

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA- Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie Physico-Chimique

# **Mémoire de Master**

**Option : Biochimie Appliquée**

**Thème :**

**Activité antihyperuricémique et anti  
xanthine oxydoréductase *in vivo* de  
l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des  
feuilles de *Clematis flammula***

Présenté par :

Mlle : Habib Lilia

Mlle : Laidi Lydia

**Membre du Jury :**

Présidente : Mme Debbache N.

Promotrice : Mlle Sebaihi S.

Co-promotrice: Mlle Cheraft N.

Examinatrices: Mlle Ayouni K.

Mlle Tahiri O.

**Grade et lieu :**

M.A.A. Université de Bejaïa

M.A.B. Université de Bejaïa

M.A.B. Université de Bejaïa

M.A.A. Université de Bejaïa

M.A.A. Université de Bejaïa

2012-2013

# REMERCIEMENTS

*Nos remerciements vont tout d'abords à Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la volonté tout au long de ce travail.*

*Un grand merci à Mr et Mme Atmani pour nous avoir accueillis au sein de leur laboratoire.*

*Nos remerciements vont également à Mlle Sebaihi et Mlle Cheraft pour nous avoir orientées tout au long de ce travail.*

*Nous adressons également nos remerciements les plus sincères aux membres du jury : à Mme Debbache pour avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'à Mlle Ayouni et Mlle Tahiri pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*A Mlle Saidane Naima, Mlle Madi Wahiba et Mlle Moulaoui Kenza pour leur gentillesse et précieuse aide.*

*Nos considérations sont également à l'encontre de toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, plus spécialement, l'ensemble du personnel du laboratoire de Biochimie appliquée de l'université de Bejaïa.*

# DEDICACE

*Je dédie ce travail :*

*A mes parents ; qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

*A ma chère sœur Lydia, et à mes deux frères Redouane et Rassim.*

*A la mémoire de mon grand père Mohand sghir.*

*A ma grand-mère Khlidja, que Dieu la garde.*

*A toute ma famille ; petits et grands.*

*A tous mes ami(e)s.*

*A toute la promotion Biochimie Appliquée 2012-2013.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Lilia*

# DEDICACE

*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 mon frère et mes sœurs.*

*A mes cousins et cousines.*

*A Salim et à tous mes amis (es).*

*lydia*

## *Liste des abréviations*

**XOR** : Xanthine Oxydoréductase.

**XO** : Xanthine Oxydase.

**XDH** : Xanthine Déshydrogénase.

**Mo**: Molybdène.

**KDa** : Kilo Dalton.

**FAD**: Flavine Adénine dinucléotide.

**Cys**: Cysteine.

**SH**: Résidu Sulfhydryl.

**NAD**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé.

**EOR**: Espèces oxygénées réactives.

**BSA**: Bovin Serum Albumin.

**URAT**: Transporteur d'urate.

**GLUT**: Transporteur du glucose.

**OCT**: Organic Cations Transporters.

**OAT**: Organic Anion Transporters.

**hUAT**: hepatic Uric Acid Transporter.

## *Liste des figures*

figure	Titre	page
01	Structure de l'enzyme XOR.	5
02	Conversion de la XDH en XO.	6
03	L'oxydation des substrats au niveau des deux sites Mo et FAD de la XOR.	7
04	Catabolisme des purines	8
05	Mécanisme de génération des EOR par la XOR lors de l'ischémie réperfusion.	9
06	La réaction catalysée par la XOR et l'inhibition par l'allopurinol.	10
07	Voie des Schikimates.	15
08	Voie des malonates.	15
09	Quelques acides phénols benzoïques.	16
10	Exemple de quelques acides de la série cinnamique.	17
11	Structure de base de flavonoïdes.	17
12	Structure de quelques flavonoïdes.	18
13	Structure des tannins hydrolysables.	19
14	Structure des tannins condensés.	20
15	Photographie de <i>Clematis flammula</i> .	21
16	Procédure d'extraction à partir des feuilles de <i>Clematis flammula</i> .	24
17	Image d'une souris albinos	25
18	Traitement par voie intra-gastrique et par voie intra-péritonéale.	26
19	Image d'une souris disséquée	27
20	Taux d'acide urique chez les souris normales	32
21	Taux d'acide urique chez les souris hyperuricémiques	33
22	Activité XO/XDH chez les souris normales	34
23	Activité XO/XDH chez les souris traitées par de l'oxonate de potassium	35

## *Liste des tableaux*

Tableau	Titre	page
I	Traitements de l'hyperuricémie.	4
II	Localisation de la XOR dans les tissus humains.	7
III	Quelques plantes à usage médical.	12
IV	Activités biologiques des composés phénoliques.	20
V	Classification de <i>Clematis flammula</i> .	22
VI	Répartition des lots selon les traitements effectués.	26
VII	Taux d'extraction des composés phénoliques de <i>Clematis flammula</i> .	30

# *Sommaire*

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1

## I/ Partie théorique

Généralités sur l'inflammation.....	2
I-1- La goutte.....	2
I-1-1. Définition.....	2
I-1-2. Facteurs de risque de la goutte.....	3
I-2-L'hyperuricémie.....	3
I-2-1. Définition.....	3
I-2-2. L'hyperuricémie et l'acide urique.....	3
I-2-3. Traitement de l'hyperuricémie.....	5
I-3-La xanthine oxydoréductase.....	5
I-3-1. Définition.....	5
I-3-2. Gène de la XOR.....	6
I-3-3. Interconversion XO/XDH.....	6
I-3-4. Différence en XO et XDH.....	7
I-3-5. Localisation de la XOR.....	8
I-3-6. Role de la XOR.....	10
I-3-7. Inhibiteurs de la XOR.....	12
I-4-Les plantes médicinales.....	14

I-5-Généralités sur les polyphénols.....	14
I-5-1. Biosynthèse des composés phénoliques.....	16
I-5-2. Classification des composés phénoliques.....	16

## II/ Partie pratique

II-1. Matériel végétal.....	21
II-1-1. Description botanique.....	21
II-1-2. Distribution.....	21
II-1-3. Classification.....	22
II-1-4. Propriétés thérapeutiques.....	22
II-2- Méthodes.....	23
II-2-1. Préparation des extraits de plante.....	23
II-2-2. Expérimentation animale.....	25
II-2-2-1. Choix des animaux.....	25
II-2-2-2. Répartition des souris.....	25
II-2-2-3. Test de la XO et de la XDH.....	28
II-2-2-4. Dosage des protéines.....	29
II-2-2-5. Analyse statistique.....	29
II-3- Résultats et discussion.....	30
II-3-1. Taux d'extraction.....	30
II-3-2. Activité antihyperuricémique et antixanthine oxydoréductase.....	31
II-3-2-1. Tests d'acide urique.....	31
II-3-2-2. Activité inhibitrice sur l'activité XO/XDH au niveau du foie.....	33
II-4- Discussion des résultats.....	36
Conclusion.....	41

Bibliographie.....42

Annexes

# *Introduction*

## Introduction

Les plantes médicinales ont été utilisées, depuis la nuit des temps, dans le traitement des maladies pathologiques y compris les maladies à caractère inflammatoire comme l'hyperuricémie et la goutte. Cette dernière est une pathologie du métabolisme des purines causées par la précipitation de l'urate de sodium au niveau des articulations. Les traitements chimiques actuels de cette maladie sont basés sur l'inhibition de la XO.

La xanthine oxydase (XO) est l'enzyme clé du catabolisme des purines, elle catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine et ensuite en acide urique, avec réduction de l'oxygène et production de peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde.

L'inhibition de la XO peut avoir un double rôle en plus de lutter contre la maladie de la goutte et toutes les pathologies qui lui sont associées, elle peut prévenir le stress oxydant en réduisant les espèces réactives oxygénées produites. L'allopurinol, est l'un des puissants inhibiteurs de la XO et le plus utilisé, néanmoins, ce dernier présente des effets secondaires sur la santé humaine. Pour y remédier, les scientifiques se sont intéressés à de nouveaux composés naturels mieux tolérés par l'organisme. Parmi ces traitements, les substances naturelles d'origine végétale dont les composées phénoliques figurent, vu leur rôle important dans la prévention de divers maladies.

- l'objectif de notre travail est l'étude, *in vivo*, de l'activité anti-hyperuricémique et anti xanthine oxydoréductase de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuille de *Clematis flammula* ; communément appelée « AZENZU »

# *Partie théorique*

L'inflammation ou réaction inflammatoire, est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression, c'est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires, parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation ou par anomalies de régulation du processus inflammatoire (**Mc Rousselet et al., 2005**). L'inflammation articulaire ou maladie de la goutte déclenchée par des microcristaux d'urate monosodique est un exemple de maladie inflammatoire aigue (**Bellamy et al., 1987**).

## **I-1-La goutte**

### **I-1-1. Définition**

La goutte est une maladie métabolique fréquente liée à un désordre du métabolisme des purines et donc, par un taux élevé d'acide urique (**Choi et al., 2008**). L'acide urique est un acide faible qui est présent sous forme d'urate, la forme ionisée à pH physiologique, lorsque les concentrations d'urates augmentent dans les liquides biologiques ; les urates peuvent cristalliser dans les tissus sursaturés, principalement dans et autour des articulations mais aussi dans la peau ou d'autres structures comme les ligaments ou l'os (**Kanavets et al., 2009**).

L'urate est issu du métabolisme hépatique des purines, produit par le métabolisme des purines ingérées (synthèse *de novo*) et par le métabolisme purique endogène (**Fox et Kelley, 1972**). Les propriétés physicochimiques de l'Urate Monosodique (UMS) conduisent à sa précipitation dans les liquides biologiques au-delà d'une concentration d'acide urique supérieure à 68 mg/l (**Kanavets et al., 2009**). La solubilité des urates dépend du pH, de la température, de l'hydratation des tissus et de la concentration en cations (**Kanavets et al., 2009**)

### **I-1-2. Facteurs de risque de la goutte**

De très nombreux facteurs de risque de goutte ont été identifiés chez l'Homme, dans des études épidémiologiques prospectives : facteurs génétiques, facteurs alimentaires, syndrome métaboliques (incluant l'hypertension et l'obésité), insuffisance rénale et

diurétique, mais le facteur de risque le plus important est l'hyperuricémie (**Wijnands et al., 2011**).

## **I-2-L'hyperuricémie**

### **I-2-1. Définition**

L'hyperuricémie est définie par un niveau élevé d'acide urique présent chez 5 à 30% de la population générale (**Kang et al., 2007**). Elle est considérée comme un facteur important dans l'apparition de la goutte et peut être associée au développement de sévères maladies liées au stress oxydant, cancer et maladies cardiovasculaires (**Shahabimadj et al., 2004 ; Strazzullo et Puig, 2007**). L'hyperuricémie est une anomalie biochimique fréquente, sa définition se base sur la limite de solubilité de l'urate dans les liquides corporels et a été définie comme une concentration d'urates supérieure à 420 $\mu$ mol/l (**Mazzali et al., 2002**).

### **I-2-2. L'hyperuricémie et l'acide urique**

Comme cité précédemment, l'hyperuricémie peut être le résultat d'une surproduction d'urates, du fait de causes acquises comme un régime riche en purine, ingestion du fructose, prise d'alcool... (**Choi et al., 2008**). Tout comme elle peut être due à un défaut d'élimination de l'acide urique qui se fait par voie rénale et voie digestive avec un rapport de 2 : 1 (**Puig et al., 1986 ; Rose et Post 2001**) ou à une déficience enzymatique (**Lioté et Bardin, 2007**). Le contrôle de la production de l'acide urique est un point clé dans la prévention de l'hyperuricémie (**Lioté, 2003**).

### **I-2-3. Traitement de l'hyperuricémie**

Il existe des nombreux traitements classés en deux catégories (Tableau I): les traitements non pharmacologiques (**Feig et al., 2008 ; Richette et Bardin, 2010**) et les traitements pharmacologiques(**Campion et al., 1987 ; Richette, 2011**). Les traitements hypouricémiant ont pour objectif la dissolution des dépôts d'urates pathogènes et de maintenir l'uricémie de façon prolongée en dessous du point de saturation de l'urate de sodium (**Richette, 2011**).

**Tableau I** : Traitements de l'hyperuricémie.

Traitement	Détails	
<b>Non pharmacologique</b>	Arrêt d'un médicament	Rediscuter sur la légitime de certains médicaments ( <b>Richette, 2011</b> )
	Règles hygiéno-diététiques	Perte du poids et modification des habitudes alimentaires ; en évitant les aliments riches en fructose et purines ( <b>Choi et al., 2005</b> )
<b>pharmacologique</b>	L'allopurinol	Inhibiteur non spécifique de la xanthine oxydase, c'est un hypouricémiant de référence ( <b>Sarawat et al., 2006</b> )
	Le fébuxostat	Inhibiteur sélectif, non purinique de la xanthine oxydase, son métabolisme est essentiellement hépatique ( <b>Becker et al., 2005 ; Schumacher et al., 2008</b> )
	Les uricosuriques	Diminuent l'uricémie en augmentant l'excrétion urinaire de l'acide urique ( <b>Bardin, 2004 ; Hamada et al., 2008</b> )
	L'uricase	Effet hypouricémiant ( <b>Richette et al., 2007</b> ), médicament en cours d'essai pour ces nombreux effets secondaires ( <b>Terkeltaub, 2007</b> )

Des études ont montré que la xanthine oxydoréductase est l'enzyme clé dans le catabolisme des purines, il est donc intéressant de définir cette enzyme ainsi que ses différents rôles (**Pages et al., 1998**).

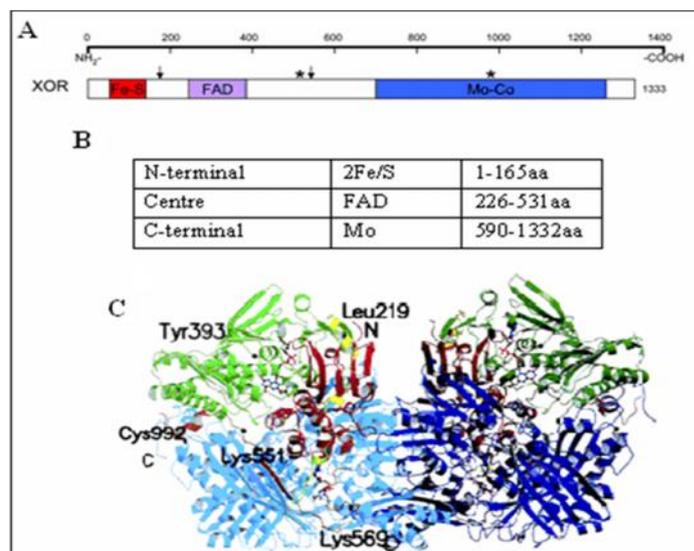
## I-3- La xanthine oxydoréductase

### I-3-1. Définition

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une metallo-flavoprotéine qui catalyse l'hydroxylation oxydative des purines, des pyrimidines, des ptérides, et des substrats d'aldéhyde (Hille et Nishino, 1995). De plus, la XOR est un homodimère d'environ 300kDa, chaque sous unité contient quatre centres redox : un cofacteur du molybdène (MoCo), un cofacteur flavine-adenine dinucleotide (FAD) et deux sites fer-soufre (Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>) (Figure n°1) (Bray, 1975 ; Hille, 1996).

### I-3-2. Le gène de la XOR

Le gène qui code pour la XOR humaine est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 (Martelin, 2004), ce gène est d'une longueur de 60Kb constitué de 36 exons et de 35 introns (Xu *et al.*, 1996). La séquence de la XOR humaine est de 1333 acides aminés, elle présente un degré d'homologie de 91% avec celle de la XOR de la souris et du rat (Martelin, 2004).



**Figure n°1:** Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase (Amaya *et al.*, 1990).

**A :** Structure secondaire de la XOR, les flèches indiquent les sites de protéolyse par la trypsine, et les étoiles indiquent les résidus cystéines modifiés lors de la conversion réversible de la XOR (cys535, cys992).

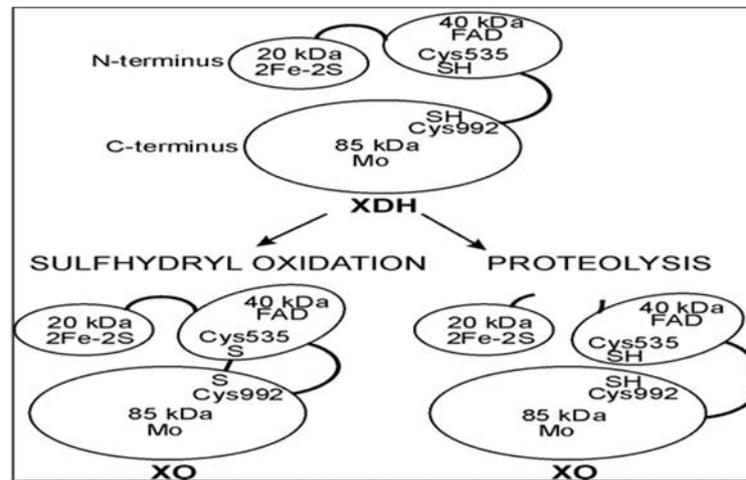
**B :** Les trois domaines des sous unités de la XOR, leurs tailles et cofacteurs associés.

**C :** Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine ; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (clair pour le monomère gauche, et plus foncé pour celui de droite), en rouge les domaines de Fe<sub>2</sub>/S<sub>2</sub>, en vert le domaine du FAD, et en bleu le domaine Mo.

### I-3-3. Inter-conversion XDH/XO

La xanthine oxydoréductase existe sous deux formes inter-convertibles ; elle existe sous forme de déshydrogénase dans les cellules, mais elle est convertie en forme oxydase par modification de la protéine (Figure n°2) (Nishino, 1994). Cette conversion en forme oxydase, peut être réversible ou irréversible :

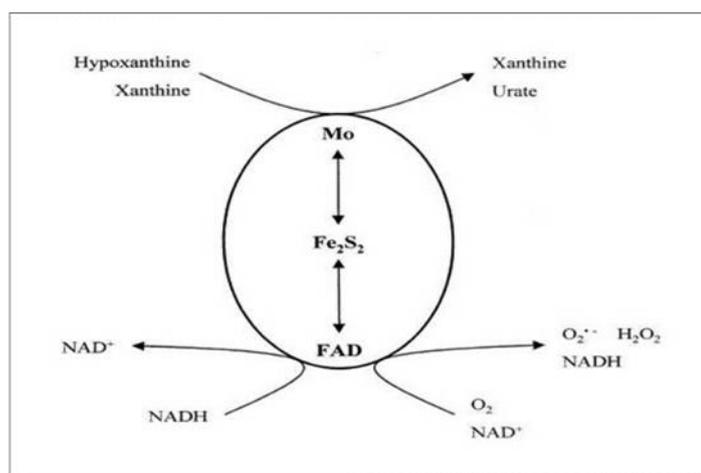
Elle est réversible par oxydation des résidus sulfhydryl (SH) en utilisant des solvants organiques ou par incubation anaérobique, cette conversion est accomplie par modification de cystéine : Cys 535 et Cys 992 (Nishino, 1997 ; Enorth *et al.*, 2000 ; Mc Manaman et Bain, 2002). Soit irréversible par protéolyse en utilisant des enzymes protéolytiques comme la trypsine (Della Corte *et al.*, 1972).



**Figure n°2:** Conversion de la Xanthine déshydrogénase (XDH) en xanthine oxydase (XO) (Martelin, 2004).

### I-3-4. Différences entre XDH et XO

La différence des propriétés entre XDH et XO est principalement due aux différences de réactivité du cofacteur flavine avec ces accepteurs d'électron, la XO utilise l' $O_2$  et la XDH utilise préférentiellement le  $NAD^+$  comme substrat de réduction, le site de liaison NAD est localisé à côté de la flavine, ce dernier étant stable dans la déshydrogénase et instable dans l'oxydase (Figure n°3) (Mc Manaman *et al.*, 1996).



**Figure n°3:** L'oxydation des substrats au niveau des deux sites Mo et FAD de la XOR  
(Harrison, 2002).

### I-3-5. Localisation et distribution de la XOR

La localisation de cette enzyme se fait au moyen de plusieurs méthodes : biochimiques, enzymatiques, histochimiques et immuno-histochimiques. Il a été démontré que la XOR est largement distribuée entre les différentes espèces allant des bactéries à la plantes, à l'être humain (Tableau II) (Parks et Ganger, 1986).

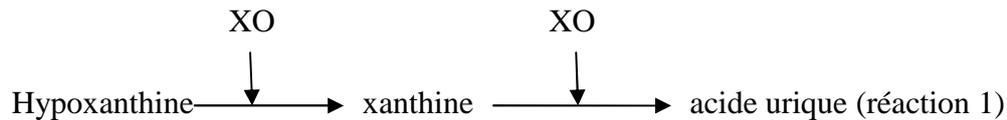
**Tableau II:** Localisation de la XOR dans les tissus humains (Linder *et al.*, 2005)

Tissus	Localisation
<b>Foie</b>	Hépatocytes pré portaux, cellules kuppfer
<b>Jéjunum</b>	Enterocytes, cellules endothéliales des capillaires
<b>Glandes mammaires en non lactation</b>	Quelques ascini dans les conduits terminaux, cellules endothéliales des capillaires et des artérioles
<b>Glandes mammaires en lactation</b>	Les ascini dans les conduits terminaux, dans les cellules des larges conduits, et dans les capillaires et les artérioles
<b>Muscles squelettiques</b>	Cellules endothéliales des capillaires et des vénules
<b>Rein, cœur, cerveau et paumons</b>	Cellules endothéliales des capillaires

### I-3-6. Rôle de la XOR

- **Rôle physiologique**

La XOR est l'enzyme clé du catabolisme des purines (Figure n°4), elle catalyse ainsi deux dernières réactions, en convertissant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (réaction 1) (Page *et al.*, 1998 ;Enorth *et al.*, 2000).



Elle catalyse aussi la réduction du nitrate avec une production d'acide nitrique ( $\text{NO}^\cdot$ ) et ce sous certaines conditions d'anaérobie (Miller *et al.*, 1998), elle joue aussi un rôle important dans la sécrétion du lait chez les mammifères (Kurozaki *et al.*, 1996 ; Vorbach *et al.*, 2002 ).

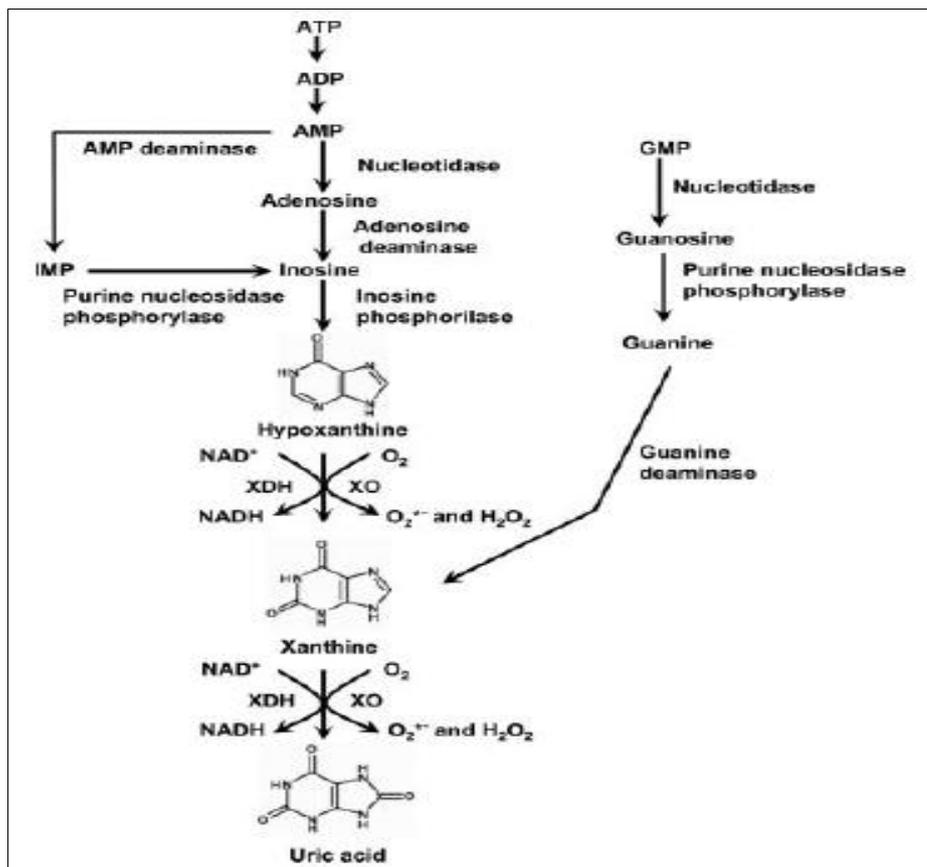
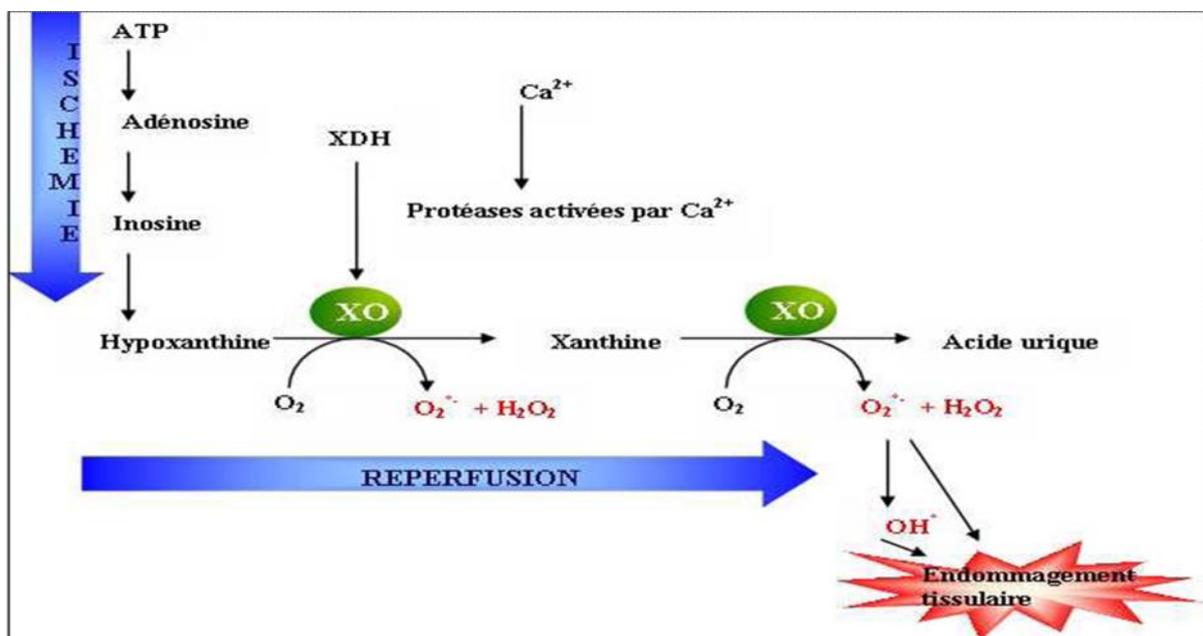


Figure n°4: Catabolisme des purines (Borges *et al.*, 2002).

- **Physiopathologie**

La XOR est une source majeure des radicaux libres dans plusieurs conditions physiopathologiques (Srivastava et Kale, 1999). Ces derniers sont impliqués dans le développement et la complication de différentes maladies : la goutte, la xanthinurie, le vieillissement et le diabète (Parks et Ganger, 1988 ; Kawada, 1992). La XOR joue également un rôle dans la réponse inflammatoire (Harrison, 2002) et un rôle dans l'ischémie-reperfusion (Figure n°5) (Ganger *et al.*, 1981).



**Figure 5:** Mécanisme de génération des EOR (espèces réactives de l'oxygène) par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / reperfusion (Harrison, 2002).

Comme cité précédemment, la XOR catalyse la réaction de transformation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique : la surproduction et/ou la sous excrétion de l'acide urique peut aboutir à l'apparition d'une hyperuricémie (inflammation) comme la goutte (Kang *et al.*, 2000).

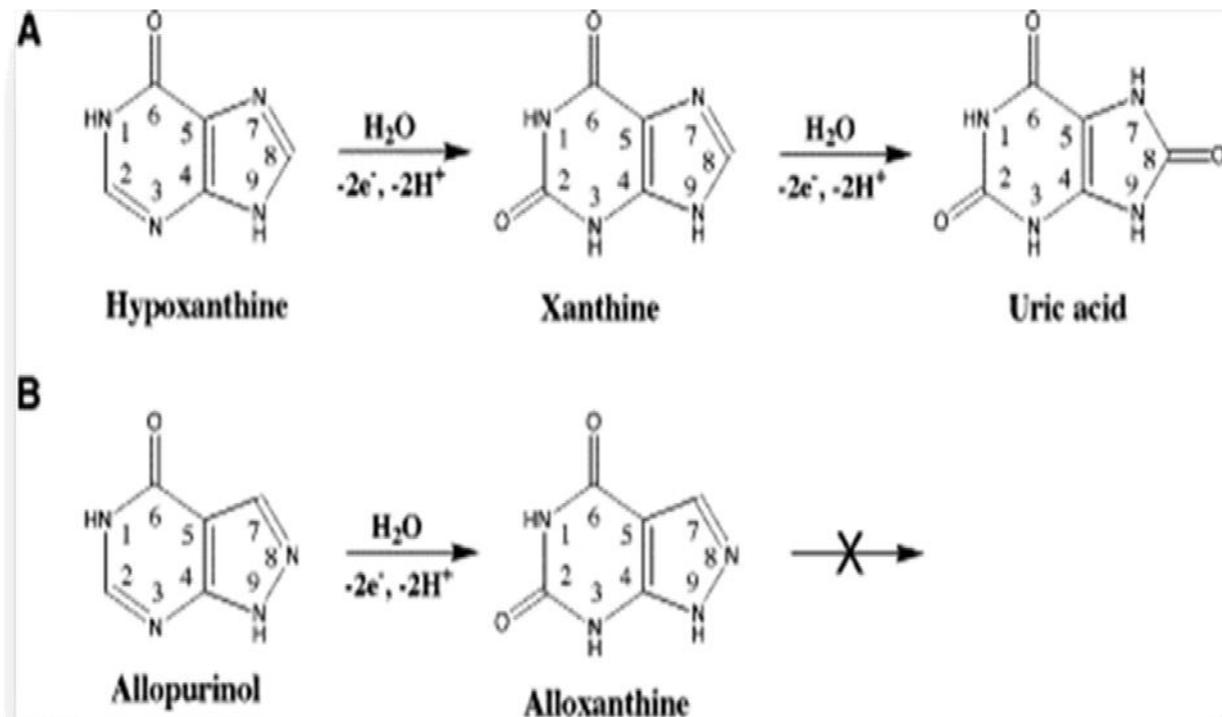
L'une des approches thérapeutiques pour traiter la maladie de la goutte est l'utilisation d'inhibiteurs de la XOR qui bloquent la production d'acide urique (Chang *et al.*, 1993).

### I-3-7. Inhibiteurs de la xanthine oxydase

- **L'allopurinol**

L'allopurinol (1,5-dihydro-4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidin-4-one) est le seul inhibiteur de synthèse utilisé dans des applications cliniques durant ces trois dernières décades, il agit comme un substrat de l'enzyme vu son analogie structurale avec la xanthine et l'hypoxanthine (Figure n°6) et est donc un substrat compétitif de ces dernières, et à de fortes concentrations, agit comme un inhibiteur non compétitif (Owen et Johns, 1999).

La XOR hydroxyle l'allopurinol en alloxanthine (4,6-dihydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine) (Salida, 2000; Borges *et al.*, 2002), qui se lie fortement au site actif, cette forte liaison garde l'atome Mo à un état de valence +4 au lieu de retourner à l'état de valence +6 comme il est constaté lors du cycle aromatique des purines (cycle normal), d'où l'importance de l'action suicide sur la XO (Massey *et al.*, 1970).



**Figure 6:** La réaction catalysée par la XOR (A), l'inhibition par l'allopurinol (B) (Truglio *et al.*, 2002).

- **Le febuxostat**

Le febuxostat ou le 2-(3-cyano-4-[2-méthylpropoxyl]phényl)-4-méthylthiazole-5-acide carboxylique est un inhibiteur sélectif non purinique de la xanthine oxydoréductase, d'un poids moléculaire égal à 316,38, sa formule est  $C_6H_{16}N_2O_3S$  (**Schumacher, 2005**).

D'autres molécules comme l'acide urique (**Radi et al., 1992**), L'arsenite et le cyanure (**Ellis et al., 2000**), le salicylate (**Danny et al., 2002**) certains analogues structuraux comme le BOF-427 (**Okamoto et Nishino, 1995 ; Naito et Nishimura, 2001**), certains co-facteurs comme les ptéridines (**Oetl et Reibnegger, 1999**), certains métaux comme le cuivre  $Ca^{2+}$ , l'argent  $Ag^+$  et le mercure  $Hg^{2+}$  (**Mondal et al., 2000, Sau et al., 2001**) inhibent la XOR mais la plupart ne peuvent être utilisés en médecine pour leurs toxicités et leurs effets secondaires (**Owen et Johns, 1999**). Il est donc intéressant de déterminer des molécules susceptibles de remplacer ces molécules synthétiques avec pas ou peu d'effets indésirables et pour cela découvrir de nouvelles sources de ces composés, soit de nouvelles plantes.

## I-4- Les plantes médicinales

‘A travers des âges, l’Homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L’utilisation thérapeutique extraordinaire des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l’Homme est très ancienne (Tableau III). Bien qu’une grande partie du XX<sup>ème</sup> siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles a conduit à la découverte d’un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006)

**Tableau III** : Quelques plantes à usage médical (Gurib-Fakim, 2006)

Nom de la plante	Figure représentative	Utilisation	Molécules Actives
<i>Catharanthus roseus</i>		Chimiothérapie anticancéreuse, antidiabétique.	Vincristine Vinblastine
<i>Conrodendron tomentosum</i>		Relaxation musculaire, analgésique.	D-Tubocurarine
<i>Harpagophytum procumbens</i>		Rhumatismes, fièvre.	Acide caféique
<i>Piper methysticum</i>		Stimulant, anxiolytique.	Pyrones
<i>Podophyllum peltatum</i>		Chimiothérapie anticancéreuse, laxative.	Lignanes
<i>Prunus africana</i>		Hyperplasie de la prostate, laxative.	Sitostérols

Les plantes médicinales sont essentiellement utilisées sous deux formes à savoir sous forme d'un complexe contenant un large spectre de constituants (infusion, des huiles essentielles et des extraits des teintures) ou pure, chimiquement définie comme principe actif **(Hamburger et Hostettmann, 1991)**

Avec les progrès de la biochimie et l'analyse organique et pharmacologique ainsi que la physiologie végétale, un tri rationnel dans la masse des actions attribuées aux plantes a été entamé pour comprendre certaines activités tributaires aux molécules bioactives présentes dans les végétaux **(Nascimento et al., 2000)**.

La plupart des matrices naturelles sont des molécules biologiquement actives qui constituent la clé de voûte du système interactionnel plantes-environnement et elles sont assez souvent impliquées dans la défense des végétaux, ces composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité structurale possédant un large éventail d'activités biologiques **(Bahorun, 1997)**.

Parmi ces substances actives, les polyphénols qui trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie.

## I-5- Les composés phénoliques

### I-5-1. Généralités

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal, et font partie intégrante de l'alimentation humaine (**Martin, 2002**) ; Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structure plus ou moins complexe (**Bennick, 2002**).

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement : L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyle libres ou engagés dans une autre fonction chimique (**Bennick, 2002**).

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Martin et al., 2002**).

### I-5-2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes (**Martin, 2002**). Lors du processus de biosynthèse des composés aromatiques à partir du glucose, une série de composés intermédiaires tels que la phénylalanine, la tyrosine et l'acide shikimique sont à la base du composé phénolique (**Richter, 1993**).

La biogénèse peut se faire selon deux voies : voie des shikimates et voie des polyacétates (**Guignard, 2000**).

- **Voie des shikimates** : Cette voie conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Figure n°7) (**Martin, 2002**).

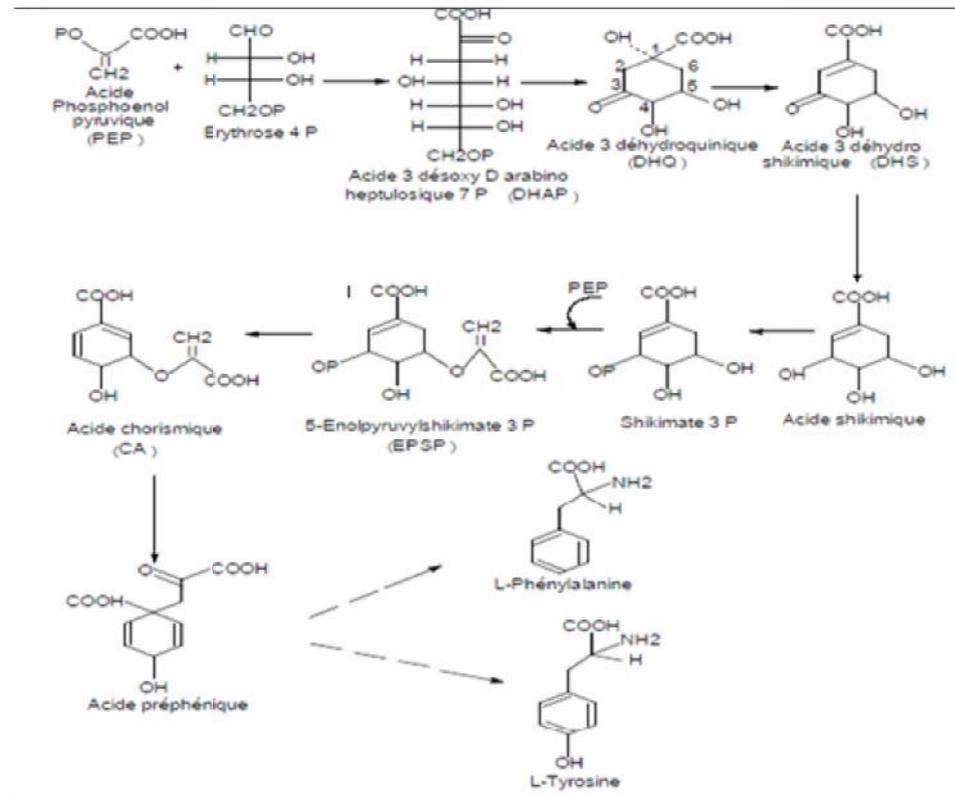


Figure n°7: Voie des shikimates (Bruneton, 1999).

- **Voie de l'acétate malonate :** Cette voie intervient, chez les végétaux supérieurs, dans la synthèse d'un second noyau benzénique par cyclisation des chaînes polyacétoniques (Figure n°8) (Guignard, 2000).

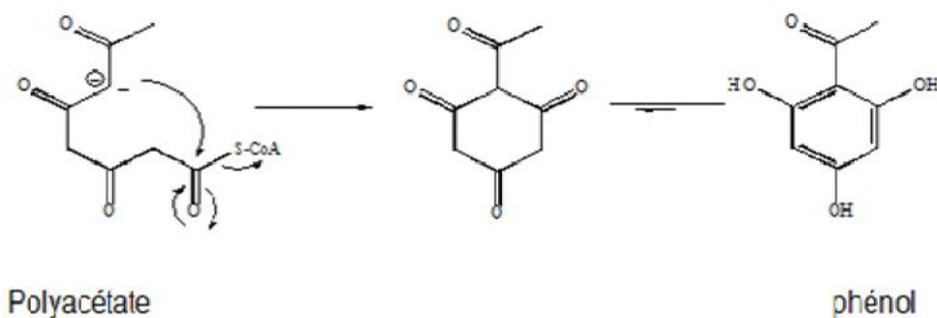


Figure n°8: voie des polyacétates (Bruneton, 1999).

La diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte (Martin, 2002).

### I-5-2. Classification des composés phénoliques

La classification des composés phénoliques diffère selon les auteurs, en effet, plusieurs classifications, basées sur différents critères, ont été proposées, les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes, les plus importantes sont les phénols simples, les flavonoïdes et les tannins (Martin, 2002).

- **Les phénols simples et acides phénoliques**

Le terme « phénol simple » s'applique à un composé organique ayant un cycle aromatique C6 (Bennick, 2002). En phytochimie, cette dénomination est réservée aux acides phénoliques simples (C6), les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) et les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (Bruneton, 1993).

Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque comme l'acide vanillique et l'acide gallique (figure n°9) (Bruneton, 1993).

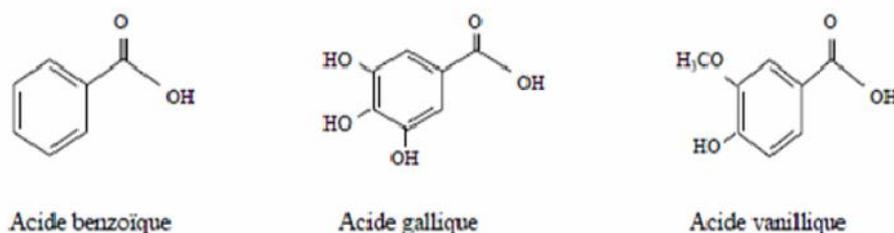
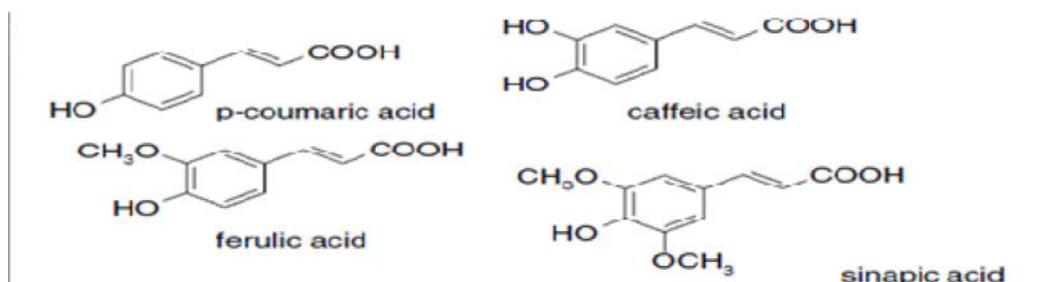


Figure n°9 : Quelques acides phénols benzoïques (Bruneton, 1999).

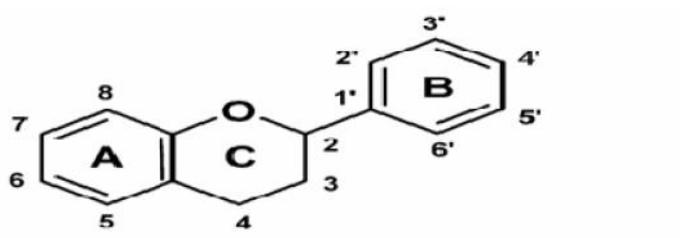
Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large comme l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (figure n°10) (Smadi, 2000)



**Figure n°10** : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique (Balasundram *et al.*, 2005).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels, ils sont considérés comme des pigments quasi-universels des végétaux (Ghestem *et al.*, 2001). Leur structure commune se compose de deux anneaux aromatiques liés par 03 carbones, formant le plus souvent, un noyau hétérocyclique (figure n°11) (Bennick, 2002).



**Figure n°11** : Structure de base des flavonoïdes (Yilmaz et Toledo, 2004)

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, flavanols, flavanones, isoflavones, flavane et anthocyanines (Figure n°12) (Marfak, 2003 ; Skerget *et al.*, 2005).

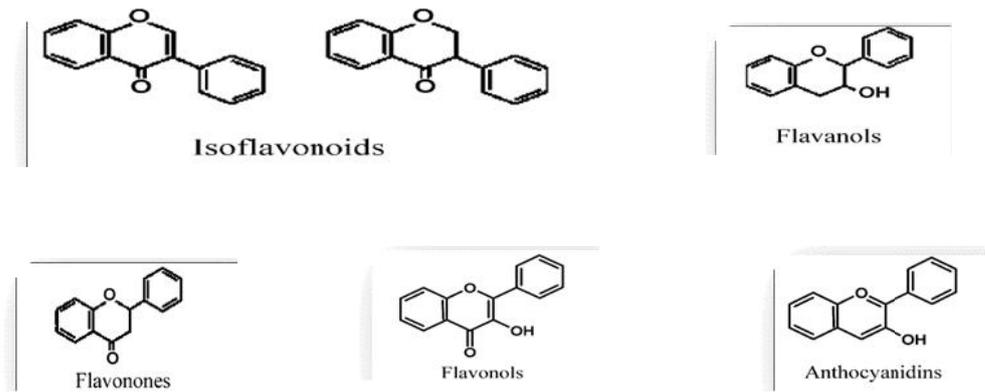


Figure n°12 : Structures de quelques flavonoïdes (Yilmaz et Toledo, 2004)

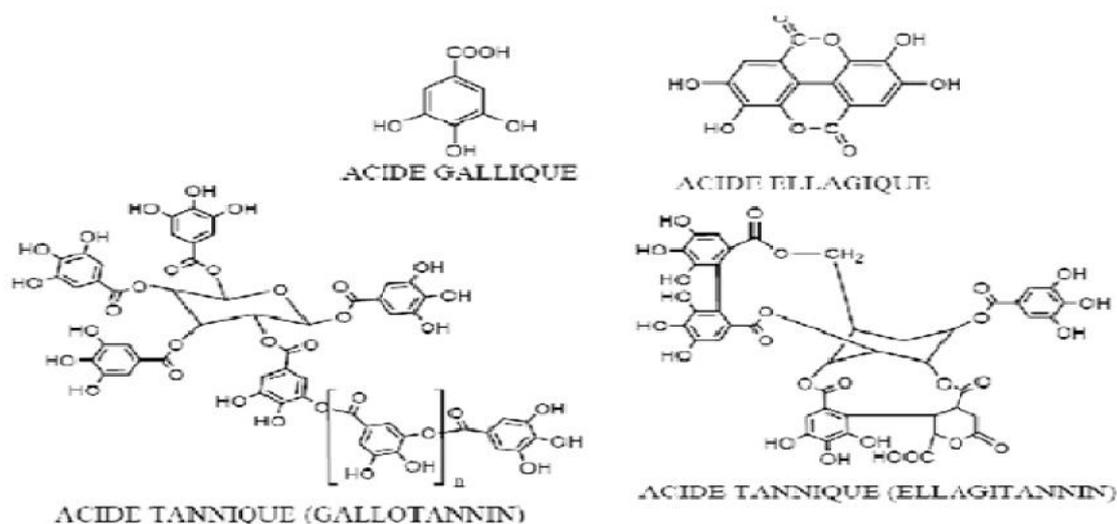
- **Les tannins**

Les tannins sont d'origine végétale et non azoté, ce sont des composés polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la masse moléculaire des tannins est comprise entre 500 et 3000 kDa (Ghestem *et al.*, 2001 ; Atefeibu, 2002). Selon leur structure chimique, les tannins sont classés en deux groupes :

- **Les tannins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique, les tannins hydrolysables, en raison de leur nombreux groupements OH, se dissolvent plus ou moins dans l'eau, en fonction de leur poids moléculaire (Cherynier *et al.*, 1998). Ces tannins sont de deux types : Les tannins galliques, qui sont des esters d'oses (glucose) et d'acide gallique et les tannins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagique (Figure n°13) (Bruneton, 1999 ; Atefeibu, 2002).

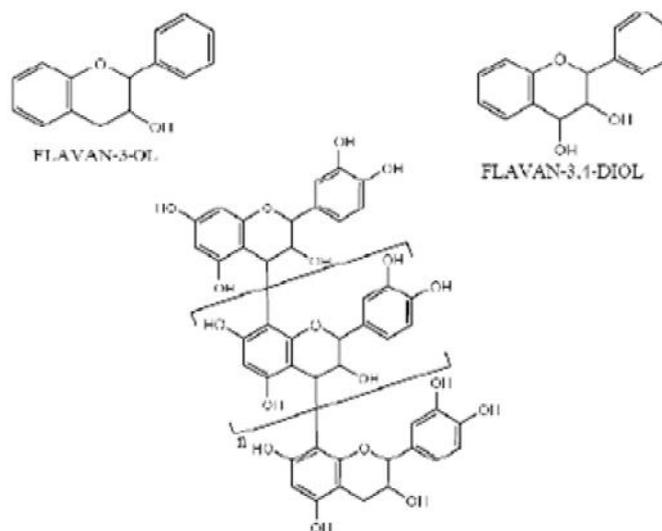
Dans les deux cas, la fraction osidique est esterifiée par plusieurs molécules d'acide ellagique (Guestem *et al.*, 2001)



**Figure n°13** : Structure des tannins hydrolysables (Bruneton , 1999)

### ➤ Les tannins condensés

Les tannins condensés, appelés également proanthocyanidines (Reed, 1995), sont largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruits, légumes, boissons...) (Peronny, 2005). Selon le degré de polymérisation de ces composés, on distingue les monomères, les dimères et les polymères (figure n°14).



**Figure n°14:** Structure des tannins condensés (Bruneton, 1999)

Les composés phénoliques possèdent diverses propriétés biologiques, les plus importantes sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau IV :** Activités biologiques des composés phénoliques.

composé	Propriétés	Références
<b>Acides phénoliques</b>	Antibactériens, antioxydants	<b>Hannebelle, 2004</b>
<b>Coumarines</b>	Vasoprotectrices, anti œdémateuses	<b>Mabrey et Ulubelen, 1980</b>
<b>Anthocyanes</b>	Protection des veines et capillaires	<b>Bruneton, 1993</b>
<b>Tannins</b>	Antioxydants	<b>Bennick, 2002</b>

L'objectif de cette étude est de déterminer l'activité antihyperuricémique et antixanthine oxydoréductase de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula*.

# *Partie pratique*

*Matériels et  
méthodes*

## II-Matériels et méthodes

### II-1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur une plante connue pour ses effets thérapeutiques dans la médecine traditionnelle, il s'agit de *Clematis flammula* (figure n°15).



**Figure n°15:** Photo de *Clematis flammula*

#### II-1.1. Description botanique

*Clematis flammula* appelée communément clématite brulante est une plante ligneuse, grimpante qui conserve tout l'hiver son fruit (**Baba Aissa, 2000**). Cette plante a une tige sarmenteuse ; des feuilles bipennées à 3-7 folioles assez petites ovales ou lancéolées, entières ou rarement trilobées à saveur brulante ; des fleurs blanches odorantes en panicules lâche, des sépales pubescents en dehors, des glabres en dedans ; des pétales nuls ; des anthères grandes égalant le filet ; des réceptacles glabres ; et des carpelles très comprimés (**Bock, 2013**).

#### II-1-2. Distribution

Cette plante est retrouvée dans les régions méditerranéennes (**Bock, 2013**) plus précisément les régions tempérées de l'hémisphère nord. Ce sont des herbes pérennes ou annuelles généralement terrestre mais peuvent être ligneuses sarmenteuses ou bien aquatiques (**Baba Aissa, 2000**).

### II-1-3. Classification

*Clematis flammula* est une espèce du genre *Clematis* appartenant à la famille des Ranunculacées, dont la classification est représentée dans le tableau suivant :

**Tableau V:** Classification de *Clematis flammula*.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Ranunculales
<b>Famille</b>	Ranunculaceae
<b>Genre</b>	<i>Clematis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Clematis flammula</i>
<b>Nom commun</b>	Clématite brulante

### II-1-4. Propriétés thérapeutiques

Selon de nombreux auteurs, *Clematis flammula* est utilisée à de nombreuses fins thérapeutiques, les feuilles sont utilisées pour traiter l'arthrite et les brûlures superficielles (Atmani et al., 2009) ; le genre *Clematis* est aussi utilisé comme diurétique, diaphorétique, stimulant, rubéfiant et analgésique. Cette plante sert aussi à soigner en application externe les furoncles et les mauvaises plaies et en usage interne la fièvre et la goutte (Chawla et al., 2012).

## II-2- Méthodes

### II-2-1. Préparation des extraits de plante

- **Récolte de la plante**

*Clematis flammula* a été récoltée dans la région d'Azrou N'Bechar d'amizour, wilaya de Bejaia pendant la période Juillet – Aout 2012. La récolte s'est faite dans un endroit loin de la pollution afin d'écartier toute modification dans la composition chimique de la plante.

- **Séchage**

Sur la base de l'utilisation traditionnelle locale, *Clematis flammula* a été choisie pour la réalisation de notre étude dont nous avons utilisé uniquement les feuilles. Après la récolte, le matériel végétal a été séché à une température ambiante à l'abri de la lumière puis, afin d'éliminer toute trace d'humidité.

- **Broyage**

Une fois séché, le matériel végétal a été réduit en poudre par l'utilisation d'un broyeur électrique de granulométrie plus ou moins fine.

- **Tamissage**

Après le broyage, le broyat a fait l'objet d'un raffinement par le biais d'un tamiseur afin d'avoir à la fin, une poudre fine à particules de granulométrie homogène équivalente à 63µm, cette dernière a été utilisée pour l'extraction des composés phénoliques.

- **Extraction :**

L'extraction a été entreprise selon le protocole de Chiang et ses collaborateurs (1994) avec quelques modifications (Atmani *et al.*, 2009). Le principe général de cette méthode est basé sur une extraction sélective à plusieurs solvants de différentes polarités (Figure n°16).

180g de la poudre de feuilles de *Clematis flammula* ont été macérés dans de l'éthanol (95%) avec un rapport 1 : 4 (1g de poudre dans 4ml d'éthanol). Après 24h d'agitation et 16-18h de décantation, le surnageant représentant l'extrait éthanolique a été versé dans des

crystallisoirs. Ces derniers ont été soumis à un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière jusqu'à stabilisation complète du poids.

La seconde étape de l'extraction correspond à la macération de l'extrait éthanolique dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau selon un rapport **3 : 1**. Après macération et décantation, deux phases non miscibles ont été récupérées ; une phase aqueuse et une phase organique d'acétate d'éthyle qui ont été séparées et séchées suivant les conditions citées ci-dessus. Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

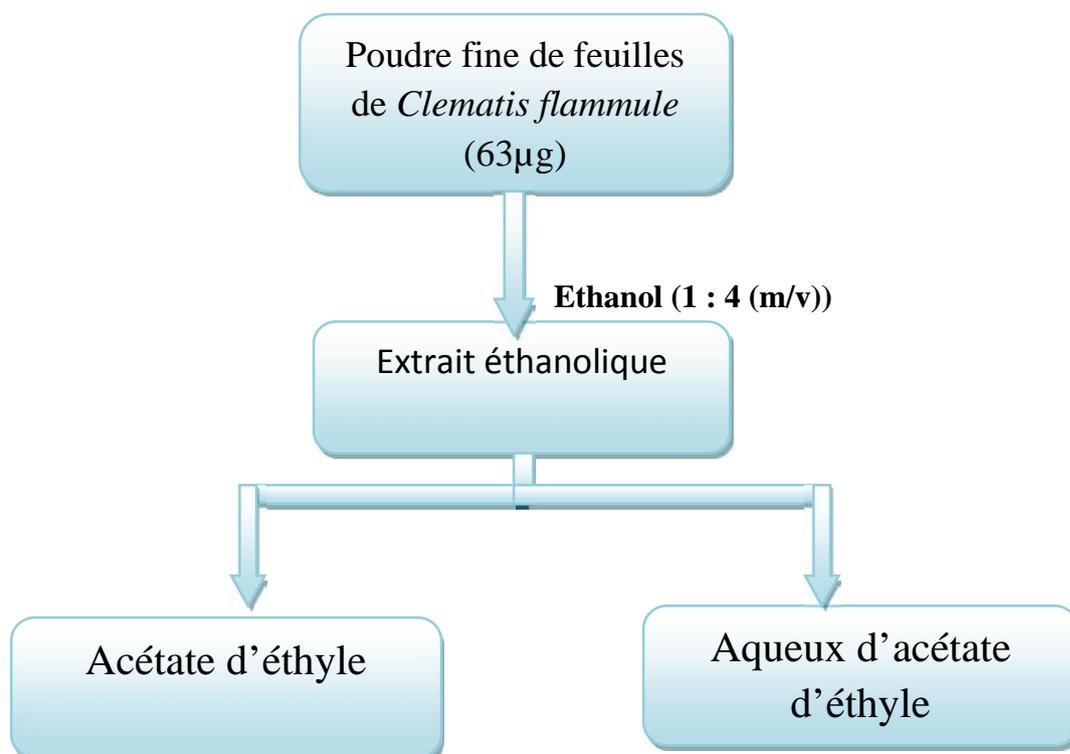
$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/P_i] * 100$$

Avec :

$P_1$  : Poids de l'extrait après évaporation (g)

$P_0$  : Poids initial du cristallisoir ou de la boîte de pétri (g)

$P_i$  : Poids de l'échantillon initial (poudre ou extrait sec de la phase précédente) (g)



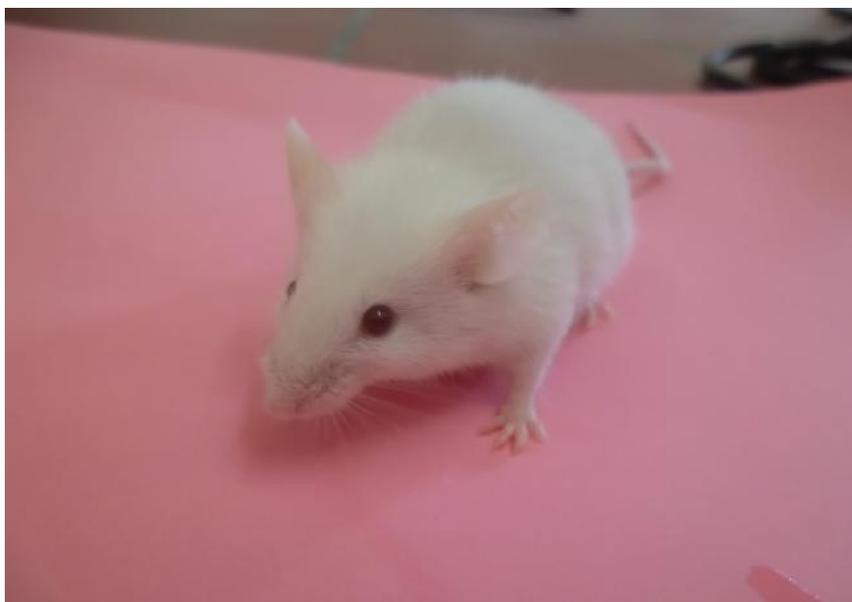
**Figure n°16** : Procédure d'extraction à partir des feuilles de *Clematis flammula*.

## **II-2-2. Expérimentation animale**

### **II-2-2-1. Choix des animaux**

Ce travail a été réalisé sur des souris adultes males de variété albinos de l'institut Louis Pasteur d'Alger (figure n°17). Le poids de ces souris vari entre 18 à 22g et sont regroupés dans des cages et répartis en lots selon le traitement à subir. Ces souris ont un accès libre à l'eau et à la nourriture et sont soumises à des conditions d'élevage de température ambiante de (23 °C à 25°C) et à un rythme d'éclairage lumière/ obscurité 12h/12h.

L'élevage et les différents tests effectués ont été réalisés au sein de laboratoire d'expérimentation animale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

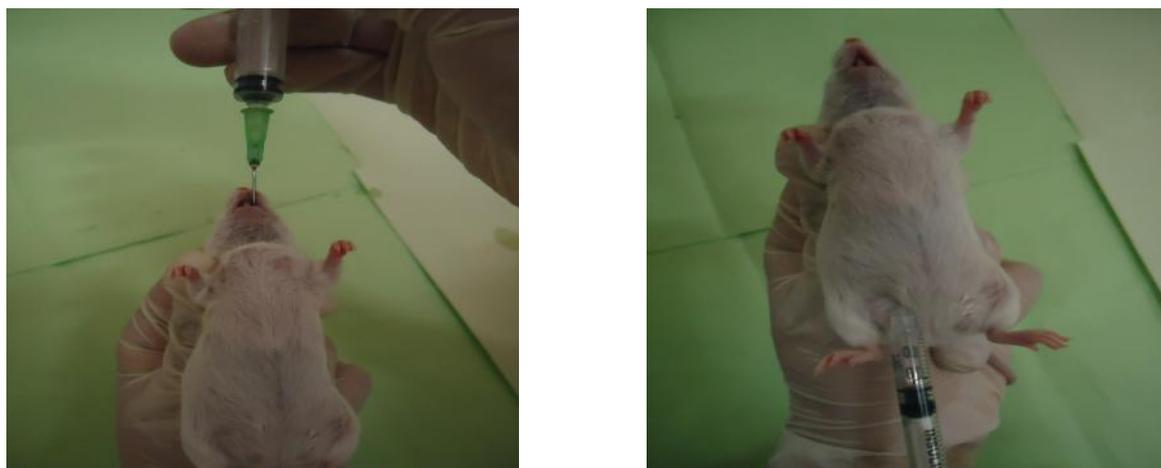


**Figure n°17:** Image d'une souris albinos.

### **II-2-2-2. Répartition des souris**

Pour la réalisation de notre étude, un total de 60 souris males a été sélectionné et répartis dans des lots de 6 souris chacun. Deux groupes majeurs ont été établis : un groupe normal et un groupe hyperuricémique.

Les différents traitements seront entrepris soit par voie orale (intra-gastrique) (figure18-A) soit par voie intra-péritonéale (IP) (figure18-B).



**Figure n°18** : traitement par voie intra-gastrique (A) et par voie intra-péritonéale (B).

Le tableau ci-dessous résume les différents traitements exercés.

**Tableau VI** : Répartition des lots selon les traitements effectués.

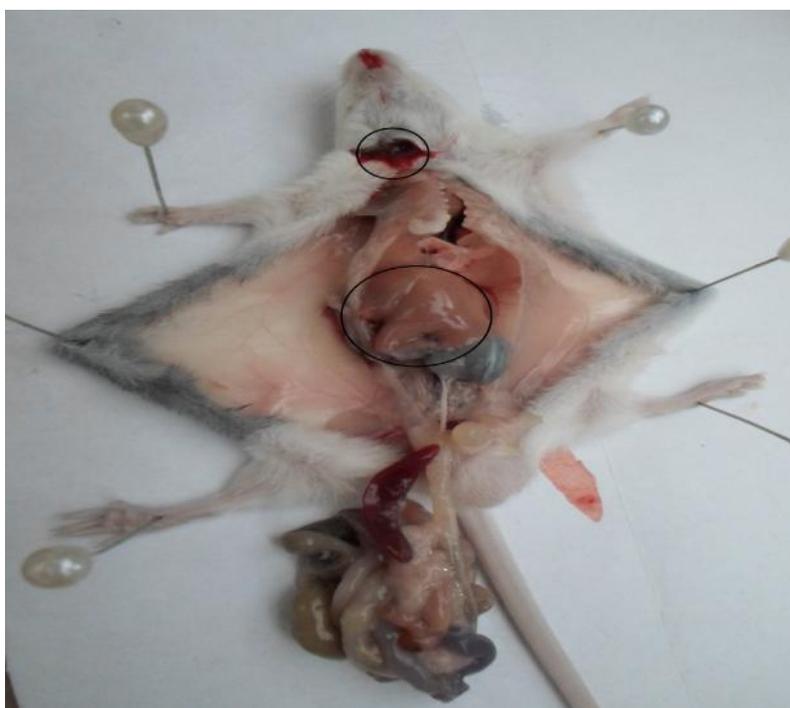
N	Lot	Traitements
1	Normal (eau+CMC)	eau par IP + gavage par CMC
2	Normal + Allopurinol (10mg/kg)	eau par IP + gavage par l'allopurinol (10mg/kg)
3	Normal + Extrait100 mg/kg	eau par IP + gavage par l'extrait 100 mg/kg
4	Normal + Extrait 200 mg/kg	eau par IP + gavage par l'extrait 200 mg/kg
5	Normal + Extrait400 mg/kg	eau par IP + gavage par l'extrait 400 mg/kg
6	Hyperuricémique (oxonate +CMC)	Oxonate par IP + gavage du CMC
7	Hyperuricémique+Allopurinol (10mg/kg)	Oxonate par IP + gavage par l'allopurinol (10mg/kg)
8	Hyperuricémique + Extrait 100mg/kg	Oxonate par IP + gavage par l'extrait 100 mg/kg
9	Hyperuricémique + Extrait200 mg/kg	Oxonate par IP + gavage par l'extrait 200 mg/kg
10	Hyperuricémique + Extrait400 mg/kg	Oxonate par IP + gavage par l'extrait 400 mg/kg

### II-2-2-3. Evaluation *in vivo* de l'activité antihyperuricémique

Les souris ont été réparties en 10 lots de 6 souris chacun. Le test de l'évaluation *in vivo* de l'activité antihyperuricémique a été réalisé en 3 jours. Après une heure de l'administration finale du 3<sup>ème</sup> jour, les souris ont été anesthésiées par du chloroforme; le sang de chaque souris a été récupéré, centrifugé pendant 10 min à 5000g afin de récupérer les sérums. Ces derniers ont été conservés à -80°C pour une utilisation lors de test du dosage d'acide urique sérique.

immédiatement, toutes les souris ont été disséquées (Figure n°18), prélevant les foies, qui ont été rincés et pesés dans du KCl froid (0.15 M), puis broyés en ajoutant un volume adéquat à raison de 10% (p/v) de solution tampon+ EDTA(0.05M) à chaque homogénat de foie.

Les homogénats ont été centrifugés pendant 10min à 5000g, le surnageant de chaque tube a été récupéré tout en évitant la partie lipidique ; une seconde centrifugation pendant 10 min à 5000g a été entreprise afin de récupérer des surnageants (puis seront mis à -80°C). Ces homogénats seront utilisés lors des tests d'activités de la XO et la XDH (**Raju *et al.*, 2012**)



**Figure 19** : Image d'une souris disséquée

### II-2-2-3. Dosage d'acide urique

Le taux d'acide urique sérique de chaque souris a été déterminé en utilisant un kit commercial d'acide urique de marque Human de diagnostics worldwid.

L'acide urique est déterminé par une réaction avec l'uricase. En présence de la peroxydase, l'indicateur violet rouge quinoneimine se développe à partir de l' $H_2O_2$  formé, de l'acide 3,5 dichloro-2hydroxybenzène sulfonique (DCHBS) et de 4-aminophénazone (PAP) (Barham et Trinder, 1972 ; Fossah *et al.*, 1980) Selon les ( réaction 1 et 2) :



La concentration d'acide urique (mg/dl) est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{concentration de l'acide urique} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance du standard}} * 8$$

### II-2-2-4. Test de l'activité de la xanthine oxydase (XO) et la xanthine oxydoréductase (XDH)

Le test XO et XDH a été réalisé selon la méthode de Raju *et al.* (2012) qui consiste à ajouter **3.5mL** de la solution tampon phosphate (0.05M) (PH=7.5) avec **0.5mL** de l'homogénat du foie et **1mL** d'oxonate (1mM). La réaction a été initiée suite à une pré-incubation de **15 min** à **37°C**. En suite, **1mL** de xanthine (250 $\mu$ M) a été ajouté à la solution précédente et une incubation de **10 min** à température ambiante a été faite. A la fin, la réaction est arrêtée par l'ajout de **0.5mL** d'HCl (0.58M) suivie d'une centrifugation pendant **5min** à **5000g**. Alors que la procédure expérimentale de détermination de l'activité de XDH est la même que la précédente, avec quelques différences, qui consiste à ajouter **0.5 mL** de NAD<sup>+</sup> (200 $\mu$ M) au milieu réactionnel. Le test a été réalisé sur l'ensemble des homogénats et une lecture d'absorbance à **290 nm** contre un blanc (Tampon + EDTA) a été effectuée. Les activités de XO et XDH ont été exprimées en nM d'acide urique formé/ min/ mg de protéine (Raju *et al.*, 2012).

#### **II-2-2-5. Dosage des protéines**

La mesure de la concentration des protéines dans la solution a été réalisée par un dosage spectroscopique suivant la méthode de **Bradford et al. (1976)**. Ces derniers ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et la formation de ce complexe induit le passage de la coloration rouge au bleu.

Ce test a été effectué sur l'ensemble des homogénats, et la lecture des absorbances à été faite à **595 nm** contre un blanc. Les concentrations en protéines ont été déterminées en utilisant une courbe d'étalonnage (voir annexes) établie en utilisant des concentrations croissantes en sérum d'albumine bovin (BSA), et les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de protéines

#### **II-2-2-6. Analyse statistique :**

Les résultats des tests *in vivo* ont été représentés par leur moyenne  $\pm$  SEM. Les données expérimentales ont été analysées avec le logiciel Graph Pad Prism5.30. L'analyse à un facteur a été utilisée suivit par le test Dunnett. Les valeurs différentes P 0.05 ont été considéré comme statistiquement significatives.

# *Résultats et discussion*

## II-3- Résultats et discussion

### III-3-1. Taux d'extraction

Le séchage des feuilles de *Clematis flammula*, à une température ambiante, loin de l'humidité a pour but d'éliminer toute trace d'eau afin d'éviter la dégradation et la détérioration des composés phénoliques suite à leur oxydation (**Macheix et al., 2006**).

L'extraction des composés phénoliques est une étape très importante puisqu'elle détermine la teneur en composés actifs, leur quantité et leur qualité, ce qui permet d'évaluer les propriétés et les activités pharmacologiques de la plante étudiée (**Cowan, 1999**).

Il est à noter que l'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques dépend de plusieurs facteurs qui influent sur les résultats comme : la nature et le volume du solvant, la granulométrie des particules, la méthode d'extraction, la température... etc (**Escribano-Bailon et Santtos-Buelga, 2003 ; Levizou et al., 2004**).

L'extraction à partir de feuilles de *Clematis flammula* a été réalisée selon le protocole de **Chiang et al. (1994) in Atmani et al. (2009)** ; basée sur l'utilisation des solvants de différente polarité à savoir l'éthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau, permettant d'extraire le maximum de diverses classes de composés phénoliques (**Cowan, 1999**). L'éthanol est considéré comme un solvant par excellence grâce à sa polarité comparativement au méthanol ayant un effet méthanolyse qui peut perturber la teneur des extraits en composés phénoliques (**Bruneton, 1999**).

Les taux d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Clematis flammula* obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VII** : Taux d'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Clematis flammula*.

Solvant	Ethanol	Ethyle acétate	Aqueux d'éthyle acétate
<b>Taux d'extraction</b>	11.30%	18.74%	39.44%

D'après le tableau précédant, on note que le taux d'extraction diffère d'une étape à une autre selon le solvant utilisé. En effet, le taux d'extraction de la première phase d'extraction obtenu suite à l'utilisation de l'éthanol a été de 11.30%.

Concernant, de la deuxième étape c'est au niveau de la phase aqueuse que il a été enregistré le taux le plus élevé avec 39.44% au coté de d'une valeur de 18.74% notée par la phase organique, suggérant que les composés de cette plante sont riches en groupement polaires.

L'étude de **Atmani et al. (2009)** ont rapporté des taux d'extraction variables, sachant qu'ils ont effectué la même méthodologie d'extraction sur *Clematis flammula* en utilisant différents solvants : l'extrait éthanolique à 20.3%, l'acétate d'éthyle à 3.5% et 6.7 pour l'aqueux d'acétate d'éthyle. Il est a noté que le protocole d'extraction est le même, la granulométrie est équivalente donc ces différences dans les résultats sont probablement dues à la différence des plantes et au changement des saisons.

### **II-3-2. Activité antihyperuricémique et antixanthine oxydoréductase des extraits de *Clematis flammula* :**

La goutte est une maladie métabolique fréquente, liée à un désordre du métabolisme des purines. C'est la conséquence d'une hyper-uricémie prolongée qui peut être secondaire soit à un excès de production, soit à un défaut d'élimination d'acide urique (**Bardin, 2004**).

Dans ce présent travail, *Clematis flammula* ; une plante appartenant à la famille des Ranunculacées, connue pour ses effets pharmacologiques importants a fait l'objet d'une étude dans le cadre du traitement et de la prévention de l'hyper-uricémie et de l'inhibition de l'activité de la XO/XDH.

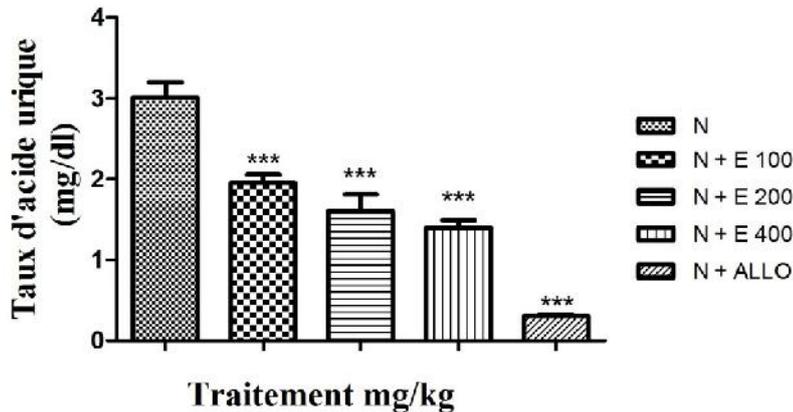
#### **II-3-2-1. Tests d'acide urique**

Le point clé de la prévention de l'hyper-uricémie est le contrôle du niveau d'acide urique dans le sang (**Lin et al., 2000**), pour faire les différents groupes de souris ont été traités par différents composés selon le groupe auxquels elles appartiennent.

Le tableau présenté ci-dessous montre les taux d'acide urique obtenus suite aux tests biochimiques réalisés sur les sérums sanguins des souris normales (groupe Contrôle) et les souris hyper-uricémiques (groupe tests).

➤ **Activité hypouricémique chez les souris normales :**

La figure ci-dessous illustre les taux d'acide urique dans les sérums normaux.



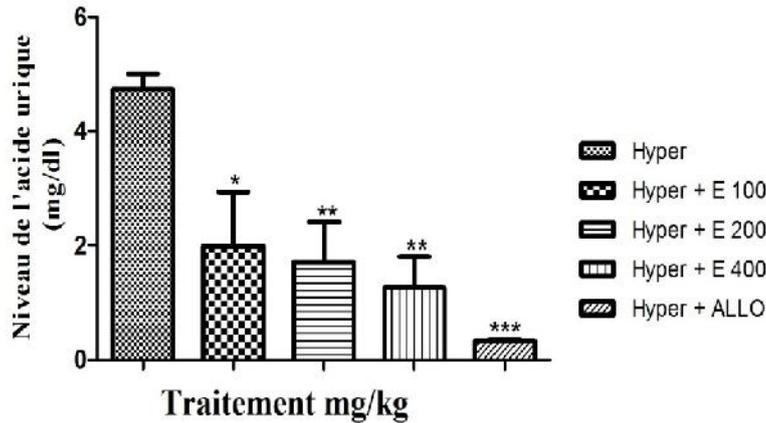
**Figure n°20 :** Taux d'acide urique chez les souris normales.

N : souris normales (eau/CMC), N+E100 : Normal+extrait100, N+E200 : normal+extrait, N+E400 : Normal+Extrait 400, N+ ALLO : Normal+ allopurinol. Les résultats sont représentés en moyenne±SEM Avec : \* : (P 0.05), \*\* : (P 0.01), \*\*\* : (P 0.001)

Le dosage de l'acide urique chez les souris véhicule a révélé une valeur de  $3.01 \pm 0.19$  mg/dl. Alors qu'une diminution du taux d'acide urique a été notée chez les souris normales qui ont été traitées par voie orale avec les extraits aqueux d'acétate éthylique de *Clematis flammula* à différentes doses. Il est important de noter que cette diminution est très prononcée (P 0.001) au niveau des doses 100, 200 et 400 mg/kg, comparativement au groupe de souris normales.

➤ **Activité hypo-uricémiant des extraits de *Clematis flammula* sur les souris hyper-uricémique :**

La figure ci-dessous représente le taux d'acide urique des souris traitées par de l'Oxonate de potassium par voie intra-péritonéale puis traitées par les extraits ou de l'allopurinol.



**Figure n°21 :** Taux d'acide urique sérique chez les souris hyper-uricémiques.

Hyper : souris hyperuricémiques (oxonate/CMC), Hyper+E100 : Hyperuricémique+Extrait100, Hyper+E200 : Hyperuricémique+Extrait200, Hyper+E400 : Hyperuricémique+Extrait 400 , Hyper+ ALLO : Hyperuricémique+ allopurinol. Les résultats sont représentés en moyenne±SEM Avec : \* : (P 0.05), \*\* : (P 0.01), \*\*\* : (P 0.001)

Après 3 jours d'administration de l'oxonate de potassium par voie intra-péritonéale, le taux de l'acide urique chez les souris a atteint  $4.73 \pm 0.18$  mg/dl. Cela est dû à une inhibition de l'uricase responsable de la dégradation de l'acide urique induite par l'oxonate de potassium.

Cependant le taux d'acide urique chez les souris hyper-uricémiques traitées par le gavage avec les extraits aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula* à différentes doses 100, 200 et 400 mg/kg a été de  $1.99 \pm 0.85$ ,  $1.71 \pm 0.70$  et  $1.26 \pm 0.55$  respectivement, marquant une baisse de manière significative pour l'extrait 100 mg/kg (P 0.05) et très significative pour les extraits à concentration 200 et 400 mg/kg (P 0.001).

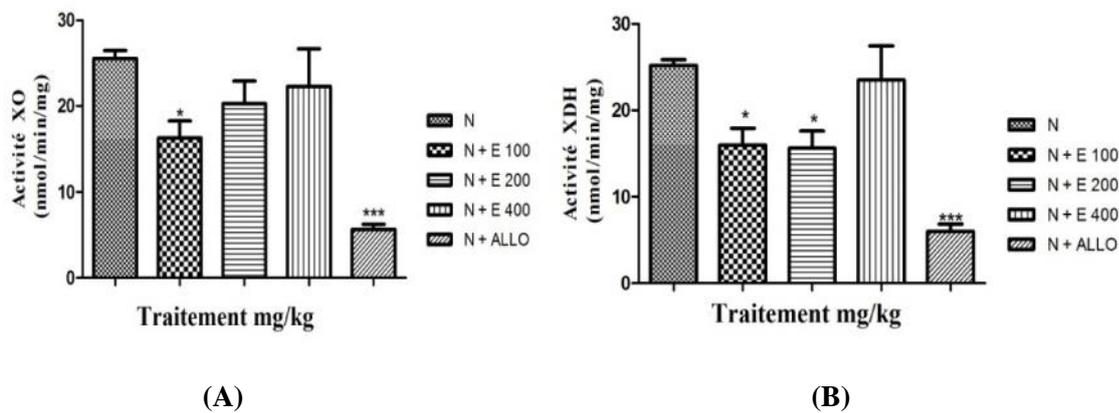
Il est aussi à noter que le traitement des souris ; qu'elles soient normales ou hyper-uricémiques par l'allopurinol à une dose 10 mg/kg, comme molécule de référence, a également baissée de façon très significative (P 0.001). Le taux d'acide urique dans le sérum sanguins à des taux de  $0.30 \pm 0.02$  et  $0.33 \pm 0.02$  respectivement.

### III-3-2-2. Activité inhibitrice des extraits de *Clematis flammula* sur l'activité de XO/XDH au niveau du foie :

Afin de mieux cerner les propriétés antihyperuricémiques des extraits aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula* ; des essais *in vivo* sur les homogénats des souris visant l'activité XO/XDH ont été effectués. Les différentes activités et les taux d'inhibition XO/XDH sont illustrés dans le tableau suivant :

➤ **Activité de la XO/XDH chez les souris normales**

Comme cité précédemment, la XOR joue un rôle essentiel dans l'apparition de l'hyper-uricémie et constitue le point clé de sa résolution; les résultats des tests effectués sont présentés ci-dessous :



**Figure n° 22 :** Activité de XO (A) /XDH (B) chez les souris normales.

N : souris normales (eau/CMC), N+E100 : Normal+extrait100, N+E200 : normal+extrait, N+E400 : Normal+Extrait 400, N+ ALLO : Normal+ allopurinol. Les résultats sont représentés en moyenne±SEM Avec : \* : (P 0.05), \*\* : (P 0.01), \*\*\* : (P 0.001)

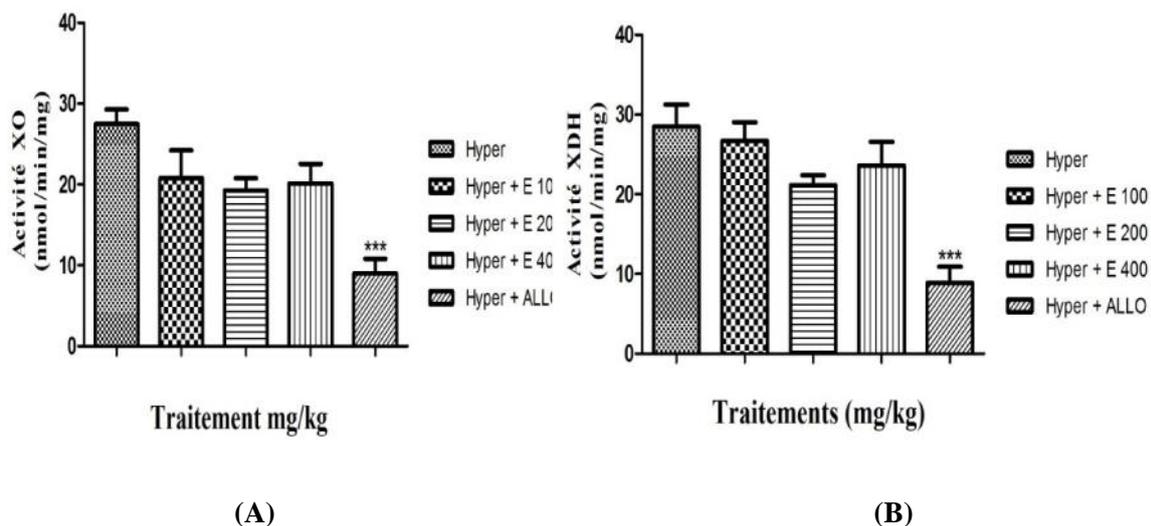
L'analyse statistique a révélé une activité inhibitrice significative ( $p < 0.05$ ) de la xanthine oxydases XO seulement suite au traitement des souris normales par l'extrait l'aqueux d'acétate d'éthyle à 100 mg/kg avec  $16.30 \pm 1.96$  nmol/min/mg de protéines, soit une inhibition de 36,17%. Tandis que les taux d'inhibition de cette enzyme sont non significatifs à 200 et 400 mg/kg (20.55 et 12,76%, respectivement).

Concernant, l'activité de l'inhibition de la XDH, une différence significative a été notée à des doses testées notamment à 100 mg/kg mais aussi à 200 mg/kg avec des valeurs respectives de  $15.98 \pm 1.95$  et de  $15.62 \pm 1.99$  nmol/min/mg de protéines. A 400 mg/kg de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle  $23.52 \pm 3.93$  nmol/min/mg de protéines de l'activité de cette enzyme a été enregistrée, après trois jours d'administration par voie intra-gastrique.

Après traitement des souris normales durant trois jours, l'allopurinol inhibe d'une manière très significative ( $p < 0.001$ ) chacune de la XO et XDH avec des taux d'inhibition de 77.83% et 76.22% respectivement, démontrant ainsi qu'il est plus efficace que les extraits de *Clematis flammula* dans l'inhibition de la XO/XDH.

➤ **Activités de la XO/XDH chez les souris hyper-uricémiques :**

Les figures ci-dessous montrent l'activité XO/XDH des souris hyper-uricémiques traitées par l'allopurinol et les extraits de plante.



**Figure N°23 :** Activité XO (A)/XDH (B) chez les souris traitées par l'Oxonate de potassium.

Hyper : souris hyperuricémiques (oxonate/CMC), Hyper+E100 : Hyperuricémique+Extrait100, Hyper+E200 : Hyperuricémique+Extrait200, Hyper+E400 : Hyperuricémique+Extrait 400 , Hyper+ ALLO : Hyperuricémique+ allopurinol. Les résultats sont représentés en moyenne±SEM Avec : \* : (P 0.05), \*\* : (P 0.01), \*\*\* : (P 0.001)

Le traitement par l'inhibiteur de l'uricase ; oxonate de potassium à une dose de 250 mg/kg provoque l'hyperuricémie chez le model animal en question, enregistrant des valeurs de  $27.48 \pm 1.79$  et  $28.50 \pm 2.74$  U/mg de protéines pour XO et XDH respectivement.

Suite aux traitements effectués sur ces souris, l'activité XO a été de  $20.77 \pm 3.43$  pour l'extrait à 100mg/kg,  $19.29 \pm 1.48$  pour l'extrait 200mg/kg et de  $20.14 \pm 2.40$  pour l'extrait 400 mg/kg, avec des inhibitions de 24.41%, 29.80% et de 26.71%, respectivement, alors que l'activité XDH pour les différentes concentrations de l'extrait a été de  $26.73 \pm 2.32$  et  $21.14 \pm 1.25$  U/mg de protéines respectivement ; soit des inhibitions de 06.20%, 25.82% et de 17.08%, respectivement; ne marquant aucune activité inhibitrice significative comparativement au contrôle, comme le montre les histogrammes A et B de la figure 22.

Cependant, l'allopurinol inhibe très significativement ( $P < 0.001$ ) chacune de la XO et XDH avec des taux d'inhibition de 67.35% et 73.58%, respectivement démontrant une seconde fois qu'il provoque des baisses beaucoup plus significatives que celles des extraits.

#### IV- Discussion des résultats

Les approches thérapeutiques pour le traitement de l'hyper-uricémie incluent l'utilisation des anti-inflammatoires et les inhibiteurs de XO/XDH qui bloquent la synthèse de l'acide urique à partir des purines. Et cela a connu de nombreux progrès au fil des années et a bénéficié de plusieurs nouveautés avec la mise en place de nouveaux médicaments, le plus utilisé est l'allopurinol (**Lioté et Bardin, 2007**).

Au cours des années précédentes, de nombreux auteurs ont montré une très grande importance à l'effet inhibiteur exercé par l'allopurinol sur la XO dans la réduction du taux d'acide urique. Cependant, il a été démontré que ce dernier, induit à des doses élevées, des effets secondaires tels l'hypersensibilité, le syndrome de Stevens-Johnson et la toxicité rénale (**Fritsch and Sidoroff, 2000 ; Horiuchi et al., 2000 ; Hammer et al., 2001**). Une alternative pour l'utilisation de l'allopurinol est l'utilisation de certaines substances phytochimiques contenues dans des plantes étant connues pour leurs effets thérapeutiques (**Nagao et al., 1999**).

Dans la présente étude, il a été démontré que 3 jours d'administration par voie orale des extraits de *Clematis flammula* à différentes doses (100, 200 et 400mg/kg) ont été capable de baisser mais d'une manière peu ou pas significative le taux d'acide urique dans le sérum sanguin chez les souris hyperuricémiques comparativement aux taux enregistrés de l'utilisation de l'allopurinol (10mg/kg).

Les composés actifs contenus dans *Clematis flammula* peuvent exercer différentes activités afin de réduire le taux d'acide urique et de prévenir l'hyper-uricémie tel que :

La favorisation de l'élimination rénale et/ou la réabsorption intestinale. En effet, l'élimination de l'acide urique se fait par voie rénale (2/3) et digestive (1/3). La clairance de l'acide urique chez l'adulte sain est seulement de 7 à 12% du taux filtré, indiquant qu'il existe une nette réabsorption tubulaire (90% de l'urate filtré) par les transporteurs tubulaires proximaux (**Puig et al., 1986 ; Rose et Post, 2001**).

Plusieurs transporteurs tubulaires peuvent être impliqués dans l'homéostasie de l'acide urique tels que URAT1 et GLUT9 (**Wright et al., 2010**). Des études réalisées par **Hu et al. (2010)** ont effectivement déterminé l'effet des extraits de *Simiao pill* dans la favorisation de l'excrétion urinaire de l'acide urique et augmentent la fonction rénale ; il a été montré aussi que ces extraits interviennent dans la régulation des transporteurs rénaux GLUT9 ET URAT1 ainsi que OCT1, OCT2 et OAT1 chez des souris précédemment traitées par de l'oxonate de potassium.

En outre, il a été rapporté que l'urate est un facteur de risque du diabète : une simple élévation du glucose chez les patients diabétiques est associée à l'hyperuricémie (**Whitehed et al., 1992**). Il est important de noter que le glucose diminue significativement les probabilités d'ouverture des canaux hUAT, ce qui suggère le rôle du glucose extracellulaire dans la régulation de l'activité des canaux hUAT (**Whitehed et al., 1992 ; Gonzalez-sicilia et al., 1997 ; Leal-Pinto et al., 2003**).

**Zhao et al. (2006)** ; ont réalisé des études menant à mettre en évidence l'implication des composés glucidiques dans la régulation des probabilités d'ouverture des canaux hUAT et de la dégradation de l'urate en allantoiné qui est facilement excrété par voie rénale, et de ce fait régulé les taux d'acide urique dans le corps, suite aux tests effectués sur les tiges de *Cassia oil*.

Il est aussi probable que notre extrait de plante favorise le transport de l'urate vers les hépatocytes ou il sera dégradé par l'uricase à l'intérieur des peroxysomes hépatiques en composés plus aqueux : l'allantoïne qui est alors excrété par voie rénale (**Briggs et al., 1997**). L'acide urique hépatique est partiellement exporté vers le foie, l'autre partie est transformé en allantoïne : l'existence de différents pools d'acide urique est soutenue par les différentes compartimentations de la xanthine oxydoréductase (**Marinello et al., 2001**).

De nombreuses recherches effectuées ont démontré le rôle de certains métabolites secondaires dans l'inhibition de la XO :

Des études *in vitro*, sur l'effet de l'extrait méthanolique de *Coccinia grandis*, *Datura metel*, *Strychnos nux-vomica* et *Vitex negundo* des plantes médicinales connues pour leur vaste propriétés pharmacologiques ont montré de forts pourcentages d'inhibitions de la XO, il a aussi été démontré que les constituants phytochimiques (flavonoïdes, triterpénoïdes, diterpénoïdes, lignanes et les alcaloïdes) inhibent la XO par de nombreux mécanismes (**Umamaheswari et al., 2007**). 84 extraits de 27 plantes médicinales ont fait l'objet de l'étude réalisée par **Halvic et al. (2010)**, il a été démontré que les flavonoïdes contenus dans ces différents extraits inhibent *in vitro* tout comme *in vivo* l'activité de la XO et diminuent de ce fait le niveau d'acide urique.

**Huang et al. (2011)** ont testé l'action de certaines métabolites secondaires pures comme la genisteine, l'apigénine, la quercétine la rutine et l'astilbine sur le niveau d'acide urique sérique et la XO, ils ont effectivement noté des baisses dans les taux d'acide urique et une inhibition de l'activité de la XO. La quercétine et la rutine ont également des effets inhibiteurs sur la XO, en effet, des études réalisées par **Zhu et al. (2004)** sur l'extrait éthanolique de *Biota orientalis* ainsi que sur des molécules pures de rutine et de quercétine ont appuyé sur cette supposition.

**Kong et al. (2004)** ont déterminé l'effet des ptéridines principalement et d'autres molécules contenues dans les extraits aqueux de certaines plantes chinoises dans la régulation de l'hyperuricémie.

Les flavonoïdes sont des composés naturels présents dans les plantes ayant des propriétés pharmacologiques diverses (Nagao *et al.*, 1999). Il est possible que les flavonoïdes réduisent le taux d'acide urique en inhibant l'activité XO/XDH. En effet il a été démontré que les flavonoïdes peuvent inhiber la formation de l'acide urique suite à l'action de la XO (Nagao *et al.*, 1999 ; Selloum *et al.*, 2001), et cela selon différents mécanismes rapportés par plusieurs études relation/structure des flavonoïdes/activité inhibitrice de la XO:

- a. La flavone, la 4'-hydroxyflavone et la naringénine sont incapables d'inhiber la production de l'acide urique. Il est donc possible qu'une structure plane soit importante pour l'inhibition de la XO (Cos, 1998).
- b. Toutes les flavones ont montré des activités presque similaires quelque soit les substituant du cycle B, indiquant que le cycle B n'a que peu d'influence sur l'inhibition de l'enzyme par les flavones (Cos, 1998).
- c. Les flavones ont la capacité d'inactiver la XO. Cette inhibition est due à la présence de la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>. Les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3-4-diols n'ont aucun effet sur l'activité de la XO (Middleton *et al.* 2000).
- d. En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, il a été observé que l'absence du groupe hydroxyle en C<sub>3</sub> augmente légèrement l'activité, qui peut être expliqué par la déstabilisation au niveau de la polarité du groupement OH dans la région hydrophobe du site actif qui engendre la diminution de l'affinité de liaison (Middleton *et al.*, 2000).
- e. Les chercheurs ont pu mettre en évidence l'importance des groupements hydroxyles en C<sub>7</sub> et C<sub>5</sub> ainsi que les groupements carbonyles en C<sub>4</sub> qui participent aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif de la XO (Chun *et al.*, 2002 ; da Silva *et al.*, 2004).
- f. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Une substitution glycosyl en position C<sub>6</sub> dans le noyau benzopyranone (cas de l'isovitexine) empêche son interaction avec le site actif de la XO en raison de la taille volumineuse du groupement glycosyl (Lin *et al.*, 2002).

Dans notre présente étude nous avons constaté que les extraits aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula in vivo* inhibent l'activité XO/XDH, Cette inhibition est due probablement à la présence des structures favorables, comme cité, au niveau des composés flavonoïques contenus dans cette plante.

*Conclusion*

## Conclusion et perspectives

Dans cette présente étude, une plante connue pour ses effets pharmacologiques a fait l'objet d'extraction des composés phénoliques selon un protocole basé sur l'utilisation de solvants à différentes polarités.

Les résultats obtenus ont montré que l'administration de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula* à différentes doses a marqué une réduction de l'acide urique d'une manière significative, et une inhibition de l'activité XO/XDH peu significative.

De nombreuses autres études effectuées sur différentes plantes et différentes parties, ont eu des résultats plus ou moins similaires, il est donc à mentionner que les extraits aqueux d'acétate d'éthyle de *Clematis flammula*, ne peuvent pas remplacer l'allopurinol, mais peuvent être associés à des régimes alimentaires, ou à des médicaments pour la prévention de nombreuses maladies, l'hyper-uricémie plus précisément.

Il est intéressant d'exploiter les connaissances acquises à travers de telles études dans le but de définir les différentes molécules contenues dans cette plante ayant des attributs thérapeutiques dans la médecine traditionnelle et cela par :

- Etudier l'activité antihyperuricémique des fractions chromatographiques de cet extrait.
- La séparation, l'identification et la caractérisation des composés actifs présents dans les extraits qui sont responsables de l'activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase.
- Etudier la toxicité et la pharmacologie de cette plante et la possibilité de les utiliser comme médicaments pour traiter la goutte et d'autres maladies.

*Références  
bibliographiques*

## *Références bibliographiques*

- **Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Nishino T (1990).** Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type of the O<sub>2</sub> –dependent type. Amino acid sequences of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage site of the enzym protein during irreversible conversion by trypsin. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.265, pp.14170-14175.
- **Atefeibu ESI (2002).** Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'Acacia Nilotica Var Andesonii .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar.33p.
- **Atmani D, Chaher N, Barboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*; 112:303-309.
- **Baba Aissa F (2000).** Encyclopedie de plantes utiles : flore d'Algérie et du maghrels, substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Librairie moderne. Louiba. Dépôt leyal ; N91. P 1-294.
- **Bahorun T (1997).** Substances naturelles actives: la flaire mauricienne; une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agriculture Research Council Réduit Mauritius.
- **Balasundram N, Yew Ai T, Sambanthamurthi R, Sundram K, Sammam S (2005).** Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pac Journal Clinical Nutrition*; 4(4): 319-324.
- **Bardin T (2004).** Current management of gout in patients unresponsive or allergic to allopurinol. *Revue du Rhumatisme*; 71: 860-864.
- **Bardin T (2004).** Current management of gout in patients with unresponsive or allergic to allopurinol. *Joint Bone Spine*; 71:481-5.
- **Barham D, Trinder P (1972).** Analys97.
- **Becker MA, Schumacher HRJ, Wortmann RL, Mc Donald PA (2005).** Febuxostat compared with allopurinol in patient with hyperuricémie and gout. *National England Journal of Medecine*; 353:2450-61.

- **Bellamy N, Downie WW, Buchanan WW (1987).** Observations on spontaneous improvement in patients with podagra: implications for therapeutic trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Clinical Pharmacology*; 24:33-6.
- **Bennick A (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. University of Toronto Canada. *Anders*; 13(2):184-196.
- **Bennick A (2002).** Interaction of plant polyphénols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*; 13(2): 184-196.
- **Bock B (2013).** Base de Données Nomenclature de la flore de France. Tela Botanica. BDNFF v4.02.
- **Borges F, Fernandes E, Roleira, F (2002).** Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medical Chemistry*, vol.9,pp. 195-217.
- **Bradford M (1976).** *Anal Biochemistry*; 72: 248-254.
- **Bray RC (1975).** Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: Boyer, Pd. Ed *The enzymes*. Vol 13. *Academic Press*: New York; 299-419.
- **Briggs JP, Levitt MF, Abramson RG (1997).** Renal excretion of allantoin in rats: a micropuncture and clearance study. *American Journal of Physiology*; 233:F373-F381.
- **Bruneton J (1993).** Les composés phénoliques. In pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition. Lavoisier, Paris ; 200-225.
- **Bruneton J (1999).** *Pharmacognosy: phytochemistry, medicinal plants*. Ed Estem; Pp660.
- **Campion EW, Glynn RJ, Delabry LO (1987).** Asymptomatic hyperuricémie risks and consequences in the Normative Aging Study. *American Journal of Medicine*; 82:421-6.
- **Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC (1993).** Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*; 13:2165-2170.
- **Chawla R, Kumur S, Sharma A (2012).** The genus Clematis (Ranunculaceae): Chemical and Pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*; 143:116-150.
- **Cheynier VV, Souquet JM, Fulcrand H, Sarni P, Moutounet M (1998).** Stabilization tannins-anthocyanes données In “les composés phénoliques”. Journée Technique (compte rendu). *Biology and Medicine*; 13(2) : 184-196.
- **Chiang HS, Julio Y, Lu FJ (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, 8(1): 61-71.
- **Choi HK (2005).** Diet, alcohol and gout: how do we advise patients given recent development? *Curr Rheumatology Rep*; 7:220-6.

- **Choi HK (2010)**. A prescription for lifestyle change in patient with hyperuricémie and gout. *Curr Opin Rheumatology*; 22:165-72.
- **Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Curhan G (2005)**. Obesity, weight change, hypertension, diuretic use and risk of gout in men: the health professionals follow-up study. *Archive International Medecine*; 165:742-8.
- **Choi HK, Curhan G (2005)**. Gout: epidemiology and lifestyle choices. *Curr Opin Rheumatology*; 17:341-5.
- **Choi HK, Curhan G (2008)**. Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort-study. *Br Medecine Journal*; 336:309-12.
- **Choi HK, De vera MA, Krishnan E (2008)**. Gout and the risk of type 2 diabetes among men with a high cardiovascular risk profile. *Rheumatology (Oxford)*; 47:1567-70.
- **Choi JW, Ford ES, Gaou X, Choi HK (2008)**. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drinks, and sérum uric acid level : The third national Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheumatology*; 59:109-16.
- **Cos P, Calomme M, Ying L, Hu JP, Cimanga K, Bart Van P, Luc P, Vlientick A, Berghe DV (1998)**. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal National Production*; 61:71-76.
- **Cowan MM (1999)**. Plant products as antimicrobial agent. *Clinical microbiology reviews*; 12 (4): 564.
- **Da Silva SL, Honorio KM, Marangoni S, Toyama MH (2004)**. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase . *Journal of Molecular Structure*, Vol.684, pp.1-7.
- **Dalbeth N, Merriman TR (2010)**. Bases génétiques de l'hyperuricémie et de la goutte. *Revue de Rhumatisme monographie 77* ; 328-334.
- **Della corte E, Stripe F (1972)**. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochemistry Journal*; 126:739-745.
- **Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N (2006)**. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plant extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*; 97(4): 654-660.

- **Enorth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Pai EF (2000).** Crystal structure of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Academic Science USA*; 97:10723-10728.
- **Escribano-bailon MT, Santos-Buelga C (2003).** Polyphenol extraction from foods. In « Method in polyphenol analysis ». *Journal of Royal society of chemistry*; 1-16.
- **Feig DI, Kang DH, Johson RJ (2008).** Uric acid and cardiovascular risk. *National England Journal Medecine*; 359:1811-21.
- **Feig DI, Soledtdky B, Johson RJ (2008).** Effects of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. *JAMA*; 300:924-32.
- **Fossah P, et al (1980).** *Clinical Chemistry* 26slch2.
- **Fox IH, Kelley WN (1972).** Studies on the mechanism of fructose-induced heyeruricemia in man. *Metabolism*; 21:713-21.
- **Fritsch PO, Sidoroff A (2000).** Drug-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *American Journal of Clinical Dermatology*; 1:349-360.
- **Ganger DN, Rutili G, McCord JM (1981).** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* ; 81 :22-29.
- **Ghestem A, Segun E, Paris M, Orecchioni AM (2001).**Le préparateur en pharmacie : Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris; 273p.
- **Gonzalez-sicilia L, Garcia-Estan J, Martinez-Blazquez J, Fernandez-Pardo J, Quiles JL, Hernandez J (1997).** Renal metabolism of uric acid in type I insulin-dependent diabetic patients relation to metabolic compensation. *Hormone and Metabolic Research*; 29: 520-523.
- **Guignard JL (2000).** Les composés aromatiques .Biochim végé. Edition DUNOD ; 161-176.
- **Guignard PJ (2000).** Composés phénoliques. Biochimie végétale. Edition DUNOD, paris ; 159-176.
- **Gurib-Fakim A (2006).** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*; 27:1-93.
- **Hamada T, Ichida K, Hosoyamada M, et al (2008).** Uricosuric action of Isortan via the inhibition of urate transporter 1 (URAT1) in hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*; 21:1157-62.

- **Hammer B, Link A, Wagner A, Bohn M (2001)**. Fatal allopurinol-induced hypersensitivity in asymptomatic hyperuricemia syndrome. *Deutsch Medizinisch Wochenschrift*; 126: 1331-1334.
- **Hannebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004)**. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* ; 1 :3-6.
- **Harrison R (2002)**. Structure and function of xanthine oxidoreductase : where are we now ? *Free Rad Biology Med*;33:774-797.
- **Havlik J, Gonzalez R, Hejtmankova K, Fernandez J, Simonova J, Melich M, Rada V (2010)**. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*; 132: 461-465.
- **Hille R (1996)**. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*; 96:2757-2816.
- **Hille R, Nichino T (1995)**. Flavoprotein structure and mechanism.4. xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J*; 9:995-1003 on the mechanism of action of molybdoenzymes. *Biochemistry*; 13:560-567.
- **Horiuchi H, Ota M, Nishimura S, Kaneko H, Kasahara Y, Ohta T, Komoriya K (2000)**. Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice. *Life science*; 66: 2051-2070.
- **Hu QH, Jiao RQ, Wang X, Lv YZ, Kong LD (2010)**. Simiao pill ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology*; 128:685-692.
- **Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X (2011)**. Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food and Chemical Toxicology*; 49: 1943-1947.
- **Humburger, Hostettmann (1991)**. Bioactivity in plants : the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*; 30: 3804-3814.
- **Kanavets U, Sharma K, Dresser K, Shi Y (2009)**. A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated andjuvanticity. *Journal of Immunology*; 182:1912-8.
- **Kang LD, Cai Y, Huang WW, Cheng CH, Tan RX (2000)**. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology*; 73:199-207.

- **Kang LD, Mo SF, Zhou F, Lv YZ, Hu QH, Zhang DM (2007).** Hyperuricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. *Biol Pharm Bull*; 30:1551-1556.
- **Kawada J (1992).** New hypothesis for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus. *Yakkugaku Zasshi*; 112:773-791.
- **Kong LD, Yang C, Ge F, Wang HD, Guo YS (2004).** A chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. *Journal of Ethnopharmacology*; 93:325-330.
- **Kurozaki M, Zonatta S, Licalzi M, Garattini E, Terao M (1996).** expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin. *Biochemistry Journal*; 319:801-810.
- **Levizou E, Petroupoulou Y, Manetas Y (2004).** Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of co-extracted phenolics. *Photosynthetica*; 42:295-297.
- **Lin C, Chen CS, Chen, CT, Liang, YC, Lin JK (2002).** Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol.294, pp.167-172.
- **Lin KC, Lin HY, Chou P (2000).** The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in prospective study. *Journal of rheumatology*; 27:1501-1505.
- **Linder N (2005).** Expression and regulation of human xanthine oxidoreductase. Academic Dissertation Program for Developmental and Reproductive Biology Biomedicum Helsinki and Hospital for Children and Adolescent. University of Helsinki Finland; 1-47.
- **Linder N, Rapola J, Raivio KO (1999).** Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Investigation*; 79:967-974.
- **Lioté F (2003).** Hyperuricémie and gout. *Current Rheumatology Rep*; 5:227-234.
- **Lioté F, Bardin T (2007).** Traitement de la goutte. *Revue de Rhumatology* ; 74 :160-167.
- **Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado Y (2004).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, repartition et role. In : les polyphénols en agroalimentaire. Edition Technologie et document, paris ; 380-398.
- **Marfak A (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges ; 24-42.

- **Marinello E, Pizzichini M, Guerranti R, Cenci G, Arezzini L, Porelli B, Teruzio L (2001).** Purine nucleotide catabolism in rat liver, labelling of uric acid and allantoin after treatment with oxonic acid and allopurinol. *Life science*; 68: 1131-1142.
- **Martelin E (2004).** Regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. *Halinski University Biomedical Dissertation*, Vol.42, Finland.
- **Martin S (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Agéologie* ; 51 :304-315.
- **Massey V, Komain, H, Plamer, G (1970).** On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by Allopurinol and other pyrazole (3, 4-d) pyrimidines. *The Journal of Biological Chemistry*. Mc Manaman, J.L; and Shellman, V. (1996). Purification of rat livers xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by affinity chromatography on benzamidine-sepharose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.Vol.332, No.1, pp.135-141.
- **Mazzali M, Kanellis J, Han L, et al (2002).** Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure independent mechanism. *American Journal of Physiology*; 282-F991-7.
- **Mc Manaman JL, Bain DL (2002).** Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*; 277(24): 21261-21268.
- **Mc Rousselet JM, Vignaud P, Hofman F, Chatelet P (2005).** Inflammation et pathologies inflammatoires. Copyright AFECAP.
- **Middleton EJ, Kandaswam, C, Theoharidies TC (2000).** The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*, Vol.52, No.673-751.
- **Miller TM, Page S, Brayant R, Benboubetra M, Tosh D (1998).** Xanthine oxidase catalyses the reduction of nitrates and nitric oxid under hypoxic conditions. *FEBS Lett*; 427:225-226.
- **Mondal MS, Sau AK, Mitra S (2000).** Mechanism of the inhibition of milk XO activity by metal ions: a transient kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1480:302-310.
- **Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999).** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*; 63: 1787-1790.
- **Nascimento GGF, Lacatelli J, Freitas PC, Silva GL (2000).** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*; 31(4): 886-891.

- **Nishino T (1994)**. the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Biochemistry*; 116:1-6.
- **Nishino T (1997)**. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *Journal of Biology and Chemistry*; 272:29859-29864.
- **Okamoto K, Nishino T (1995)**. Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor. *Journal of Biology and Chemistry*; 270 (14): 7816-7821.
- **Ottel K, Reibnegger G (1999)**. Pteridine as inhibitors of xanthine oxidase structural requirements. *Biochimica and Biophysica Acta*; 1430:387-395.
- **Owen PL, Gulcin I, Kufrevioglu OI (2003)**. Xanthine oxidase inhibitory activity of Northeastern North America plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*; 64:149-160.
- **Owen PL, Jhonst T (1999)**. Xanthine oxidase inhibitory activity of north American plant remedies used for gout. *Journal of ethnopharmacology*; 64: 149-160.
- **Pages S, Powell D, Benboubetra M, Stevens RC, Black DR, Selase F, Wolstenholme AJ, Harrison R (1998)**. XOR in human mammary epithelial cells: Activation in reponse to inflammatory cytokines. *Biochemical and Biophysica Acta*; 1381:191-202.
- **Parks DA, Ganger DN (1986)**. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiology Scand Supplement* 548:87-99.
- **Parks DA, Granger DN (1988)**. Xanthine oxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiology Scand Supplement*; 548:87-99.
- **Peronny S (2005)**. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie ;151p.
- **Puig JG, Anton FM, Alonso-vega GG (1986)**. Renal handling of uric acid: hypouricemia and tubular urate secretion. *Archive International Medecine*; 146:1865.
- **Puig JG, De Miguel E, Castillo MC, et al (2008)**. Asymptomatic hyperuricemia : impact of ultrason graphy nucleosides nucleotides nucleic acids ; 27 :592-5.
- **Radi R, Tan S, Prodanov E, Evans RA, Parks DA (1992)**. Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochimica et Biophysica acta*; 1122:178-182.

- **Raju R, Sigimol J, Scria S, Mathews SM, Umamheshwari M (2012).** Effect of the fractions of *Erythrina stricta* leaf extract on serum urate levels and Xo/Xdh activities in oxonate-induced hyperuricaemic mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 02(02): 89-94.
- **Reed JD (1995).** Nutritional toxicology of tannins and related polyphénols in forage legumes. *Journal of Animal Science* vol.73, pp.1516-1528.
- **Richette P (2011).** Mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant. *Revue du Rhumatisme* 78 ; S142-S147.
- **Richette P, Bardin T (2010).** Gout. *Lancet* ; 275:318-28.
- **Richette P, Briere C, Hoenen-Clavert V (2007).** Rasburicase for tophaceous gout not treatable with allopurinol : an exploratory study. *J Rheumatol*; 34:2093-8.
- **Richter (1993).** Métabolisme des végétaux. In : « physiologie et biochimie ». Edition : presses polytechniques et universitaires Romandes ; 318-338.
- **Rose BD, Post TW (2001).** Clinical physiology of acid-base and electrolyt disorders. 5<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill; 2001-96-9.
- **Sarawat CA, Brewer KK, Yang W et al (2006).** Gout medication treatment patterns and adherence to standards of care from a managed care perspective. *Mayo Clin Proc*; 81: 925-34.
- **Sau AK, Mondal MS, Nitra S (2001).** Interaction of Cu<sup>2+</sup> ion with milk xanthine oxidase. *biochimica and Biophysica Acta*; 1544:89-95.
- **Schumacher HR (2005).** Febuxostat: A non-purine, selective inhibitor of xanthine oxidase for the management of hyperuricemia in patients with gout. *Expert Opin Investigation Drugs*; 14: 893-903.
- **Schumacher HR, Becker MA, Wortmann RL, Mc Donal PA, Hunt B, Streit J, et al (2008).** Effects of febuxostat versus allopurinol and placebo in reducing serum urate in subjects with hyperuricémie and gout: a 28 weeks, phase III, randomized, double blind, parallel-group trial, *Arthritis Rheumatology*; 59:1540-8.
- **Selloum L, Reichl S, Muller M, Sbihi L, Arnhold J (2001).** Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archiveslogy of biochimistry biophysics*; 395: 49-56.
- **Shahabimajd N, Poumorad F, Hosseinimehr SJ, Shahrbandi K, Hosseinzadeh R (2004).** Anti oxidant screeing of some medicinal plants of Iran. *Iranian Journal of Pharmacology-Research*; suppl 2:77-77.

- **Skerget AN, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z (2005)**. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*; 89:191-198.
- **Smadi A (2000)**. Etude de l'extrait chloroformique d'Oudneya Africana. Université el Hadj Lakhdar Batna. Thèse de magister.
- **Strazzullo P, Puig JG (2007)**. Uric acid and oxidative stress relative impact on cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*; 17:409-414.
- **Strivastava M, Kale RK (1999)**. Effect of radiation on the Xanthine oxidoreductase System in the liver of mice. *Radiation Research*; 152:257-264.
- **Terkeltoub R (2007)**. Learning how and when to employ uricase as bridge therapy in refractory gout. *Journal of Rheumatology*; 34:1955-8.
- **Truglio, J.J; Theis, K; Leimkuhler, S; Rappa, R; Rajagopalan, K.V, Kister, C. (2002)**. Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Departement of pharmacological Sciences and biochemistry, New York*. Vol.10, 115-125.
- **Umamaheswari M, AsokKumar K, Somasundaram A, Sivashanmugam T, Subhadradevi V, KochupapyRavi T (2007)**. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 109 : 547-551.
- **Vorbach C, Scriven A, Capecchi MR (2002)**. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. ; 16:3223-3235.
- **Whitehead TP, Jungner I, RobinsonD, Kolar W, Pearl A, Hale A (1992)**. Serum urate, serum glucose and diabetes. *Annals of Clinical Biochemistry*; 29: 159-161.
- **Wijnands JM, Boonen A, Art IC, et al (2011)**. Large epidemiologic studies of gout : challenges in diagnosis and diagnostic criteria. *Curr Rheumatol Rep*; 13:167-74.
- **Wright AF, Rudan I, Hastie ND, Campbell H (2010)**. A complexity of urate transporters. *Kidney International*; 78:446-52.
- **Xu P, Huecksteadt TP, Hoidal JR (1996)**. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics*; 34:173-180.

- **Yilmaz Y, Toledo R (2004).** Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* ; 15 :422-433.
- **Zhao X, Zhu JX, Mo SF, Pan Y, Kong LD (2006).** Effect of cassia oil on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*; 103: 357-365.
- **Zhu JX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X (2004).** Effect of biota orientalis extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*; 93:133-140.

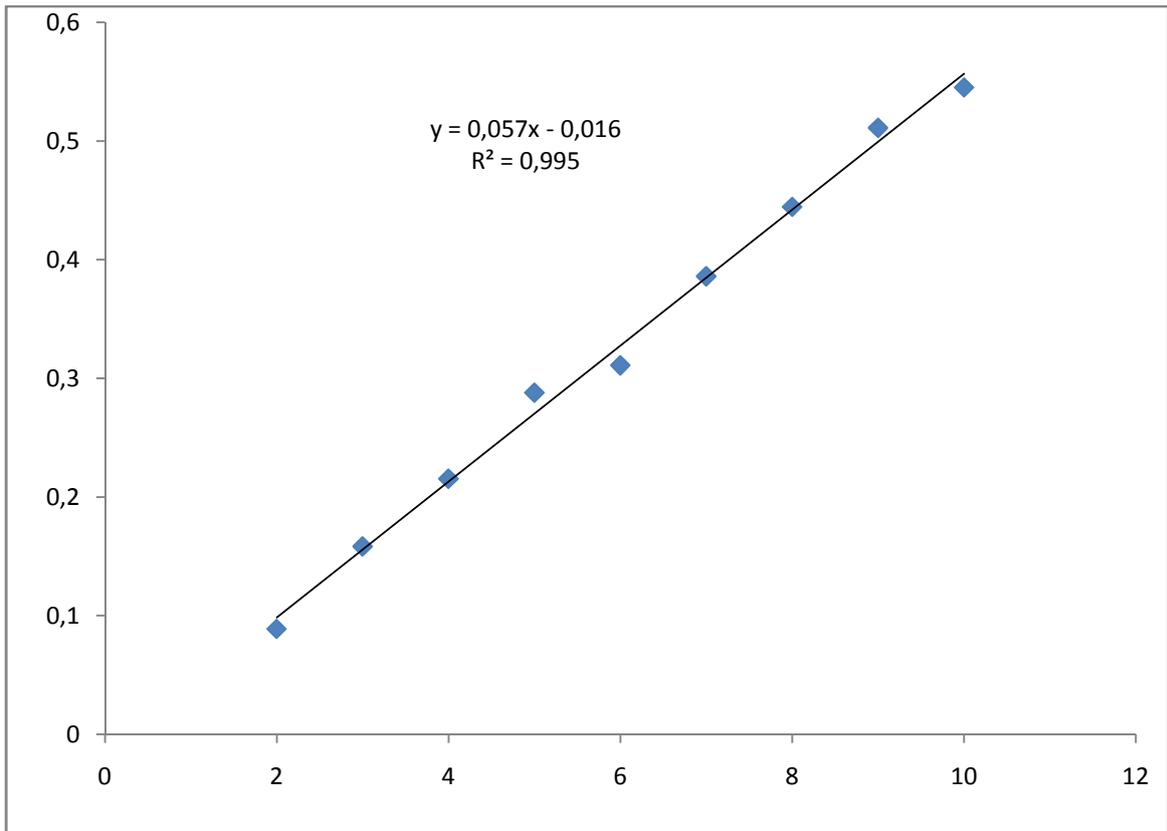
# *Annexes*

**Tableau :** Taux d'acide urique chez les souris normales, hyper-uricémiques et les souris traitées par de l'allopurinol ou les extraits de *Clematis flammula*.

Traitement	Dose (mg/Kg)	Taux d'acide urique (mg/dl)
<b>Normal</b>	-	3.01±0.19
<b>Normal + Allopurinol</b>	10	0.30±0.02
<b>Normal + Extrait 100</b>	100	1.95±0.11
<b>Normal + Extrait 200</b>	200	1.60±0.21
<b>Normal + Extrait 400</b>	400	1.40±0.09
<b>Hyperuricémique</b>	280	4.73±0.18
<b>Hyperuricémique + Allopurinol</b>	10	0.33±0.02
<b>Hyperuricémique + Extrait 100</b>	100	1.99±0.85
<b>Hyperuricémique + Extrait 200</b>	200	1.71±0.70
<b>Hyperuricémique + Extrait 400</b>	400	1.26±0.55

**Tableau :** Activité XO/XDH et taux d'inhibition résultant de l'administration des extraits de *Clematis flammula* et de l'allopurinol.

Traitement	Dose( mg/kg)	XO	XDH	%d'inhibition	
		nm/min/mg		XO	XDH
<b>Normal</b>	-	25.54±0.91	25.19±0.67	-	-
<b>Normal + Allopurinol</b>	10	05.66±0.59	05.99±0.85	77.83	76.22
<b>Normal + Extrait 100</b>	100	16.30±1.96	15.98±1.95	36.17	37.99
<b>Normal + Extrait 200</b>	200	20.29±2.63	15.62±1.99	20.55	06.62
<b>Normal + Extrait 400</b>	400	22.28±4.37	23.52±3.93	12.76	48.97
<b>Hyperuricémique</b>	280	27.48±1.79	28.50±2.74	-	-
<b>Hyperuricémique + Allopurinol</b>	10	08.97±1.86	08.90±2.02	67.35	73.58
<b>Hyperuricémique + Extrait 100</b>	100	20.77±3.43	26.73±2.32	24.41	06.20
<b>Hyperuricémique + Extrait 200</b>	200	19.29±1.48	21.14±1.25	29.80	25.82
<b>Hyperuricémique + Extrait 400</b>	400	20.14±2.40	23.63±2.94	26.71	17.08



Courbe d'étalonnage des tests du Bradford

## **Résumé**

Dans cette étude, nous avons démontré l'effet hypo-uricémique et inhibiteur des activités XO/XDH de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *Clematis flammula* en utilisant un modèle animal traité par l'oxonate de potassium.

L'administration orale des extraits de *Clematis flammula* à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg) a réduit significativement le taux d'acide urique chez les souris normales contrairement chez les souris hyperuricémiques. Une inhibition non significative de l'activité XO/XDH chez les souris hyperuricémiques a été enregistrée. Tandis que, l'inhibition est peu significative chez les souris normales pour les concentrations 100 et 200 mg/kg. L'allopurinol baisse d'une manière très significative l'activité XO/XDH ainsi que les taux d'acides urique.

Les effets des composants de *Clematis flammula* sur le niveau d'acide urique chez les souris hyperuricémiques et l'inhibition de l'activité XO/XDH au niveau du foie, peuvent être expliqués par leur métabolisme et absorption avec leur potentiel d'application contre la goutte et l'hyperuricémie ; pour cela, l'extrait testé de cette plante peut être associé à des régimes alimentaires et des médicaments mais ne peut pas remplacer l'allopurinol.

**Mots clé :** Hyperuricémie, Allopurinol, *Clematis flammula*, XO/XDH, acide urique.

## **Abstract**

We investigated in this study, the hypouricemic and inhibitory actions against liver XO/XDH effects of aqueous ethyl acetate extract of *Clematis flammula* leaves, using hyperuricemic mice induced by the uricase inhibitor: potassium oxonate.

Oral administration of *Clematis flammula* extract at different concentrations (100, 200 and 400 mg/kg) reduced significantly urate serum levels in normal mice although the significance was lower in the hyperuricemic mice. No significant inhibition XO/XDH activities in hyperuricemic mouse. At 100 and 200mg/kg of extract a lower inhibition in normal mice was showed. Allopurinol decrease very significantly XO/XDH activities and acid uric levels.

The effects of *Clematis flammula* components on serum urate levels in hyperuricemic mice induced by oxonate and the inhibition of enzyme activities in mouse liver are discussed in relation to their absorption and metabolism, and their potential application to treat gout and hyperuricemia; in this way, the extract of *Clematis flammula* can be associated with drugs and diets but can't replace allopurinol.

**Key words:** Hyperuricemia, allopurinol, *Clematis flammula*, XO/XDH, uric acid.