demi-vie brève qui nécessite d'avoir recours à des injections sous-cutanées quotidiennes (**Dubost et al., 2011**). Les bénéfices de ce médicament sont les effets immédiats dans l'atténuation des symptômes inflammatoires dès la première injection (**Figure N° 11**) (**Pétrilli et Martinon, 2007**).

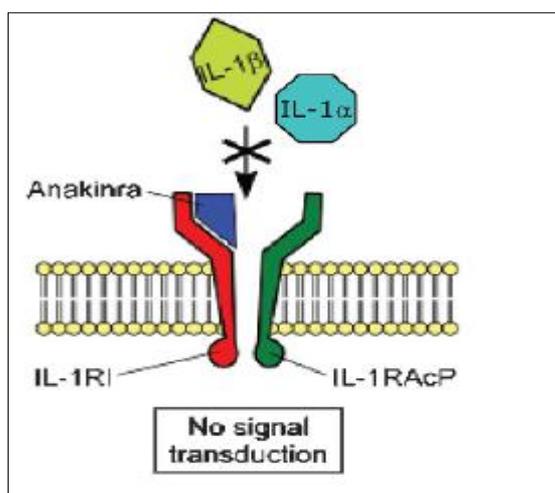


Figure N° 12: Mode d'action d'anakinra (**Richette et al., 2011**).

2.3. Les traitement hypouricémiant

2.3.1. Les inhibiteurs de synthèse de l'acide urique: ce sont des inhibiteurs de la XOR, dont le plus utilisé dans le traitement de la goutte est l'allopurinol (**Zyloric®**) (**Faure, 2010**). C'est un composé aromatique possédant un cycle purine, (4-hydroxypyrazolo-(3,4-d) pyrimidine), isomère de l'hypoxanthine (**Figure N°12**).

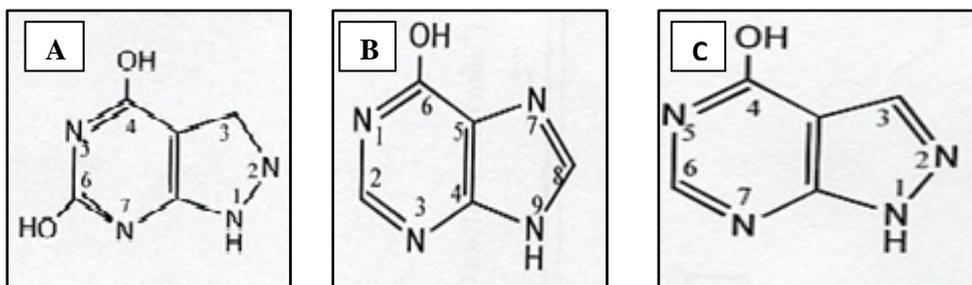


Figure N°13 : Structure montrant les analogues structuraux entre l'oxypurinol (A). L'hypoxanthine (B) et l'allopurinol (C)

Dans l'organisme et en présence de l'oxygène moléculaire, il est métabolisé par la xanthine oxydase en oxypurinol (inhibiteur non compétitif de la xanthine-oxydase donnant naissance à des molécules de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Kim et al., 2003**), selon la réaction suivante :

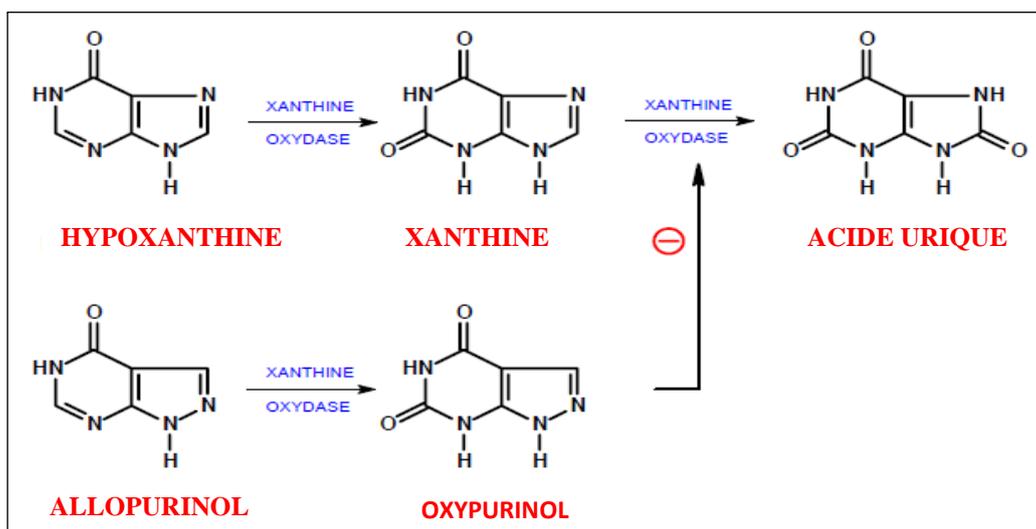
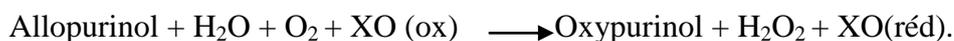


Figure N° 14 : Mécanisme d'action de l'allopurinol (**Le treut, 2009**).

Certaines manifestations d'intolérance vis-à-vis l'allopurinol peuvent être signalées tels que la réaction d'hypersensibilité qui se manifeste par une éruption disquamative ou nécrotique avec fièvre, l'hépatite et insuffisance rénale (**Dubost et al., 2011**). De ce fait,

L'allopurinol est contre indiqué chez le sujet insuffisant rénal (**Rozenberg, 2007**), chez le transplanté d'organe (**Lioté et Hang-Korng, 2007**).

2.3.2. Les uricosuriques

Ces médicaments exercent leurs effets hypouricémisants en inhibant les transporteurs d'anions notamment URAT1 (**Dubost et al., 2011**). Deux uricosuriques sont officiellement disponibles, le probénécide et la benzbromarone. Tous deux induisent le risque de lithiase urique, qu'il est possible de prévenir en assurant une diurèse suffisante et par le contrôle du pH urinaire, qu'il faut maintenir au dessus de 6 en alcalinisant si besoin les urines (**Lioté et Bardin, 2007**).

✓ Le probénécide (Bénémidé®)

C'est un acide organique P-(dipropylsulfamyl) benzoïque ($C_{13}H_{19}NO_4S$) (**Figure N°14**), prescrit comme médicament alternatif dans les cas d'intolérance à l'allopurinol (**Marié et al., 2005**). Favorisant l'élimination urinaire d'acide urique, il est conseillé dans le traitement des hyperuricémies, de la goutte tophacée ou non et contre indiqué lors d'hypersensibilité aux sulfamides, l'insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine < 30 ml/minute), la lithiase urique, et l'hyperuraturie (**Faure, 2010**). Il est prescrit à la dose de 250 mg à raison de 2 fois/jour et qui peut être augmentée progressivement toutes les deux semaines jusqu'à un maximum de 2 g/j (**Richette, 2011**). Le probénécide diminue l'excrétion rénale de nombreux médicaments dont l'héparine, l'aspirine, les AINS et la pénicilline (**Benesser et al., 2010**).

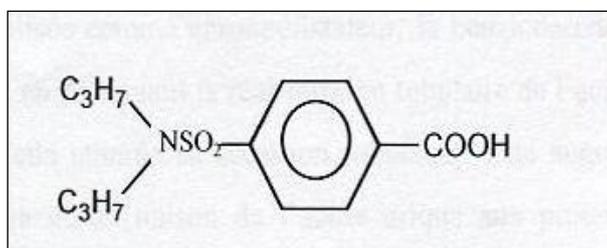


Figure N° 15 : Structure du probénécide.

2.3.3. Les uricolytiques

Des uricases extraites d'*Aspergillus fumigatus* sont utilisées comme substituant aux enzymes hépatiques inactives chez l'homme (**Izzedine et Deray, 2011**). Elles métabolisent l'acide urique en allantoïne (**Figure N°15**) (**Pétrilli et Martinon, 2007**) et sont donc prescrites dans certaines gouttes tophacées (**Bardin, 2007**).

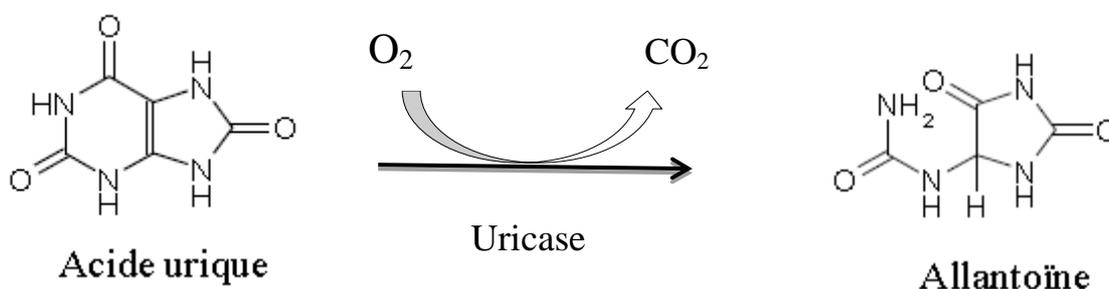


Figure N°16 : Action de l'uricase sur l'acide urique

-**Le (Fasturtec®)** est une uricase recombinante de *A. flavus* (**Richette, 2011**) obtenue par génie génétique (**Perez-Ruiz, 2007**), elle est indiquée dans le traitement des hyperuricémies aiguës observées au cours de certaines hémopathies malignes traitées par chimiothérapie (**Brière et al., 2006**)(**Garay et al., 2012**). Pour maintenir une uricémie basse les injections doivent être rapprochées, ce qui expose à une immunisation avec des risques de réactions allergiques et de perte d'efficacité (**Dubost et al., 2011**).

-**La PEG Uricase (Puricase®)** est une uricase porcine recombinante pégylée (PEG uricase) (**Richette et al., 2011**), produite par l'association du polyéthylène glycol à l'urate oxydase recombinante, ce qui permet une amélioration des propriétés pharmacocinétiques de l'uricase (**Benesser et al., 2010**). Elle est utilisée en perfusion intraveineuse à 8 mg tous les 15 jours. Chaque perfusion est associée à une perfusion de 200 mg d'hydrocortisone pour limiter les réactions allergiques (**Hang-Korng, 2012**).

3. Les inhibiteurs naturels

Des plantes médicinales sont utilisées dans la médecine populaire pour le traitement de certaines maladies telles que : le rhumatisme, et la goutte par l'extraction de leur principes actifs et tester leur effet inhibiteur sur la XO (**Gonzalez et al., 1995**). Leur effet inhibiteur sur la XOR a fait l'objet de plusieurs études qui ont montré que celui-ci est dû à la présence dans les plantes y compris *Fraxinus rhynchophylla* (**Kong et al., 2000**) des métabolites secondaire comme les flavonoïdes (**Costantino et al., 1992**) les tanins et les polyphénols (**Owen et Johns, 1999**), les coumarines (**Li et al., 2011**).

3.1. Les composés phénoliques

Ce sont des molécules spécifiques de règne végétale, l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés à un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (**Wang et al., 2012 ; Kim et al., 2013**). Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydants et protègent les tissus des lésions provoqués par les radicaux libres, avec une activité germicide, anti inflammatoire et bactéricide (**D'Archivio et al., 2007**)

3.3.1. Les coumarines

Les coumarines sont des molécules issues du métabolisme de la phénylalanine via l'acide shikimique par estérification et cyclisation, se formant par une substitution sur un cycle aromatique analogue à celle des dérivés de l'acide cinnamique. Presque toutes les

coumarines sont substituées par un hydroxyle en position C7 (**Figure N°18**) (**Guignard, 1993**).

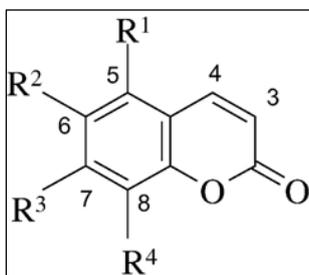


Figure N° 17: structure des coumarines.

les coumarines présentent des activités pharmacologiques et biologiques, elles sont antioxydantes (**Lin et al., 2008**), anti-inflammatoire (**Wang et al., 2012**) et anti-xanthine oxydoréductase (**Gonzalez et al., 1995**). Y compris la fraxine qui a un effet anti-hyperuricémique (**Li et al., 2011**).

3.3.2. Les flavonoïdes

Ce sont des substances naturelles phénoliques hydroxylées, qui contribuent à colorer les fleurs et les fruits, formées généralement de 15 atomes de carbones arrangés dans une configuration C₆-C₃-C₆; deux cycles aromatiques de 6 carbones (cycles A et B) reliés entre eux par un hétérocycle de 3 carbones (**Umamaheswari et al., 2011**). Ce groupe de substances présente plusieurs activités biologiques et pharmacologiques : antioxydant, antivirale, anti-tumoral, anti-inflammatoire et plusieurs effets inhibiteurs sur différentes enzymes comme la phospholipase (**Van Hoorn et al., 2002**). D'autre part, un effet inhibiteur des flavonoïdes comme le quercétine et la rutine sur la xanthine oxydase in vitro et in vivo a été démontré (**Hirschamann et al., 1987; Owen et Johns, 1999 ; Pirouzpanah et al., 2009**).

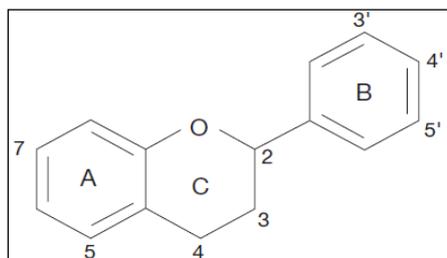


Figure N° 18 : Structure générale des flavonoïdes

3.3.3. Les tannins

Les tannins sont des substances phénoliques de nature variée a très grand nombre de groupement hydroxyles OH ce qui leur confèrent des propriétés réductrices marquées (**Bennick, 2002**).

Les tannins inhibent les enzymes par combinaison avec leur fonction protéique (**Khady et al., 2010**) et inhibent la génération du O_2^- généré par le système hypoxanthine /xanthine oxydase (**Cowan, 1999**). Ils peuvent agir comme scavengers de radicaux libres (**Mamadou, 2002**), leur activité inhibitrice sur la XOR augmente proportionnellement avec leur poids moléculaire et le nombre de groupement hydroxyles présents sur le noyau phénolique de molécule (**Owen et Johns, 1999**).

Plusieurs activités biologiques sont attribuées à ces métabolites secondaires des plantes (**Gonzalz et al., 1995 ; Owen et Johns, 1999**). Telle que l'activité anti-hyperuricémique, anti-arthrite et anti-goutte via l'inhibition de la XOR. En effet plusieurs études *in vivo* et *in vitro* concernant l'inhibition de la XOR sont illustrées dans le tableau II.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, choisi sur la base de son usage traditionnel. L'écorce est utilisée contre les hémorragies passives, la goutte atonique, la lithiase biliaire et surtout contre les fièvres intermittentes (**Beloued, 2001**).

Fraxinus angustifolia est un arbre caractéristique des forêts méditerranéennes qui peut atteindre 20 mètres de hauteur à feuilles adultes grandes de 12 à 25cm, glabres de 7 à 13 folioles, dentées en scies, bourgeons brunâtre, inflorescences en grappes (**Russell et Culter, 2008**) et caractérisé par un écorce restant très longtemps lisse, gris clair, se divisant en petites écailles à un âge avancé (**Rameau et al., 1989**).

Selon **Wallander (2008)**, la classification de *Fraxinus angustifolia* est comme suit :

Règne : plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classes : Magnoliopsides

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : Fraxinus.

Espèce : *Fraxinus angustifolia*.

Noms vernaculaires : **Berbère** « Aslène », **Arabe** «Dardar», **Français** : « Frêne »



Figure N° 19 : Photographie de l'arbre et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (originel)

L'écorce du frêne contient des tannins, des résines, des glucosides (fraxine, fraxétole, rutine), sels minéraux, acide malique, vitamine C et flavonoïdes (**Baba- Aissa, 1999**).

II.1.2. Animaux d'expérimentation

Pour évaluer l'activité anti-hyperuricémique de l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, des souris albinos pesant 18 à 23g, provenant de l'institut Pasteur, Kouba Alger, ont été utilisées. Dès leur réception les animaux ont été répartis dans des cages et placés dans un laboratoire expérimental soumis à un cycle jour/nuit de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité et maintenue à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

II.1.3. Appareillages et réactifs

❖ Réactifs chimiques et solvants

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans cette expérimentation, parmi ces produits : le Tampon phosphate constituée de Di-hydrogenophosphate de potassium (KH_2PO_4 , Biochem) Di-potassium monohydrogène phosphate (K_2HPO_4 , Biochem) et Ethylene Diamine Tétracétique (EDTA, Prolabo) ; Chlorure d'hydrogène (HCl); Eau distillée ; Eau distillée stérile ; eau physiologique (0.9%NaCl) ; carboxyméthylcellulose (CMC, Sigma) ; La xanthine (2,6Dihydroxypurine, Sigma) ; Nicotinamide Adénine dinucleotide (NAD^+ , Sigma) ; L'Oxonate (Sigma) de potassium ; NaOH ; l'Allopurinol (Sigma) ; chlorure de potassium (KCl) ; réactif de Bradford contenant 0,01% de bleu de coomassie G-250, 5% d'éthanol, 8% d'acide phosphorique (H_3PO_4) et l'albumine du sérum bovine (BSA, Sigma); kit de dosage de l'acide urique (SPINREACT)

❖ Matériel divers

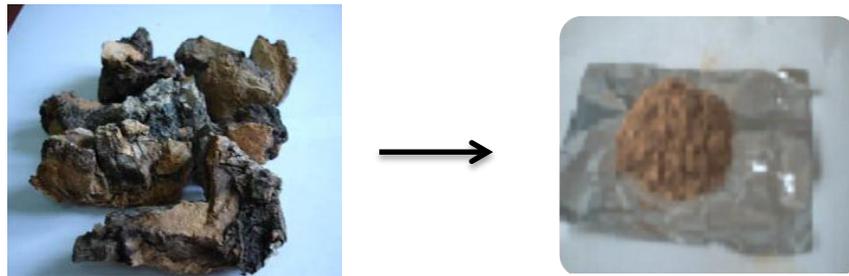
Spectrophotomètre à (UV-Vis 1800) (SHIMADZU), étuve (BINDER), centrifugeuse (SIGMA) (5000 rpm), sonicateur (RAYPA), Balance de précision (RADWAG, Max=600g, d=0,001g), Balance analytique (RADWAG, Max=220g, d=0,1mg), Plaque chauffante agitatrice. PH mètre, Cages d'élevage de souris, broyeur de tissus en verre, Bêchers, Entonnoirs, Tubes à essai, Eprouvettes, Spatules, Tubes Eppendorfs, Micropipettes, Mortier en porcelaine, Seringues, Sonde de gavage, Un chronomètre.

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits

La récolte de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été réalisée en mois de juin, à Chemini, wilaya de Bejaïa. Elle à été séchée dans un endroit propre aéré et ombragé.

A l'aide d'un mortier, puis un broyeur électrique, l'écorce à été réduite en poudre. Cette dernière a été tamisée pour récupérer une poudre très fine d'un diamètre < 63µm, qui a été préservée dans des flacons en verre fermés et stockés à l'abri de la lumière, pour une extraction ultérieure.



❖ Extraction

Le procédé d'extraction qui à été employé au niveau de laboratoire de Biochimie appliquée est celui de Chiang et ses collaborateurs (1994), qui porte sur trois principales étapes illustrées dans la figure suivante :

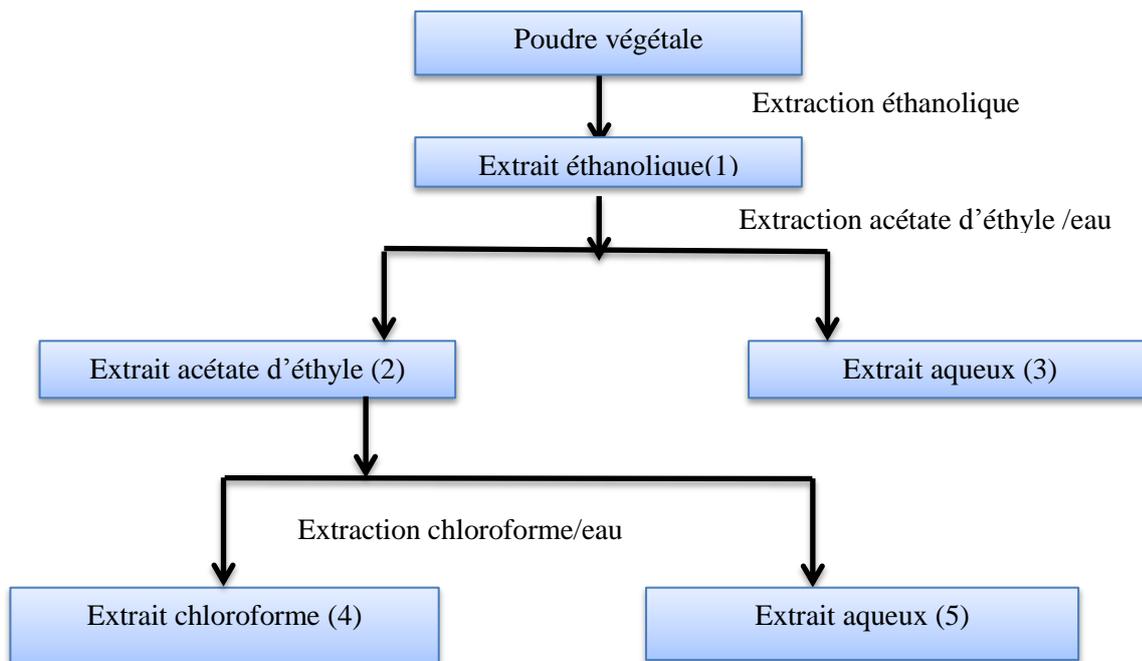


Figure N° 20 Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction (Chiang et al., 1994).

II.2.2. Evaluation de l'activité anti-hyperuricémique *in vivo*

L'activité anti-hyperuricémique de l'extrait aqueux (5) de l'écorce de *F.angustifolia* à été menée selon la méthode décrite par **Hall et al., 1990 ; Zhu et al.2004 ; Haidari et al., 2008.** Elle consiste en l'induction de l'hyperuricémie chez les souris par l'inhibiteur de l'uricase, l'oxonate de potassium.

II.2.2.1. Traitement des animaux

Les souris sont réparties en 8 groupes de 8 individus d'une manière homogènes par rapport à leur poids (18g-23g). Elles sont privées de nourriture pendant 1h30 min avant la première administration des solutions (injection intra péritonéal, et gavages). Les souris ont reçu par administration intra péritonéale l'eau distillée stérile pour les groupes témoin (contrôles) et l'oxonate de potassium (250mg/kg) pour les groupes test. Après une heure, les lots ont reçu par gavage, l'extrait à différentes concentrations (50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg) dissous dans le CMC. Un contrôle négatif (solutions véhicule) et contrôle positif (Allopurinol) ont été réalisés.

L'ensemble des lots et leurs traitements respectifs sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III : L'ensemble des lots et leurs traitements.

N° lot	Traitement
1	Contrôle négatif (Eau distillée + CMC)
2	Contrôle positif (Eau distillée + Allopurinol)
3	Eau distillé + FE 50mg/ml de CMC
4	Eau distillé + FE 100mg/ml de CMC
5	Eau distillé + FE 200mg/ml de CMC
6	Oxonate de potassium (OP)
7	Oxonate de potassium + Allopurinol
8	Oxonate de potassium + FE 50mg/ml de CMC
9	Oxonate de potassium + FE 100mg/ml de CMC
10	Oxonate de potassium + FE 200mg/ml de CMC

Ces traitements ont été répétés pendant trois jours avant le sacrifice des souris pour la récupération des échantillons biologiques.

II.2.2.2. Prélèvement et préparation des échantillons biologiques :

Après 3 jours de traitement et après 1 heure de la dernière administration par gavage (solution extrait, Allopurinol ou CMC) les animaux ont été sacrifiés par décapitation et rapidement disséqués pour récupérer le sang et les foies, respectivement.

❖ Préparation du sérum

Le sang est récupéré pendant le sacrifice des souris dans des tubes Eppendorf secs est laissé coaguler pendant environ une heure. Les tubes ont été par la suite centrifugés à 5000x g pendant 10 min. Les sérums sont délicatement récupérés et destinés pour le dosage de l'acide urique.

❖ Préparation des homogénats de foie

Le foie, excisé et pesé, est immédiatement stocké à -80°C . Un échantillon de chaque foie est broyé et homogénéisé à l'aide d'un broyeur de tissus en verre dans une solution tampon phosphate (0,05 M ; additionné d'EDTA (292.25M) ; pH 7,5) avec des proportions de 1g de foie/10ml tampon. L'homogénat est ensuite centrifugé à 5000x g pendant 10 min pour le débarrasser de la couche lipidique et récupérer le surnageant. Ce dernier est recentrifugé à 5000x g pendant 10min, le surnageant récupéré est stocké à -80°C et utilisé pour le dosage des activités XO et XDH hépatique.

II.2.2.3. Tests biochimiques

II.2.2.3.1. Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique est basé sur la méthode enzymatique (méthode de l'uricase-peroxydase (POD)). L'acide urique est oxydé en allantoiné par l'uricase avec production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier réagit avec la 4-aminophénazone (4-AP) et l'acide 2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS) en présence de la POD, pour produire un composé coloré en rouge-violet, appelé quinoneimine. L'intensité de la couleur qui en résulte est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'aliquote du sérum utilisé.

Le kit de réactif acide urique (SPINREACT), est fourni sous forme de petits flacons utilisés contenant le lyophilisat des enzymes à préparer dans un flacon de tampon pour obtenir une solution réactif d'acide urique. La réaction consiste à ajouter 25 µl du sérum sanguin à 1ml de ce réactif, suivie d'une incubation du mélange 10 min à température ambiante et la lecture d'absorbance à 520 nm contre un blanc réactif après étalonnage de l'appareil avec l'eau distillée. La même réaction est réalisée avec 25 µl d'une solution standard d'acide urique ayant une concentration de 6 mg/dL, comme référence pour le calcul suivant :

$$[\text{Acide urique dans l'échantillon}] \text{ mg/dL} = [\text{A échantillon/A Standard}] \times 6.$$

II.2.2.3.2. Dosage de l'activité XOR

Les homogénats des foies préparés ont été décongelés, afin d'évaluer des activités XO et XDH chez les souris normales et hyperuricémiques. Le test s'effectue en 3 étapes :

Une préincubation à 37°C/15min de 100µl d'homogénat de foie dans 3,5ml de tampon phosphate (0,05M) additionné de 1ml d'oxonate (1mM) et (0,5 ml de solution NAD⁺ (200µM) uniquement dans les tubes destinés pour la mesure de la XDH).

La réaction est initiée par l'ajout de 1ml de xanthine (250µM) suivie d'une incubation pendant 10 min à 37°C. Enfin la réaction est arrêtée par l'addition de 0,5ml d'une solution HCL (0,58M).

Les mélanges réactionnels sont ensuite centrifugés à 5000 x g pendant 5 min, puis les absorbances sont mesurés à 290nm, contre un blanc contenant le tampon phosphate additionnée d'EDTA.

Afin d'exprimer les activités spécifiques d'enzymes en U/mg de protéine, un dosage des protéines dans les homogénats à été réalisé par la méthode de Bradford.

- **Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

Une courbe d'étalonnage a été réalisée par des concentrations croissantes des solutions de la BSA (**Annexe I**).

La réaction consiste à ajouter 1ml de Bradford à une solution protéique (10µl d'homogénat+ 90 µl eau distillée), suivie d'une incubation de 10min à l'obscurité.

La réaction de bleu de Coomassie G250 avec les groupements NH₃⁺ des protéines forme un complexe bleu dont l'absorbance est enregistrée à 595nm. Cette absorbance est convertie en mg de protéine par ml d'homogénat à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement réalisée avec des concentrations croissantes de la protéine BSA.

II.3.L'analyse statistique:

Tous les résultats sont exprimés par une moyenne ±S.E.M. L'analyse statistique a été réalisée par l'analyse de la variance par le test de Bartlett, suivi du test de la comparaison multiple, Dunnett, pour la comparaison des valeurs obtenus par rapport au contrôle négatif. L'estimation est considéré significative a α=0.05 et P<0,05, p<0.01 et p<0.001.

III.1. Résultats de l'extraction

Cette étude a été effectuée sur *F. angustifolia*, en raison de sa richesse en composés phénoliques ; (phénols simples, Flavonoïdes, Tannins), et ses bonnes activités antioxydantes (Atmani et al., 2009), révélées par des travaux de recherche antérieurs menés au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université de Bejaia.

Les conditions de l'extraction, à savoir le volume, le type du solvant, la taille des particules et l'état du matériel végétal ont un impacte sur l'extraction en influençant le taux et la nature des composés extraits (Naczk et Shahidi, 2006). Dans le but de réaliser une bonne extraction des composés de cette plante, la méthode a été choisie par rapport à son caractère sélectif, selon la polarité des solvants sélectionnés. On a utilisé des solvants à caractère polaire différent et décroissant, et c'est parce qu'ils sont moins polaire qu'ils sont accompagnés par des solvants polaire (l'eau) pour les phases aqueuses. Selon Falleh et al. (2009), la différence de la polarité des composantes peuvent expliquer la différence du rendement d'extraction dans chaque phase. Le premier solvant utilisé dans la première étape est l'éthanol, étant donné que c'est le solvant qui extrait le maximum de composés phénoliques. De plus, il est moins altérant que le méthanol. Les taux d'extraction ont été calculés et les résultats sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV : Taux d'extraction (%) à partir de l'écorce de *F. angustifolia*.

Solvants	Taux d'extraction
Ethanol	5,6%
Acétate d'éthyle	23,5%
Acétate d'éthyle aqueux	49,18%
Chloroforme	61%
Aqueux de Chloroforme	26%

L'extrait éthanolique de l'écorce de *F. angustifolia* présente des taux d'extraction faible par rapport à la masse de la poudre utilisée au départ. La phase aqueuse, notamment la phase d'aqueux d'acétate d'éthyle présente un taux élevé, avec 49,18% par rapport à sa phase organique qui est de 23,5%. Ceci pourrait être justifié par la nature du solvant utilisé dans l'extraction ainsi que la présence de composés polaires dans cet extrait. Ce qui donne un signe aussi de leur richesse en composés hydrosolubles.

Nous constatons aussi que la majeure partie des composés qu'on a extrait en dernière étape, ont tendance à se retrouver dans l'extrait aqueux de chloroforme, dont les taux d'extraction atteignent une moyenne de 61% par rapport à l'extrait chloroforme qui présente un taux plus faible avec 26%. Ce qui suggère la présence de composés apolaires

III.2. Résultats de l'effet hypouricémiant de l'extrait aqueux de chloroforme de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

III.2.1. Effet sur les souris normales :

L'effet de l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* sur le taux d'acide urique dans le sérum de souris comparé à celui de l'allopurinol (10mg/kg) est représenté dans la figure N° 21 et le tableau V en annexe 02.

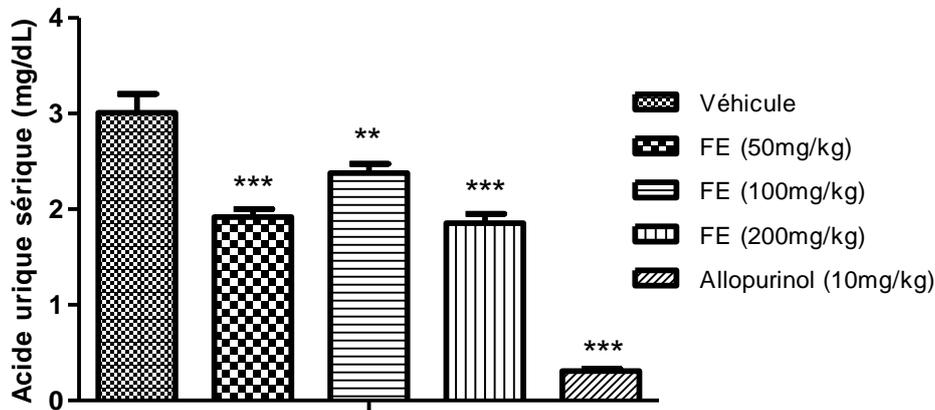


Figure N° 21: L'effet de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations sur le taux d'acide urique dans le sang chez les souris normales.

Les souris du groupe véhicule présentent un taux d'acide urique de 3.01 ± 0.19 mg/dL, qui est réduit significativement ($p < 0.01$) par les extraits à différentes concentrations et l'allopurinol ($p < 0.001$).

La diminution du taux d'acide urique sérique peut être le résultat d'une diminution de sa production selon Hu et al. (2010), ou bien l'augmentation de son élimination par stimulation de l'expression des OAT1 et OAT 3, qui participent à l'excrétion rénale de l'acide urique par l'extrait. Elle serait également une conséquence de l'activation de l'uricase qui catalyse la transformation de l'acide urique en allantoïne (Kuo et al., 2012).

Selon (Zhao et al., 2006), l'effet de la diminution de cette plante peut être dû à la réduction de la capacité de la libération de l'urate dans le foie vers le sang, ou bien l'extrait présente un potentiel similaire à la fonction de l'uricase.

L'allopurinol agit comme inhibiteur compétitive de la xanthine oxydase (Zhao et al., 2006), d'où une diminution considérable du taux d'acide urique dans le sang.

L'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* agirait également par inhibition de cette enzyme, via sa composition phénolique. En effet, les composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Costantino et al., 1992) ont été rapporté comme de bon inhibiteurs compétitifs de la XOR, et cela révélé par rapport aux différentes études qui a été réalisées sur l'inhibition de la XOR *in vitro* (Costantino et al., 1992 ; Gonzalez et al., 1995 ; Umamaheswari et al., 2009 ; Havlik et al., 2010). Selon Zhu et al., 2004 la diminution peut être due au composés bioactifs tels que les polyphénols contenant dans l'extrait de la plante comme la quercétine et la rutine. Ils ont montré que ces composés peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte et l'hyperuricémie en réduisant le taux d'acide urique.

On sait que le diabète est l'un des facteurs de risque de la goutte (l'hyperuricémie), alors on trouve chez les diabétiques une surexpression des UAT, ce qui augmente le taux d'acide urique dans le sang, on suppose que dans cet extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* contient des métabolites aldéhydes et agit comme de l'insuline, par conséquent la réduction d'acide urique.

III.2.1.Effet sur les souris hyperuricémiques :

Cet effet hypouricémiant à été également évalué chez des souris hyperuricémiantes, sous l'effet d'un traitement par l'oxonate de potassium, les résultats sont représentés dans la figure N°22 et le tableau V en annexe 02.

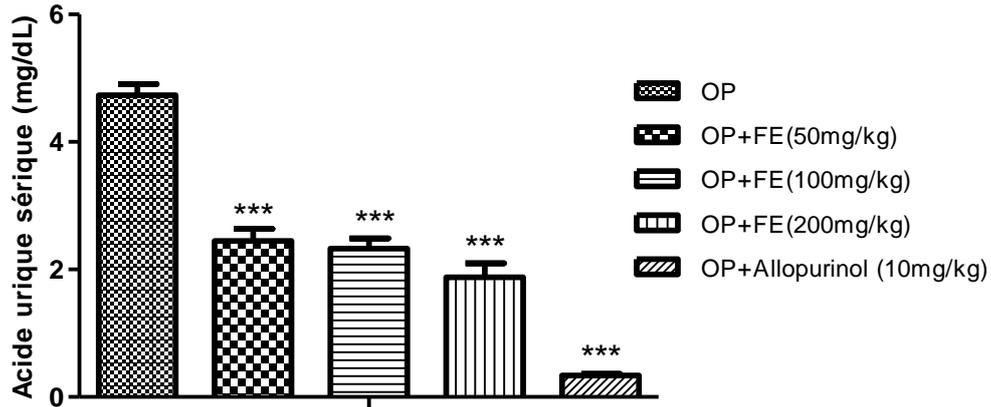


Figure N° 22: L'effet de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations sur Le taux d'acide urique dans le sang chez les souris hyperuricémique.

L'oxonate de potassium (250mg/kg) a augmenté considérablement le taux d'acide dans le sérum des souris avec un taux de 4.73 ± 0.18 mg/dL. Ceci par l'action inhibitrice de l'uricase. L'oxonate agit également sur les transporteurs notamment URAT1, selon **Hu et al., 2010** et sur OAT selon **Li et al., 2011**, par l'augmentation et diminution respectivement de leurs expression dans le tubule proximal rénal, ayant comme conséquence l'accumulation de l'urate dans le sang.

Les groupes de souris hyperuricémiques traités avec des concentrations croissantes de l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* ont montré une réduction significative ($p < 0.001$) dans le taux d'acide urique à différentes concentrations d'une manière dose dépendante, valeur à 50 mg/kg < valeur à 200 mg/kg), toutefois cet effet reste inférieur à celui exhibé par l'allopurinol.

Cette réduction significative ($p < 0,001$) peut être due aux mécanismes d'élimination par les substances naturelles comme les coumarines (fraxin, fraxetin), qui diminuent l'expression de l'URAT1, la diminution de l'expression du Glut9 par la fraxin et augmentation de l'expression des ABCG2 par la fraxine, la fraxetine, l'esculetine et l'esculine (**Li et al., 2011**).

Afin d'avoir une idée sur le mécanisme par lequel cet extrait aqueux a exercé son effet hypouricémiant, l'activité XO et XDH dans les homogénats des foies a été évaluée.

III.3. Résultats de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de chloroforme sur les activités de la XO et la XDH

La xanthine oxydoréductase catalyse la réaction de l'oxydation de l'hypoxanthine à la xanthine et cette dernière à l'acide urique impliquée donc dans l'augmentation de son taux dans le sang (Wang *et al.*, 2010).

III.3.1. Activité de la XO et XDH chez les souris normales et hyperuricémiques :

Les effets de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations sur les activités XO/XDH chez les souris normales et hyperuricémiques, en comparant son pouvoir inhibiteur à celui de l'allopurinol, sont représentés respectivement dans les histogrammes de la **figure N° 23** et de la **figure N° 24**.

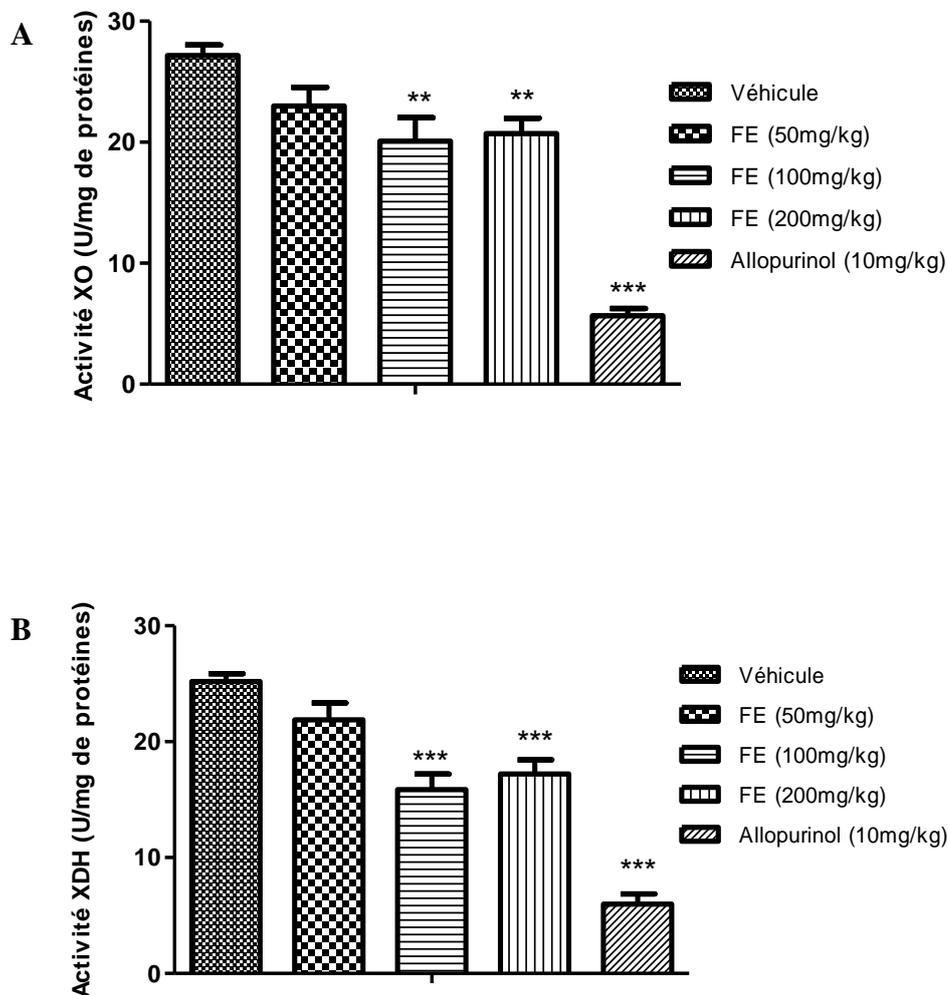


Figure N° 23: Les activités anti-XO (A) et anti XDH (B) de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations chez les souris normales.

Les souris du groupe véhicule présentent une activité XO de $27.16 \pm 0,89$ U/mg de protéines et XDH de 25.19 ± 06 U/mg de protéines, qui est réduite significativement à ($p < 0,01$) et ($p < 0.001$), respectivement par les extraits à différentes concentrations et l'allopurinol ($p < 0.001$).

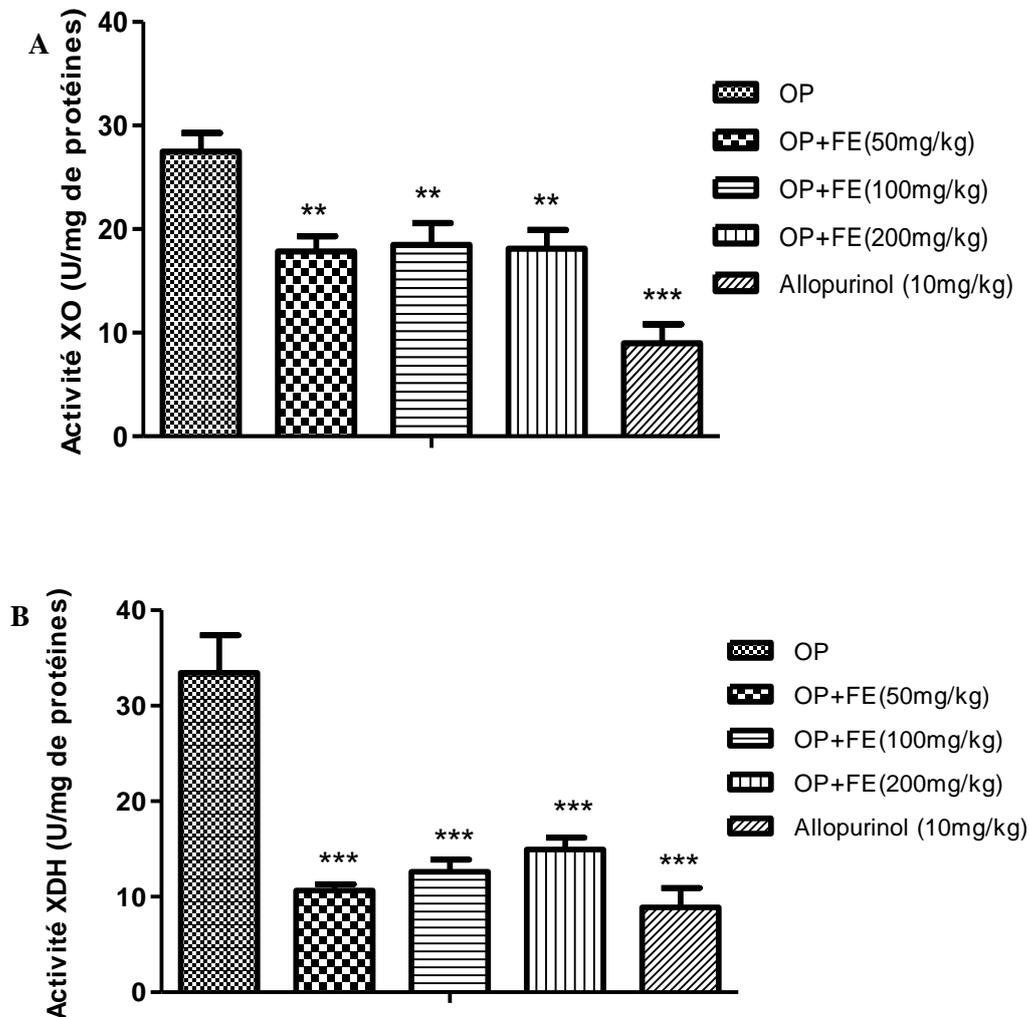


Figure N° 24: Les activités anti-XO (A) et anti XDH (B) de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations chez les souris hyperuricémiques.

Les souris du groupe hyperuricémique présentent une activité XO de 27.48 ± 1.79 et XDH de 33.44 ± 3.93 , qui est réduite significativement à ($p < 0,01$) et ($p < 0.001$), respectivement par les extraits à différentes concentrations et l'allopurinol ($p < 0.001$).

L'inhibition des activités XO/XDH sont beaucoup plus prononcées chez les souris hyperuricémiques comparativement aux inhibitions chez les souris normales. La XDH se

trouve significativement ($p < 0.001$) inhibé par les trois doses testées, comparativement à la XO ($p < 0.01$).

Ces activités inhibitrices de l'extrait sur la xanthine oxydoréductase peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs, tels que les polyphénols (**Costantino et al., 1992**) les tannins (**Schmeda-Hirschmann et al., 1996**) et les flavonoïdes (**Van Hoorn et al., 2002**). Les flavonoïdes sont des composées polyphénoliques rapportés pour leurs effets inhibiteurs sur la XO (**Baghiani et al., 2011**), donc la forte réduction de l'activité enzymatique chez les les deux groupes de souris peut être due à la présence de ces flavonoïdes dans cet extrait de *Fraxinus angustifolia*, notamment la quercétine et la rutine (**Gonzalez et al., 1995 ; Umamaheswari et al., 2009**). Cette réduction est liée à un mécanisme moléculaire exercé par les groupements hydroxyles C5 et C7 des flavonoïdes, qui ont une importante fonction inhibitrice de la XO, en remplaçant C2 et C6 de la xanthine dans le site de la XO, par conversion des groupements carboxyls en groupements hydroxyles (**Bindolli et al., 1985**). La quercetine présente une structure chimique comparable à celle de l'allopurinol, la xanthine et l'oxypurinol (**Van Hoorn et al., 2002**).

Les pourcentages d'inhibition de l'activité **XO/XDH** sont illustrés dans le tableau VI.

Tableau VI : L'effet de l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* sur l'activité XO/XDH chez les souris normales et hyperuricémiques.

Traitements	Dose mg/kg	XO U/mg protéines	XDH U/mg protéines	% Inhibition	
				XO	XDH
Véhicule	–	27,16±0.89	25,19±0.67	–	–
Eau+ FE	50	22,99±1,56	21,90±1,43	15,35	13,06
Eau+ FE	100	20,09±1,95**	15,87±1,35***	26,03	36,99
Eau+ FE	200	20,72±1,27**	17,22±1,23***	23,71	31,63
Allopurinol	10	05,66±0,595***	05,99±0,87***	79,16	76,22
OP	250	27,48±1,79	33,44±3,93	–	–
OP+ FE	50	17,85±1,45**	10,64±0,68***	35,1	68,18
OP+ FE	100	18,48±2,09**	12,62±1,26***	32,8	62,26
OP + FE	200	18,12±1,80**	14,94±1,25***	34,1	55,32
OP+ Allopurinol	10	08,97 ±1,86***	08,90±2,02***	67.35	73,58

Les résultats indiquent que l'extrait possède la plus grande activité inhibitrice 35.1% sur la **XO** et 68.8% sur la **XDH** à la dose 50mg/kg dans les groupes hyperurécimique, 26.03 % et 36.99 % à la dose 100 mg/kg dans les groupes normales. Néanmoins ces inhibitions restent

toujours inférieures à l'activité inhibitrice de l'allopurinol sur **XO/XDH**, 79.16% et 76,22% respectivement chez les groupes normales et 67.35% et 73.58% chez les groupes hyperuricémiques.

Les pourcentages d'inhibition obtenue par cet extrait *in vivo* sont inférieurs à celle obtenus par des études *in vitro* sur d'autres espèces comme *Fraxinus rhynchophylla* (96%), cette différence peut être expliquée par la biodisponibilité des composés de cet extrait *in vivo* (**Kong et al., 2000**). L'extrait exerce son effet inhibiteur d'une manière significative chez les groupes hyperuricémiques et d'une manière dose dépendante chez les souris normales. Cette différence peut être due également aux différents métabolismes et biodisponibilité.

Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de la *Fraxinus angustifolia* est capable de réduire l'accumulation du métabolite des purines, l'acide urique, et démontre son potentiel inhibiteur de la xanthine oxydoreductase comme l'un des mécanismes clé de l'hypouricémie, par conséquent, ces résultats explique son usage traditionnel dans le traitement des rhumatismes et de la goutte.

Fraxinus angustifolia est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits de l'écorce de cette plante sont largement utilisés, depuis des siècles, pour soigner divers maladies à caractère inflammatoire (le rhumatisme articulaire, la goutte et la néphrite...). Les études récentes lui attribuent des propriétés curatives intéressantes et prometteuses (anti-inflammatoire, anti-hyperuricémique...).

Une extraction à été faite, selon un protocole sélectif avec l'utilisation de différents solvants, pour récupérer l'extrait aqueux/chloroforme pour l'évaluation de son activité hypouricémiante et inhibitrice de la XOR à 50mg/ml, 100mg/ml et 200mg/ml.

D'après les résultats obtenus, l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* s'est avéré anti-hyperuricémique, avec une réduction du taux d'acide urique de 1.85 ± 0.09 mg/dL à 200mg/kg chez les souris normales et de 1.87 ± 0.22 mg/dL à 200mg/kg chez les souris hyperuricémiques.

Les activités inhibitrices des activités XO/XDH étaient également intéressantes, notamment la XDH à toutes les concentrations testées, avec des pourcentages de 68.18, 62.26, 55.32%.

L'extrait de la plante étudiée est probablement lié à leurs teneurs en composés phénoliques, notamment coumarines et flavonoïdes. Il serait donc intéressant de fractionner par des méthodes chromatographiques, cet extrait et isoler et identifier ces composés actifs.

Les résultats de cette étude sont prometteurs et permettent de considérer l'utilisation de l'écorce de cette plante contre la maladie de la goutte, aussi bien comme traitement curatif que préventif, néanmoins d'autres tests sont à compléter, à savoir l'étude de sa toxicité aux concentrations considérées.

Références bibliographiques

-A-

Atmani,D., Chaher,N., Berboucha, M.Ayouni, K.,Lounis, H.Boudaoud, H.,Debbache, N.
Atmani, D.(2009).Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants.Food Chemistry,112,303-309.

-B-

-Baba Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb.Librairie Moderne.Roiba Dépôt légal.

-Baghiani, A., Ameni, D., Boumefreg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N., Khennouf, S., and Arrar, L. (2012).Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis Spinosa*L. *American Journal of Medicine and Medical Science* 2(1): 25-32.

-Bardin, T. (2004). Comment traiter un goutteux résistant ou allergique à l'allopurinol en 2004. *Revue du Rhumatisme*, 71,860–864.

-Bardin,T.(2007). Progrès en pathologie microcristalline. *Revue du Rhumatisme* ,74 ,52-57.

-Bardin, T., and Richette, P. (2011). Épidémiologie et génétique de la goutte. *Arthropathies microcristallines*, 40(9) ,830-835.

-Battelli, M., Abbondanza, Musiani, S., Buonamici, L., Strocchi, P., Tazzari, P.L., Gramantieri, L., and Stirpe, F. (1999).Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica Chimica Acta* (281)147–158.

-Beloud, A. (2001) *plantes médicinales d'Algérie*. Alger : Office de la publication Universitaire.

- Beneytout,J.L.(2008). Consommations sucrées au fructose et risque de goutte. *Biochemtry nutrition*,(408),14-15.

Références bibliographiques

-Benesser, H.A., Tazi, Z.M., Harmouche, H., Aouni, M., and Maaouni, A. (2010). La goutte : nouvelles recommandations. *Revue de Rhumatisme*, 17 (166) ,119-133.

-Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2), 184-196.

- Berboucha, M ., Ayouni, k., Atmani, D., Djebbar, A., and Benboubetra, M.(2009). Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *journal of medicinal food*.13 (4) :1–9.

-Berry, C.E.,and Hare, J.M. (2004). Xanthine oxydoréductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol*, 555 (3), 589- 606.

-Bindoli, A., Cavalini, L., Rigobello, M., Coassin, M., and Dilisa, F. (1988). Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress. Free radical. *Biology & Medicine*,(4) ,163-167.

-Boumefrag, S. (2010). Antioxydative properties of *Tamus communis* L., *Carthamus caeruleus* L. And *Ajuga iva* L. Extracts; Thèse ; université Sétif ; 116.

-Brière,C. Richette, P. Hoenen-Clavert, V. Loeuille, D. Bardin, T.(2006). Efficacité et tolérance de la Rasburicase (Fasturtec®) chez des patients goutteux intolérants ou réfractaires à l'allopurinol. *Revue du Rhumatisme* ,73 ,1031–1088

-C-

-Chalès, G. (2011). De l'hyperuricémie à la goutte : épidémiologie de la goutte .*Rev Rhum*, 78, 109-115.

-Chiang, H.S., Juilo, Y.,and Lu, F.J.(1994).Xanthine oxydase inhibitors forme the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of enzyme inhibition*, 8(1), 61-71.

Références bibliographiques

-Cighetti,G., ,Debiasi, S., and Paron, P.(1994). No documentable role for xanthine oxidase in the pathogenesis of hepatic in vivo ischaemia/reperfusion injury .*Pharmacological Research*, 30(3), 243-251.

-Corpas , F., Palma, J., Sandalio , L., Valderrama, R., Barroso, J., and Rio, L . (2008). Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiology*, 165, 1319-1330.

- Costantino, L., Rastelli, G. and Albasini A.,(1992). Inhibitory activity of flavonols towards the xanthine oxidase enzyme. *internationel Journal of Pharmaceutics*, 86 17-23.

-Cowan., M.M. (1999). Plant products as antimicrobiol agents. *Clinical Microbiology Reviews* (12), 564-582.

-D-

-D'Archivio , M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R.,Giovannini, C. and Masella, R.(2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4), 348-361.

-Da Silva, M., Mira, L., Lima, J., and Manso, C. (1996).Kinetics of the inhibition of xanthine dehydrogenase and of the reversible and irreversible forms of xanthine oxidase by silibinin and bendazac. *Environmental Toxicology and Pharmacology* ,(1),279-284.

-Deray, G., and Bitker, M.(2012). La lithiase urique pour les nuls. Séminaires Universitaires de Néphrologie de Paris. Janvier 2012.p.254.

-De souza, M.R., De Paula, C.A., De Resende, M.L.P., Grabe-Guimaraes, A., Filho, J. D., and Saude-Guimaraes, D.A. (2012). Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 845–850.

-Dubost, J., Mathieu, S., and Soubrier, M. (2011). Traitement de la goutte : *La Revue de médecine interne*, 32 ,751–757.

Références bibliographiques

-F-

Falleh,H. ,Ksouri,R.,Chaieb,K.,Karray-Bouraoui ,N. ,Trabelsi,N.,Boulaaba,M.and Abdelly,C (2009).Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L.organs,and theirbiological activities.*Comptes Rendus Biologies*,331,372-379.

-Faure, S. (2010). Les antigoutteux. Faculté de pharmacie .p.51-54

-Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling current Opignon. *Cell Biology* (10):248-253.

-G-

- Garay, R., El-Gewely , R., Labaunec, J.P., and Richette, P.(2011). Perspectives des uricases dans la goutte. *Revue du rhumatisme*, 79, 17–22.

-Golovinsky,E.and Spassova,M.(1981).Analogue of pyrimidine and purine mononucleotide precursors as metabolic inhibitors. *Pharmac.Ther*,13,385-420

-Gonzalez, A., Bazzocchi, I., Moujir, L., Ravelo, A., Correa, M.,and Gupta, M. (1995). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 25-29.

-Guignard, J.L. (1996).Biochimie végétale. Paris :Masson.

.-H-

-Haidari, F., Rashidi, M.R., Keshavarz, S.A., (2008). Effects of onion on serum uric acid levels and hepatic xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase activities in hyperuricemic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 1779–1784

-Hall, I.H., Scoville, J.P., Reynolds, D.J., Simlot, R., Duncan, P., 1990. Substituted cyclic imides as potencial anti-gout agents. *Life Sciences* 46, 1923–1927.

-Hang Korng, Ea. (2010). Physiopathologie de l'inflammation goutteuse. *Revue de Rhumatisme*,14 ,7-10.

Références bibliographiques

-HangKorng, Ea. (2011).De l'hyperuricemie a la goutte : physiopathologie. *Revue Rhumatismale*, 78 ,103-108.

- HangKorng, Ea. (2012).Mise au point sur la goutte. *Rhumatologie*,453-456.

-Harrison, R. (2002).Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 46, 3308-3310.

-Harrison, R. (2006). Milk xanthine oxidase: Properties and physiologicalroles. *International Dairy Journal*, 16, 546–554.

-Havlik, J., Gonzalez, R., Hejtmankov, K., Fernandez, J., Simonova, J., Melich, M., and Rada,V.(2010). Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 461–465.

-Hille, R., Nishino, T. , and Bittner, F.(2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination ChemistryRev*,255 , 1179–1205.

-Hirschmann, G. S., Theoduloz, C., Franco, L.,Ferro B. E., and De Arias, A. R. (1987).Preliminary pharmacological studies on *eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhiritory activity .*Journal Of Ethnopharmacology*, 21, 183- 18.

-Hosomi , A., Nakanishi ,T. , Fujita, T., and Tamai, I.(2012). Extra-renal élimination of uric Acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *Biopharmaceutic*, 7, 1-8.

- Hu, H., Jiao, R., Wang, X., Zhong, Y., Kong, L. (2010). Simiao pill ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 685–692

- Hurtes, X., and Meria, P. (2011). Atteintes uro-néphrologiquesdes hyperuricémies. *Journal de medecine*, 40, 865–868.

-I-

-Ichida, K., Amayaa Y., Noda K., Minoshima, SH., Hosoyab, T., Sakaib O., Shimizu,N., and Nishino, T.(1993). Cloning of the cDNAencoding human xanthine dehydrogenase (oxidase). *Structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene*, (133), 279-284.

Références bibliographiques

-Izzedine H., and Deray G.(2011) .Acide urique et fonction rénale. *Revue du Rhumatisme* ,(78), 134-141.

-J-

-Johnson,S .(1999). Effect of gradual accumulation of iron, molybdenum and sulfur, slow depletion of zinc and copper, ethanol or fructose ingestion and phlebotomy in gout. *Medical Hypotheses*, **53**(5), 407–412

-K-

-Khady, B., Emmanuel,T., Destain, J., Cissé ,N and Thonart, P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol* ,14(1), 131-139.

- Kim, k .,Pharm D . , Schumacher, R . , Hunsche, E . , Dipl, R ..Albert I . , Wertheimer,Ph.,and Sheldon X.(2003).A Literature Review of the Epidemiology and Treatment of Acute Gout .*clinicalthérapeutics*, (6),1593-1617.

- King, M . , De vriest, L., and Pepinsky, R. (1952).An X-ray diffraction determination or the chemical structure of colchicines..*Acta Cryst*, (5), 437-440.

-Kong, L.D., Cai ,Y. , Huang, W.W. , Cheng, C. H.K. , Tan, R.X. (2000) Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology* ,73 ,199–207.

-Kuo,C. Y., Kao, E. S., Chan ,K. C., Lee ,H. J., Huang, T .F.,Wang ,C. J. (2012).*Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats.*journal of functional foods* ,4 ,375 –381

-L-

-Le Bellec, M., Gastine, B., Mosquet, B., Godde ,F., Ze Bekolo, R., Gloro, R., Le terrier, C., and Coquerel, A.(2009). Risque d'intoxication à la colchicine chez les personnes âgées et

Références bibliographiques

moyens de prévention : à propos de quatre observations : Colchicine intoxication in four elderly patients: How to prevent it ?. *Revue de médecine interne*, (30), 783–788.

-Lederer, J. (1978). Régime de la goutte. *Manuel de diététique*. p.2

-Le treut A.(2009). Metabolisme des Purines. Université de Rennes I.p.1-17.

- Li, J., Zhang, X., Wang, X., Xie Y., and Kong, L. (2011). Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *European Journal of Pharmacology*, 666, 196–204.

-Lin, H. , Tsai S. , Chen, C., Chang Y. , Lee, C., Lai ,Z., and Lin, C.(2008). Structure–activity relation ship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *biochemical pharmacology*, (75) ,1416 – 1425.

-Lioté F., and Hang-Korng Ea . (2007). Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Revue Rhumatismale*, 74 ,131–137.

-Lioté,F. and bardin,T.(2007). Traitement de la goutte. *Revue du Rhumatisme*, 74, 160–167

-Lioté, F.(2010). Epidémiologie de la goutte. *Rev Rhum*, 14,11-14.

-Lioté,F., Lancrenon, S., Lanz S., Guggenbuhl ,P., Lambert, C., Sarauxi, A., Chiarelli,P., Delva ,C. , Aubert, J.P and Hang-Korng , Ea. (2012) . Goutte et observation des stratégies de prise en charge en médecine ambulatoire(GOSPEL). *Revue du rhumatisme* 79, (1003) ,405–411.

-M-

-Mamadou, B. (2002). Action pharmacologique des tannins. Thèse, Université Cheikh Anta Diop De Dakar.

-Many, A., Hubel, A., and Robert, J.,(1996). Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Current development* , (1) ,288-290.

Références bibliographiques

-Marié, E. Fournier, C. Bautin, N. Doyen, V. Wallaert, B. (2005). Accoutumance ultrarapide à l'allopurinol. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 45, 498–500.

-Marti, R., Varela E., Pascual C., and Segura, R.(2001).Determination of xanthine oxidoreductaseforms: influence of reaction conditions. *Clinicachimica* , 303 ,117-125.

-Mathieu, M.,and Guimezanes, A.(2011).Inflamation dans d'autres maladies chroniques.Séminaires Ketty Schwartz de Paris.28septembre -09février2012.p.74.

- Mbouiti N.(2008). Facteurs plasmatiques liberes Sous l'effet des cristaux d'urate Monosodique. Mémoire de maître des sciences, Université Laval Québec.51p.

-McDonald-Blumer M.D ., and Fabian ,J.(2010).Un moment propice pour réexaminer le traitement de la goutte 43-44.

-Merriman T and Dalbeth N,(2010). Bases génétiques de l'hyperuricémie et de la goutte : *Revue du rhumatisme*, (77), 328–334.

-Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques régions de Tlemcen. Thèse de magister. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, 155 p.

-Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda ,M., Takahashi, S., Agbedana, O.E., Hada ,T. and Higashino, K.(1993). Purification and immuno histochemical localization of human xanthine oxidase.*Biochem. Biophys. Acta*, (1164), 327-330.

-N-

- Naczk, M.and Shahidi, F. (2006).Phenolics in cereals,fruits and vegetables :Occurrence,extraction and analysis.*Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*,41 :1523-1542.

-Nakamura, T., Tanaka, T., Takagi , K., Yoshio, N. , Lani ,K.,Urasaki , Y. , Fukushima, T., and Tsutani, H. (1997). Urate transport in nephrons of gouty patients. *Clinical biochemistry* , (30),272.

Références bibliographiques

- Nishino, T., and Okamoto, K., (2000). The role of the [2Fe–2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase. *Biochem* , 82 ,43–49.

- Nolfi, J.R. (1970). Biosynthesis of uric acid in the tunicate, *Molgula Manhattensis*, with a general scheme for the function of stored purines in animals. *Comp Biochem physiol*, 35, 827–842.

-O-

-Olivier, B. (2004). Rôle de Glut9 dans l'homéostasie de l'acide urique. *Revue Médicale*,

-Owen, P., and Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Ethnopharmacology*, (64), 149–160.

-P-

- Paris, M. and Hurabielle, M. (1981). Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. Tome 1. *Ed Masson, Paris* p : 339.

- Perez-Ruiz, F. (2007). Les nouveaux traitements de la goutte. *Revue du Rhumatisme* , 74 , 624–626.

-Pétrilli, V., and Martinon, F. (2007). The inflammasome, auto-inflammatory diseases, and gout, *Rhumatisme*, 74, 1240–1246.

-Pirouzpanah, S., Rashidi, M. R., Delazar, A., Razavieh, S .V., Hamidi, A .A. (2009). Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. extract on guinea pig liver and bovine milk xanthine oxidase. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 163-170.

- Pritsos, C.H. (2000). Metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chemico-Biological Interactions*, (129), 195–208.

Références bibliographiques

-R-

- Rameau, J.C., Mansion, D., Dumé, G., Timbal, J., Le cointe, A., Dupont,P., and Kller, R., (1989). Flore forestière françaises. Guide écologique illustré. Paris
- Reach , G.(2011). L'observance dans la goutte. *Revue du rhumatisme* (78)319–323
- Richette, P., and Bardin, T. (2009). Gout. *Revue du Rhum*, 375 ,318-328
- Richette, P. (2010).Goutte. Séminaires de Réflexions rhumatologiques. Octobre 2010.40p.
- Richette, P., Ottaviani, S., Bardin, T. (2011). Nouveaux traitements de la goutte. *Presse Med*, 40,844–849.
- Richette, P. (2011) .Goutte : mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant .*Revue de Rhumatisme*, 78 ,142-147.
- Rozenberg, S. (2007). La goutte médicamenteuse. *Revue du Rhumatisme*, 74 ,150–152.
- Russell, T., and Culter, C. (2008).L'encyclopédie Mondiale des arbres. London

-S-

- Silanikove, N., and Shapiro, F. (2007). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in bovine milk: Physiological and technological implications. *International Dairy Journal*, (17), 1188–1194.
- Simon, L., blotman, F., and Claustre, J. (1975).*Abrégé de rhumatologie*. Paris : Masson.

-U-

- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam A.T., Remyaraju, A.,Subhadradevi ,V., Ravi, T.K. (2009) *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 646–648.

Références bibliographiques

-Umamaheswari, M., Madeswaran, A., Asokkumar, K., Sivashanmugam T., Subhadra Devi, V., and Jagannath, P.(2011). Discovery of potential xanthine oxidase inhibitors using *in silico* docking studies. *Pharma Chemica* , 3 (5),240-247.

.-V-

- Valeix, N., and Guillot, X. (2013). Thérapeutiques antigoutteuse et hypo-uricémiante. *Medecine*, (524) ,20-25.

- Van Hoorn, D., Nijveldt, R., Van Leeuwen, P., Hofman, Z., M'Rabet, L., Bont, D., and Van Norren, K.(2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, 451,111 – 118.

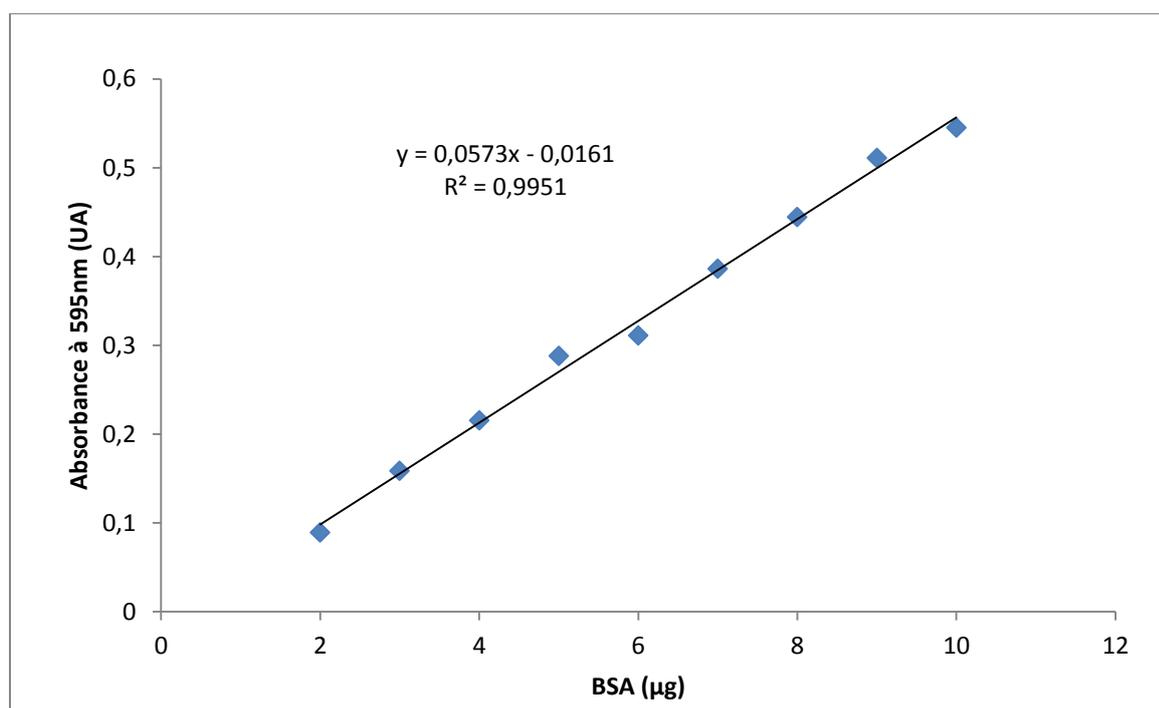
-W-

- Wallander, E. (2008). Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Syst Evol*, 273, 25–49.

- Wang, J., Pan, Y., Hong, Y., Zhang, Q., Wang, X., and Kong, L. (2012). Quercetin Protects against Cadmium-Induced Renal Uric Acid Transport System Alteration and Lipid Metabolism Disorder in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.1-14

-Wang, C., Pei, A., Chen, J., Yu, H., Sun, M., Liu, CH., and Xu, X. (2012).A natural coumarin derivative escultin offers neuroprotection on cerebral ischemia reperfusion injury in mice.(121),1007-1013.

-Wilma, F., and Vreeling-Sindelárová, H. (2002). Ultra structura llocalization of xanthine Oxidoreductase activity in isolated rat livercells. *Acta histochemica* 104(1): 29–37.

Annexe 01 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.**Annexe 02** : Effet de l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* sur l'acide urique des sérums des souris normales et hyperuricémiques.

Traitements	Dose mg/kg	Acide urique mg/dL
Véhicule	-	3.01±0.19
Eau+FE	50	1.92±0.08***
Eau+FE	100	2.37±0.09**
Eau+FE	200	1.85±0.09***
Allopurinol	10	0.30±0.02***
OP	250	4.73±0.18
OP+ FE	50	2.44±0.19***
OP+ FE	100	2.32±0.16***
OP+ FE	200	1.87±0.22***
OP+ Allopurinol	10	0.33±0.02***

Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.

Résumé :

Les plantes médicinales constituent une source importante de métabolites actifs avec un important potentiel thérapeutique, *Fraxinus angustifolia*, appelé communément frêne, est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de divers pathologies notamment celle à caractère hyperuricémique et inflammatoire « la goutte » .

Le travail réalisé s'est intéressé à l'étude de l'activité anti-hyperuricémique de l'extrait aqueux d'écorce de *Fraxinus angustifolia* par la méthode d'induction de l'hyperuricémie par l'oxonate de potassium chez les souris. Les résultats obtenus ont montré que cet extrait aqueux exprime un pourcentage d'inhibition de XO/XDH est de 35,1/68,18 respectivement, et assez remarquable à une concentration de 50 mg/ml. Un des mécanismes de l'activité anti-hyperuricémique, qui s'est avérée aussi significative ($p < 0.001$), aussi bien chez les souris normales et hyperuricémiques. Nos résultats sont prometteurs pour une exploitation des extraits de *Fraxinus angustifolia* pour lutter contre la goutte.

Mots clés : acide urique, oxonate de potassium, hyperuricémie, XOR.

Abstract

Medicinal plants are an important source of active metabolites with an important therapeutic capacity, *Fraxinus angustifolia* named usually frêne, is a plant used in traditional medicine for treatment of several diseases namely with inflammatory and hyperuricemic character.

-The aim of this study was to evaluate anti-hyperuricemic activity of bark extract of *Fraxinus angustifolia*, though the oxonate potassium induced hyperuricemic in mice. The results showed that extract express and inhibition of XO /XDH (35.1/68.18) at 50mg/ml, one of the mechanisms of anti-hyperuricemic activity, which is also significant ($p < 0.001$) in normal and hyperuricemic mice.

Our results are promising for exploitation of *Fraxinus angustifolia* extract for fight against gout.

Key words: uric acid, potassium oxonate, hyperuricemic, XOR

Tableau II : Activité inhibitrice des extraits des plantes médicinales sur la XOR *in vivo* et *in vitro*

Espèce	famille	Extrait (dose)	composant	Inhibition <i>in vivo</i> du XOR		Inhibition <i>in vitro</i> du XOR		Référence
				% d'inhibition	IC ₅₀	% d'inhibition	IC ₅₀	
<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtaceae	EtOAc des feuilles (50µM)	Flavonoïde -myricétin -quercétine -quercétrine	96 86 85	2 µM 3 µM 15 µM	–	–	(Hirschmann et al., 1987)
<i>Erythrina stricta</i>	Papilionaceae	Chloroforme des feuilles (100µg/ml)	Flavonoïdes	–	–	84,75±0,54	21,2±1,6 µg/ml	(Umamaheswari et al., 2009)
<i>Populus nigra</i>	Salicaceae	Ethanolique de bourgeon (200µg/ml)	Flavonoïdes	–	–	88,6±2,82	9,4 µg/ml	(Havlik et al., 2010)
<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	Ethanolique des feuilles (200µg/ml)	Flavonoïdes	–	–	81,2±2,8	39,4 µg/ml	
<i>Hyptis obustiflora</i>	Lamiaceae	Ethanolique des racines (50µg/ml)	Flavonoïdes et polyphénols			93	1,1 µg/ml	(Gonzalez et al., 1995)
<i>Lychnophora trichocarpha</i>	Asteraceae	Ethanolique du partie aérienne (250mg/kg)	Flavonoïdes	34,8	28,8 µg/ml	–	–	(de souza et al., 2012)
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	Oleaceae	Aqueux et Méthanolique d'écorce (100µg/ml)	Flavonoïdes	–	–	86 96	53 µM 28 µM	(Kong et al., 2000)
<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	EtoAC des feuilles (10 µM)	Flavonoïdes quercétine	98,2±7,6	0,7±0,1	95,1±2,6	0,4±0,01	(Pirouzpanah et al., 2009)
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Malvaceae	Méthanolique des fleurs	Polyphénols	Hypouricémiant <i>in vivo</i> (↑activité d'uricase)				(Kuo et al., 2012)

