République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA –Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase *in vivo* de l'extrait brut éthanolique de feuilles de *Clematis flammula*

Réalisé par :

M[r] SAIDI Massinissa

M[r] ZERROUKI Atmane

Membre du jury

Présidente : Mme AYOUNI K. (MAA)

Promotrice : Mme CHERAFT N. (MAB)

Examinatrice 1 : Mme BOUDAOUD-OUAHMED H. (MAA)

Examinatrice 2 : Mme BERBOUCHA-RAHMANI M. (MAA)

Année : 2012/2013

Remerciements

*N*ous remercions **Mr ATMANI** et **Mme ATMANI** de nous avoir ouvert les portes de leur laboratoire de génétique et pour leurs conseils très importants durant toute la période de la réalisation de ce travail.

*N*ous tenons à remercier tout particulièrement notre promotrice, **Mme CHERAFT N.** pour avoir accepté de nous encadrer, pour la confiance qu'elle nous a faite, pour les conseils qu'elle nous a accordés tout au long de la réalisation de ce modeste travail. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et l'expression de notre vive reconnaissance.

*N*os remerciements vont aussi à **Mme AYOUNI K.** pour son aide et ses encouragements, et d'avoir accepté d'être présidente du jury de notre mémoire.

*N*ous remercions également **Mme BERBOUCHA-RAHMANI M.** pour ses conseils et son aide, et d'avoir accepté de juger ce travail.

*N*os vifs remerciements pour **Mme BOUDAOUD-OUAHMED H.** Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de mémoire. Hommage respectueux.

*S*ans oublier les membres du laboratoire de génétique : **Mme DEBBACHE N.** et **Mme TAHIRI W.,** et tous les enseignants qui ont contribué à notre formation qu'ils retrouvent à travers ce mémoire le fruit de leurs longues années de travail.

*N*ous remercions chaleureusement les deux ingénieurs du laboratoire **Naima** et **Wahiba,** sans lesquels rien de ce travail ne serait fait, sans oublier nos charmantes collègues **Saliha**, **Kenza**, **Souad** et **Malika**.

*N*os sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Atmane et Massi

Dédicaces

À mes parents que Dieu les protège :

En témoignant de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissants. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour la meilleurs récompense ;

À mes chères sœurs Linda, Thiziri et Lamia ;

À mes chers grands parents ;

À ma chère tante Saida et son époux Ahmed ;

À toute mes chères tantes et leurs familles ;

À mes chers cousins et leurs familles ;

À mes chers oncles et leurs familles ;

À mon binôme Massinissa et à sa famille ;

À tous mes amis (es) : Azzeddine K, Cherif B, Lyes O, Kadi B, Younes M, Nassim B, Hamid B, Soufiene A et à tous ceux que je connais.

À mes collègues et amis, plus particulièrement Kahina, Ghania, Fatty, Salma, Leila, Hamza,

Mazigh, Massina, sans oublier Sara, Merbouha, Katia, Nawel, Lynda, Yasmine, Sonia, Samia, Bila, Assia, Lilia, Lydia et Assema pour les sympathiques moments qu'on a partagés ;

À tous mes collègues de la promotion de Biochimie Appliquée 2013.

Je leur dédie ce modeste travail.

Atmane

Dédicaces

À mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études et que je remercie chaleureusement ;

À ma très chère sœur Kahina ;

À mes frères Sofiane, Kouseila et Zoubir ;

À tout le reste de la famille, petit et grand ;

À mon binôme Atmane et à sa famille ;

À mes collègues et amis, plus particulièrement Kahina, Ghania, Fatty, Salma, Leila, Hamza, Mazigh, Massina, sans oublier Sara, Merbouha, Katia, Nawel, Lynda, Yasmine, Sonia, Samia, Bila, Assia, Lilia, Lydia, Wahiba, Yasmina, Hanane, Yasmina, Nassime et Lakhder pour les sympathiques moments qu'on a partagés ;

À Mokrane, Abdelhak, Namir, Amine, Karim, Bouzid, Dodo, Rachid, Lamou, Assia, Silia Siham et Siham, pour les bons et les mauvais moments qu'on a du passé et enduré ensemble ;

À toute la promotion de Biochimie Appliquée 2013.

Je leur dédie ce modeste travail.

Massi

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ……..……..……1

Partie bibliographique

I- La xanthine oxydoréductase 2

I.1 Généralité 2

I.2 Structure de la xanthine oxydoréductase 2

I.3 Inter-conversion xanthine déshydrogénase / xanthine oxydase 2

I.4 Distribution et localisation de la xanthine oxydoréductase 3

I.5 Rôle de la xanthine oxydoréductase 3

II- L'acide urique 5

II.1 Généralité 5

II.2 Formation de l'acide urique 5

II.3 Elimination de l'acide urique 7

II.4 Effets de l'acide urique 8

III- L'hyperuricémie 9

III.1 Définition 9

III.2 Facteurs induisant l'hyperuricémie 9

III.3 Effets de l'hyperuricémie 9

IV- La goutte 10

IV.1 Définition 10

IV.2 Physiopathologie et caractéristiques cliniques 10

IV.3 Traitements de la goutte 11

V- La médecine traditionnelle 14

V.1 Généralité 14

V.2 Métabolites secondaires 14

Partie pratique

I- Matériel 18

I.1 Matériel végétal 18

I.1.1 Description 18

I.1.2 Utilisation médicinale 18

I.1.3 Localisation 19

I.1.4 Composition chimique 19

I.1.5 Toxicité de la *Clematis flammula* : 19
I.2 Matériel animale 20
II- Méthodes 20
II.1 Préparation de la poudre végétale 20
II.1.1 Récolte 20
II.1.2 Séchage 20
II.1.3 Broyage et tamisage 20
II.1.4 Extraction 21
II.2 Evaluation *in vivo* de l'activité anti-hyperurecemique de l'extrait brut de feuilles de *Clematis flammula.* 22
II.2.1 Traitement des animaux 22
II.2.2 Principe de ce test 22
II.2.3 Préparation de souris hyperuricémiantes et administration des médicaments ... 23
II.2.4 Prélèvement du sang et sacrifice des animaux 24
II.3 Analyses biochimique 25
II.3.1 Détermination du taux d'acide urique sérique 25
II.3.2 Détermination des activités XO / XDH du foie des souris 25
II.3.3 Dosage des protéines 26
II.4 Analyse statistique 26
Résultats et discussion
III.1 Taux d'extraction 27
III.2 Effet de l'extrait éthanolique sur le niveau de l'acide urique sérique 28
III.2.1 Chez les souris normales 28
III.2.2 Chez les souris hyperuricémiques 30
III.3 Effet de l'extrait éthanolique sur l'activité de la XO/XDH hépatique 32
III.3.1 Chez les souris normales 32
III.3.2 Chez les souris hyperuricémiques 34
Conclusion et perspectives……..……..……38
Références bibliographique……..……..……...39
Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la XOR humaine et site de clivage de la xanthine oxydoréductase. 2

Figure 2 : La voie de dégradation des purines. 3

Figure 3 : Structure de l'AU avec ses précurseurs et la numérotation des atomes. 5

Figure 4 : Voie de la synthèse des purines, de la récupération et de la dégradation dans les tissus humains. 6

Figure 5 : Transport de l'acide urique dans le néphron. 7

Figure 6 : Effet antioxydant de l'acide urique..... 8

Figure 7 : Dérèglement de l'homéostasie de l'acide urique provoque l'hyperuricémie et l'hyperuricosurie. 9

Figure 8 : Points de régulation essentiels de la pathogénie de la goutte. 11

Figure 9 : Acide urique et mécanisme d'action des traitements hypo-uricémiants. 12

Figure 10 : Les effets inhibiteurs de l'allopurinol et de son métabolite, oxipurinol. 13

Figure 11 : Les principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires. 14

Figure 12 : Classification de la *Clematis flammula* ainsi qu'une représentation photographique. 18

Figure 13 : Structure des composés toxique de *Clematis flammula* L. 20

Figure 14 : Protocole d'extraction des composés phénoliques. 21

Figure 15: L'oxydation de l'acide urique en l'allantoïne qui peut être bloquée par l'Oxonate de potassium, agent inhibiteur de l'uricase. ……..22

Figure 16 : Voie intrapéritonéale et voie intragastrique..... 23

Figure 17 : Niveau de l'acide urique sérique chez les souris normales. 29

Figure 18 : Niveau de l'acide urique sérique chez les souris hyperuricémiques. 30

Figure 19 : Activité de XO (en haut) et XDH (en bas) chez les souris normales. 33

Figure 20 : Activité de XO (en haut) et XDH (en bas) chez les souris hyperuricémiques. ….34

Liste des tableaux

Tableau I : Localisation de la xanthine oxydoréductase. 3

Tableau II : Représentation de quelques plantes médicinales à effets hypo-uricémiant. 16

Tableau III : Répartition des lots entre les deux groupes normaux et groupes hyperuricémiques. 24

Tableau IV : L'effet de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* sur le niveau de l'acide urique chez les souris normales et hyperuricémique. 28

Tableau V : L'effet de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* sur l'activité de la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase chez les souris normales et hyperuricémique. 32

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes comme remède pour les maladies remonte à la médecine chinoise, bien avant la découverte des composés bioactifs tel que les composés phénoliques. Ces derniers possèdent un pouvoir inhibiteur de plusieurs enzymes dont la xanthine oxydase (Van Hoorn et *al.* 2002), responsable de la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique (Pacher et *al*., 2006).

L'acide urique est le dernier produit du métabolisme des composés puriniques dont l'élimination se fait par voie rénale. Il représente la moitié de la capacité antioxydant chez l'Homme. Cependant, son accumulation dans le sang induit une hype-ruricémie, facteur de risque de plusieurs maladies (Kaur et Halliwel, 1990).

En Algérie, beaucoup de plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter les maladies inflammatoires, dont la goutte. Cette dernière est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique, dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une mono-arthrite aigüe de gros orteil. Elle est associée, bien que de façon inconstante, à une augmentation du taux circulant d'acide urique. Son évolution sans traitement se fait vers le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain avec une prédilection pour les articulations (arthrite goutteuse), la peau (tophus) et les riens (néphropathie uratique), conduisant au maximum de destruction articulaire et une insuffisance rénale potentiellement fatale.

Parmi ces plantes, il y a la *Clematis flammula,* appartenant à la famille des Ranunculacea, dont le nom vernaculaire Kabyle « Azanzou ». Cette plante est connue pour sa spécificité très répondue dans le soin de nombreuses maladies inflammatoires comme l'arthrite et la goutte. Largement utilisée dans les régions méditerranéennes surtout dans les régions Kabyles, malgré cela, elle reste très peu étudiée.

Ainsi nous nous sommes proposés dans ce travail d'évaluer l'activité antihype-ruricémique et antixanthine oxydoréductase de l'extrait brut éthanolique *in vivo* de feuilles de *Clematis flammula* sur des souris normales et hype-ruricémique.

Partie bibliographique

I- La xanthine oxydoréductase

I.1 Généralité

La xanthine oxydoréductase (XOR), identifiée pour la première fois il y a un siècle dans le lait, est un membre hautement conservé de la famille molybdoenzyme (Berry et Hare, 2004). Elle comprend deux enzymes interconvertibles, la xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) et la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.17.1.4), qui sont des molybdoptérine contenant des flavoprotéines, composées de deux sous-unités d'environ 145 kDa (Pacher et *al*., 2006).

I.2 Structure de la xanthine oxydoréductase

Chez les animaux supérieurs, la XOR existe sous forme d'un homodimère de sous-unité de 150 kDa. Chaque sous-unité contient un centre de molybdène (cofacteur de molybdène ; Moco), une flavine adénine dinucléotide (FAD) cofacteur et deux centres de soufre et de fer distinct (de type [2Fe-2S]) (Figure 1) (Enroth et *al*., 2000 ; Ichida et *al*., 2012). La forme homodimère de la XOR est découpée en deux points au niveau de chaque sous-unité monomère, et les sites de clivage sont situés dans les deux zones d'articulation reliant la 2Fe/2S au domaine contenant la flavine, et ce à la région contenant le MoCo (Garattini et *al*., 2003).

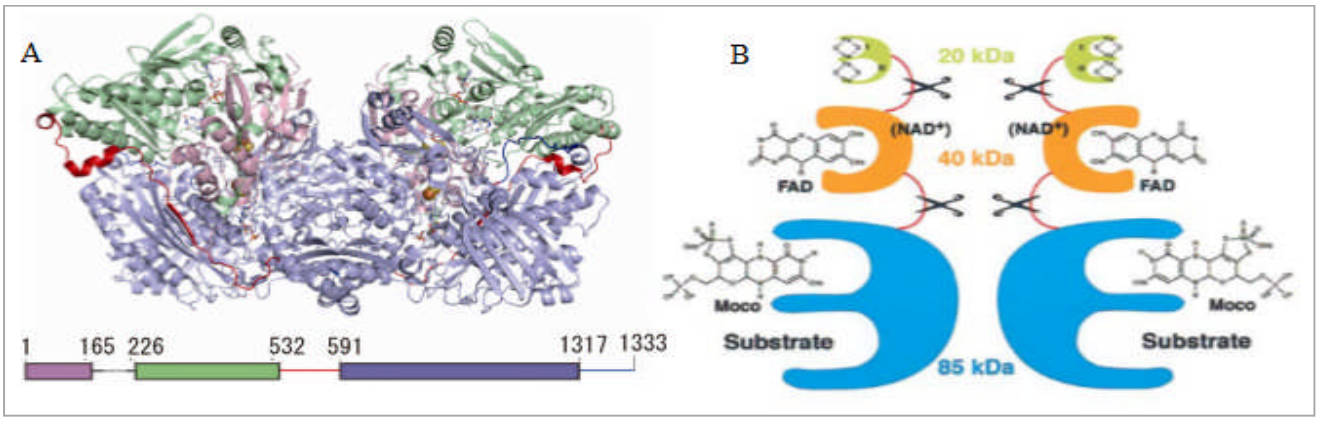

Figure 1 : A : Structure de la XOR humaine. Le Fe / S, FAD et les domaines molybdoptérine sont de couleur rose, vert clair et bleu clair, respectivement (Enroth et *al*., 2000 ; Ichida et *al*., 2012). B : Site de clivage de la xanthine oxydoréductase (Garattini et *al*., 2003).

I.3 Inter-conversion xanthine déshydrogénase / xanthine oxydase

La XOR des mammifères existe sous la forme de XDH dans des conditions normales dans la cellule, mais elle est convertis à la forme de XO lors de l'extraction ou de purification, soit irréversiblement par protéolyse ou de manière réversible par oxydation de résidus cystéine à des ponts disulfures (Enroth et *al*., 2000 ; Ichida et *al*., 2012).

Cette conversion de XDH en XO n'est pas une caractéristique de tous les XORs eucaryotes. En effet, la XOR de foie de volaille est présente uniquement sous la forme de XDH et elle est résistante à la conversion (Garattini et *al*., 2003).

I.4 Distribution et localisation de la xanthine oxydoréductase

L'activité de la XOR a été détectée dans toutes les espèces, y compris les bactéries. Dans les tissus des mammifères notamment chez l'Homme, l'activité est largement répandue (Tableau I), avec un plus haut niveau dans le foie et l'intestin. Toutefois, il y a des variations considérables, comme en témoigne le large éventail de niveaux dans le sang et le cœur (Harrison, 2002).

Tableau I : Localisation de la xanthine oxydoréductase (Berry et Hare, 2004 ; Kitamura et *al*., 2006 ; Pacher et *al*., 2006 ; George et Struthers, 2009 ; Ichida et *al*., 2012).

Localisation tissulaire	Localisation subcellulaire
Le foie	Le cytoplasme
L'intestin grêle	Les membranes cellulaires
Les glandes mammaires	Les peroxysomes des hépatocytes
Les cellules endothéliales des vaisseaux vasculaires	Dans divers organites des cellules de Kupffer
L'estomac	Les cellules sinusoïdales
Les cavités buccale et nasale, la langue	Le réticulum endoplasmique rugueux
L'œsophage	Les lysosomes
Le rein, le cœur, le cerveau, les poumons	Les vésicules d'endocytose.
L'utérus	
Le plasma	

I.5 Rôle de la xanthine oxydoréductase

I.5.1 Rôle physiologique

Physiologiquement, la XO et la XDH participent à une variété de réactions biochimiques dont l'hydroxylation de diverses purines, ptérines, et les hétérocycles aromatiques, ainsi que des aldéhydes aliphatiques et aromatiques, contribuant ainsi à la détoxication ou l'activation de composés endogènes et des xénobiotiques. Un des principaux rôles de la XOR est la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de xanthine en acide urique (AU) et elle est la seule enzyme capable d'effectuer ce rôle (Figure 2) (Pacher et *al*., 2006 ; George et Struthers, 2009).

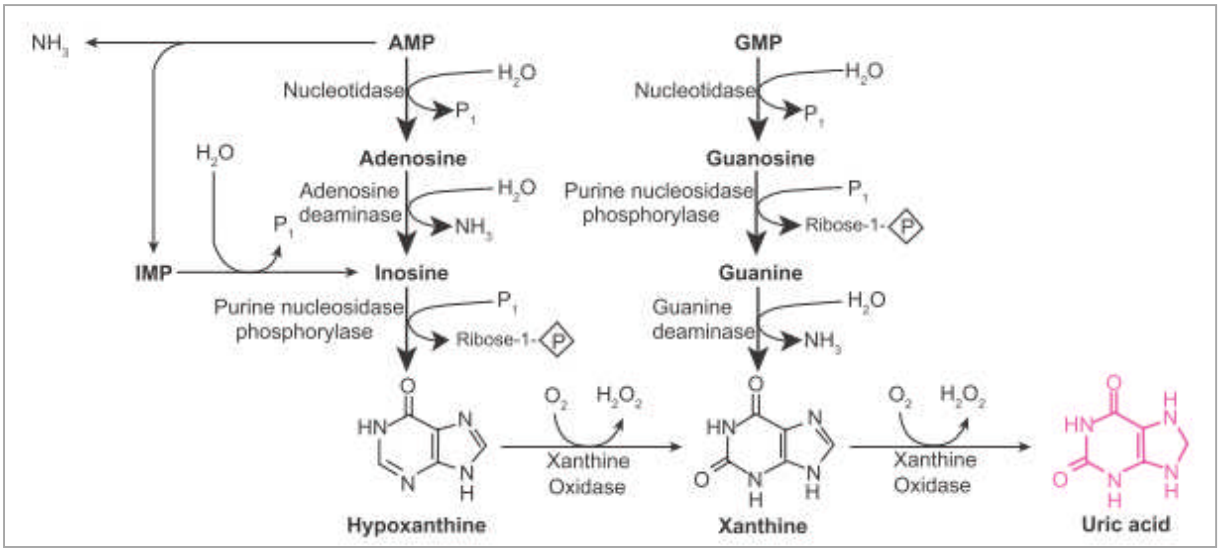

Figure 2 : La voie de dégradation des purines (George et Struthers, 2009).

Chez certaines espèces, le catabolisme des purines se poursuit au-delà de l'acide urique. Les mammifères, autres que les primates, excrètent l'allantoïne qui est formée par l'oxydation de l'urate. Certaines espèces de poissons excrètent l'allantoate, produit de l'hydratation de l'allantoïne. Chez les amphibiens et certains poissons, l'allantoate est hydrolysé davantage en deux molécules ; urée et glyoxylate. Certains invertébrés marins hydrolysent l'urée en NH_4 et CO_2 (Álvarez-lario et Macarron-vicente, 2011).

En outre, la XOR a longtemps été connue pour avoir des propriétés bactéricides en présence d'hypoxanthine. L'enzyme est régulée positivement par les cytokines pro-inflammatoires et elle est de plus en plus perçue comme un agent défensif, en grande partie en raison de sa capacité à générer des ERO (Espèces Réactives d'Oxygène). Ainsi, l'activité microbicide de la XOR peut être considérée comme étant une troisième ligne de défense antimicrobienne dans le tube digestif de l'Homme (Harrison, 2002).

I.5.2 Rôle pathologique

La XOR est impliquée dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin, les accidents vasculaires cardiaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'athérosclérose et la goutte. Cette dernière est le résultat de l'augmentation de la concentration de l'acide urique dans le sang et elle se traduit par une hyperuricémie aboutissant ainsi à des précipitations uratiques dans différents tissus, en particulier dans les articulations (Squadrito et *al*., 2000 ; Nuki, 2006).

II- L'acide urique

II.1 Généralité

L'acide urique (AU) ou l'urate est un acide organique, constitué de carbone, d'azote, d'oxygène et d'hydrogène ($C_5H_4N_4O_3$) (Figure 3). Il est le produit final du catabolisme des purines chez les humains, les primates supérieurs et dans une espèce particulière de chien (Dalmatiens) (Lippi et *al*., 2008). Environ 98 % de l'AU est ionisé en urate de sodium alors que chez la plupart des autres mammifères, l'uricase catalyse la dégradation de l'AU en allantoïne, un composé plus soluble et plus facilement excrété que l'AU (voir annexe Figure 1) (Ruilope et Garcia-puig, 2001 ; Tan et *al*., 2010).

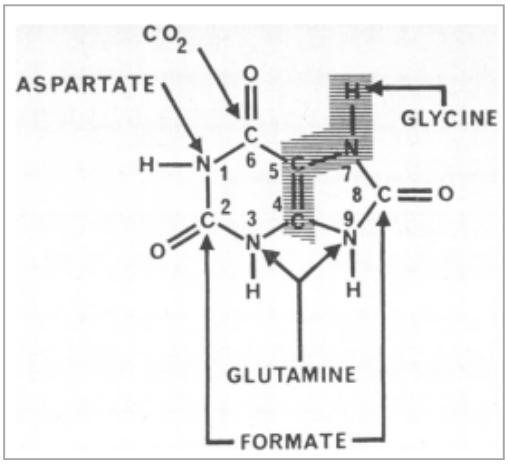

Figure 3 : Structure de l'AU avec ses précurseurs et la numérotation des atomes (Watts, 1974).

II.2 Formation de l'acide urique

L'urate est issu du métabolisme hépatique des purines. Il est produit par l'action, soit dans la voie de dégradation des purines ingérées (synthèse *de novo*) ou par le métabolisme purique endogène (voie de sauvetage), à la fois de l'oxydation et réduction de la XOR (connu sous le nom de XO et de XDH], respectivement) en hypoxanthine et xanthine (Watts, 1974 ; Merriman et Dalbeth, 2010 ; Neogi et *al*., 2012).

II.2.1 Purinosynthèse *de novo*

La purinosynthèse *de novo* ou synthèse *de novo* des purines est la synthèse de composés puriniques à partir de diverses molécules non puriniques. Elle s'effectue principalement dans le cytoplasme des cellules hépatiques. Le premier acide nucléotide formé est l'acide inosinique d'où proviennent les autres nucléotides puriniques notamment l'acide adénylique, l'acide xanthylique et l'acide guanylique (Watts, 1974 ; Wyngaarden, 1974 ; Ea, 2011).

La première réaction irréversible de la purinosynthèse de novo est la formation de phosphoribosylamine. Une fois formée, la phosphoribosylamine est transformée en acide inosinique après plusieurs réactions enzymatiques (Ea, 2011 ; Watts, 1974 ; Wyngaarden, 1974).

L'acide inosinique est transformé en acide adénylique et acide guanylique qui sont des nucléotides puriniques des acides ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN). Ces derniers sont catabolisés et entrent dans la voie de « sauvetage » de la purinosynthèse lorsqu'ils ne sont pas utilisés pour la synthèse des acides nucléiques. La dégradation de l'acide inosinique aboutit à la formation de l'hypoxanthine, alors que celle de l'acide xanthylique à la xanthine et celle de l'acide guanylique à la guanine. La guanine est transformée en xanthine grâce à une désaminase alors que l'hypoxanthine est oxydée en xanthine par la XO puis en acide urique, produit final du métabolisme des purines (Figure 4) (Watts, 1974 ; Wyngaarden, 1974 ; Ea, 2011).

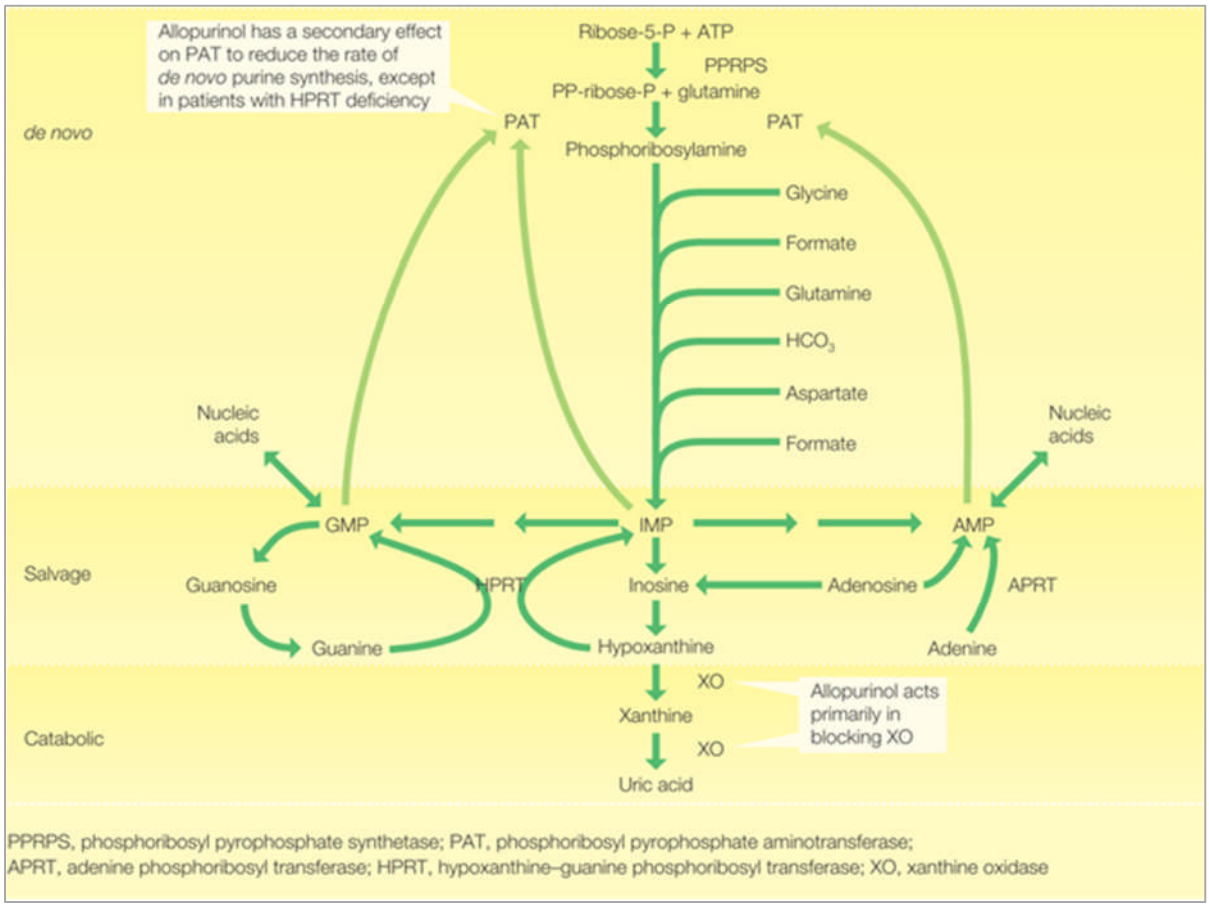

Figure 4 : Voie de la synthèse des purines, de la récupération et de la dégradation dans les tissus humains (Nuki, 2006).

II.2.2 Sources exogènes

Les purines sont en grande quantité dans le foie, les reins, le cerveau de bœuf, les extraits de viande ; les anchois, les sardines (Lippi et *al*., 2008), et dans les légumes tels que les haricots, les asperges, les épinards et les champignons (Lee et Terkeltaub, 2005).

L'apport excessif en fructose en cas de glycémie élevée (chez le diabétique) et de réserve de glycogène reconstituée, il y'aura une dérivation du métabolisme des nucléotides adényliques vers la production d'AU (Lecerf, 2009).

Les purines iatrogènes proviennent des traitements médicamenteux comme les chimiothérapies anticancéreuses et des traitements hypo-uricémiant. Les diurétiques sont les principaux pourvoyeurs d'hyperuricémies secondaires, avec pour singularité, la constitution silencieuse de tophus (Bannwarth, 2005).

II.3 Elimination de l'acide urique

L'élimination de l'AU se fait par voie rénale (2/3) et digestive (1/3). Cependant, la clairance de l'AU 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 (Figure 5) (Nuki, 2002 ; Izzedine et Deray, 2011).

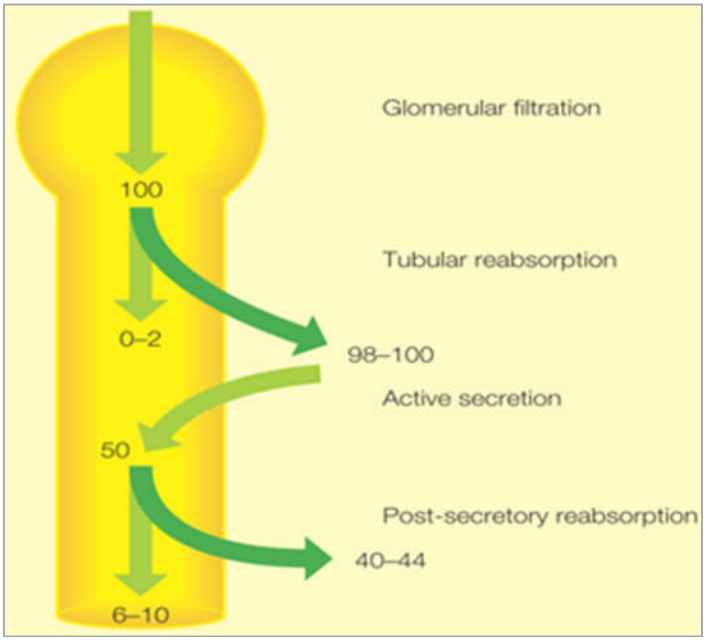

Figure 5 : Transport de l'acide urique dans le néphron (Les chiffres représentent l'ordre de grandeur approximatif des processus de transport) (Nuki, 2002).

II.4 Effets de l'acide urique

Initialement, l'AU a été considéré comme un déchet inerte qui se cristallise à des concentrations élevées pour former des calculs rénaux et provoquer l'arthrite goutteuse (So et Thorens, 2010), mais par la suite, on lui a attribué des effets protecteurs (Kaur et Halliwel, 1990 ; Heo et Lee, 2010).

II.4.1 Effets protecteurs

L'acide urique est connu pour avoir des effets protecteurs en agissant comme un piégeur de radicaux libres. Il est un puissant agent réducteur (donneur d'électrons) et un puissant antioxydant (Knapp, 2004 ; Heo et Lee, 2010). Chez l'Homme, environ la moitié de la capacité antioxydant du plasma provient de l'acide urique. En outre, l'AU a des actions importantes dans le système immunitaire et le développement de certains processus inflammatoires ainsi une neuro-protection dont les actions antioxydants bénéfiques semblent prévaloir (Kaur et Halliwel, 1990 ; Alvarez-lario et Macarron-vicente, 2010).

- **Exemple d'un effet antioxydant**

L'AU peut inactiver directement le peroxynitrite par une réaction qui génère des radicaux d'acide urique (AU˙), qui peuvent être rapidement éliminés par l'acide ascorbique plasmatique (Figure 6) (So et Thorens, 2010).

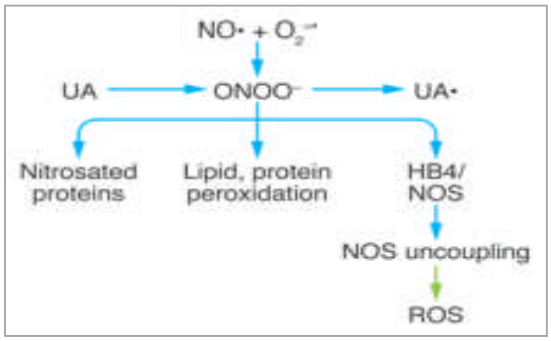

Figure 6 : Effet antioxydant de l'acide urique (So et Thorens, 2010).

II.4.2 Effets néfastes

L'acide urique peut agir comme un agent pro-oxydant, cela en fonction de sa concentration sérique et localisation cellulaire. Ainsi, l'élévation de la concentration de l'acide urique provoque une hyperuricémie et conduit à la diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique, qui à son tour contribue à la réduction de certaines fonctions biologiques telles que la fonction rénale et à l'insulino-résistance (Knapp, 2004 ;Bhole et *al*., 2010 ; Lapsia et *al*., 2012).

III- L'hyperuricémie

III.1 Définition

L'hyperuricémie est définie comme une élévation de l'acide urique sérique (AUS) au-dessous de 7,0 mg/dl, une valeur supérieure juste à la limite de solubilité de l'urate dans les liquides extracellulaires (6,8 mg/dl). L'augmentation de la concentration de l'acide urique sérique au-delà de 7,0 mg/dl rend les liquides extracellulaires sursaturés en AU et augmente le risque de dépôt de cristaux (Scott, 1978 ; Ruilope, 2001 ; Ernst et Fravel, 2009 ; Grabowski et *al*., 2011).

III.2 Facteurs induisant l'hyperuricémie

L'hyperuricémie peut résulter d'une augmentation de la production d'AU provenant de sources endogènes ou exogènes (anomalies des enzymes spécifiques, l'alimentation et les médicaments hyeruricémiants), d'une diminution de l'excrétion d'AU en raison de déficits dans la clairance rénale de l'urate rénal, ou d'une combinaison de ces 2 mécanismes (Grabowski et *al.*, 2011), ou bien, résulter indirectement par d'autres facteurs tels que certaines maladies (les maladies cardiovasculaires et le diabète, les protéines d'hémoglobine) (Scott, 1978).

III.3 Les effets de l'hyperuricémie

La sévérité de provoque une arthropathie goutteuse et elle est néfaste pour le rein de trois façons : en entraînant une néphropathie uratique (dépôts de cristaux d'urate), une néphropathie urique aiguë par précipitation tubulaire d'AU (syndrome de lyse tumorale aiguë) ou une lithiase urique (Figure 7). De plus, l'hyperuricémie est l'un des facteurs prédictifs dans le développement de l'hypertension artérielle et elle est un facteur de risque en cas de mauvais pronostic lors d'une insuffisance cardiaque chronique ou d'accident vasculaire cérébral (Chalès et Guggenbuhl, 2005).

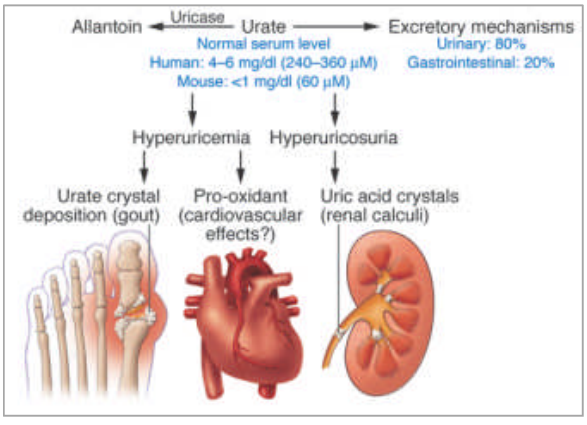

Figure 7 : Dérèglement de l'homéostasie de l'acide urique provoque l'hyperuricémie et l'hyperuricosurie (So et Thorens, 2010).

IV- La goutte

IV.1 Définition

La goutte est l'une des maladies les plus anciennes du monde animal, comme le montre le célèbre squelette de Sue (Tyrannosaures rex) avec des lésions osseuses caractéristiques. En outre, l'arthrite goutteuse a été parmi les premières maladies à être reconnu comme une entité clinique. D'abord identifiée par les Égyptiens à 2640 av. J.-C. ; elle a été reconnue plus tard par Hippocrate dans le Ve siècle avant J.-C. et, six siècles plus tard, par Galien (Nuki et Simkin, 2006 ; Punzi et *al*., 2012).

La goutte est une forme courante d'arthrite causée par la réaction inflammatoire due à la formation des cristaux d'urate mono-sodique dans les articulations. Initialement, la maladie se présente comme une autolimitation des attaques d'inflammation articulaire sévère ; et en présence d'une hyperuricémie persistante, la goutte chronique peut également se développer avec les tophi et la synovite chronique (Nuki et Simkin, 2006 ; Rome et *al*., 2011).

IV.2 Physiopathologie et caractéristiques cliniques

Les manifestations cliniques de la goutte se produisent en raison du dépôt de l'urate de sodium dans les fluides corporels. L'urate de sodium peut se déposer dans et autour des articulations, mais aussi dans d'autres tissus pendant des années avant qu'une véritable crise goutteuse se produit (Falasca, 2006).

Le développement de la goutte passe par 4 étapes : l'hyperuricémie asymptomatique, l'attaque goutteuse, la période inter-critique, et l'arthrite goutteuse chronique. Après des années de l'existence d'une hyperuricémie asymptomatique, une attaque goutteuse peut se produire et elle est généralement mono-articulaire et l'articulation métatarso-phalangienne est la première articulation attaquée dans environ la moitié des patients. Souvent, une goutte poly-articulaire sévère peut être la toute première manifestation de la maladie. La période inter-critique commence après la résolution de la première crise. Durant cette phase, les articulations semblent revenir à la normale entre les attaques. Ces dernières peuvent avoir des mois ou des années d'intervalle au début, mais elles ont tendance à devenir plus fréquentes avec le temps, et impliquer davantage les articulations (Falasca, 2006).

Le stade de la goutte chronique se produit par l'accumulation d'urate de sodium autour des tissus provoquant ainsi la formation de tophus, nodules blanchâtres, très ferme à la palpation et peut être confondu avec soit des tumeurs ou des infections chroniques (Figure 8) (Falasca, 2006).

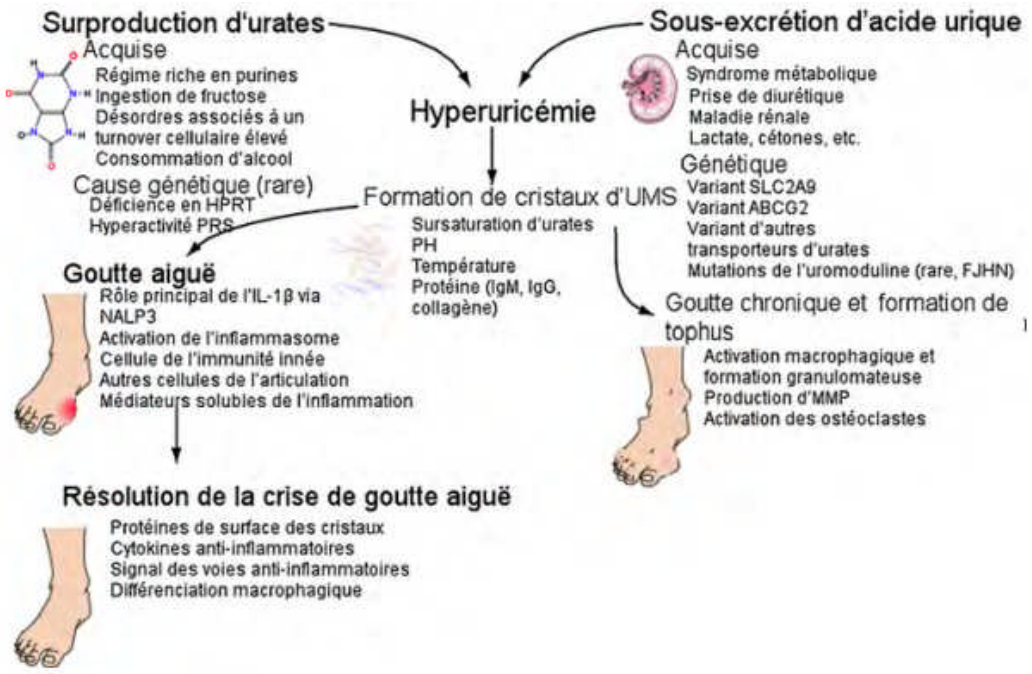

Figure 8 : Points de régulation essentiels de la pathogénie de la goutte (Merriman et Dalbeth, 2010).

IV.3 Traitements de la goutte

IV.3.1 Traitements non médicamenteux

Le traitement non pharmacologique consiste à la diminution de l'apport en purine pour diminuer le taux de formation de l'AU, et ce en ayant recoure à des règles hygiéno-diététiques (modification des habitudes alimentaires, perte de poids) et un arrêt ou substitution de médicaments hyperuricémiants tels que les diurétiques ou l'aspirine (Richette, 2011).

IV.3.2 Traitements médicamenteux

Le traitement de la goutte se réalise par deux traitements : le traitement de la crise de goutte aiguë et le traitement hypo-uricémiant. Le premier traitement se fait par la prise de la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ou les deux à la fois, alors le second se fait par prise de médicaments hypo-uricémiants favorisant l'élimination ou la dégradation de l'AU, ou bien l'inhibition de la synthèse de l'AU via l'inhibition de la XO**,** en utilisant le fébuxostat et l'allopurinol (Figure 9) (Dalbeth et Stamp, 2007 ; Richette, 2010 ; Ea, 2012). L'allopurinol est recommandé pour être la première ligne de diminution de l'AU chez les patients goutteux et d'insuffisances rénales (Dalbeth et Stamp, 2007).

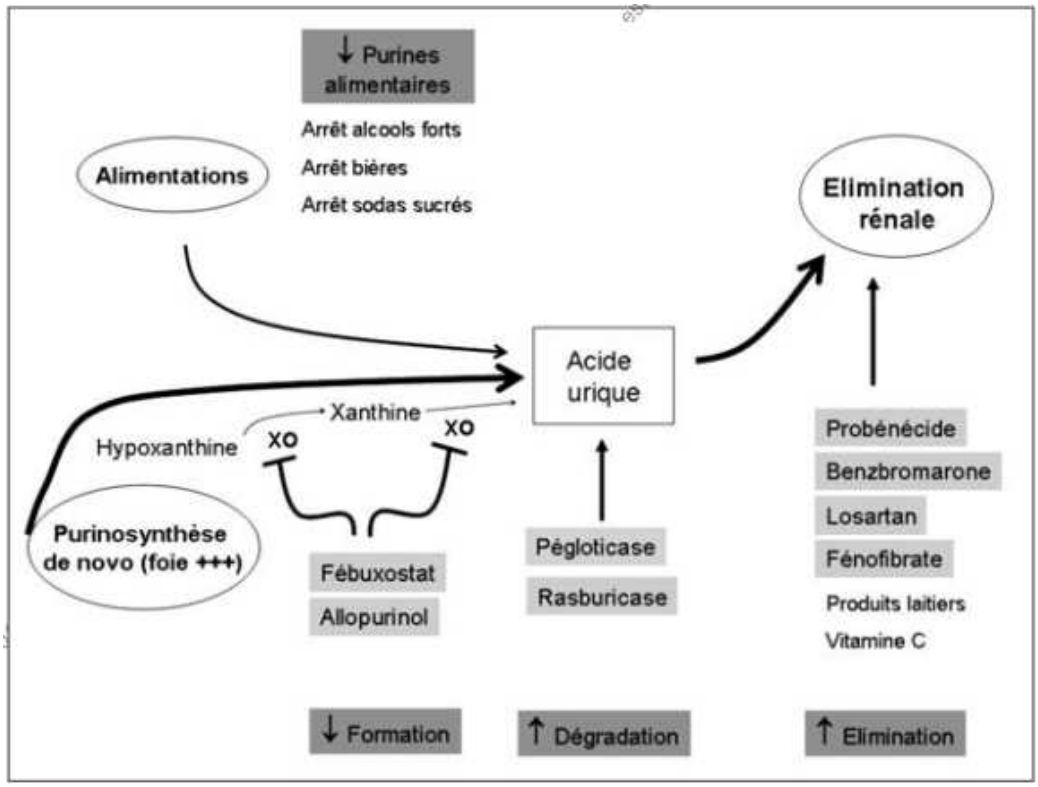

Figure 9 : Acide urique et mécanisme d'action des traitements hypo-uricémiants (Ea, 2012).

IV.3.2.1 L'allopurinol

L'allopurinol a été introduit, en 1963, comme un inhibiteur de la XO et une substance concomitante avec des médicaments de chimiothérapie contre le cancer. Il est utilisé dans le traitement la goutte et de l'hyperuricémie (Hitchings, 1966 ; Klein et *al*., 1996 ; Peglow et *al*., 2011).

L'allopurinol est le médicament hypo-uricémiant le plus utilisé en médecine humaine et vétérinaire pour traiter l'hyperuricémie primaire et secondaire. De structure analogue à l'hypoxanthine (Figure 10), il est à la fois un substrat et un inhibiteur compétitif de la XO. Il est métabolisé par la XO en Oxypurinol, lui-même inhibiteur non compétitif de la XO (Hitchings, 1966 ; Klein et *al*., 1996 ; Dallwig, 2010 ; Faure, 2010).

L'allopurinol réduit la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de xanthine en AU dans le foie. L'allopurinol diminue donc le taux d'AU dans le plasma et augmente les concentrations d'hypoxanthine et de xanthine. Ces derniers sont plus solubles que l'AU et sont éliminées par voie urinaire (Hitchings, 1966 ; Klein et *al*., 1996 ; Dallwig, 2010 ; Faure, 2010).

IV.3.2.2 Effets cliniques de l'allopurinol

IV.3.2.2.1 Effets thérapeutiques

Le traitement à l'allopurinol réduit le niveau d'urate sérique (US) au-dessous du seuil de la sursaturation jusqu'à atteindre des niveaux en dessous de 0.36 Mmol/l pour permettre la dissolution des cristaux d'urate mono-sodiques existants dans les articulations, mais aussi pour arrêter le dépôt de nouveaux cristaux (Figure 10) (Baer, 1997 ; Reinders et *al*., 2011).

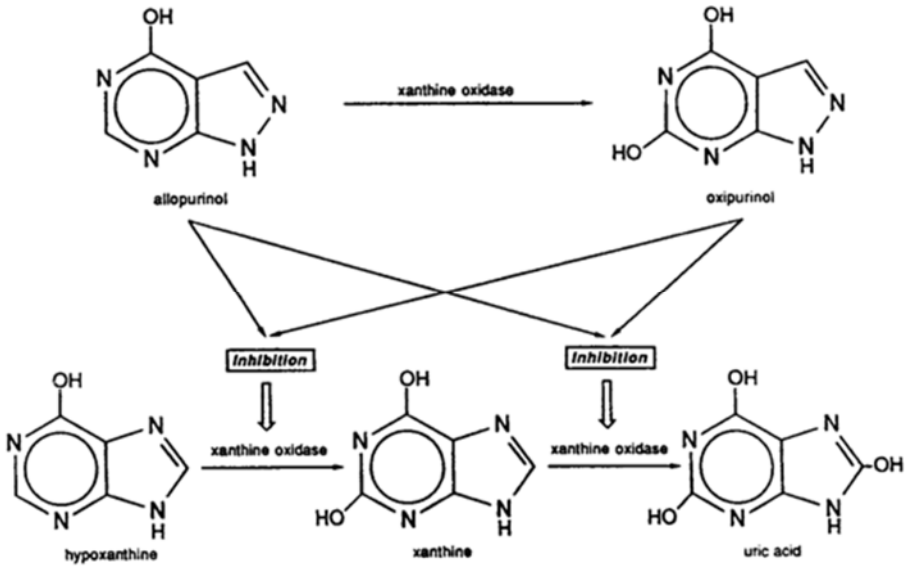

Figure 10 : Les effets inhibiteurs de l'allopurinol et de son métabolite, Oxypurinol (Baer, 1997).

IV.3.2.2.2 Effets secondaires

Les effets secondaires de l'allopurinol sont présents chez environ 2 % des patients. Il peut être associé à un syndrome rare potentiellement mortel, il s'agit de l'hypersensibilité à l'allopurinol, qui se caractérise par une éruption cutanée (par exemple, syndrome de Lyell et la dermatite exfoliative), éosinophilie, leucocytose, de la fièvre, l'hépatite et insuffisance rénale progressive (Dalbeth et Stamp, 2007 ; Fravel et Ernst, 2011).

IV.3.3 Traitements par phytothérapie

Les médicaments hypo-uricémiants ont été confirmés d'avoir des effets indésirables. C'est pourquoi il y a eu le recours à la médecine traditionnelle.

V- La médecine traditionnelle

V.1 Généralité

L'expression « médecine traditionnelle » se rapporte aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage de plantes à des fins médicales (Eddouks et *al.*, 2007). L'effet bénéfique de ces plantes est dû à leurs richesses en métabolites primaires, mais aussi en métabolites secondaires, dont les composés phénoliques, les flavonoïdes, les quinones, etc. (Heldt, 2005 ; Zhang et *al*., 2011).

V.2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ont été considérés comme des déchets jusqu'au début du XXe siècle. Leur importance en tant que drogues médicinales, antibiotiques, insecticides et d'herbicides a été démontré dans plusieurs études (Taiz et Zeiger, 2002 ; Fraga, 2010). Ces métabolites secondaires peuvent être divisés en trois groupes distincts : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (Figure 11) (Taiz et Zeiger, 2002).

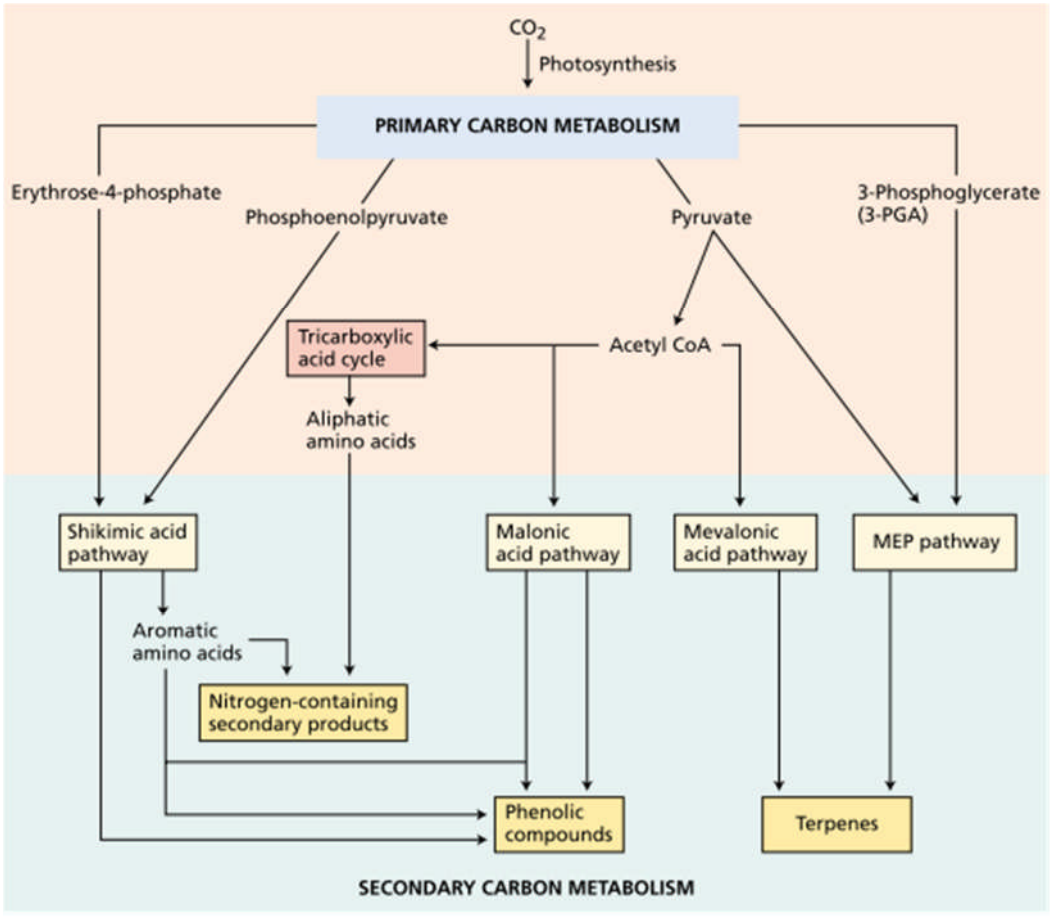

Figure 11 : Les principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires (Taiz et Zeiger, 2002).

V.2.1 Polyphénols

Les polyphénols ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Marcheix et *al*, 2005). Ils peuvent être devisés en de nombreuses classes (voir annexe Tableau I) qui se différencient par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation..) et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines…) (Marcheix et *al*, 2005).

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies différentes : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique. La voie de l'acide shikimique participe à la biosynthèse de la plupart des composés phénoliques végétaux (voir annexe Figure 2) (Taiz & Zeiger, 2002).

V.2.2 Terpènes

Les terpènes sont des substances importantes dans la protection des plantes contre les agressions des champignons et d'autres bactéries. Ils sont omniprésents dans le monde végétal (Collet, 2002). Ce sont des substances volatiles et employées comme condiments, parfums et comme solvants. Ils sont biosynthétisés à la suite du couplage d'aux moins de deux entités moléculaires à cinq atomes de carbones, appelées entité isoprène (Vollhardt & Schore, 2004).

Malgré leur diversité, tous les terpènes ainsi que leurs dérivés, possèdent en commun une voie de biosynthèse appelée voie de l'acide mévalonique. Elle débute par l'acétylcoenzyme A (acétyle-CoA). Trois molécules d'acétyle CoA se condensent lors d'une réaction en deux temps formant le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) qui ensuite transformé en acide mévalonique (MVA) (voir annexe Figure 3) (Hopkins, 2003).

Ainsi, les traitements hypo-uricémiants penchent de plus en plus vers l'utilisation des plantes médicinales, et le tableau suivant représente quelqu'une des plantes à effets hypo-uricémiant.

Tableau II : Représentation de quelques plantes médicinales à effets hypo-uricémiant.

Plante	*Partie utilisée*	*Type de l'extrait*	*Effets*	*Référence*
Biota orientalis	Feuilles	Extrait éthanolique	Inhibition de l'activité de la XO/XDH	(Zhu et *al*., 2004)
Cinnailmomum cassia	Écorce des tiges	L'huile de cassia	Inhibition de l'activité de la XO/XDH	(Zhao et *al*., 2006)
Cinnamomum osmophloeum	Feuilles	L'huile de cassia	activité inhibitrice de l'activité XOD.	(Wang et *al*., 2008)
Coccinia grandis ***Vitex negundo***	Feuilles	Extrait méthanolique	Inhibition de la xanthine oxydase et activité antihyperuricémique	(Umamaheswari et *al*. 2007)
Lychnophora trichocarpha	Partie arienne de la plante	Extrait éthanolique Fraction d'éthyle acétate	Inhibition de la xanthine oxydase	(de Souza et *al*., 2012)
Phellodendron chinense ***Atractylodes lancea***	Ecorces Partie souteraraine	Extrait aqueux	effets relativement inhibiteurs sur l'activité de XDH et XO	(Kong et *al*., 2004)
Phellodendron chinense ***Atractylodes lancea*** ***Achyran-thes bidentata BL*** ***Coix lacryma-jobi L***	Écorce Partie souterraine Racines Graines	Extrait aqueux	actions uricosuriques et néphroprotecteur	(Hu et *al*., 2010)
Phyllanthus niruri	Feuilles	Extrait méthanolique Lignanes	Action uricosurique et inhibition de la xanthine oxydase Action uricosurique	(Murugaiyah et Chan, 2009)
Pistacia integerrima	Feuilles	Fraction d'éthyle acétate	Une activité inhibitrice de la xanthine oxydase	(Ahmad et *al*., 2009)
Ramulus Mori	Branches	Extrait éthanolique	effets uricosuriques et amélioration du dysfonctionnement rénal	(Shi et *al*., 2012)
Smilax china L	Parties souterraine	Fraction d'éthyle acétate	Inhibition de l'activité XOD et l'amélioration de l'excrétion d'urate par l'augmentation du volume urinaire	(Chen et *al*., 2011)

Les extraits de feuilles de *Clematis flammula*, ont démontré une bonne activité antioxydant *in vitro*, notamment le pouvoir réducteur, l'activité anti-radicalaire ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ [acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique]) et activité anti-enzymatique XO (Atmani et *al.*, 2011).

Il est connu que la réduction de la concentration de l'anion super-oxyde est faite parallèlement avec la diminution du taux de l'acide urique dans le sang suite à l'action de l'enzyme XO.

Ainsi, l'objectif de notre étude s'inscrit sur la détermination d'un effet hypo-uricemique de l'extrait éthanolique *in vivo* de feuilles de *Clematis flammula* à des doses 100, 200 et 400 mg/Kg sur le niveaux de l'acide urique sérique chez les souris normales et hyper-uricemiques, en utilisant l'oxonate de potassium inhibiteur de l'uricase ainsi que l'effet inhibiteur de l'activité de la xanthine oxydoréductase dans le foie.

Partie pratique

Matériel et méthodes

I- Matériel

I.1 Matériel végétal

Le matériel végétal choisi pour cette étude est une plante médicinale appartenant à la famille des Ranunculacea, très répondu en Algérie, et elle a une large utilisation dans la médecine traditionnelle, il s'agit de *Clematis flammula L.*

I.1.1 Description

La *Clematis flammula* ou clématite brulante est une liane dont les tiges grêles portent des feuilles caduques opposées, et les pétioles se tordent et s'enroulent sur le support (Figure 12) ; elles sont très divisées en 3 à 7 folioles elles-mêmes découpées en segments linéaires lancéolés. De juin à août dans les régions méditerranéennes, les fleurs très odorantes forment des bouquets lâches lesquelles ont des sépales blanches veloutés et de nombreuses étamines formant un dôme ; plusieurs pistils évoluent chacun en un fruit élémentaire sec (akène) surmonté d'une arête plumeuse. À la fructification, l'ensemble évoque un nuage cotonneux (Lemoine, 2005).

Embranchement : Angiospermes
Classe : Eudicots
Ordre : Ranunculales
Famille : Ranunculacées
Genre : *Clematis L*
Espèce : *Clematis flammula L*
Nom vernaculaire Berbère : Azanzou
Nom vernaculaire Français : Clématite brulante

Figure 12 : Classification de la *Clematis flammula* ainsi qu'une représentation photographique (photo prise à l'université de Bejaïa).

I.1.2 Utilisation médicinale

Les parties aériennes de diverses espèces de clématite sont particulièrement utilisées en Europe et en Asie de l'Est comme un remède pour réduire la douleur et la fièvre et comme diurétique. Elles sont utilisées également dans le traitement des douleurs rhumatismales, les infections oculaires, les symptômes gonorrhéique, les maladies osseuses, les maladies chroniques de la peau, mais aussi dans le traitement de la goutte et varicosité (Chawla et *al*., 2012).

Des données ethnopharmacologiques obtenues à partir des herboristes indiquent que les feuilles de *C. flammula* L. sont utilisées pour traiter l'arthrite et des brûlures superficielles. Elles sont aussi utilisées comme un insectifuge pour prévenir la détérioration de blé et de maïs stockés (Chawla et *al*., 2012).

La clématite brûlante est utilisée dans le traitement des affections du foie et de la rate, ses multiples propriétés à savoir révulsives, vésicantes et dans le traitement de la maladie dite bûzelûm (sorte de sciatique) ont été mises de profils en réalisant un cataplasme avec la plante fraîche, à raison d'une application le soir sur le pied (Boullard, 2001 ; Benkhnigue, 2011).

I.1.3 Localisation

En Algérie, elle a une répartition assez vaste, elle en va du sahel littoral oranais et algérois, la grande Kabylie, la petite Kabylie, la Numidie, hauts plateaux algérois, oranais et constantinois, l'Atlas saharien oranais, algérois, et constantinois, Sahara septentrional occidental, oriental, et enfin le Sahara Central (Medjahdi et al., 2009).

I.1.4 Composition chimique

Les espèces de clématites ont un large éventail de composants tels que des tri-terpènes, des flavonoïdes, des lignanes, des coumarines, des alcaloïdes, des huiles volatiles, des stéroïdes, des acides organiques, des composés macrocycliques, des polyphénols… etc. Parmi ceux-ci, les saponines triterpénoïdes, les flavonoïdes et les lignanes constituent les principales catégories de constituants chimiques (Chawla et *al*., 2012).

I.1.5 Toxicité de la *Clematis flammula* :

La *C. flammula* étant fraiche contient une toxicité importante due à la présence de protoanimonines (une lactone insaturée instable), un composé qui est hydrolysé en anémonine (un métabolite inoffensif) puis en un acide carboxylique non toxique au séchage (Figure 13 :

a). Un autre constituant qui est l'alcaloïde clématine a été signalé d'avoir des effets toxiciques (Figure 13 : b) (Chawla et *al*., 2012).

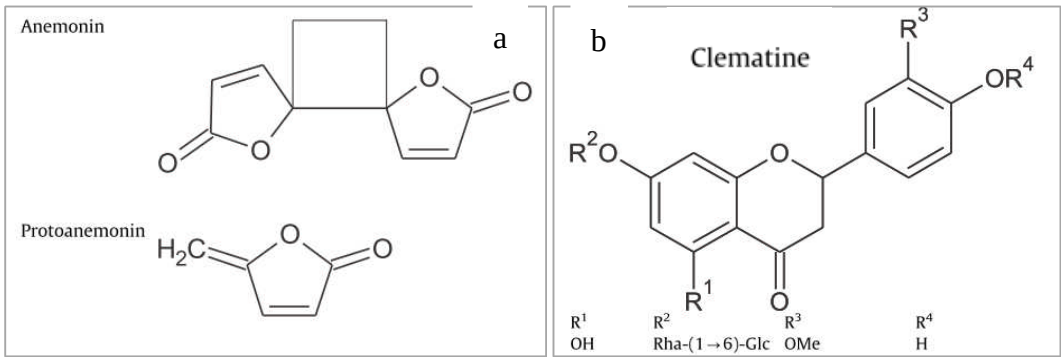

Figure 13 : Structure des composés toxique de *Clematis flammula* L **(**Chawla et *al*., 2012**)**.

I.2 Matériel animale

Cette étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles albinos obtenues par l'Institut Pasteur, pesant entre 17 g à 26 g. Les animaux ont été logés dans des cages de polypropylène dans une animalerie bien aérée à température ambiante soumise à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les animaux ont été nourris avec des granulés alimentaires commerciaux, fournis par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia, et de l'eau potable.

II- Méthodes

II.1 Préparation de la poudre végétale

II.1.1 Récolte

La plante a été récoltée, dans la forêt d'Azru n Bechar à Amizour, 30 km du centre-ville de la wilaya de Bejaïa, en mois de juin 2012. L'identification de cette plante comme étant la clématite « *Clematis flammula* », a été effectuée au niveau du laboratoire de botanique de l'université de Bejaia.

II.1.2 Séchage

Des feuilles de *Clematis flammula* ont été séchées dans un endroit aéré et ombragé, afin d'éliminer toute trace d'humidités et pour assurer une meilleure élimination d'eau tout en préservant la composition en composés phénoliques.

II.1.3 Broyage et tamisage

Après le séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (IKA) puis le broyat obtenu a été tamisé via une série de tamiseurs jusqu'à l'obtention d'une poudre fine

de diamètre 63um. La fine poudre résultante a été conservée dans un récipient hermétique jusqu'au moment de l'utilisation.

II.1.4 Extraction

L'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre fine des feuilles de *Clematis flammula* a été réalisée par macération. 180 g de poudre des feuilles ont été macérés dans l'éthanol (96 %) avec un rapport de 1:4 (m/v) à température ambiante, à l'abri de la lumière sous agitation pendant 24 h. Le mélange a été décanté dans des éprouvettes pendant 24 h. Le surnageant récupéré (extrait éthanolique) a été versé dans des cristallisoirs et a été soumis à un séchage sous la hotte jusqu'à la stabilisation complète de son poids sec (Figure 14). Une fois séché, l'extrait éthanolique (EÉ) obtenu est stocké dans un congélateur (-20 °C) jusqu'au moment de l'utilisation dans l'expérimentation *in vivo*.

Le pourcentage d'extraction est calculé selon la formule suivante :

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

P_1 : Poids d'extrait après évaporation (g) ; P_0 : Poids vide de la boite de pétri (g). ; E : poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

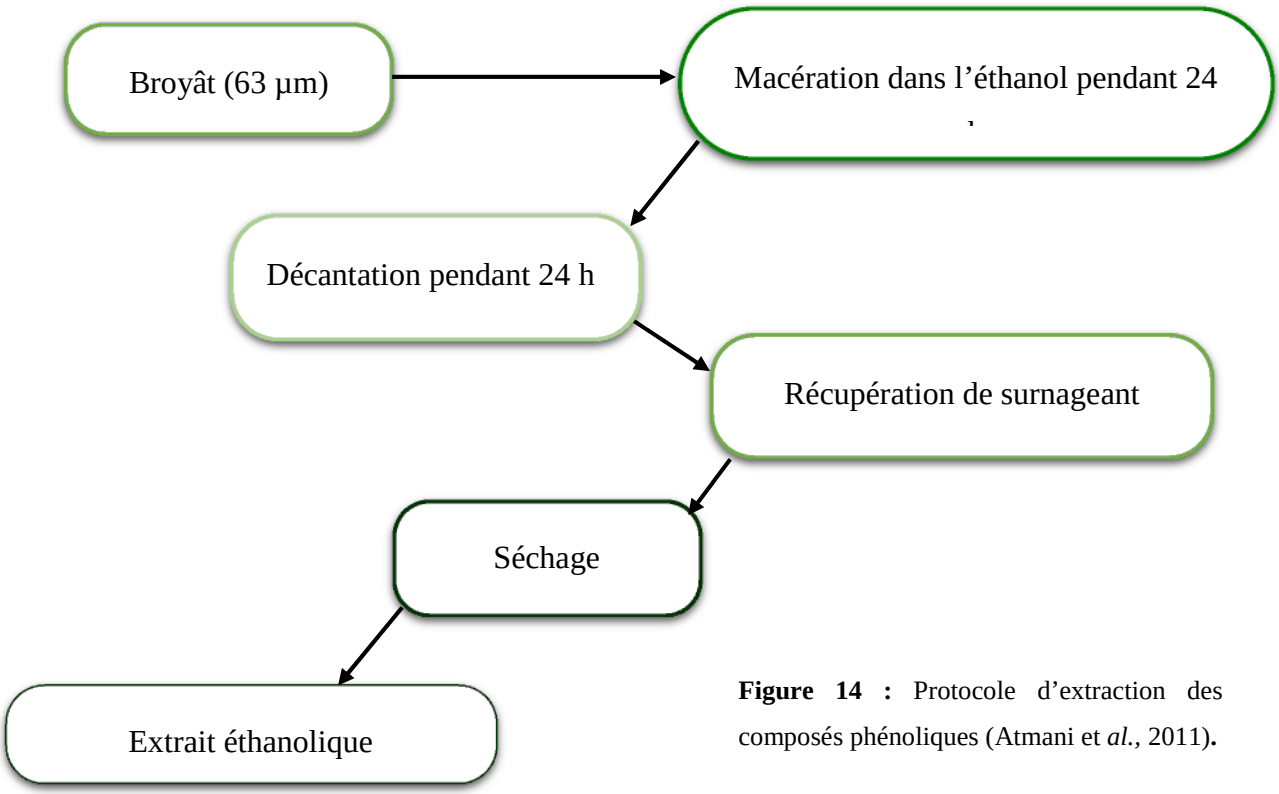

Figure 14 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (Atmani et *al.*, 2011).

II.2 Evaluation *in vivo* de l'activité anti-hyperuricémique de l'extrait brut de feuilles de *Clematis flammula.*

II.2.1 Traitement des animaux

Au total, 60 souris males ont été utilisées dans cette étude, elles ont été réparties selon l'homogénéité de leurs poids en 10 groupes, 5 groupes normaux et 5 autres groupes hyperuricémiques, de 6 souris chacun. Elles ont été traitées quotidiennement pendant 03 jours, par voie intra-gastrique et intrapéritonéale.

II.2.2 Principe de ce test

Le principe du test se repose sur l'inhibition de l'uricase, enzyme uricolytique hépatique qui catalyse la conversion de l'acide urique en composé plus excrétable l'allantoïne, par l'oxonate de potassium qui est un analogue d'oxypurine et il est un inhibiteur efficace et sélectif de l'uricase. Il bloque la conversion et l'excrétion métaboliques de l'acide urique sans effectuer la biosynthèse, ainsi ayant pour résultat des accumulations *in vivo* de cette substance (Figure 15) (Gralla et Crelin, 1976).

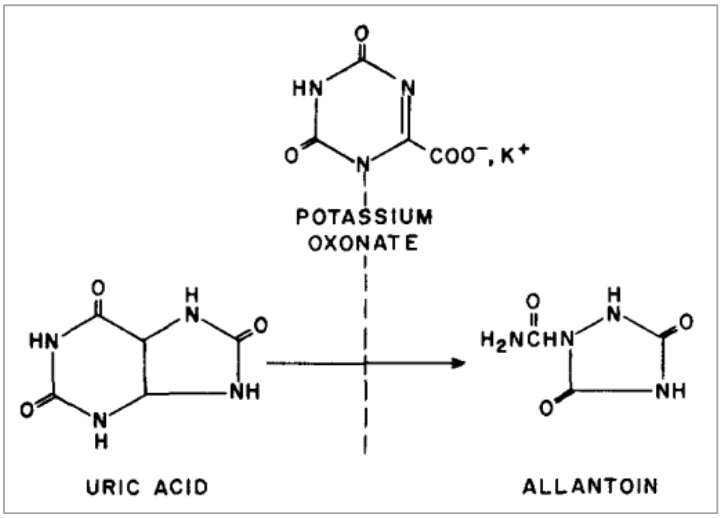

Figure 15 : L'oxydation de l'acide urique en l'allantoïne qui peut être bloquée par l'Oxonate de potassium, agent inhibiteur de l'uricase (Gralla et Crelin, 1976).

II.2.3 Préparation de souris hyperuricémiante et administration des médicaments

Le traitement pendant trois jours des différents groupes de souris utilisés dans ce test anti-hyperuricémie *in vivo* a été réalisé selon la méthode décrite par de Souza et ses collaborateurs (2012). Les groupes normaux de souris à savoir groupe véhicule, contrôle 100, contrôle 200, contrôle 400 et groupe témoin (allopurinol) ont été injectés par l'eau distillée. Une administration par voie intra-gastrique (Figure 16) de CMC (0,8 %) pour groupe normal, de l'extrait éthanolique à différentes concentrations 100, 200 et 400 mg/kg pour les trois groupes contrôle 100, 200 et 400 respectivement, et l'allopurinol à une dose de 10mg/kg pour le lot témoin a été entrepris, après une heure de l'expérience (Tableau III).

Simultanément, une hyperuricémie est induite, par voie intrapéritonéale (Figure 16), chez toutes les souris des groupes hyperuricemiques par l'oxonate de potassium (250mg/kg) dissout dans l'eau distillée, inhibiteur de l'uricase. Après une heure, les souris du groupe hyperuricémique ont été gavées par l'eau distillée, alors que les autres groupes notamment ; test 100, test 200, test 400 et groupe témoin, ont été traités avec de l'extrait éthanolique de feuilles de *Clematis flammula* à différentes doses 100 , 200 et 400 mg/kg et allopurinol respectivement, dissous dans le carboxyméthylique cellulose (CMC 0.8 %). (Tableau III). Les volumes administrés étaient basés sur le poids corporel mesuré avant chaque dose. La nourriture et l'eau ont été retirées une heure (1 h) avant l'expérience.

Figure 16 : Voie intrapéritonéale (à gauche) et voie intra-gastrique (à droite).

Tableau III : Répartition des lots entre les deux groupes normaux et groupes hyperuricémiques.

	lots	*1er administration*	*2eme administration*
Groupes Normaux	Normal	Eau distillée	CMC 0.8 %
	Contrôle 100		Extrait 100mg/kg
	Contrôle 200		Extrait 200mg/kg
	Contrôle 400		Extrait 400mg/kg
	Allopurinol		Allopurinol 10mg/kg
Groupe Hyperuricémiques	Hyperuricémique	Oxonate de potassium	CMC 0.8 %
	Test 100		Extrait 100mg/kg
	Test 200		Extrait 200mg/kg
	Test 400		Extrait 400mg/kg
	Allopurinol		10mg/kg

II.2.4 Prélèvement du sang et sacrifice des animaux

Une heure après la dernière administration, les souris ont été anesthésiées puis sacrifiées. Le sang a été collecté et soumis à une centrifugation à 5000rpm pendant 10 minutes. Le sérum récupéré a été conservé dans le congélateur (-20 °C). Simultanément, les foies ont été rapidement et soigneusement séparés, lavés dans du KCl froid (0.15 M), découpés en petits morceaux puis conservés à -80 °C pour des essais ultérieurs.

II.3 Analyses biochimique

II.3.1 Détermination du taux d'acide urique sérique

Le taux d'acide urique sérique a été déterminé par spectrophotométrie en utilisant un kit standard avec pour principe ce qui suit :

$$Acide\ urique\ +\ O2\ +\ 2\,H2O\ \xrightarrow{\text{Uricase}}\ Allontoïne + CO2 + H2O2$$

$$2\,H2O2 + DCHBS + PAP\ \xrightarrow{\text{Peroxydase}}\ quinonéimine\ HCl + 4\,H2O$$

20 µl de sérum ont été ajoutés à 1 ml de mélange réactionnel. Le tout a été mis dans une étuve pendant 5 min à 37 °C et l'absorbance a été lue à 520 nm contre un blanc contenant l'acide urique. La concentration de l'acide urique a été déterminée selon la formule suivante :

$$Concetration\ de\ l'acideurique\ (mg/dl) = \frac{l'absorbance\ standard}{l'absorbancede\ l'echantillon} \times 8$$

II.3.2 Détermination des activités XO / XDH du foie des souris

Les foies conservés à – 80 °C ont été broyés manuellement avec un volume de tampon glacé de phosphate de potassium (0.05 M, pH 7.5, à raison de 10 % p/v) contenant 0.5mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). L'homogénat a été ensuite centrifugé à 5000rpm pendant 10 min. La couche lipidique a été soigneusement éliminée et le surnageant résultant a été encore centrifugé à 5000rpm pendant 10 min (Raju et *al.*, 2012).

Le surnageant obtenu a été utilisé pour le dosage des activités enzymatiques de la xanthine oxydase (XO) et de la xanthine déshydrogénase (XDH). Un volume de 100 µl d'homogénat a été ajouté à un mélange réactionnel contenant 3.5 ml de tampon phosphate de potassium et 1 ml d'oxonate (1Mm), pour la mesure de l'activité de la XDH, 0.5 ml de NAD^+ (200 µM) a été ajouté au mélange réactionnel.

Après une préincubation à 37 °C pendant 15 min, la réaction a été initiée en ajoutant 1 ml de xanthine (250 µM) le tampon phosphate de potassium (pH 7,5). Après 10min, la réaction a été stoppée par ajout de 0.5 ml de HCl (0.58 M) et le mélange a été centrifugé à 5000rpm pendant 5 min (Raju et *al.*, 2012). L'absorbance du surnageant a été mesurée à 290 nm et l'activité de XO/XDH a été exprimée en l'acide urique produit en nM/minute/milligramme de protéine.

II.3.3 Dosage des protéines

Le dosage de protéines contenues dans le plasma de chaque souris a été effectué par spectrophotométrie en utilisant la technique de Bradford (1976), en utilisant une protéine standard BSA (Bovine Sérum Albumine). Ce dosage est basé sur la réaction de bleu brillant de Coomassie G -250 (CBB) avec des résidus d'acides aminés basiques dans les protéines. La teneur en protéines a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec l'albumine sérique bovine (BSA) et exprimée en µg/mg de tissu hépatique (voir annexe Figure 5). L'absorbance sera mesurée à 595 nm.

II.4 Analyse statistique

Les résultats des tests *in vivo* ont été représentés pas leur moyenne et S.E.M. Les données expérimentales ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism 5.03. L'analyse à un facteur a été utilisée suivi par le test de Dunnett. Les valeurs $P \leq 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats et discussion

III- Résultats et discussion

III.1 Taux d'extraction

Le séchage des feuilles de *Clematis flammula* a été fait dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière, pour mieux préserver ses composés phénoliques des oxydations provoquées par les rayons et éliminer le maximum d'eau qui est une source d'oxydation des métabolites secondaires (Macheix et *al*.,2006) .

L'extraction de composés phénoliques à partir des différentes parties de la plante est influencée par différents paramètres à savoir la nature chimique de ces composés, le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage, ainsi que la saison de la récolte (Escribano et *al.*, 2003 ; Naczk, 2004 ; Atmani et *al.* 2009).

Dans cette étude, un taux d'extraction des composés phénoliques a été calculé pour l'extrait éthanolique de feuilles de *C. flammula*, et il est estimé à 11.3015 % ; une valeur proche de celle rapportée par Wang et *al.*, (2008) enregistrée pour l'extrait éthanolique des feuilles de « *Cinnamomom osmophloeum »*.

Umamaheswari et *al*. (2007) ont réalisé une étude sur six plantes médicinales, où l'extrait méthanolique des feuilles de ces différentes plantes a donné un taux d'extraction qui varie entre 8.3 % et 18.0 %, dont la valeur majeure et de 11 %. Confirmant le même effet entre les deux solvants (méthanol et éthanol) sachant qu'ils ont le même degré de polarité, mais la toxicité du méthanol rend l'éthanol le solvant le plus favorable pour l'extraction.

Cependant, une étude menée par Petlevski et ses collaborateurs (2013) en appliquant une extraction éthanolique et aqueuse par ultrasoncation sur *Pelargonium radula* a montré un taux d'extraction inférieur comparativement au taux d'extraction obtenue avec macération (solide liquide) appliquée sur les feuilles de *Clematis flammula*.

Une variation dans le taux d'extraction a été enregistré entre les résultats obtenus, et celles rapportées par Atmani et *al*. (2011) ayant appliqué le même protocole d'extraction sur les feuilles de la même plante. En effet, un taux de 20% a été exhibé par l'extrait éthanolique des feuilles. Cette différence peut être justifiée par le changement des saisons.

III.2 Effet de l'extrait éthanolique sur le niveau de l'acide urique sérique

L'acide urique est le produit final de la dégradation des purines par la xanthine oxydoréductase. L'augmentation du niveau de l'acide urique dans le sang provoque une hyperuricémie qui peut engendrer plusieurs maladies à savoir la goutte (Watts, 1974).

III.2.1 Chez les souris normales

Les résultats du taux d'acide urique dosé dans le sérum des souris normales et hyperuricémiques traitées par l'extrait éthanolique à des doses 100, 200 et 400 mg/Kg et l'allopurinol à une dose de 10 mg/Kg sont représentés dans le Tableau IV.

Tableau IV: L'effet de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* sur le niveau de l'acide urique chez les souris normales et hyperuricémique.

Traitement	*dose (mg/Kg)*	*Nombre*	*niveau de l'acide urique (mg/dl)*
souris normal			
Véhicule		6	3.01 ± 0.19
Contrôle 100	100	6	$1.29 \pm 0.22^{**}$
Contrôle 200	200	6	$1.29 \pm 0.16^{**}$
Contrôle 400	400	6	1.76 ± 0.30
Allopurinol	10	6	$0.31 \pm 0.02^{***}$
Souris hyperuricémiques			
Hyperuricémie		6	$4.50 \pm 0.12^{***}$
Test 100	100	6	$0.69 \pm 0.06^{###}$
Test 200	200	6	$0.69 \pm 0.06^{###}$
Test 400	400	6	$1.39 \pm 0.18^{###}$
Allopurinol	10	6	$0.33 \pm 0.02^{###}$

Les données sont représentées en moyenne ± S.E.M. **P < 0.01, ***P < 0.001 comparé au groupe normal. ###P < 0.001 comparé aux souris hyperuricémiques.

Chez le groupe véhicule, le niveau de l'acide urique sérique est de 3.01 ± 0.19 mg/dl, un taux équivalent à ceux rapportés par plusieurs études *in vivo* (Kong et *al.*, 2004 et Umamaheswari et *al.*, 2007). Après traitement des souris, pendant trois jours, avec l'allopurinol

(inhibiteur de la synthèse de l'acide urique) à une dose de 10 mg /kg, une diminution significative ($P < 0.001$) du taux d'acide urique sérique enregistrant une valeur près de 10 fois moins celle obtenue par le véhicule (0.31 ± 0.02 mg/dl) a été obtenue.

Des études ont montré que l'utilisation de l'allopurinol à une dose de 10 mg/Kg était suffisante pour réduire le taux de l'acide urique sérique, et que cette diminution augmente avec l'augmentation de la dose (dose-dépendant) avec pour conséquence un dysfonctionnement rénal (Zhu et *al.*, 2004).

Par ailleurs, l'administration, par voie intra-gastrique, de l'extrait éthanolique à des doses 100 et 200 mg/Kg a provoqué une remarquable diminution significative ($P < 0.01$) du niveau de l'acide urique sérique avec des valeurs de 1.29 ± 0.22, 1.29 ± 0.16 mg/dl respectivement comparativement au taux enregistré par le véhicule. Cependant, le traitement avec l'EÉ à une dose de 400 mg/Kg n'a montré aucun effet statistiquement significatif avec 1.76 ± 0.3 mg/dl (Figure 17). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Kong et *al.* (2004), en étudiant les effets de Ermiao wan *in vivo* sur la réduction de l'acide urique sérique chez les souris hyperuricémique et l'activité de XDH et XO hépatique.

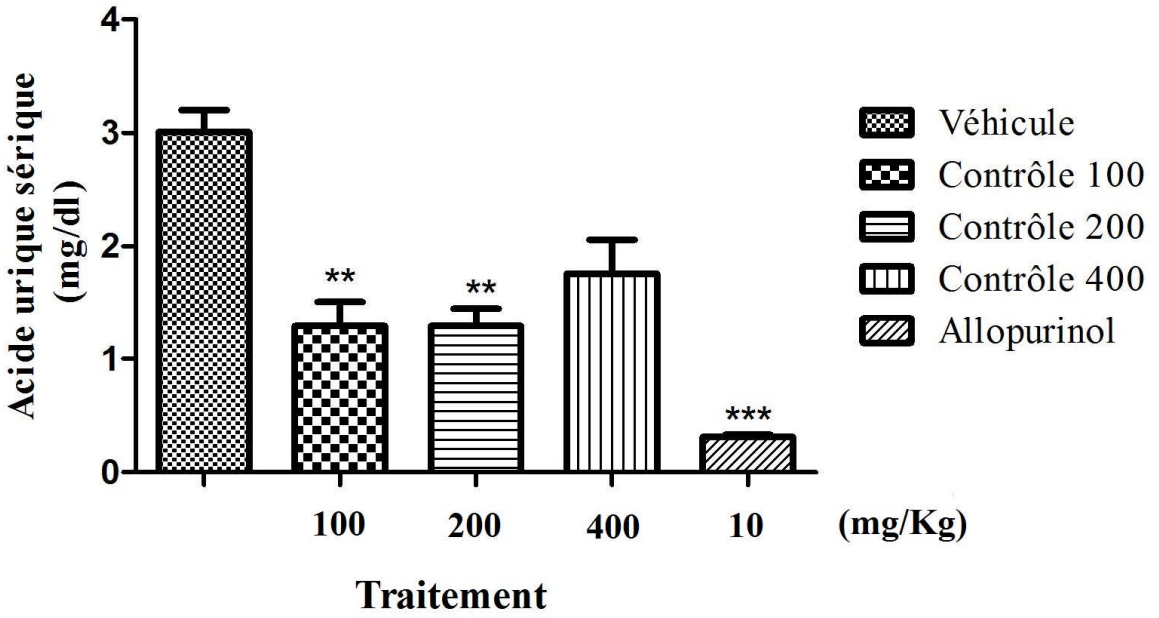

Figure 17 : Niveau de l'acide urique sérique chez les souris normales. Les données sont représentées en moyennes ± S.E.M. $^{***}P < 0.001$, $^{**}P < 0.01$ comparé au groupe véhicule.

III.2.2 Chez les souris hyperuricémiques

Les souris traitées avec l'oxonate de potassium peuvent servir comme un modèle animal de l'hyperuricémie pour évaluer les médicaments qui affectent le niveau de l'acide urique sérique et les agents thérapeutiques possibles dans certains troubles associés à des niveaux

d'acide urique anormal. L'oxonate de potassium ; un inhibiteur sélectif et compétitif de l'uricase ; bloque l'activité de l'uricase hépatique et produit une hyperuricémie chez les rongeurs (Chen et *al.*, 2011 ; Huang et *al.*, 2011).

Les effets hypouricémiants de l'extrait éthanolique et l'allopurinol chez les souris hyperuricémiques induits par l'oxonate de potassium sont représentés dans la figure suivante :

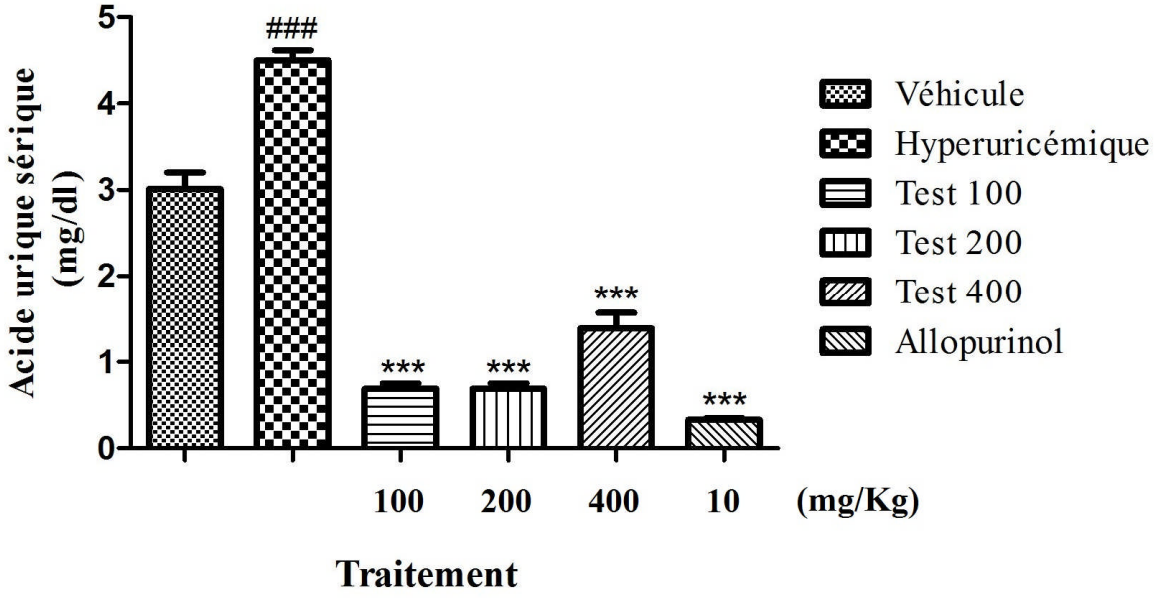

Figure 18 : Niveau de l'acide urique sérique chez les souris hyperuricémiques. Les données sont représentées en moyennes ± S.E.M. $^{***}P < 0.001$ comparé au groupe hyperuricémique, $^{###}P < 0.001$ comparé au groupe véhicule.

Le traitement des souris pendant trois jours avec l'oxonate de potassium par voie intrapéritonéale, a causé une hyperuricémie significative ($P < 0.001$) où le niveau de l'acide urique a atteint 4.50 ± 0.19 mg/dl, alors qu'il était de 3.01 ± 0.19 mg/dl chez le groupe véhicule. Cela est dû à l'inhibition de l'uricase, l'enzyme responsable de la dégradation de l'acide urique sérique en un composé plus excretable, l'allantoïne.

Cependant chez le groupe témoin traité par l'allopurinol à une dose de 10 mg/Kg par voie orale, une diminution significativement ($P < 0.001$) a été enregistrée avec un niveau de l'acide urique sérique de 0.33 ± 0.02 mg/Kg, mettant au claire la même marge de diminution observée entre le groupe de souris véhicule et groupe témoin (allopurinol).

Cela justifie l'utilité de cette molécule, allopurinol, dans la diminution de l'acide urique signalée dans la bibliographie.

Egalement, les traitements avec l'extrait éthanolique à des doses 100, 200, 400 mg/Kg montre une diminution très significative ($P < 0.001$) du niveau de l'acide urique sérique

comparé au groupe hyperuricémique. Les valeurs obtenues pour ces tests sont de 0.69 ± 0.06, 0.69 ± 0.06 et 1.39 ± 0.18 mg/dl respectivement.

Ce cas de figure a été mis en évidence dans des études récentes notamment dans celle de Wang et *al.* (2010) en étudiant l'effet antihyperuricémique d'un mélange des extraits de trois plantes à des doses 489, 978 et 1956 mg/Kg, mais aussi dans l'étude de Kuo et *al.* (2012) qui a été faite sur les effets hypouricémiants de *Habiscus sabdariffa* L. chez les rats hyperuricémiques.

En outre, Zhao et ses collaborateurs (2006) ont appliqué le même protocole sur des souris pendant trois jours afin d'étudier l'activité antihyperuricémique d'une plante « *Cinnamomum cassia »*, à des doses 300, 450 et 600 mg/Kg, où un effet hypouricémiant inférieur a été enregistré comparativement à celui obtenu suite au traitement avec l'extrait éthanolique de *Clematis flammula*.

Concernant le groupe témoin de souris, les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas une nette différence entre l'effet de l'administration, par voie intra-gastrique, des différentes doses de l'extrait éthanolique et celle de l'allopurinol. La même chose a été notée dans les études menées par Kong et *al.* (2004) et Umamaheswari et *al.* (2007).

D'après les résultats obtenus dans notre étude, il a été démontré que le traitement avec l'extrait éthanolique par voie intragastrique est capable de diminuer significativement le niveau de l'acide urique sérique chez les souris hyperuricémiques et normales. Cela, peut s'expliquer par l'augmentation du taux d'élimination par l'inhibition des transporteurs responsables de la réabsorption de l'acide urique ou bien par la stimulation des transporteurs responsables de l'excrétion (Hu et *al.*, 2010), ou par dégradation de l'acide urique à savoir l'activation de l'uricase (Kuo et *al.*, 2012).

En outre, des études antioxydants *in vitro* menées par Atmani et *al.* (2011) (Thèse) ont rapporté que l'extrait éthanolique de *C. flammula* possède une faible capacité inhibitrice de l'activité de la xanthine oxydase avec 20 % pour 100 µg/ml d'extrait éthanolique. À la même concentration, l'effet scavenger de cet extrait sur le radical produit par la xanthine à savoir l'anion superoxyde est de 34.6 %.

Et tant donné que la réduction de la concentration de l'anion superoxyde est équimoléculaire à la diminution du niveau de l'acide urique produit par la xanthine oxydase (Cos et *al.*, 1998), donc la diminution du taux d'acide urique sérique chez les souris normales et hyperuricémiques induites par l'extrait de cette plante peut être expliqué par l'inhibition de l'enzyme XO.

III.3 Effet de l'extrait éthanolique sur l'activité de la XO/XDH hépatique

La xanthine oxydase est l'enzyme responsable de la formation de l'acide urique à partir des purines, l'hypoxanthine et la xanthine. Elle est la première cible des traitements visant à soigner plusieurs maladies telles que l'hyperuricémie et la goutte (Havlik et *al.*, 2010).

III.3.1 Chez les souris normales

Le tableau V représente le taux de l'activité et le pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase et de la xanthine déshydrogénase chez les souris normales traitées avec l'extrait éthanolique à des doses croissantes (100,200et 400 mg/kg) et l'allopurinol à 10 mg/kg.

Tableau V : L'effet de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* sur l'activité de la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase chez les souris normales et hyperuricémiques.

Lots	*Dose (mg/Kg)*	*Activité (nmol/min/mg)*		*% d'inhibition*	
		XO	XDH	XO	XDH
Souris normales					
Véhicule		25.54 ± 1.08	25.19 ± 0.67	_	_
Contrôle 100	100	24.37 ± 3.58	54.28 ± 5.91**	_	_
contrôle 200	200	34.86 ± 8.23*	58.43 ± 5.91***	_	_
contrôle 400	400	27.40 ± 3.98	39.17 ± 4.00*	_	_
Allopurinol	10	05.66 ± 0.59*	05.99 ± 0.87	77.83%	76.19%
Souris hyperuricémiques					
Hyperuricémique		24.13 ± 1.19	28.30 ± 2.11	_	_
Test 100	100	31.79 ± 3.60	37.66 ± 4.56	_	_
Test 200	200	33.26 ± 3.80	52.92 ± 6.65$^{\#\#}$	_	_
Test 400	400	28.81 ± 2.86	45.91 ± 7.03$^{\#}$		
Allopurinol	10	08.97 ± 1.86$^{\#\#}$	08.90 ± 2.02$^{\#}$	62.82%	68.55%

Les données sont représentées en moyenne ± S.E.M. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 comparé au groupe normal. $^{\#}$P < 0.05, $^{\#\#}$P < 0.01 comparé aux souris hyperuricémiques.

Comparativement avec le groupe véhicule, le gavage du groupe de souris témoin par l'allopurinol (10 mg/Kg) a induit une diminution significative ($P < 0.05$) de l'activité de la XO et XDH dans le foie avec un pourcentage d'inhibition de 77.83 % et 76.19 % respectivement (Tableau V). Un taux d'inhibition de l'activité de la XO semblable a été approuvé par Murugaiyah et Chan (2009) en utilisant l'allopurinol comme molécule standard dans le test anti-hyperuricemique.

Le traitement par gavage avec l'extrait éthanolique à des doses 100, 200 et 400 mg/Kg n'a montré aucune diminution mais une augmentation de l'activité de la XO/XDH. Cela s'accorde bien avec les résultats obtenus par Huang et *al.*, (2011) rapportant une augmentation dans l'activité XO hépatique des souris hyperuricémiques suite à une administration intra-gastrique d'une molécule pure, la rutine, à des concentrations croissantes (75, 150 et 300mg/kg).

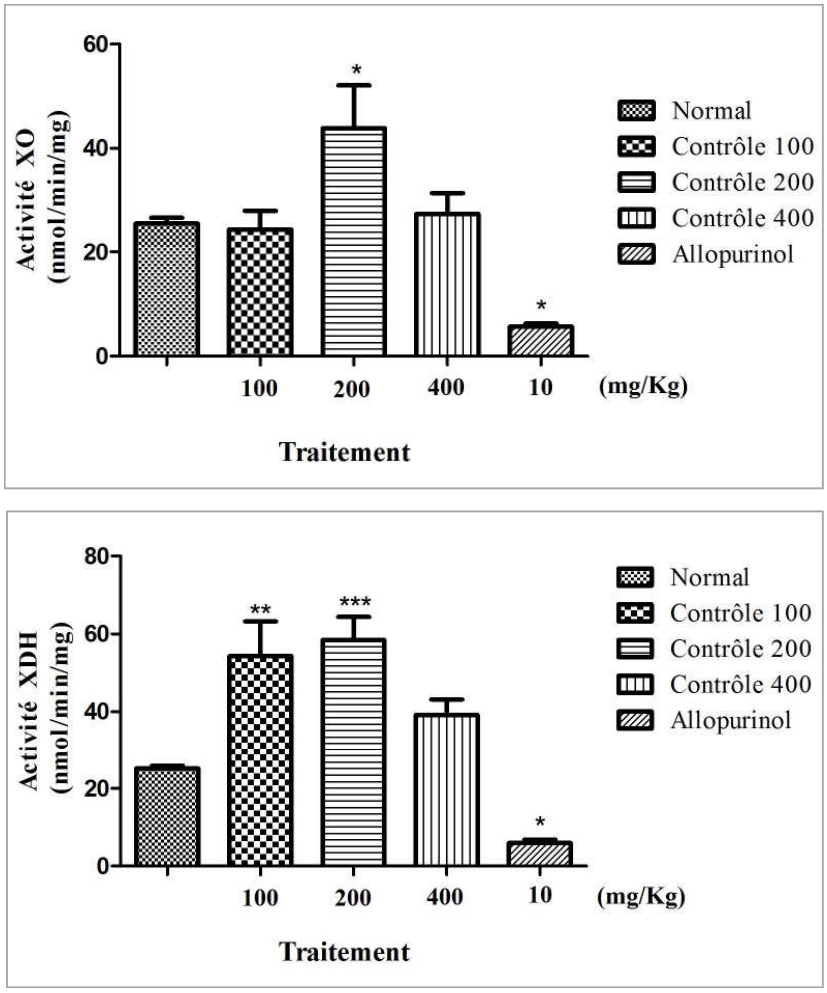

Figure 19 : Activité de XO (en haut) et XDH (en bas) chez les souris normales. Les données sont représentées en moyennes ± S.E.M. $^{***}P < 0.001$, $^{**}P < 0.01$ et $^{*}P < 0.05$ comparé au groupe Normal.

III.3.2 Chez les souris hyperuricémiques

L'activité et le pourcentage d'inhibition de XO/XDH chez les souris normales du groupe véhicule et hyperuricémiques traitées avec les doses 100, 200 et 400 mg/Kg d'extrait éthanolique et l'allopurinol à une dose 10 mg/Kg sont représentées dans la figure qui suit :

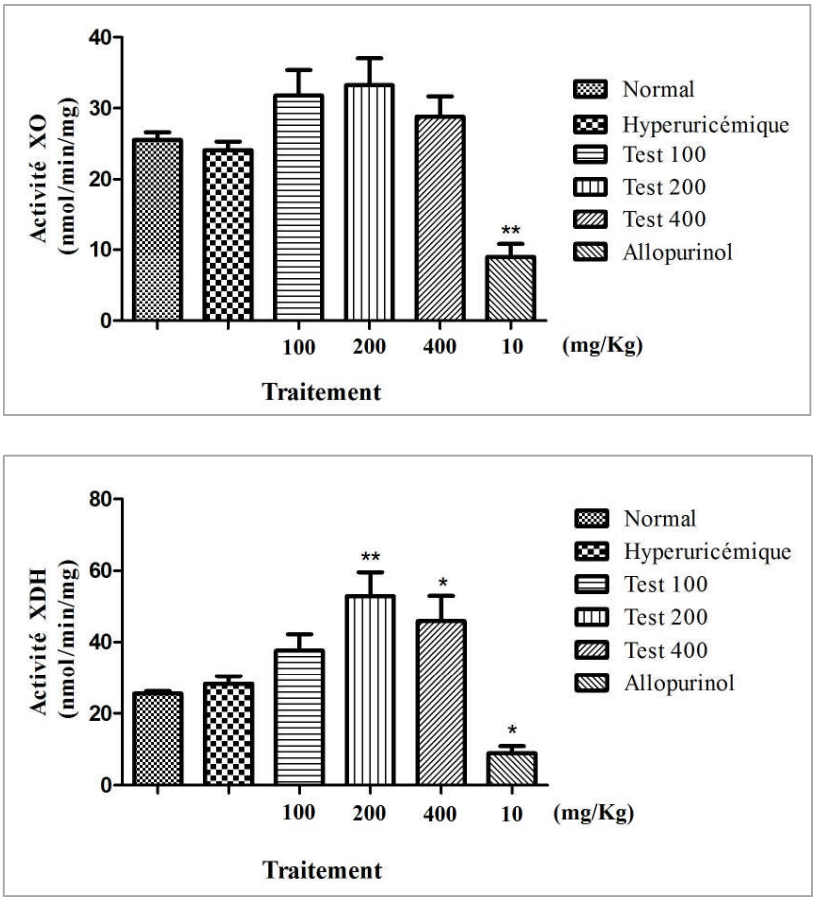

Figure 20 : Activité de XO (en haut) et XDH (en bas) chez les souris hyperuricémiques. Les données sont représentées en moyennes ± S.E.M. $^{**}P < 0.01$ et $^{*}P < 0.05$ comparé au groupe hyperuricémique.

Le même résultat de l'activité de la XO et de la XDH observé dans le test chez les souris normales, a été enregistré après le traitement par gavage des souris hyperuricémiques avec l'extrait éthanolique par différentes doses, où aucune diminution de l'activité de XO n'a été enregistrée par rapport au groupe hyperuricémique. Cependant, une augmentation significative des activités a été remarquée. Un cas de figure rapporté par Huang et *al*., (2011) en utilisant des molécules flavonoïques pures à doses croissantes notamment l'apigenine (175,350 et 700 mg/kg) et l'astilbine (1,3 et 9 mg/kg).

de Souza et *al.* (2012) ont rapporté des résultats similaires aux précédents dans une étude visant à évaluer l'activité anti-inflammatoire, antihyperuricémique et inhibitrice de XOD hépatique *in vivo* de *Lychonophora trichocarpha* et ses composés chez la souris. Une autre étude menée par Kuo et *al.* (2012) sur l'effet d'un extrait d'une plante *Hibiscus sabdariffa*, en utilisant des rats hyperuricémiques, a montré une absence d'inhibition de l'activité de la xanthine oxydases (XO).

Par ailleurs, après traitement pendant trois jours par l'allopurinol des souris hyperuricémiantes, les résultats obtenus ont montré, que cette molécule standard reste et demeure toujours l'inhibiteur le plus efficace dans l'inhibition de la XO/XDH. En effet, une diminution considérable de l'activité de XO/XDH a été enregistrée dans notre test avec un pourcentage d'inhibition de 62.82 % et 68.55 % respectivement, comparativement au contrôle hyperuricémique.

Plusieurs études récentes ont prouvé l'effet bénéfique des extraits de plantes dans le traitement de différente maladie notamment la goutte. Ces activités biologiques sont dues aux métabolites secondaires, dont des composés phénoliques à savoir les flavonoïdes qui sont représentés par plus de 4000 composés différents (Danny et *al.*, 2002). En effet des études structure-activité de ces derniers ont été mise en évidence, en démontrant l'importance de la structure et des groupements dans l'inhibition de la formation de l'acide urique *via* l'inhibition de l'activité de la XO, à savoir la présence du groupement hydroxyle en C-5 et C-7 du cycle A et la présence de la double liaison entre C-2 et C-3 du Cycle C (Cos et *al.*, 1998). Ammar et *al.* (2009) ont rapporté que le groupement hydroxyle en C-7 des flavonoïdes peut prendre la place de C-2 ou de C-6 dans le site actif de la xanthine.

Cependant, la xanthine oxydase hépatique n'a pas été affectée par l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula* à aucune des doses testées à savoir 100, 200 et 400 mg/kg. Ce qui indique que la diminution du taux d'acide urique sérique induit par l'extrait éthanolique ne s'effectue pas *via* l'inhibition de l'activité de la XO.

Selon la synthèse bibliographie rapportée précédemment, notre plante est très riche en saponines et flavonoïdes et le résultat obtenu dans le test enzymatique XO peut être expliqué soit ; par l'absence de composés dont la structure est favorable pour inhiber la XO à savoir l'inexistante de groupement hydroxyle en C-5 et C-7 et la double liaison entre C-2 et C-3 du Cycle C ; par la complexité de cet extrait et l'occupation de ces groupements hydroxyles qui entrent dans le mécanisme de formation du complexe (F-XO).

En effet, il a été démontré que la présence de groupements hydroxyles en C-3, C-8 et C-2` contribue négativement dans l'inhibition de la xanthine oxydase et ceci à cause de l'encombrement stérique dû à la perturbation des liaisons d'hydrogène qui a lieu dans le centre allostérique de l'enzyme (Van Hoorn et *al.*, 2002, da Silva et *al.* 2004). Ainsi que l'addition d'un groupement OH en C-6 réduit l'effet de l'inhibition de la OX (Cos et *al.*, 1998).

Par ailleurs, da Silva et *al.* (2004) ont rapporté qu'une étude faite sur la narangenin a démontré que cette molécule n'enregistre aucun effet inhibiteur sur la OX, cela est expliqué par l'absence de la structure plane dans ce composé. En plus de ça, ils ont démontré que les composés flavonoïques qui exhibent une activité inhibitrice de la XO ont une torsion de l'angle formé par les atomes C3-C2-C1'-C2'qui présente une valeur entre 26 et 27°, ainsi, si cette torsion dépasse 27°, les composés flavonoïques ne peuvent inhiber la XO à cause de la déstabilisation du complexe F-XO.

Des études non publiées faites sur la *C. flammula* (Atmani et *al.*, 2011) ont démontré que les composés flavonoïques de cette plante sont très glycosylés, ce qui ne favorise pas l'inhibition de la XO. En effet, da Silva et ses collaborateurs (2004) ont rapporté que la substitution en C-6 par un sucre ne favorise pas la formation du complexe Flavonoïde-XO.

En prenant compte des observations effectuées supra, l'effet antihyperurcémique de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula* chez les souris normales et hyperuricémique peut être effectué par un autre mécanisme autre que celui de l'inhibition des XO et XDH *in vivo*, à savoir la diminution de la réabsorption, ou l'augmentation de l'élimination ou de la dégradation de l'acide urique sérique.

À base des données de la littérature, le niveau de l'acide urique est le facteur clé pour la prévention et le traitement de l'hyperuricémie et la goutte. Le transporteur d'urate 1 (URAT1, SLC22A12) responsable de 50 % de la réabsorption, transporteur de glucose 9 (GLUT9, SLC2A9) et le transporteur organique d'anion (OAT1, SLC22A6) jouent un rôle central dans l'homéostasie d'urate et peuvent être des cibles potentielles pour le développement de médicaments dans le traitement de l'hyperuricémie (Shi et *al.*, 2012).

Cependant, plusieurs études ont démontré que l'oxonate de potassium bloque et/ou induit l'expression anormale de l'URAT1 et GLUT9 et OAT1 chez les souris (Zhao et *al.*, 2006 ; Shi et *al.*, 2012). Ainsi l'induction de l'hyperuricémie chez le rat par une injection intrapéritonéale de 200 mg/Kg d'oxonate de potassium provoque une diminution du niveau de l'acide urique urinaire comparé au groupe de rats normal 5 h après le traitement (Wang et *al.*, 2010).

La diminution du taux d'acide urique sérique enregistré dans les résultats de notre étude chez les souris hyperuricémiantes après traitement avec l'extrait éthanolique de *Clematis flammula*, peut être expliquée par la présence des composés dans ce dernier capable de diminuer la réabsorption d'urate induite par URAT1 et GLUT9 et d'augmenter la sécrétion par l'OAT1 et ce par la régulation négative de mURAT1 et mGLUT9 et la régulation positive de mOAT1. En effet, Wang et *al.* (2010) ont démontré que la morine, une molécule pure, comprend une capacité uricosurique une régulation négative de mURAT1 et mGLUT9 parallèle à une régulation positive de mOAT1.

Un tel cas de figure a été démontré par Wang et ses collaborateurs (2010) dans étude mené sur la double action de Sanmiao wan comme agent hypouricémique et il s'est avéré que cette mixture réduit l'expression de mURAT1 rénal chez les souris hyperuricémiques.

D'autre part, la diminution du niveau de l'acide urique indiqué par nos résultats peut être possible par l'augmentation de l'activité de l'enzyme responsable de la dégradation de l'acide urique, il s'agit bien de l'uricase. Une étude menée dans ce sens a été établie par Kuo et ses collaborateurs (2012) où ils ont déterminé la baisse du niveau de l'acide urique en même temps que l'augmentation de l'activité de l'uricase en utilisant l'extrait de *Hibiscus sabdariffa* L.

Par conséquent, l'effet hypouricémiant de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* peut être expliqué par le fait que ce dernier a ; soit la capacité de restaurer les changements qui avaient lieu sur les URAT1 et GLUT9 et OAT1 causés par l'oxonate de potassium chez les souris hyperuricémiques ou par régulation négative et positive de l'expression de mURAT1 et mGLUT9, et mOAT1 ; soit la capacité d'augmenter l'activité de l'uricase favorisant la transformation de l'acide urique en allantoïne. Ainsi, l'effet hypouricémique de l'extrait testé peut être attribué à un effet modulateur des transporteurs ou des gènes de l'URAT1 et GLUT9 et OAT1, ou de l'enzyme de dégradation qui est l'uricase. En claire ces possibilités restent à être validées expérimentalement.

Conclusion et perspectives

La *Clematis flammula* est une plante qui est utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies inflammatoires. La goutte, étant une maladie caractérisée par une réaction inflammatoire, est le résultat de l'élévation de l'acide urique sérique jusqu'à formation de cristaux d'urate et déposition de ce dernier dans divers tissus et plus généralement les articulations.

De ce fait, l'étude menée avait pour but de démontrer le pouvoir hypo-uricémiant et anti-xanthine oxydoréductase de l'extrait éthanolique la *C. flammula*. Un modèle animal hyper-uricémique induit par l'oxonate de potassium a été utilisé et traité avec différentes doses d'extrait (100, 200 et 400 mg/Kg) ainsi que l'allopurinol (10 mg/Kg), molécule standard.

Les résultats obtenus montrent une bonne diminution de l'acide urique sérique jusqu'à même donner des différences non significatives, comparé à l'allopurinol. Par contre, ils ne montrent aucun effet d'inhibition de la xanthine oxydase et de la xanthine déshydrogénase.

Ainsi, l'absence d'inhibition d'enzyme et la présence d'une diminution de l'acide urique tendent à dire que cette diminution se fait par un autre mécanisme autre que celui de l'inhibition de la XOR. Ce qui laisse à penser que l'extrait agit sur les voies d'éliminations ou de dégradations de l'acide urique, à savoir la régulation négative des transporteurs URAT1 et GLUT9 et la régulation positive de OAT1 ou bien, par la stimulation de l'enzyme de dégradation; l'uricase.

Cette étude ne reste que préliminaire et peut servir de référence de base pour d'autres recherches et plusieurs perspective peuvent être envisagées :

- L'utilisation d'une autre partie ou d'autres extraits de plante ;
- L'utilisation de doses inférieurs à 100 mg/Kg, vu la légère diminution de l'effet hypo-uricémique obtenue par la dose 400 mg/Kg ;
- L'étude et la détermination des principaux composés de *Clematis flammula,* ainsi que leur structure pour une meilleure compréhension de l'absence de l'inhibition de la XOR ;
- Dosage des molécules responsables dans l'élimination et la réabsorption de l'acide urique sérique notamment les transporteurs ;
- Dosage de la créatinine et l'azote uréique sanguin ;
- Détermination d taux d'acide urique hépatique et l'activité de la XO/XDH sérique.

Références bibliographique

Références bibliographies

Ahmad, N.S., Farman, M., Najmi, M.H., Mian, K.B. et Hasan, A. (2008). Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. *Journal of Ethnopharmacology*. **117** : 478-482.

Alvarez-lario, B. et Macarron-vicente, J. (2011). Is there anything good in uric acid?, *Q J Med*. **104** : 1015–1024.

Ammar R.B., Bhouri, W., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A-M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M-G. et Ghedira K. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*. **116** : 258-264.

Atmani, D., Ruiz-Larrea, M.B., Ruiz-Sanz, J.I., Lizcano, L.J., Bakkali, F., et Atmani, D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5 (4)** : 589-598.

Atmani, D. (2011). Effet antioxidant et cytotoxique des extraits d'une plante médicinale locale la clématite (*Clematis flammula*). *Thèse de doctorat en biologie*. Université de Bejaïa. 58-70p.

Baer A.N. (1997). Chapter 36 Treatment of gout and hyperuricemia. *Principles of Medical Biology*. **8** : 723-735.

Bannwarth, B. (2005). Problèmes rhumatologiques iatrogènes. *EMC-Médecine.* **2** : 378–384.

Benkhnigue, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A. et Douira, A. (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc*. **53** : 191-216.

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

Bhole, V., Choi, J.W.J., Kim, S.W., De Vera, M. et Choi, H. (2010). Serum Uric Acid Levels and the Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *The American Journal of Medicine.* **123 (10)** : 957-961.

Boullard, B. (2001). In : Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. *De Boeck Secundair*. 141-142.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72** : 248-254.

Chales, G. et Guggenbuhl, P. (2005). Hyperuricémies, une équation extra-articulaire à trois composantes : rénale, cardiovasculaire et métabolique. *La lettre du Rhumatologue*. **(314)** : 18-23.

Chawla, R., Kumar, S. et Sharma, A. (2012). The genus Clematis (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*. **143** : 116-150.

Chen, L., Yin, H., Lan, Z., Ma, S., Zhang, C., Yang, Z., Li, P. et Lin, B. (2011). Anti hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **135** : 399-405.

Collet, É. (2002). Aspect Chimique des allergies aux parfums. Progrès en dermato-allergologie. *John Libbey Eurotext*. 23-28.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., et Vanden Bergh, D. (1998). Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xnthine Oxydase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.* **61** : 71-76.

da Silva, S.L., da Silva, A., Honorio, K.M., Marangoni, S., Toyama, M.H. et da Silva, A.B.F. (2004). The influence of electronic, steri and hydrophobic properties of flavonoid compounds in inhibition of xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure (Theochem).* **684** : 1-7.

Dalbeth, N. et Stamp, L. (2007). Allopurinol Dosing in Renal Impairment: Walking the Tightrope Between Adequate Urate Lowering and Adverse Events. *Seminars in Dialysis*. **20 (5)** : 391-395.

Dallwig, R. (2010). Allopurinol. *Journal of Exotic Pet Medicine*. **19 (3)** : 255-257.

Danny E.C., Van Hoorn a ., Robert J., Nijveldt b., Paul A.M., Van Leeuwen b., Zandrie Hofman a., Laura M'Rabet a., Dries B.A., De Bont a. et Klaske Van Norren a. **(2002).** Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*. **451** : 111-118.

de Souza, M.R., de Paula, C.A., de Resende, M.L.P., Grabe-Guimar~aes, A., de Souza Filho, J.D. et de-Guimar~aes, D.A.S. (2012). Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. **142** : 845-850.

Ea, H.K. (2011). De l'hyperuricémie à la goutte : physiopathologie. *Revue du Rhumatisme*. **78** : S103-S108.

Ea, H.K. (2012). Mise au point sur la goutte. Pièges. Diagnostic et treatment. *Rhumatologie-orthopédie*. 453-456.

Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A. et Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*. **5** : 194-203.

Ernst, M.E. et Fravel, M.A. (2009). Febuxostat: A Selective Xanthine-Oxidase/Xanthine Dehydrogenase Inhibitor for the Management of Hyperuricemia in Adults With Gout. *Clinical Therapeutics*. **31 (11)** : 2503-2518.

Escribano-Bailon, M.T. et Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenols extract from food. *Methods in polyphenol analysis. Ed. Roy. Soc. Chem.* 1-16.

Falasca, G. F. (2006). Metabolic diseases: gout. *Clinics in Dermatology*. **24** : 498-508.

Faure, S. (2010). Pharmacothérapeutique pratique : Les antigoutteux. *Actualités pharmaceutiques*. **495** : 51-54.

Fraga, C.G. (2010). *In*: Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. *John Wiley & Sons, Inc*. 475p.

Fravel, M.A. et Ernst, M.E. (2011). Management of Gout in the Older Adult. The American *Journal of Geriatric Pharmacotherapy*. **9 (5)** : 271-285.

Garattini, E., Mendel, R., Romao, M.J., Wright, R. et Terao, M. (2003). Mammalian molybdo–flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem. J*. **372** : 15-32.

George, J. et Struthers, A.D., (2009). Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management*. **5** : 265-272.

Grabowski, B.A., Khosravan, R., Vernillet, L. et Mulford, D.J. (2011). Metabolism and Excretion of [C^{14}] Febuxostat, a Novel Nonpurine Selective Inhibitor of Xanthine Oxidase, in Healthy Male Subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*. **51** : 189-201.

Gralla, E.J. , et Crelin, E.S. (1976). Oxonic acid and fetal development: I. embryotoxicity in mice. *Toxicology*. **6** : 289-297.

Harrison, R., (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase : where are we now?, *Free Radical Biology & Medicine*. **33 (6)** : 774-797.

Havlik, J., de la Huebra, R.G., Hejtmankova, K., Fernandez, J., Simonova, J., Melich, M. et Rada, V. (2010). Xanthine oxidase inhibitory proprties of Czech midicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **132** : 461-465.

Heldt, H-W. (2005). Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants. *In*: Plant Biochemistry. 3^{ed}edition. *Elsevier Academic Press*. 403-413.

Heo, S.H. et Lee, S-H. (2010). High levels of serum uric acid are associated with silent brain infarction. *Journal of the Neurological Sciences*. **297** : 6-10.

Hitchings, G.H. (1966). Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis. *Ann. rheum. Dis*. **25** : 601-607.

Hopkins, W.G. (2003). Chapitre 14 : Molécules et métabolisme. *In* : Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*. 267-286.

Hu, Q-H., Jiao, R-Q., Wang, X., Lv, Y-Z. et Kong, L-D. (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. et 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.

Hurst, D.T., Griffiths, E. et Vayianos, C. (1985). Inhibition of Uricase by Pyrimidine and Purine Drugs. *Clinical Biochemistry*. **18** : 247-251.

Ichida, K., Amaya, Y., Okamoto, K. et Nishino, T. (2012). Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans. *International Journal of Molecular Sciences.* **13**: 15475-15495.

Izzedine, H. et Deray, G. (2011). Acide urique et fonction rénale. *Revue du Rhumatisme*. **78** : S134-S141.

Kaur, H. et Halliwel, B. (1990). Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem.-Biol Interactions*. **73** : 235-247

Kitamura, S., Sugihara, K. et Ohta, S. (2006). Drug-Metabolizing Ability of Molybdenum Hydroxylases. *Drug Metab. Pharmacokinet*. **21 (2)** : 83-98.

Klein, A.S., Joh, J.w., Rangan, U., Wang, D. et Bulkley, G.B. (1996). Allopurinol: Discrimination of Ntioxidant from Enzyme Inhibitory Activities. *Free Radical Biology & Medicine*. **21 (5)** : 713-717.

Knapp, CM., Constantinescu, CS., Tan, JHY., McLean, R., Cherryman, GR., et Gottlob, T. (2004). Serum uric acid levels in optic neuritis. *Multiple Sclerosis*. **10** : 278-280.

Kong, L.D., Yang, C., Ge, F., Wang, H.D., Guo, Y.S. (2004). A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **93** : 325-330.

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

Lapsia, V., Johnson, R.J., Dass, B., Shimada, M., Kambhampati, G., Ejaz, N.I., Arif, A.A. et Ahsan Ejaz, A. (2012). Elevated Uric Acid Increases the Risk for Acute Kidney Injury. *The American Journal of Medicine*. **125 (3)** : 302.e9-302.e17.

Lecerf, J.M. (2009). Effets métaboliques du fructose et du miel. *Phytothérapie*. **7** : 83-86.

Lee, S.J. et Terkeltaub, R.A. (2005). Does Diet Contribute to the Development of Hyperuricemia?, *Arthritis Rheum*. **52** : 283-289.

Lippi, G., Montagnana, M., Franchini, M., Favaloro, E.J. et Targher, G. (2008). The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. **392** : 1-7.

Marcheix, J-J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2006). Chapitre 1 : Nature et Diversité des Composés Phénoliques des Végétaux. *In* : Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*. 1-35.

Medjahdi, B., Ibn Tattou, M., Barkat, D. et Benabedli K. (2009). La flore vasculaire des monts des trara (nord-ouest algérien). *Acta Botanica Malacitana*. **34** : 57-75.

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

Murugaiyh V. et Chan K-L. (2009). Mechanisme of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignin constituents. *Journal of ethnopharmacology*. **124** : 233-239.

Naczk, M. et Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. **1054** : 95–11.

Neogi, T., George, J., Rekhraj, S., Struthers, A.D., Choi, H. et Terkeltaub, R.A. (2012). Are Either or Both Hyperuricemia and Xanthine Oxidase Directly Toxic to the Vasculature?. *Arthritis & rheumatism*. **64 (2)** : 327-338.

Nuki, G. (2002). Metabolic and endocrine arthropathies: Gout. 71-77.

Nuki, G. (2006). Metabolic and endocrine arthropathies: Gout. *Medicine*. **34 (10)** : 417-723.

Nuki, G. et Simkin, P. (2006). A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Research & Therapy*. **8** (Suppl 1) : S1.

Pacher, P., Nivorozhkin, A. et Szabó, C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev*. **58 (1)** : 87-114.

Peglow, S., Toledo, A.H., Anaya-prado, R., Lopez-neblina, F. et Toledo-pereyra, L.H. (2011). Allopurinol and xanthine oxidase inhibition in liver ischemia reperfusion. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. **18** : 137-146.

Petlevski, R., Flajs, D., Kalođera, Z. et Zovko Končić, M. (2013). Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic *Pelargonium radula* extracts. *South African Journal of Botany*. **85** : 17–22.

Punzi, L., Scanu, A., Ramonda, R. et Oliviero, F. (2012). Gout as autoinflammatory disease: New mechanisms for more appropriated treatment targets. *Autoimmunity Reviews*. **12** : 66-71.

Raju, R., Joseph, S., Scria, S., Mathews, S.M., et 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.

Reinders M.K., Van roon E.N., Houtman P.M., Brouwers J.R. B. J. et Jansen T.L.Th.A. (2007). Biochemical effectiveness of allopurinol and allopurinol-probenecid in previously benzbromarone-treated gout patients. *Clin Rheumatol*. **26** : 1459-1465.

Richette, P. (2011). Goutte : mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant. *Revue du Rhumatisme*. **78** : S142-S147.

Richette, P. et Bardin, T. (2010). Gout. *Lancet*. **375** : 318-28.

Rome, K., Survepalli, D., Sanders, A., Lobo, M., Mcqueen, F.M., Mcnair, P. et Dalbeth, N. (2011). Functional and biomechanical characteristics of foot disease in chronic gout: A case-control study. *Clinical Biomechanics*. **26** : 90-94.

Ruilope, L.M. et Garcia-puig, J. (2001). Hyperuricemia and Renal Function, Current Hypertension Reports. **3** :197-202.

Scott, J.T. (1978). New knowledge of the pathogenesis of gout. *J. Clin. Path, 12, Suppl. (Roy. Coll. Path)* **31** : 205-213.

Shi, Y-W., Wang, C-P, Wang, X., Zhang, Y-L., Liu, L., Wang, R-W., Ye, J-F., Hu, L-S. et Kong, L-D. (2012). Uricosuric and nephroprotective properties of *Ramulus Mori* ethanol extract in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **143** : 896-904.

So, A. et Thorens, B. (2010). Uric acid transport and disease. *The Journal of Clinical Investigation*. **120 (6)** : 1791-1799.

Squadrito, G.L., Cueto, R., Splenser, A.E., Valavanidis, A., Zhang, H., Uppu R.M. et Pryor W.A. (2000). Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **376 (2)** : 333-337.

Sun, F., Cai, Z., Chaudhary, M.I., Xiao, P. et Cheng, Y. (2010). Distribution of the triterpenoid saponins and chemotaxonomy of the genus Clematis L. by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Biochemical Systematics and Ecology*. **38** : 1018-1025.

Sweeney, A.P., Wyllie, S.G., Shalliker, R.A. et Markham, J.L. (2001). Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **75** : 273-277.

Taiz, L. et Zeiger, E. (2002). Chapter 13: Secondary Metabolites and Plant Defense. *In*: plant physiology. 3edition. *Sinauer Associates*. 283-308.

Tan, Q.Y., Wang, N., Yang, H., Zhang, L.K., Liu, S., Chen, L., Liu, J., Zhang, L., Hu, N.N., Zhao, C.J. et Zhang, J.Q. (2010). Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*. **384** : 165-172.

Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Somasundaram, A., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V. et Ravi, T.K. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **109** : 547-551.

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

Vermerris, W. et Nicholson, R. (2006). Chapter 1: Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. *In*: Phenolic compound biochemistry. *Springer*. 1-32.

Vollhardt, K.P.C. et Schore, N.E. (2004). Chapitre 4: Les Alcanes Cycliques. *In*: Traité de chimie organique. *De Boeck Supérieur*. 128-162.

Wang, C-P, Wang, X., Zhang, X., Shi, Y-W, Liu, L. et Kong, L-D. (2010). Morin Improves Urate Excretion and Kidney Fonction through Regulation of Renal Organic Ion Transporters in Hyperuricemic Mice. *J Pharm Pharmaceut Sci*. **13 (3)** : 411-427.

Wang, S.Y., Yang, C.W., Liao, J.W., Zhen, W.W., Chu, F.H. et Chang, S.T. (2008). Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomedicine*. **15** : 940-945.

Wang, X., Wang, C-P., Hu, Q-H.,. Lv, Y-Z, Zhang, X., OuYang, Z. et Kong, L-D. (2010). The dual actions of Sanmiao wan as a hypouricemic agent: Down-regulation of hepatic XOD and renal mURAT1 in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology.* **128** : 107–115.

Watts, R.W.E. (1974). Molecular variation in relation to purine metabolism. *J. clin. Path., 27, Suppl. (Roy. Coll. Path.).* **8** : 48-63.

Wilcox, W.D. (1996). Adnormal serum uric acid levels in children. *J Pediatr*. **128** : 731-41.

Wyngaarden, J.B. (1974). Metabolic Defects of Primary Hyperuricemia and Gout. *The American Journal of Medicine*. **56** : 651-664.

Yesilada, E. et Küpeli, E. (2007). Clematis vitalba L. aerial part exhibits potent anti inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *Journal of Ethnopharmacology*. **110** : 504-515.

Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Smith, P.T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G. et Wu, M.J. (2011). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. J. Agric. *Food Chem.* **59** : 12361-12367.

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

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

Annexes

Annexes

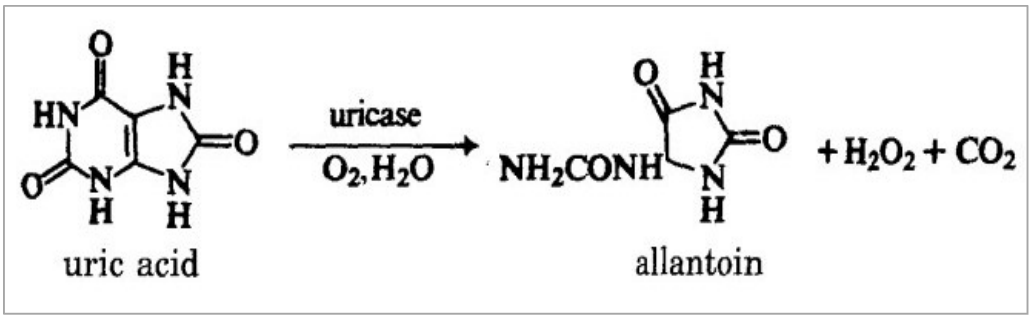

Figure 1 : Conversion de l'acide urique en allantoïne par l'uricase (Hurst et *al.*, 1985).

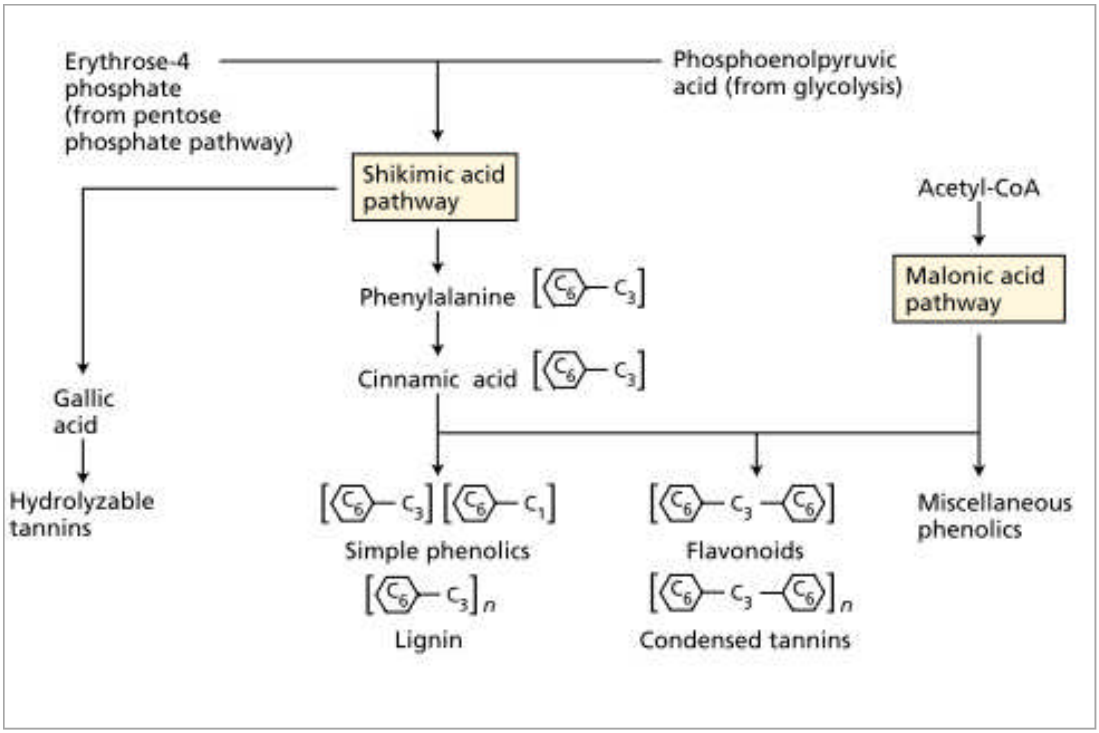

Figure 2 : Voie de biosynthèse des polyphénols (Taiz & Zeiger, 2002).

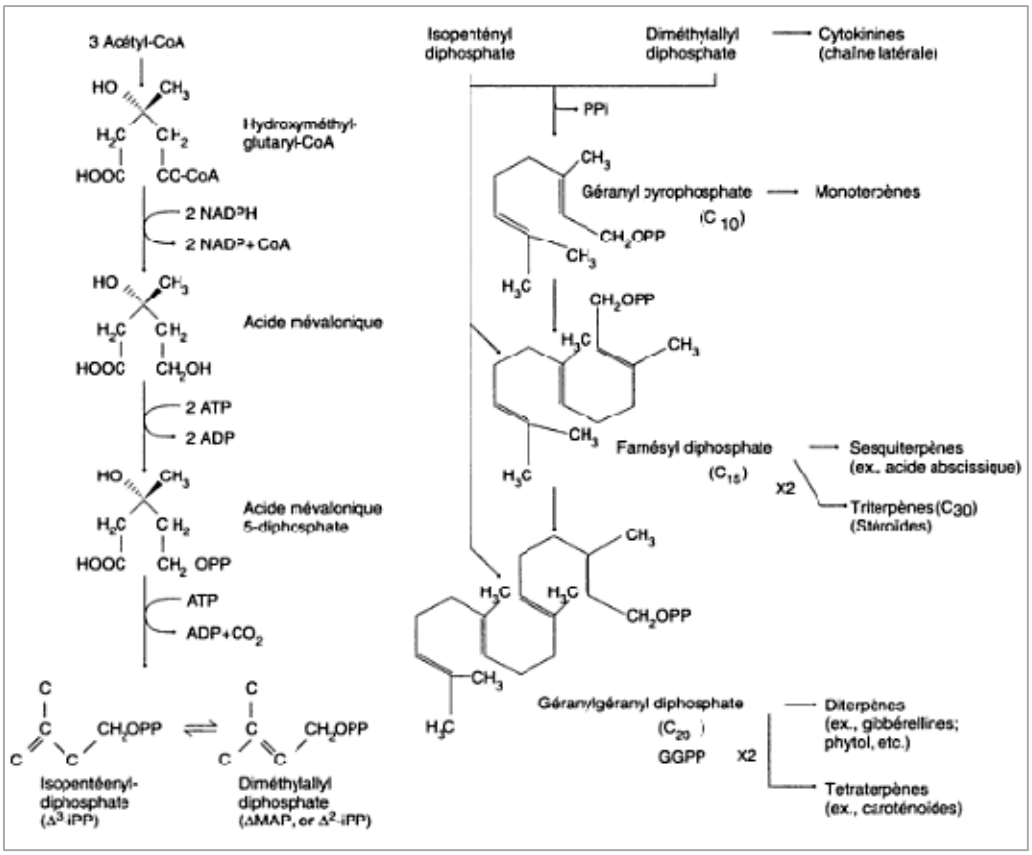

Figure 3 : Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpanoïdes (Hopkins, 2003).

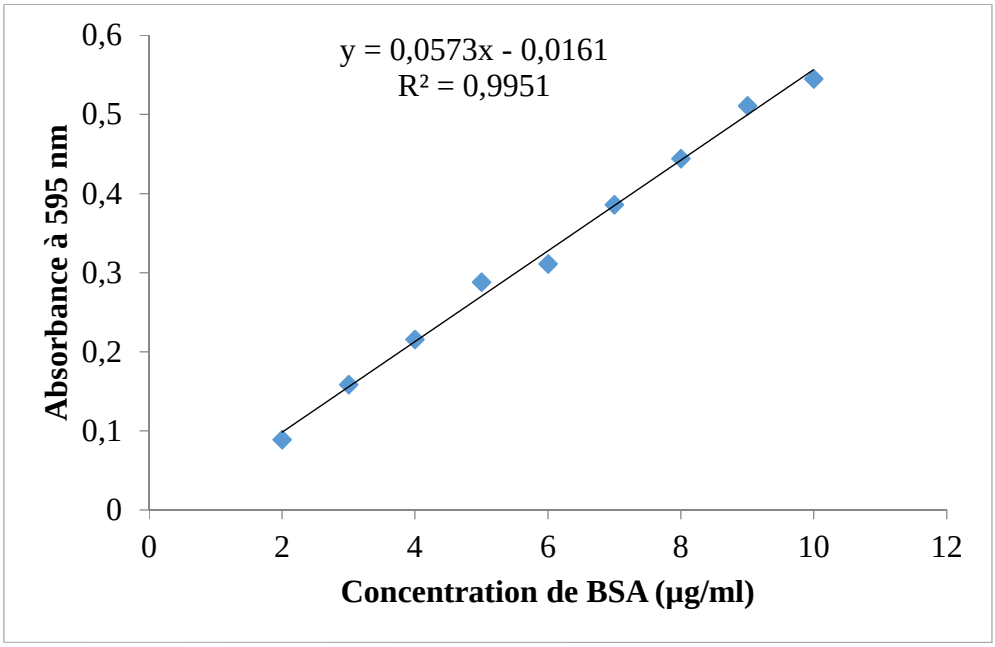

Figure 4 : Courbe d'étalonnage de dosage des protéines.

Tableau I : Classification des composés phénoliques **(Vermerris et Nicholson, 2006)**.

Structure	***Classe***
C6	Phénols simples
C6-C1	Acides phénoliques et des composés apparentés
C6-C2	Acétophénones et les acides phénylacétique
C6-C3	Acides cinnamiques, les aldéhydes cinnamyliques, cinnamylique alcools
C6-C3	Coumarines, isocoumarines et chromones
C15	Chalcones, aurones, dihydrochalcones ; flavanes ; flavones ; flavanones ; flavanonols ; anthocyanidines ; anthocyanes.
C30	Biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Les benzophénones, les xanthones, les stilbènes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Bétacyanines
Lignanes, neolignanes	Dimères ou oligomères
Lignines	Polymères
Tannins	Oligomères ou Polymères
Phlobaphènes	Phlobaphènes

Résumé

La xanthine oxydoréductase est l'enzyme responsable de la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique. Ce dernier représente plus de la moitié de l'activité antioxydant. Cependant, l'élévation de son niveau dans le sang engendre une hyperuricémie qui peut s'aggraver et générer d'autres maladies telles que la goutte. Plusieurs études ont été faites sur des plantes médicinales afin de démontrer des effets hypouricémiant. La présente étude est la seule à être réalisée sur l'activité antihyperuricémique et antixanthine oxydoréductase de l'extrait brute éthanolique *in vivo* de feuilles de *Clematis flammula*, une plante médicinale très utilisée dans le traitement de diverses maladies inflammatoires. Les résultats obtenus, après traitement des souris hyperurecemiques pendant trois jours, avec différentes doses d'extrait éthanolique (100, 200 et 400mg/kg) montrent une diminution du niveau de l'acide urique sérique chez les souris normales et hyperuricémiques et une absence d'inhibition de la xanthine oxydase. Suggérant que la réduction du taux de l'acide urique ce fait par un autres mécanisme autre que celui de l'inhibition de la xanthine oxydase.

Mots clés : Hyperuricémie, Acide urique, *Clematis flammula*, Extrait éthanolique, Xanthine oxydase.

Abstract

Xanthine oxidoreductase enzyme is responsible for the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. This represents more than half of the antioxidant activity. However, raising its level in the blood causes hyperuricemia which can worsen and cause other diseases such as gout. Several studies have been done on medicinal plants to demonstrate urate lowering effects. The present study is the only one with being realized and it treats the antihyperuricemic and antixanthine oxidoreductase activities of crude etanolic extract *in vivo* of *Clematis flammula* leaves's, a medicinal plant widely used in the treatment of various inflammatory diseases. The results obtained, after treatment of the hyperurecemic mice during three days, with various amounts of extract ethanolic (100, 200 and 400mg/kg) showed a decrease in the level of serum uric acid and hyperuricemia in normal mice and a lack of inhibition of xanthine oxidase. Suggesting that the reduction of uric acid this may be by a different mechanism other than the inhibition of xanthine oxidase acid.

Keywords : Hyperuricémia, Uric acid, *Clematis flammula*, Ethanolic extract, Xanthine oxidase.