

# Mémoire

Présenté par

**M<sup>elle</sup> BENABDELHAK Mounia**

Épouse MEDDOUR

Pour l'obtention du Diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : ingénierie Biochimique et Biotechnologie

## Thème

Inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase par les extraits et les fractions chromatographiques d'extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus*

Soutenu le : 29/09/2015

Devant le jury composé de :

Nom	Prénom	Grade		
Mme : BENABDESSELAM	Fadila	Prof	Univ. de A/M Bejaia	Président
Mr : ATMANI	Djebbar	Prof	Univ. d' A/M Bejaia	Promoteur
Mme : BEDJOU	Fatiha	Prof	Univ. de A/M Bejaia	Examinateur
Mr : OUCHEMOUKH	Salim	MCA	Univ. de A/M Bejaia	Examinateur

*À mes très chers parents, L'Hocine & Dahbia*

*À mes sœurs, Fouzia, Souad, Katia et Hania*

*...et À mes frères, Lakhal et Loucif*

*À mon marie, Nabil*

*Je vous aime tous.*

---

## REMERCIEMENTS

---

*Je tiens dans un premier temps à remercier Madame le professeur Benabdesselam F d'avoir accepté de présider cette thèse,*

*Je tiens à remercier Monsieur le professeur Djebbar Atmani, doyen de la faculté Biologie, m'avoir confié ce travail de recherches, son accueil au sein de laboratoire de génétique, son encadrement et pour ses précieux conseils au cours de toute l'année.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.*

*Madame le professeur Bedjou F, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens à la remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail, votre disponibilité.*

*Je tiens à remercier Monsieur Ouchmoukh S, d'avoir accepté de juger et d'examiner mon travail.*

*Je remercie Madame Atmani de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son soutien constant dans la réalisation de mes travaux, et je remercie toute l'équipe du laboratoire de génétique.*

*Je remercie tout particulièrement mon marie, Nabil Meddour. Pour ta patience, ton soutien, pour la motivation et le courage que tu m'apportes chaque jour pour aller plus loin. J'ai la chance d'être merveilleusement bien entourée et pour vous remercier, c'est avec joie que je tâcherai d'être à la hauteur de vos espérances. Comme je remercie toute ma belle-famille.*

*Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent ceux que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière à : Souria, Djaouida, Nadjia, Docteur Amiour (mes copines), Monsieur Bourai (surveillant médical du laboratoire du CHU de Bejaia), toute l'équipe du laboratoire du CHU, les médecins les emplois et en particulier les pré-emplois (Dalila, Tassadit, Cissa, Salma, Nabila, Assia, Samra, Fatiha, Kahina, Djoher, Kahina, Aida, Rahima, ....*

*En fin, Je remercie mes très chers parents, mes frères et sœurs, Qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études. Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance*

# ***SOMMAIRE***

---

## **I- Revues bibliographiques**

<b>1</b>	<b>Xanthine oxydoréductase .....</b>	<b>1</b>
1.1	Structure .....	2
1.2	Propriétés enzymatiques et mécanisme d'action .....	3
1.3	Conversion de la XDH en XO.....	4
1.4	Formes inactives de la XOR.....	4
1.5	Distribution et localisation de la XOR .....	5
1.6	Rôles physiologiques de la XOR.....	5
1.7	Rôles pathologiques de la XOR .....	6
1.7.1	Rôle de la XOR dans l'inflammation.....	7
1.7.2	Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion.....	7
1.7.3	Rôle de la Xanthine oxydoreductase (XOR) dans d'autres maladies.....	8
<b>2</b>	<b>Métabolites secondaires.....</b>	<b>9</b>
2.1	Polyphénols .....	9
2.1.1	Phénols simple s.....	9
2.1.2	Acide phénol .....	9
2.1.3	Flavonoïdes .....	10
2.1.4	Tanins.....	11
2.1.5	Terpenoides .....	12
<b>3</b>	<b>Inhibiteurs de la XOR .....</b>	<b>14</b>
3.1	Inhibiteurs analogues de substrats .....	14
3.1.1	Allopurinol et alloxanthine .....	14
3.1.2	Mécanisme d'action.....	14
3.2	Autres inhibiteurs de la XOR .....	15
3.2.1	Cyanide .....	15
3.2.2	Méthanol et le formaldéhyde .....	16
3.2.3	Arsénite .....	16
3.2.4	Febuxostat : (TEI-67202- (3-cyano-4-isobutoxyphényl) -4-méthyl-5-thiazolecarboxylique) .....	17
3.2.5	FYX-051 : 4- (5-pyridin-4-yl-1 H- [1, 2, 4] triazol-3-yl) pyridine-2-carbonitrile).....	18
3.3	Inhibiteurs naturels .....	18
3.3.1	Flavonoïdes .....	18

## II- Matériels et méthodes

1	Matériels et méthodes .....	22
1.1	Matériel végétale .....	22
1.1.1	<i>Pistacia lentiscus</i> .....	22
1.1.2	<i>Fraxinus angustifolia</i> .....	24
1.2	Méthodes .....	26
1.2.1	Extraction .....	26
1.2.2	Dosage des phénols totaux .....	27
1.2.3	Dosage des flavonoïdes totaux.....	28
1.2.4	Dosage des tannins totaux.....	28
1.2.5	Fractionnement des extraits bruts sur gel de Sephadex LH20 .....	29
1.2.6	Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	30
1.2.7	Activité inhibitrice de la xanthine déshydrogénase de la XOR .....	31
1.3	Analyse statistique.....	31

## III- Résultats et discussions

1	Résultats et discussions .....	32
1.1	Taux d'extraction .....	32
1.2	Teneur en polyphénols .....	34
1.2.1	Teneur en phénols totaux .....	34
1.2.2	Teneur en flavonoïdes .....	36
1.2.3	Teneur en tannins .....	37
1.3	Evaluation du pouvoir antioxydant .....	39
1.4	Analyses chromatographiques.....	42
1.4.1	Chromatographie d'adsorption sur colonne de séphadex LH20 .....	42
1.4.2	Chromatographie sur couche mince.....	42
1.4.3	Observation sous UV à 366 nm des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> .....	42
1.4.4	Observation sous UV à 254 nm des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P.lentiscus</i> .....	43
1.4.5	Révélation des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de <i>F.angustifolia</i> par la vanilline sulfurique.....	44
1.4.6	Révélation des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P. lentiscus</i> par la vanilline sulfurique .....	45
1.4.7	Rapports frontaux et couleurs après révélation par la vanilline sulfurique.....	47
1.5	Evaluation de pouvoir antioxydant des fractions .....	50

1.5.1	Evaluation de pouvoir antioxydant des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	50
1.5.2	Evaluation de l'activité anti-NADH oxydase par les fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P. lentiscus</i> .....	51

#### **IV- Conclusion et perspectives**

Conclusion et perspectives .....	<b>54</b>
----------------------------------	-----------

#### **V- Références bibliographiques**

Bibliographie : .....	<b>57</b>
-----------------------	-----------

<b>1 Annexe</b> .....	<b>64</b>
-----------------------	-----------

1.1	Annexe N°1 : Courbes d'étalonnages .....	64
-----	--	----

1.2	Annexe N°2 : Préparation des solutions utilisées pour le dosage des tannins totaux : .....	65
-----	--	----

<b>2 Annexe</b> .....	<b>66</b>
-----------------------	-----------

2.1	Annexe N°1 : Courbes d'étalonnages .....	66
-----	--	----

2.2	Annexe N°2 : Préparation des solutions utilisées pour le dosage des tannins totaux : .....	67
-----	--	----

2.3	Produits et réactifs chimiques.....	67
-----	-------------------------------------	----

## ***ABRÉVIATION***

---

XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase
XOR	Xanthine oxydoréductase
ROS	reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulphate
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical superoxide
OH <sup>·</sup>	Radical hydroxyle
MeOH	Méthanol
Mo	Molybdène
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Eac	Extrait d'acétate d'éthyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
Eaq	Extrait aqueux
Ebr	Extrait brut
Ech	Extrait de chloroforme
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	l'acide acétique
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	l'acide sulfurique
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	acide formique
AlCl <sub>3</sub>	trichlorure d'aluminium
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
FeCl <sub>3</sub>	Chlorure de fer
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ferricyanide de Potassium
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de sodium monobasique
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Phosphate de sodium dibasique
DTT	Dithiothreitol
RNS	Reactive Nitrogen Species



## **LISTE DES FIGURES**

---

Figure 1 : l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique.....	1
Figure 2: Structure du gène et la composition de la xanthine oxydoréductase.....	2
Figure 3: Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec réduction du NAD (a.déshydrogénase) ou de l'oxygène moléculaire (b.oxydase) (Chris A. Pritsos., 2000). ....	3
Figure 4: XOR a catalysé l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine(Caractérisant la plupart des substrats réducteurs) au site Mo,et du NADH au site FAD. (Harrison,2002) .....	4
Figure 5: Formes inactives de la XOR.....	5
Figure 6: Mécanisme de génération de ROS dans IR comme proposé par Granger et autres (Harisson 2002).....	7
Figure 7: Structure de phloroglucinol (Bruneton,1999).....	9
Figure 8: Structure de l'acide gallique (Shahidi et Naczk, 2004).....	10
Figure 9: Structure de base des flavonoïdes (Vercauteren et al., 2006).....	10
Figure 10: Structure de Delphinidol (cheynier, 2005) .....	11
Figure 11: Structure de l'Acide ellagique (Okuda,et al., 1995).....	12
Figure 12: Structure de Procyanidol B-4 (Cowan, 1999) .....	12
Figure 13: Unité de base de l'isoprène (2-methyl-1,3-butadiène) .....	12
Figure 14: Mécanisme de l'allopurinol.....	15
Figure 15: Mécanisme de 6-pteridylaldehyde.....	15
Figure 16: Structure chimique de l'inhibiteur febuxostat .....	17
Figure 17: Mécanisme d'action de Febuxostat .....	18
Figure 18: Structure de l'apigénine (flavone).....	19
Figure 19: Structure de la quercétine (flavonol) .....	20
Figure 20: Structure de la myricétine (flavonol).....	20
Figure 21: Structure de la génistéine (flavone).....	20
Figure 22: Structure de la naringénine (flavanone) .....	21
Figure 23: la structure de l'isovitexine (flavone glycoside) .....	21
Figure 24: Description botanique de Pistacia lentiscus .....	23
Figure 25: Description botanique de Fraxinus angustifolia .....	25
Figure 26: Protocole d'extraction des composés phénolique à partir de la poudre des plantes.....	27
Figure 27: Teneurs en phénols totaux des extraits d'écorce de F. angustifolia .....	34
Figure 28: Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de P. lentiscus.....	35
Figure 29: Teneurs en flavonoides des extraits de l'écorce de F. angustifolia. ....	36
Figure 30: Teneurs en flavonoides des extraits des feuilles de P. lentiscus.....	37
Figure 31: Teneurs en tannins des extraits d'écorce de F. angustifolia. ....	38
Figure 32: Teneurs en tannins des extraits feuilles de P. lentiscus. ....	39
Figure 33: Inhibition de l'activité NADH oxydase de la XOR par les extraits de l'écorce de F. Angustifolia.....	40
Figure 34: Évaluation de l'activité anti-NADH de la XOR par les extraits de feuilles de P.lentiscus .....	41
Figure 35: Observation sous UV des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de Fraxinus ngustifolia.....	43
Figure 36: Observation sous UV à 254 nm des fractions de l'extrait.....	43
Figure 37: révélation des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de F.angustifolia .....	44

Figure 38: Révélation des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P.lentiscus</i> par la vanilline sulfurique .....	46
Figure 39: Evaluation de l'activité anti NADH-déshydrogénase de la XOR des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de l'écorce de <i>F.angustifolia</i> .....	50
Figure 40: Inhibition de l'activité NADH deshydrogenese de la XOR par les fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>P. lentiscus</i> .....	52
Figure 41: Courbe d'étalonnage de la catéchine .....	66
Figure 42: Courbe d'étalonnage de la rutine.....	66
Figure 43: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique .....	67

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau 1: Classification classique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	22
Tableau 2: Classification phylogénétique .....	23
Tableau 3: Classification classique de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	24
Tableau 4: Classification phylogénétique de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	25
Tableau 5: taux d'extractions des différents extraits de l'écorce de <i>F.angustifolia</i> et les feuilles de <i>P.lentiscus</i> .....	33
Tableau 6: type de métabolites secondaire en fonction de la couleur des spots .....	45
Tableau 7: Résultats du screening phytochimique des feuilles de <i>P.lentiscus</i> (Andersen and Markham, 2010).....	46
Tableau 8: Rapports frontaux et couleurs après révélation de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et ces fractions de l'écorce de <i>F.angustifolia</i> : .....	48
Tableau 9: Rapports frontaux et couleurs après révélation de l'extrait éthanolique et ces fractions des feuilles <i>Pistacia.lentiscus</i> .....	49

# Introduction

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution.

La xanthine oxydoréductase (XOR) est l'une des principales sources de radicaux libres. C'est un complexe métallo-flavo-protéine, elle catalyse les deux dernières réactions de formation d'acide urique dans le catabolisme des purines humain. l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harisson et al., 2002), accompagné par la production de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ces deux espèces oxygénées peuvent être des précurseurs des autres espèces réactives soit de l'oxygène (ROS) ou de nitrogène (RNS) qui sont impliquées dans les grands dommages cellulaires et tissulaires.

La physiopathologie et le traitement de l'uricémie est à l'étude depuis de nombreuses années, des progrès ont été réalisés pour améliorer l'efficacité du traitement en agissant sur la xanthine oxydoréductase et la formation d'acide urique. Des études récentes ont donné des résultats très intéressants sur l'inhibition de la xanthine oxydase, mais parmi les travaux publiés, aucun travail n'a été effectué sur l'inhibition de la NADH-deshydrogenase par *F. angustifolia* ni *P. lentiscus*.

Notre travail est consacré sur l'inhibition de cette forme de la XOR qui est la xanthine déshydrogénase par les extraits et les fractions d'extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

L'objectif de ce travail consiste à l'extraction et le fractionnement des substances actives (polyphénols, flavonoïdes et tanins) de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et les feuilles de *Pistacia lentiscus* par plusieurs solvants et différentes méthodes chromatographiques, leurs dosages et l'étude de leurs activités inhibitrice sur la NADH-déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase.

# I- Revue bibliographique

## 1 Xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe métalloflavo-protéine (**Chris A. Pritsos.,2000**), qui a été découverte la première fois au niveau du lait bovin par Schardinger (1902). Chez les mammifère XOR existe sous deux formes interconvertibles: la xanthine déshydrogénase (XDH; EC 1.1.1.204 ) est la forme la plus dominant in vivo (**Sanders et al ., 1997**) c'est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP et qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) et la xanthine oxydase (XO; EC 1.1.3.22)(**Harrison, 2002**)où L'oxydation se fait au niveau des résidus cystéine de l'enzyme.

Bien que la XOR peut réagir avec plusieurs substrats dont les purines, les pyrimidines et les ptérides (**Krenitsky et al., 1974**), elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (**Harisson et al., 2002 ;Chris A. Pritsos.,2000**), comme suit :

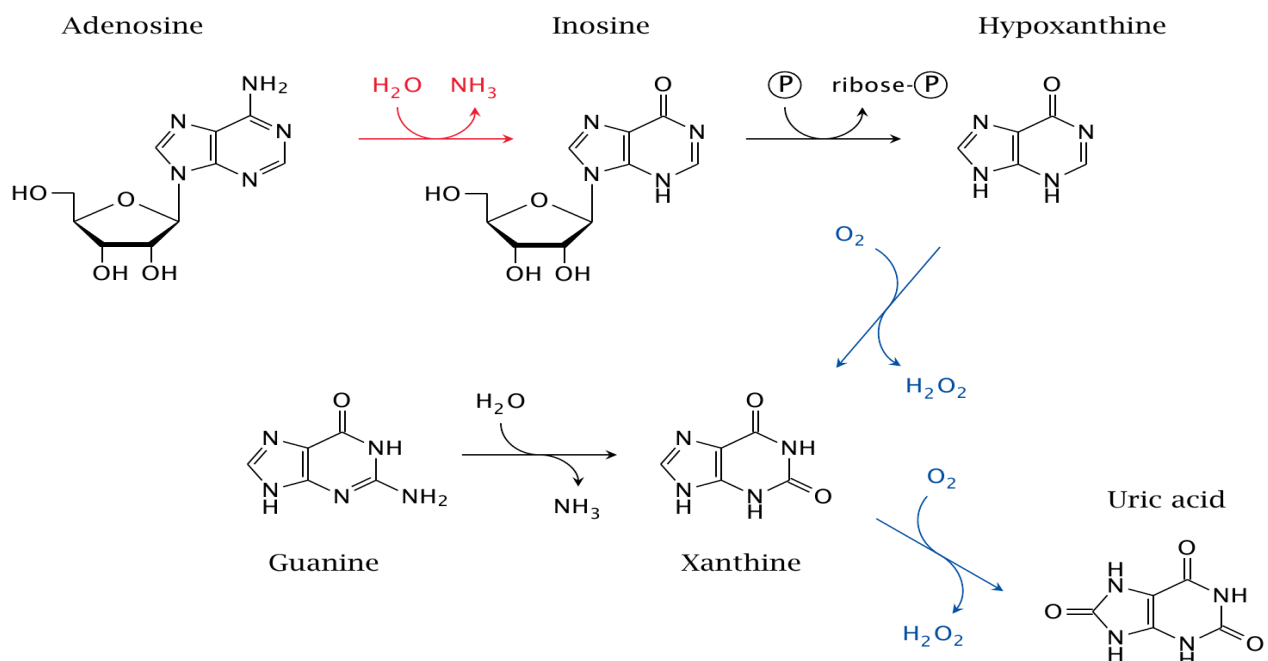


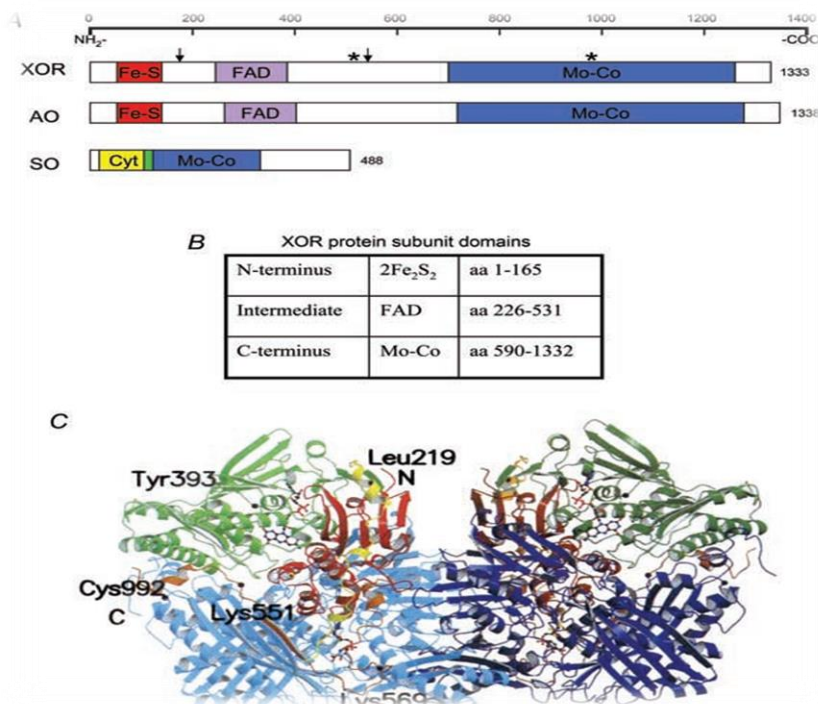
Figure 1 : l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (**Harisson et al., 2002**).

## 1.1 Structure

Le gène de la XOR humain a été localisé sur le chromosome 2p 22 et 17 (**Harrison et al., 2002**). Il s'étend sur plus de 60 000 paires de bases de l'ADN qui ont été divisés en 36 exons, la structure d'exon-intron est fortement conservée. L'Exon 36 est de plus de 700 pb et contient quelques derniers acides aminés traduits et 3% c'est l'ensemble des régions non traduites. Chacun des 35 exons restants sont constitué de 50 à 280 pb. (**Chris A. Pritsos, 2000**).

La XOR est une enzyme homodimère constituée de deux sous unités identiques de 150kDa de chacune, chaque sous unités est partagé en 3 domaines :

- ✚ le domaine C terminale de 85kDa (590-1332 acides aminés) est le molybdo-protéique (Mo)
- ✚ le domaine central de 40kDa (226-531 acides aminés), est une molécule de flavine adénine di nucléotides (FAD)
- ✚ le domaine N terminale de 20kDa (1-165 acides aminés) se constitue de deux sous-domaines, avec deux centres ( $Fe_2/S_2$ ) combinés jusqu'à quatre résidu de cystéine (**Bray., 1975 ; Harrison., 2002**).

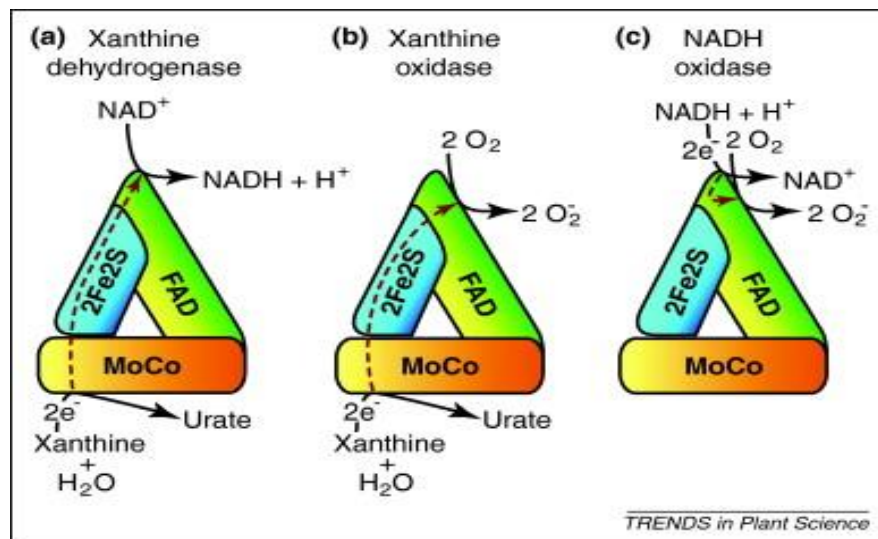


Tyr<sub>393</sub> :Tyrosine en position 393 Leu<sub>219</sub> :leucine en position 219 Cys<sub>992</sub> :Cysteine en position 992  
 Lys<sub>551</sub> : Lysine en position 551 N :N-terminal C : C-terminal

**Figure 2: Structure du gène et la composition de la xanthine oxydoréductase**

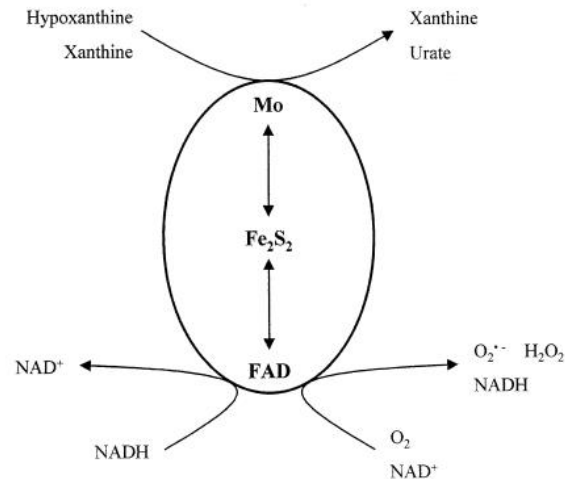
## 1.2 Propriétés enzymatiques et mécanisme d'action

Les enzymes catalysent l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec réduction simultanée du NAD (déshydrogénase) ou de l'oxygène moléculaire (oxydase). Bien que les deux formes de l'enzyme effectuent des réactions similaires de catabolisme des purines, leurs mécanismes d'actions ont différents en ce que la déshydrogénase réduit le NAD, par une réduction à deux électrons tandis que l'oxydase réduit l'oxygène moléculaire par un seul électron. (Chris A. Pritsos., 2000), suite à la compensation rapide entre les centres redox, les électrons sont généralement transmises au centre FAD, soit de NAD ou de l'oxygène moléculaire.



**Figure 3: Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec réduction du NAD (a.déshydrogénase) ou de l'oxygène moléculaire (b.oxydase) (Chris A. Pritsos., 2000).**

Krenitsky a montré que la xanthine oxydase a été capable d'oxyder une variété de purines substitués et non substitués, des pyrimidines, ptéridines azopurines et des composés hétérocyclique. Un certain nombre d'aldéhydes biologiquement pertinentes sont également avérés être métabolisé par la xanthine oxydase d'une manière similaire à leur métabolisme par l'aldéhyde déshydrogénase.



**Figure 4: XOR a catalysé l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine (Caractérisant la plupart des substrats réducteurs) au site Mo, et du NADH au site FAD. (Harrison et al., 2002).**

### 1.3 Conversion de la XDH en XO

La conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase est un procédé en deux étapes avec une étape initiale importantes impliquant l'oxydation des groupements thiols des protéines. Clivage irréversible d'un fragment de 20 kDa à partir de chacune des sous-unités par une protéase dépendante du calcium, La chaîne latérale d'asp 429 au niveau du site FAD est remplacé par l'Arg 426. (Chris A. Pritsos., 2000) la conversion réversible est réalisé par l'utilisation des réactifs sulfhydryles. Plus précisément, Cys 535 et Cys 992 ont été identifiés comme la cible dans ce processus, un changement conformationnel permet la formation de la liaison disulfure et la conversion réversible. Il est à noter que XOR dans la circulation sanguine est presque tout sous la forme d'oxydase, à la suite de la conversion XDH/ XO par les protéases sériques (Harrison et al., 2002).

### 1.4 Formes inactives de la XOR

Autant que 60 % de la XOR purifiée est inactive, Cette enzyme " inactive " se compose de deux formes, Demolybdo-XOR lui manque le molybdopterin (Mo) et constitue généralement environ de 40% d'enzyme totale, alors que 30 –40% c'est la forme desulfo-XOR, dans la quel le groupement Mo=S essentiel pour l'activité catalytique, est remplacé par Mo=O, la forme Desulfo-XOR peut être convertir en sulfo-XOR active in vitro par incubation de l'enzyme réduite avec des ions sulfurique (Harrison et al., 2002).



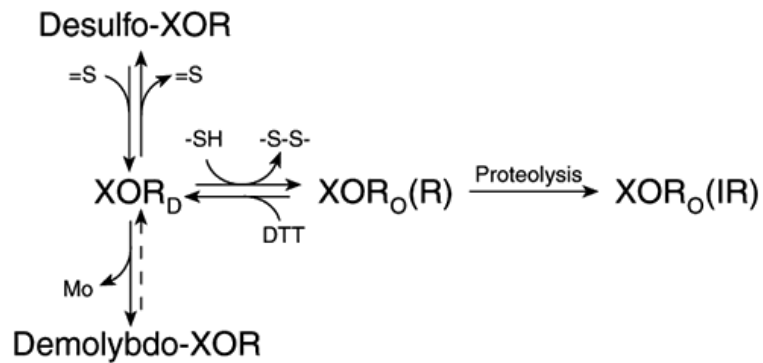


Figure 5: Formes inactives de la XOR

## 1.5 Distribution et localisation de la XOR

L'activité de la xanthine oxydoréductase (XOR) a été détectée dans les extraits de toutes les espèces étudiées à ce jour, y compris les bactéries (**Chris A. Pritsos., 2000**). L'enzyme humaine est soumise à un contrôle à plusieurs niveaux, en réponse à une série de facteurs, tels que les hormones, la tension en oxygène, et des cytokines (**Harisson et al., 2002**). Chez les mammifères, le foie et l'intestin ont l'activité la plus élevée de tous les tissus (**Chris A. Pritsos., 2000**).

Jarasch et ses collègues ont été les premiers qui ont abordé en détail la répartition cellulaire de XOR, ils ont montré la présence de l'enzyme dans les cellules épithéliales et les cellules endothéliales capillaires de la glande mammaire. XOR est détecté aussi dans les macrophages humains et les mastocytes (**Harisson et al., 2002**).

## 1.6 Rôles physiologiques de la XOR

Au cours des dernières années, un intérêt considérable dans la régulation du gène XOR a émergé dans un effort pour élucider les facteurs responsables de tissu de cette enzyme et d'expression cellulaire spécifique et de placer cette réglementation dans le cadre de son rôle physiologique. Un certain nombre de résultats significatifs ont été récemment signalés qui commencent maintenant à élargir notre compréhension du rôle physiologique de cette enzyme au-delà du métabolisme des purines. Il a été suggéré que l'expression accrue de XOR peut jouer un rôle dans l'effet immuno-modulateur et anti-viraux provoquée par ces cytokines (**Chris A. Pritsos., 2000**).

XOR a longtemps été connu pour avoir des propriétés bactéricides en présence de l'hypoxanthine, L'enzyme est régulée par les cytokines pro-inflammatoires, considéré comme un agent de défense, en grande partie en raison de sa capacité à générer les ROS. Le

peroxynitrite assure un rôle dans la stérilisation de l'intestin du nouveau-né avec la capacité de cibler les bactéries pathogènes dans les membranes épithéliales du tractus digestif. Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire est en général d'un intérêt croissant (**Harisson et al., 2002**).

L'acide urique, un antioxydant général, c'est un piègeur efficace de peroxynitrite et se produit à des concentrations relativement élevées, dans le plasma de l'homme et les primates supérieurs, qui n'ont pas l'urate oxydase. Offrant une protection contre le vieillissement et le cancer ou le stress oxydatif dans le système nerveux central (**Harisson et al., 2002**).

## 1.7 Rôles pathologiques de la XOR

XOR a la capacité de se lier aux glucose amino glycanes sur la surface des cellules endothéliales vasculaires et sous forme concentrée, pour initier des dommages oxydatifs dans des organes qui ne sont pas seulement à distance du site d'origine des dommages mais peuvent eux-mêmes avoir une faible teneur en XOR (**Harisson et al., 2002**).

La découverte que la XOR peut se produire le NO, ajoute clairement une nouvelle dimension à des considérations de rôle vasculaire de l'enzyme. Le NO et le superoxyde interagissent rapidement. Le produit résultant est le peroxynitrite, un oxydant puissant et destructeur, peut être produit par la XOR lui-même, quand il devient entièrement ou partiellement découplé de la L-arginine ou de la tétrahydrobioptérine. Cette espèce réactifs a récemment suscité beaucoup de clinique liée en intérêt et a été impliqué dans une gamme de pathologies , y compris l'arthrite , l'asthme , la septicémie , l'athérosclérose , et , en particulier , les maladies neurologiques , comme la sclérose en plaques , la maladie d'Alzheimer et de Parkinson maladies , et la sclérose latérale amyotrophique ( **Harisson et al., 2002**).

La xanthine déshydrogénase réduit la mitomycine C principalement par une réduction à deux électrons directe, la génération du métabolite 2,7-diaminomitosenone. Il semble aussi y avoir des réductions à un électron de la mitomycine C dans les mêmes conditions. La xanthine oxydase, de lait, réduit la mitomycine C en totalité par un mécanisme à un électron, la génération de la mitomycine C radical semiquinone qui réagit ensuite avec l'oxygène moléculaire pour former le superoxyde (**Chris A. Pritsos., 2000**).

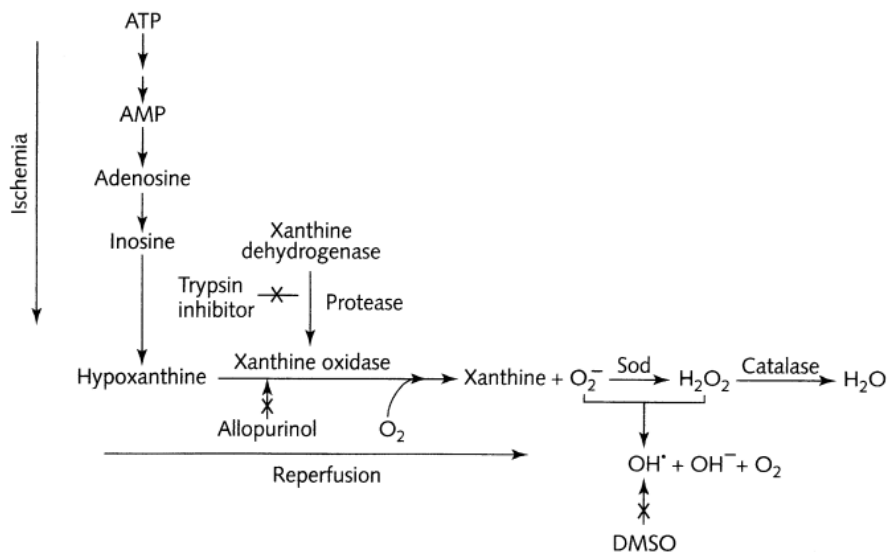
### 1.7.1 Rôle de la XOR dans l'inflammation

Les cytokines ont été montrés pour stimuler l'activité du XOR, dans un profil cohérent avec une réponse en phase aiguë (**Harisson et al., 2002**).

Les interférons de Type- I de type II induisent l'expression du gène de la XOR dans un certain nombre de tissus et de lignées cellulaires et par conséquent semblent être des inducteurs généraux du XOR. L'expression du gène XOR accrue a été rapportée dans des cellules épithéliales rénales après une exposition à un certain nombre de cytokines, y compris le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'interféron g , l'interleukine- 1 (IL- 1) , IL-6 (**Chris A. Pritsos., 2000**)

### 1.7.2 Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion

Granger et ses collègues ont attiré l'attention sur la XOR en proposant un rôle clé de l'enzyme dans la pathogénèse de l'ischémie-reperfusion (IR). Leur mécanisme hypothétique, décrit dans la figure 6.



**Figure 6: Mécanisme de génération de ROS dans IR comme proposé par Granger et autres (Harisson et al., 2002).**

Au cours de l'ischémie, des gradients ioniques transmembranaires sont dissipés, ce qui permet des concentrations élevées de calcium cytosoliques. Ceci, à son tour, active une protéase qui convertit de façon irréversible XDH, prédominant *in vivo*, en XO. Parallèlement, l'ATP cellulaire est catabolisé à l'hypoxanthine, qui s'accumule (**Sanders et al., 1997**). La réperfusion, l'oxygène réadmis, l'hypoxanthine et la XO se combinent pour générer le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent interagir

pour produire une série d'agents cytotoxiques, y compris des radicaux hydroxyles (Harrison 2002). le superoxyde a été impliqué dans un rôle majeur des lésions post- ischémiques ou de reperfusion dans une grande variété de tissus y compris l'intestin, le cœur, le rein, le foie et le cerveau (**Todd et al.,1987**).

### **1.7.3 Rôle de la Xanthine oxydoreductase (XOR) dans d'autres maladies**

La xanthine oxydoréductase provoque d'autres maladies, telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie du tissu conjonctif mixte, la sclérodermie, et l'athérosclérose (**Harrison., 2002**).

L'activité de la XOR a été déterminée dans un certain nombre de tumeurs animales et dans quelques tumeurs humaines. Les tumeurs rénales dont 25% correspondant à l'activité de la XOR. Deux autres études dans les tissus humains ont rapporté une augmentation des activités de la XOR dans le colorectal et de la prostate par rapport à leurs tissus normaux correspondants (**Chris A. Pritsos., 2000**).

## 2 Métabolites secondaires

### 2.1 Polyphénols

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques, comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyle, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Bamforth., 1999**).

Ils prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé (**Pincemail, 1999**). En effet, leur rôle d'antioxydants (**Pietta., 2000**) naturels suscite de plus en plus d'intérêt, pour la prévention et le traitement du cancer (Cheng et *al.*, 2006), des maladies inflammatoires (**Laughton et al.,1991**), cardiovasculaires (**Pincemail, 1999**) et neurodégénératives (**Orgogozo et al., 1997**). Ils sont également utilisés dans les domaines pharmaceutique et cosmétique, ainsi comme additifs dans l'industrie agroalimentaire (**Raven, 2003**).

La diversité de structures des composés phénoliques les rend difficiles à les classer. D'après Martin (1998), plusieurs catégories ont été distinguées, à savoir, les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

#### 2.1.1 Phénols simples

Les phénols simples, tels que le catéchol, le guaiacol, le phloroglucinol sont assez rare dans la nature, à l'exception de l'hydroquinone, qui existe dans plusieurs familles de plantes (Ericaceae, Rosaceae) (**Bruneton, 1999 ; Peterson et al., 2006 ; Vanamala et al., 2006**).

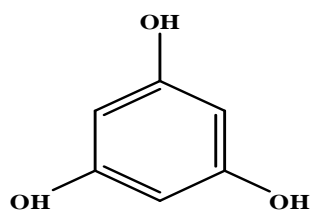


Figure 7: Structure de phloroglucinol (Bruneton,1999).

#### 2.1.2 Acide phénol

Un acide phénol est un composé organique, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont contenus dans certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Bruneton , 1999 ; Psotova et al., 2003**).La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique(**Richter, 1993 ; Sarin-Manchado et Cheynier, 2006**).

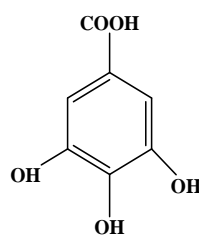


Figure 8: Structure de l'acide gallique (Shahidi et Nacz, 2004)

### 2.1.3 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (à l'exception des anthocyanes)(Yilmaz, 2006). Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone, elle-même, issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique. La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène (Vercauteren et al., 2006).

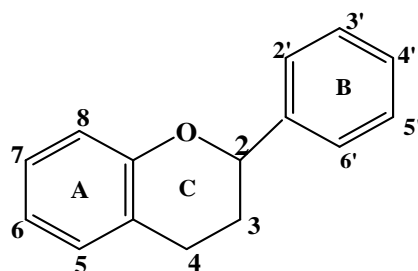


Figure 9: Structure de base des flavonoïdes (Vercauteren et al., 2006).

Les flavonoïdes constituent, eux même, une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants (interactions légumineuses/Rhizobium, filtres UV...) (Manach *et al.*, 2004). La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation, méthylation et glycosylation, de chacun des trois cycles des molécules de base. Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par :

1. La présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. En effet, les flavones, les flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés.
2. La présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy. (Bruneton, 1999).

### 2.1.3.1 Flavones et flavonols

représentent la majorité des flavonoïdes connus, leurs distributions et leurs hétérosides est universel, mais certain schéma de substitution sont restreinte à des familles ou groupes de familles d'où leur intérêt et terme de chimiotaxonomie (Vercauteren et al., 2006).

### 2.1.3.2 Flavonone

Ces molécules caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre d'asymétrie (Peterson, 2006).

À ces différentes classes des flavonoïdes, s'ajoutent les anthocyanes qui sont des dérivés du flavylum ou 2-phényl benzopyrylium. Ils portent des fonctions phénols libres, éthers, ou glycosides (Hammerstone, 2000 ; Hadi, 2004). Le terme anthocyane, initialement forgé pour désigner la substance responsable de la coloration des fleurs, attirent les insectes et les oiseaux et jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines (Bruneton, 1999).

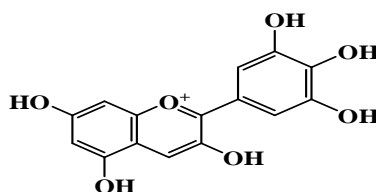


Figure 10: Structure de Delphinidol (cheynier, 2005)

### 2.1.4 Tanins

des polyphénols polaires d'origine végétale (Berthod et al., 1999), présents dans chaque partie de plante (écorce, bois, feuille...). Leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Da (Cowan, 1999) et ils sont caractérisés par leur aptitude à se complexer avec des macromolécules, telles que les protéines ou les polysaccharides. Cette caractéristique leur confère de nombreux intérêts biologiques exploités, notamment par les industries pharmaceutiques et agroalimentaires. Les chercheurs ont distingué chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins différents par leur structure, aussi bien par leur origine biogénétique (Bruneton, 1999).

#### 2.1.4.1 Tanins hydrosolubles

Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable de molécules d'acides phénols. Ces derniers peuvent être, soit l'acide gallique, dans le cas des tanins galliques ou l'acide hexahydroxy- diphénique (HHDP) et ses

dérives d'oxydation dans le cas des tanins, classiquement dénommés, tanins ellagiques (Okuda *et al.*, 1995, Remesy *et al.*, 1996 ; Cannas, 1996).

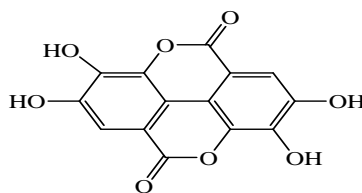


Figure 11: Structure de l'Acide ellagique (Okuda, *et al.*, 1995)

#### 2.1.4.2 Tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols, liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. (procyanidol B-4) (Hedqvist, 2004).

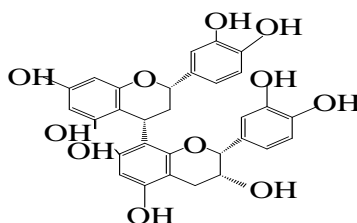


Figure 12: Structure de Procyanidol B-4 (Cowan, 1999)

#### 2.1.5 Terpénoides

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale, la plus importante, est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ), reconnue par Wallach dès 1987. Cet isoprène est à la base du concept de la règle isoprénique (Isoprène pyrophosphate : IPP) énoncée en 1953, par Ruzicka et complétée par Lynen *et al.*, 1958 et Bloch *et al.*, 1959).

Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle, désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique, d'où le nom d'isoprénoïde, également dénommé (Bruneton, 1999).

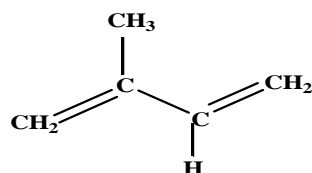


Figure 13: Unité de base de l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène)

Les terpénoïdes jouent de multiples rôles chez les plantes. Certains sont des pigments photosynthétiques (les caroténoïdes) ou des hormones (gibbérellines, acides abscissique),



tandis que d'autres sont utilisés en tant que composants de la structure des membranes (stéroïdes) ou transporteurs d'électrons (ubiquinone et plastoquinone). Les terpènes sont utilisés dans l'industrie des parfums (essence de lavande, rose), comme insecticides (acide chrysanthémique) et comme condiments (extrait du clou de girofle) (**Dubey *et al.*, 2003**).

Les terpènes sont classés selon le nombre d'unités isoprène, en une série de structures homologues, à savoir, les hémiterpènes C<sub>5</sub> (1 unité isoprène), les monoterpènes C<sub>10</sub> (2 unités isoprènes), les sesquiterpènes C<sub>15</sub> (3 unités isoprènes), les diterpènes C<sub>20</sub> (4 unités isoprène), les tetraterpènes C<sub>40</sub> (8 unités isoprènes) et les polyterpènes (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub> où n peut être de 9-30000 (**Lamarti *et al.*, 1994**).

### 3 Inhibiteurs de la XOR

De puissants inhibiteurs de la XOR peuvent être divisés en deux grandes catégories, des molécules qui sont des analogues des substrats de purine, dans une mesure plus ou moins grande et les molécules qui n'ont pas de relation structurelle particulière aux substrats physiologiques. Le premier groupe se compose de pyrazolo [3,4-d] pyrimidines (alloxanthine étant le plus important d'entre eux), ptérines comme 6-pteridylaldehyde, et certains autres composés hétérocycliques aromatiques. Le deuxième groupe sont le cyanure, l'arsénite, et le méthanol, des composés qui n'inhibent pas la XOR exclusivement, mais interagissent spécifiquement avec l'enzyme (**Hille and Massey., 1981**).

Les deux classes d'inhibiteurs agissent au niveau ou très près du site molybdène de l'enzyme, ou au niveau du site actif "cyanolysable" de l'atome de soufre et interfèrent avec la réaction de l'enzyme et les substrats réducteurs (les hydroxypurines) plutôt que de l'oxygène (**Hille and Massey., 1981**).

#### 3.1 Inhibiteurs analogues de substrats

##### 3.1.1 Allopurinol et alloxanthine

L'Allopurinol bloque la reperfusion dans le cœur, les reins, les intestins et le foie, améliore la fonction et la survie du greffon après la transplantation rénale, et augmente la capacité de survie en réponse à un choc circulatoire. Dans le cœur, il fournit également une protection contre les arythmies induites par la reperfusion (**Todd et al . ; 1987**). L'allopurinol a été utilisé comme un médicament cliniquement efficace, bien toléré dans le traitement de l'hyperuricémie associée à la goutte (**Elion et al , 1963; . Rundles et al, 1969. Yu et Cutman, 1964**).

##### 3.1.2 Mécanisme d'action

Des travaux de Massey et ses collaborateurs (**Massey et al., 1970**) a établi que l'allopurinol est un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydoréductase en formant un complexe très serrée avec le molybdène réduit au niveau du site actif après avoir été oxydé par l'enzyme en alloxanthine. L'orientation des atomes d'azote dans les analogues de substrat est une critique importante pour l'expression d'inhibition de la xanthine oxydase (**Hille and Massey., 1981**).

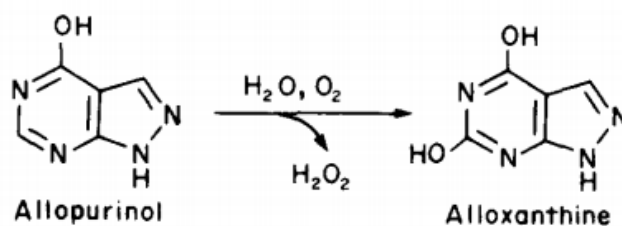


Figure 14: Mécanisme de l'allopurinol

L'oxypurinol est un inhibiteur non compétitif de l'enzyme; la formation de ce composé, avec sa longue persistance dans les tissus est responsable de la majeure partie de l'activité pharmacologique de l'allopurinol (Pacher et al., 1966).

### 3.2 Autres inhibiteurs de la XOR

le premier inhibiteur de la xanthine oxydase découvert était un produit de dégradation de l'acide folique, plus tard identifiés comme 2-amino-4-hydroxy-6-formylpteridine, généralement connu sous le nom de 6-pteridylaldehyde (Kalckaret al., 1948). Le pterin aldehyde diminue le potentiel post-ischémique de l'intestin. (Todd. et al. ; 1987).

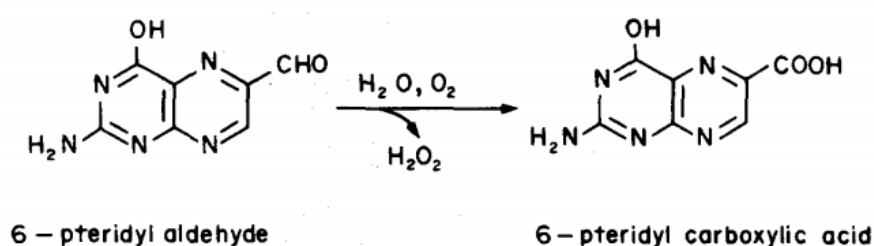


Figure 15: Mécanisme de 6-pteridylaldehyde

Bakeret Wood (1967) ont montré que le 9-phenylguanine inhibe la xanthine oxydase environ 140 fois plus efficacement que le 9-méthylguanine et que l'interaction aromatique avec l'enzyme est hydrophobe plutôt que de transfert de charge dans la nature. Cette interaction conduit à l'adaptation de site actif pour former un inhibiteur irréversible (Hille and Massey., 1981).

#### 3.2.1 Cyanide

Le Cyanide a été montré la première fois comme un inhibiteur de la xanthine oxydase par Szent- Györgyi (1926) et Handler (1958) ont rapporté que le  $^{14}\text{CN}^-$  lié à l'enzyme

avec une stœchiométrie équivalent de un molaire par site actif, mais par la suite il a été démontré par Massey et Edmondson (1970) que ce n'était pas la source de l'inactivation. Au contraire, on fait réagir le cyanure avec l'enzyme pour libérer un atome essentiel de soufre comme le sulfocyanate. L'activité peut être récupérée significativement après incubation avec le  $\text{Na}_2\text{S}$ . **(Hille and Massey.,1981).**

### 3.2.2 Méthanol et le formaldéhyde

Le méthanol inhibe la xanthine oxydase lorsqu'elle est incubée en présence de xanthine. Il est probable que le méthanol est converti en formaldéhyde avant son inactivation de l'enzyme. Comme le méthanol, le formaldéhyde est capable de réduire la xanthine oxydase **(Hille and Massey.,1981).**

L'éthylène glycol et le mercapto-éthanol inhibent également la xanthine oxydase. Le premier a été montré pour être converti en glyoxylate et oxalate par l'enzyme. **(Hille and Massey ., 1981).**

### 3.2.3 Arsénite

Coughlan et al. (1969) ont rapporté que le traitement d'arsénite, comme le cyanure, a eu comme conséquence un changement spectral de l'enzyme qui était concordante avec le développement de l'inhibition. L'observation importante a été également faite que l'inactivation de cyanure a semblé être irréversible, l'effet de l'arsénite était réversible par dilution (par la dialyse). Ainsi, ils ont conclu que les effets de l'arsénite et le cyanure sont réciproquement exclusives, et que les deux ont interagi avec l'enzyme au niveau du molybdène **(Hille and Massey ., 1981).**

Les concentrations testées de l'allopurinol, l'oxypurinol, amflutizole et (-) BOF 4272, tout en inhibant fortement l'oxydation de la xanthine par XO humaine et bovine, ont un peu d'effet sur l'oxydation du NADH par la XDH ou la XO humain.

D'autre part, le diphenyleneiodonium, un inhibiteur bien connu du neutrophile flavoenzyme NADPH oxydase, a été retrouvé à agir comme un puissant inhibiteur de l'oxydation du NADH par la XDH et la XO humaine.

L'oxydation de NADH est accompagné de la production d'anion superoxyde par la forme déshydrogénase de la XOR étaient nettement plus rapidement que par les formes d'oxydase.

### 3.2.4 Febuxostat : (TEI-67202- (3-cyano-4-isobutoxyphényl) -4-méthyl-5-thiazolecarboxylique)

Le febuxostat vient d'être commercialisé, en France, sous le nom d'Adénuric®. Comme l'allopurinol, présente un effet hypo-uricémiant avec une activité in vivo plus grande et durable comparable à celle de l'allopurinol. Il réduit le taux d'acide urique sérique avec une inhibition de la xanthine oxydoréductase de type mixte (Osada et al., 1993).

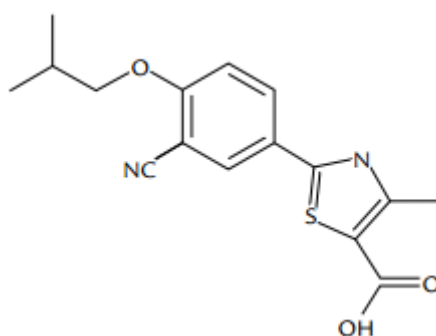
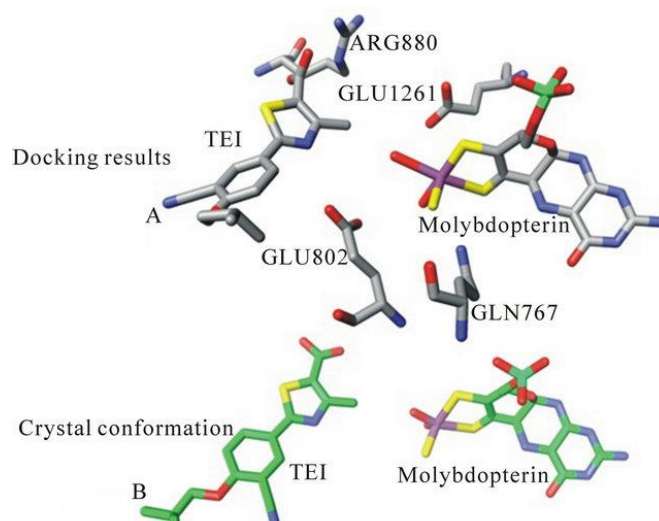


Figure 16: Structure chimique de l'inhibiteur febuxostat

C'est un inhibiteur de la xanthine oxydoréductase, mais à l'inverse de l'allopurinol, ce n'est pas un analogue des purines, c'est un inhibiteur beaucoup plus sélectif. Cette différence dans l'inhibition pourrait expliquer la plus grande puissance observée et plus durable activité hypo-uricémiante du febuxostat chez les animaux et les humains (Takano et al., 2004).

#### 3.2.4.1 Mécanisme d'action

Febuxostat remplit la majeure partie du site actif de la XOR, agissant comme un inhibiteur basée sur la structure par l'intermédiaire d'interactions multiples, lié très étroitement au site actif de l'enzyme en bloquant la liaison au substrat, de nombreuses liaisons hydrogène ainsi que des interactions hydrophobes avec la matrice de protéine ont été observées. Y compris une liaison ionique de son groupe carboxylique avec Arg880, la liaison hydrogène de l'atome d'azote du thiazole avec Glu802, et l'anneau thiazole entre Phe914 et Phe1009 dans la XOR (Fujisaki et al., 2012). Le complexe enzyme-inhibiteur est très stable et non influencée par les changements dans l'état redox du cofacteur. (Okamoto et al., 2002).



**Figure 17: Mécanisme d'action de Febuxostat**

### 3.2.5 FYX-051 : 4- (5-pyridin-4-yl-1 H- [1, 2, 4] triazol-3-yl) pyridine-2-carbonitrile)

La structure cristalline du complexe XOR-FYX-051 aux rayons X a été déterminée par **Okamoto et al. (2004)**. Ils ont démontré que FYX-051 se lie au site actif de molybdène par une liaison covalente, qui est produite par des interactions avec les résidus d'acides aminés, qui a duré une longue période, ces effets approximativement 30 fois plus puissant que ceux de l'allopurinol (**Shimo et al., 2005**).

## 3.3 Inhibiteurs naturels

### 3.3.1 Flavonoïdes

La famille des flavonoïdes montre un fort potentiel d'inhibition de la xanthine oxydoréductase. Actuellement, plus de 4000 flavonoïdes sont connus. Ils peuvent fournir une alternative intéressante pour le traitement de maladies à médiation radicalaire. L'énorme diversité de la famille des flavonoïdes suggère la nécessité d'une connaissance de la relation structure-fonction pour sélectionner les molécules les plus actifs.

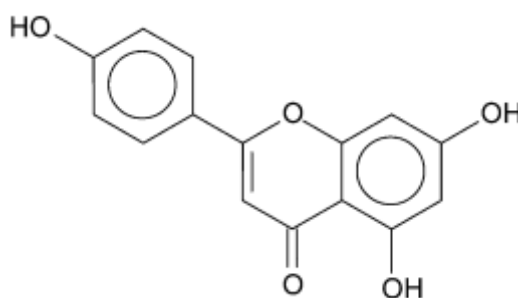
Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR isolés des plantes (**Lin et al., 2002**). Les études ont montré que ces composés inhibent la XOR d'une manière compétitive (**Lin et al., 2002; Van Hoorn et al., 2002; Da Silva et al., 2004**). Des études menées sur l'inhibition de la XO ont montrées l'existence de similarités structurales entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau purinique de l'hypoxanthine et la xanthine (**Rastelli et al., 1997**).

Les données de cette étude indiquent qu'une structure planaire est nécessaire pour l'activité inhibitrice élevée envers la xanthine oxydoréductase. Mais la structure plane des

flavones seul est insuffisante pour induire une inhibition de cet enzyme. Les groupes hydroxyle en C-5 et C-7 et la double liaison entre C-2 et C-3 sont essentiels pour une activité inhibitrice de la xanthine oxydase plus élevée. Les flavones ont montré une activité inhibitrice légèrement plus élevée que les flavonols, cet effet peut être expliqué par des affinités structurales entre 5,7 dihydroxy flavone et l'enzyme (**Danny et al., 2002**).

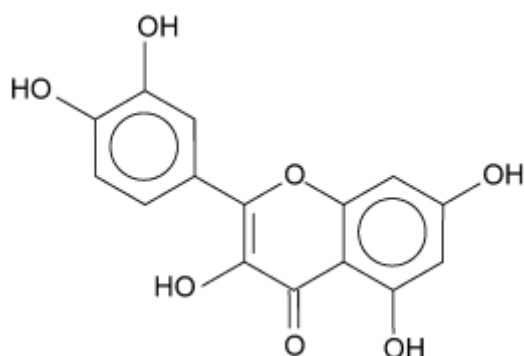
Des groupes hydroxyles qui apportent une contribution négative sur l'inhibition de la xanthine oxydoréductase, sont dans les positions 2, 8 et 3. La substitution à la position 2 a le plus grand impact. Par contre l'introduction d'une fonction hydroxyle en position 8 et 3 présente à peu près les mêmes résultats. Deux caractéristiques importantes étaient observées sont la formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle liés à C7 et C5, et l'interaction entre le groupe carbonyle et les résidus Glu 1261, Arg 880 et Thr 1010, respectivement (S.L. da Silva et al., 2004). Les effets négatifs sur l'inhibition pourraient être dus à la perturbation des liaisons hydrogène dans le centre allostérique en raison de l'encombrement stérique (**Danny et al., 2002**).

L'Apigénine était l'inhibiteur le plus puissant qui a montré l'interaction la plus favorable dans le site réactif de la XOR. L'anneau benzopyranone bicyclique de l'apigénine associé avec le Phe 914, et le groupe phénolique étiré à l'espace environnant avec plusieurs résidus hydrophobes (**Lin et al., 2002**).



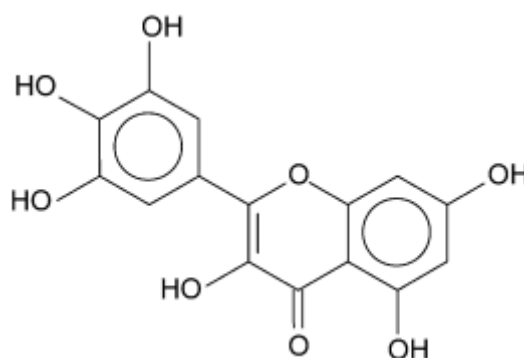
**Figure 18: Structure de l'apigénine (flavone)**

La quercétine a montré une inhibition compétitive de la xanthine oxydoréductase qui a également été vu pour d'autres flavones, ce qui suggère une liaison au centre allostérique de la xanthine oxydoréductase, remplaçant ainsi la xanthine par contre le morin et la galagine ont montré une inhibition de type mixte ce qui explique la différence du pourcentage d'inhibition (**Danny et al., 2002**).



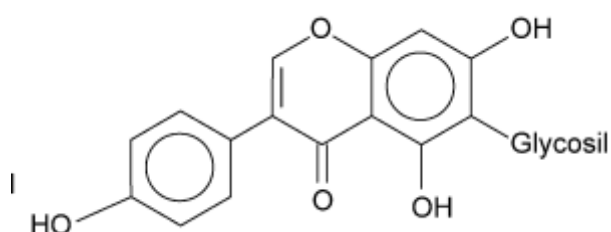
**Figure 19: Structure de la quercétine (flavonol)**

La quercétine et myricétine présentent la même orientation que l'apigénine dans le centre actif, cependant, la plus faible interaction résultant de la liaison instable de l'hydroxyle lié à C3 qui est placé à côté des résidus non polaires de Phe 1009, Val 1011 et Leu 1014 (da Silva et al., 2004).



**Figure 20: Structure de la myricétine (flavonol)**

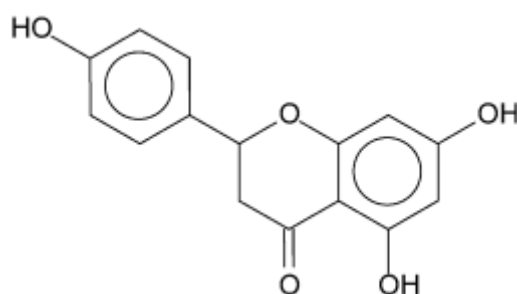
En ce qui concerne l'orientation présentée par la génistéine, en comparaison avec l'apigénine, l'étude de modélisation de Lin et al., 2002 a montré que cette molécule peut guider son anneau de benzopyranone à une région d'hydrophobe de l'enzyme. Avec des liaisons instables et une inhibition très faible en comparaison avec d'autres composés flavonoïdes (da Silva et al., 2004).



**Figure 21: Structure de la génistéine (flavone)**

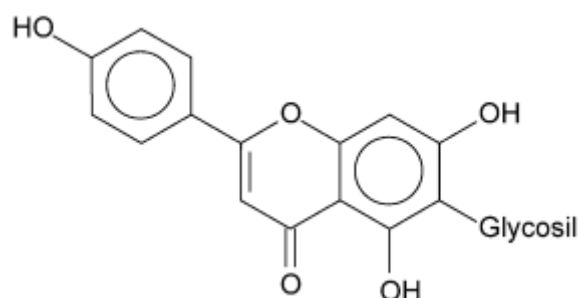


L'inactivité observée dans la molécule naringénine peut être expliquée par l'absence d'une structure plane qui est une condition importante dans les flavonoïdes pour avoir une activité inhibitrice de la xanthine oxydoréductase (**Da Silva et al., 2004**).



**Figure 22: Structure de la naringénine (flavanone)**

L'orientation de l'isovitexine très similaire à la génistéine, cependant, la présence de la fraction de sucre dans la molécule oriente cette région vers le site hydrophobe qui contribue à stabiliser le cycle benzopyranone mais la présence de plusieurs groupes hydroxyle dans le glycosil agit comme éléments instables à l'intérieur de la région non polaire ce qui ne favorisent pas la formation du complexe F-XOR. Le sucre lié à l'atome C6 de l'isovitexine provoque probablement un encombrement stérique d'éviter l'interaction avec la XOR (**Da Silva et al., 2004**).



**Figure 23: la structure de l'isovitexine (flavone glycoside)**

Enroth et al. (2000) ont récemment publié la structure cristalline de la xanthine oxydase du lait de bovins, Ils peuvent être émis l'hypothèse que l'anneau A et C de flavones ont des interactions avec phe 1009 et Phe 914, qui sont nécessaires pour l'inhibition de la xanthine oxydase.

Dans la présente étude, ils ont démontré clairement qu'une structure planaire des flavonoïdes est nécessaire pour optimiser l'inhibition de la xanthine oxydoréductase. Cette constatation est conforme aux résultats d'études antérieures réalisée par Cos et al. (1998) et Nagao et al.(1999) (Danny et al., 2002).

## II- Matériels et méthodes

### 1 Matériels et méthodes

#### 1.1 Matériel végétale

La récolte des plantes a été effectuée au mois de juillet pour *Pistacia lentiscus* et septembre pour *Fraxinus angustifolia*, l'année 2012 dans la région d'Amizour (Wilaya de Béjaia). Les plantes ont été identifiées au laboratoire de botanique, université de Bejaia.

##### 1.1.1 *Pistacia lentiscus*

###### 1.1.1.1 Description de la plante

L'Arbre au mastic, ou Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus*) est un arbuste poussant dans les garrigues et les maquis des climats méditerranéens. Plante de la famille des Anacardiaceae, à feuillage persistant, elle donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs à maturité (Katsiotis et al., 2003).

###### 1.1.1.2 Classification de *Pistacia lentiscus*

Tableau 1: Classification classique de *Pistacia lentiscus*( AL-Saghir et Porter.,2012).

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Anacardiaceae
<b>Genre</b>	Pistacia
<b>Nom binominal</b>	<i>Pistacia lentiscus</i>

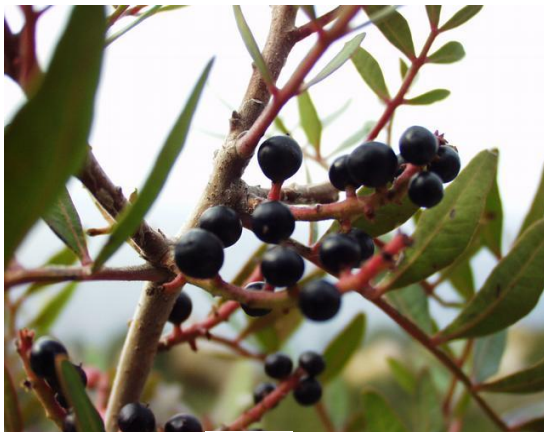
### 1.1.1.3 Classification phylogénétique

Tableau 2: Classification phylogénétique

Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae

### 1.1.1.4 Description botanique

*Pistacia lentiscus* est un arbrisseau de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte de la famille des Anacardiaceae. Elle est particulièrement représentative des milieux les plus chauds du climat méditerranéen que l'on retrouve en association avec l'oléastre (olivier sauvage), la salse pareille et le myrte dans un groupement végétal nommé «l'Oléolentisque», mais également dans les boisements clairs à Pin d'Alep ou d'autres formations de garrigues basses. En Algérie, on le retrouve sur tout type de sol, des zones sub-humides et semi-arides, plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (**Katsiotis et al., 2003**).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 24: Description botanique de *Pistacia lentiscus*

### 1.1.1.5 Utilisation traditionnel de la plante

#### 1.1.1.5.1 Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus*

*Pistacia lentiscus* est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. En effet, la décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et gastrique ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Palevitch et Yaniv, 2000).

La partie aérienne est traditionnellement utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (Scherrer et al., 2005). Les feuilles sont pourvues d'activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante (Villar et al., 1987). Elles sont également utilisées dans le traitement de l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, asthme et problèmes respiratoires (Villar et al., 1987; Shtayeh et al., 1998; Lev et Amar, 2002).

### 1.1.2 *Fraxinus angustifolia*

#### 1.1.2.1 Description de la plante

Le Frêne à feuilles étroites, Frêne du Midi ou Frêne oxyphylle (*Fraxinus angustifolia*) est un arbre de la famille des Oléacées, ne dépassant pas 25m présentant des feuilles composées pennées, à bordure irrégulièrement dentée.

#### 1.1.2.2 Classification classique

Tableau 3: Classification classique de *Fraxinus angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007)

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Scrophulariales
<b>Famille</b>	Oleaceae
<b>Genre</b>	Fraxinus
<b>Nom binominal</b>	<i>Fraxinus angustifolia</i>



### 1.1.2.3 Classification phylogénétique

Tableau 4: Classification phylogénétique de *Fraxinus angustifolia*

Ordre	Lamiales
Famille	Oleaceae



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 25: Description botanique de *Fraxinus angustifolia*

### 1.1.2.4 Activité pharmacologique et effet thérapeutiques de *Fraxinus angustifolia*

On lui connaissait des vertus pour guérir les hernies et les rachitismes infantiles. De son écorce, on extrait la fraxine traitant goutte, rhumatisme et troubles diurétiques. Les feuilles sont comestibles par les animaux, et sont aussi diurétiques et un remède contre les rhumatismes articulaires. (Kostova et Iossifova, 2007).

Durant la floraison du frêne à fleurs, des excisions, au mois d'août, dans l'écorce permettent de récolter une sève sucrée jaunâtre : la manne (qui désigne aussi les produits

dérivés d'autres plantes). Nutritive et légèrement tonique, c'est un aliment de convalescence. Elle sert aussi d'excipient, mais elle est surtout utilisée comme laxatif doux pour les enfants et les femmes enceintes. Elle était vendue, sous le nom « la manne en larmes », par les apothicaires. Le suc extrait des feuilles, bu ou appliqué sur la plaie, étaient d'une efficacité sans égale contre les morsures de serpents. Cet emploi perdura jusqu'au début du XXe siècle, à tel point qu'on dit que les serpents ne passent pas sous l'ombre des frênes. (**Kostova et Iossifova, 2007**)

En raison de leurs large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* et *Fraxinus angustifolia* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. Ces études consacrées essentiellement aux feuilles de *P. lentiscus* et à l'écorce de *F.angustifolia* ont montré la présence des phénols totaux, des flavonoïdes, des tannins et des terpenoïdes (**Romani et al., 2002; Stocker et al., 2004**).

## 1.2 Méthodes

### 1.2.1 Extraction

#### 1.2.1.1 Préparation de l'extrait brut

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont préalablement nettoyés, séchés et broyés afin d'obtenir une poudre fine (0,63 µm). Cette poudre a été macérée dans l'éthanol (95 %) à un rapport de 1g de poudre pour 4ml d'éthanol, sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. Après une période de décantation de 12h, l'éthanol est éliminé par évaporation à l'air libre jusqu'à la stabilisation du poids sec de l'extrait, permettant ainsi d'obtenir l'extrait brut (EBr) de chaque parties des deux plantes qui a été conservés à - 4°C jusqu'à l'utilisation (**Atmani et al., 2009**).

#### 1.2.1.2 Fractionnement de l'extrait brut

Dans le but d'extraire le maximum de composés nous avons utilisé une extraction sélective avec plusieurs solvants selon le protocole de **Atmani et al. 2009**, avec quelques modifications (Figure 26). L'extrait éthanolique obtenu a été mis dans un mélange eau/éthyle acétate avec un rapport de 1 :3 (V/V). Après séparation et séchage, la phase organique d'éthyle acétate subit une extraction avec un mélange chloroforme /eau a un rapport de 1 :3 (V/V).

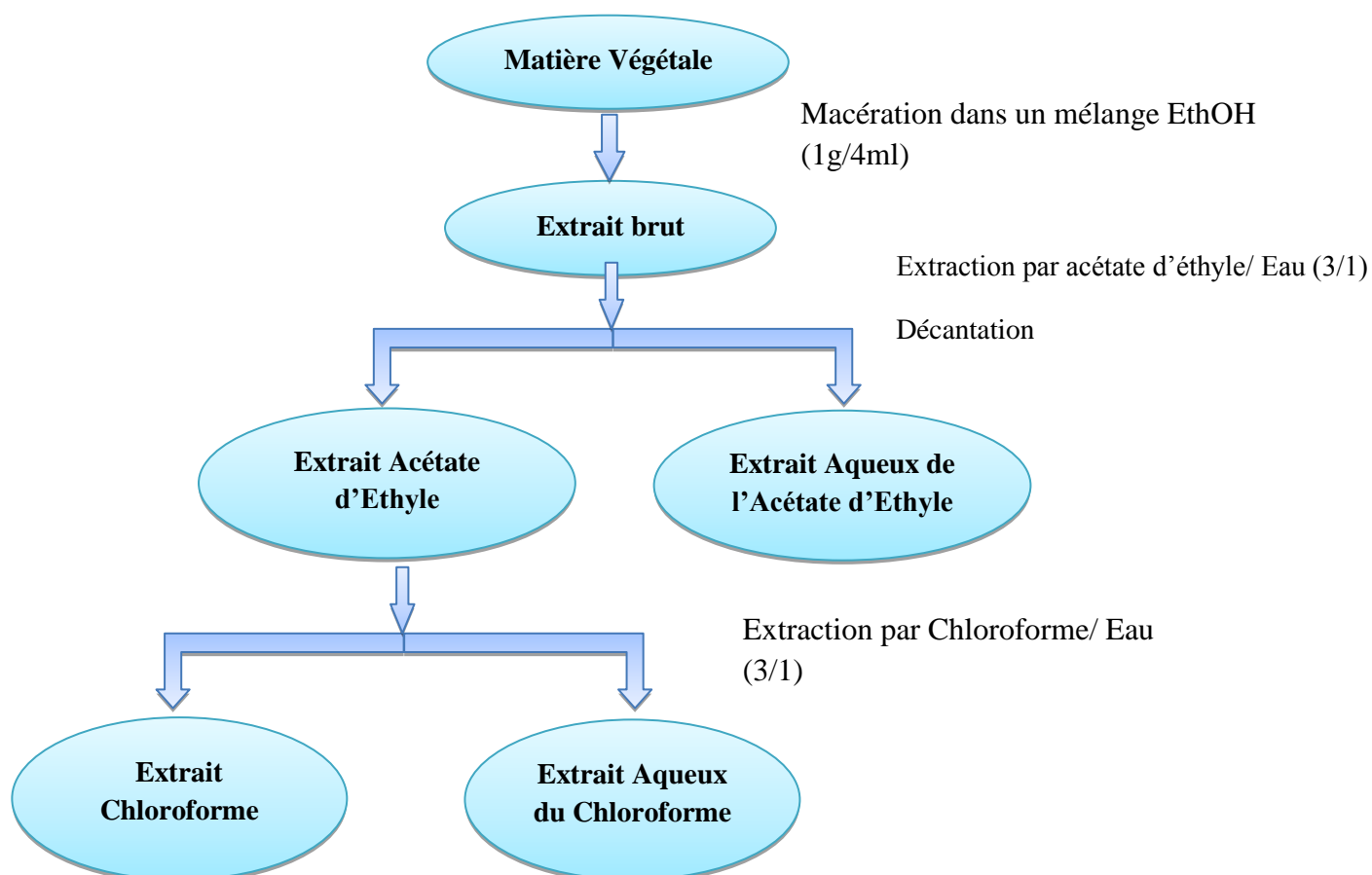
Le taux d'extraction a été calculé pour chaque extrait comme suit :

$$T_E (\%) = [(P_1 - P_0) / P_t]$$

$P_1$  : poids de l'extrait séché

$P_0$  : poids de récipient vide

$P_i$  : poids de la phase précédente.



**Figure 26: Protocole d'extraction des composés phénolique à partir de la poudre des plantes.**

### 1.2.2 Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de **Djeridane et ses collaborateurs 2006**, inspirée de la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandu pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

#### 1.2.2.1 Principe de la méthode

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de

molybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximale est à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005**).

### 1.2.2.2 Mode opératoire

La teneur en polyphénols a été déterminée spectrophotométriquement selon le protocole de Djeridane et ses collaborateurs. 100µl de chaque extrait dissouts dans 3.1mg/ml du méthanol ont été ajoutés à 500µl du réactif de Folin Ciocalteu (dilution 1/10) en plus de 1000µl de l'eau distillé. Après 1min d'incubation à l'obscurité, 1500µl d'une solution de carbonate du sodium (20%) ont été ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765nm après 2h d'incubation.

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ) réalisée en utilisant une molécule de référence « la catéchine » dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq Cat/g d'extrait). Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

### 1.2.3 Dosage des flavonoïdes totaux

#### 1.2.3.1 Principe

La méthode du trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (**Mimica Dukié, 1992**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits. Cette méthode est basée sur la formation de complexes jaunâtres par chélation de métaux (Fe et Al) par les différents extraits.

#### 1.2.3.2 Mode opératoire

1ml de l'extrait a été ajouté à un volume de 500µl de la solution d' $AlCl_3$  (133 mg d' $AlCl_3$ +400 mg acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée). Après 5min d'incubation, l'absorbance est lue à 430nm. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent de rutine par gramme de l'extrait. Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

### 1.2.4 Dosage des tannins totaux

L'estimation de la teneur en tannins contenus dans les extraits a été réalisée par la méthode de **Hagerman et Butler 1978**.



### 1.2.4.1 Principe de la méthode

Les tannins sont connus par leur propriété principale, qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) réagit avec les tannins (en milieu alcalin : SDS/TEA pour former des chélates de couleur violette).

### 1.2.4.2 Mode opératoire

500 $\mu\text{L}$  d'extrait et 1ml de la solution de BSA (1mg/ml) préparés dans un tampon acétate (0,4M, pH= 6) ont été mélangés. Après 24 heures d'incubation à 4°C, le mélange a été centrifugé à 3000g pendant 15min. Le précipité a été dissout dans 2mL de la solution tampon: SDS/TEA et mis à l'obscurité pendant 15mn. Après addition de 500 $\mu\text{L}$  de la solution de chlorure ferrique (0,1N) et une incubation de 15min, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 510nm.

La concentration en tannins a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique. Les concentrations sont exprimées en milligramme équivalent de l'acide tannique par gramme d'extrait (mg Eq AT/g d'extrait).

### 1.2.5 Fractionnement des extraits bruts sur gel de Sephadex LH20

C'est une séparation liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire ou adsorbant (Sephadex LH20) est contenu dans une colonne et la phase mobile est un solvant (méthanol ou éthanol) (**Buchmann et Kesselring 1981**).

#### 1.2.5.1 Préparation du gel et conditionnement de la colonne

La quantité de gel adéquate a été mélangée délicatement avec le solvant d'élution initial et le mélange a été laissé gonfler toute la nuit. La colonne a été remplie peu à peu pour favoriser la sédimentation du gel dans la colonne qui dure 24 heures. L'expérience a été réalisée à température ambiante.

L'extrait (8mg/1ml méthanol) a été fractionné sur une colonne de gel de séphadex LH20, relié à un Herlen meyer plain de méthanol permettant l'écoulement de l'extrait à l'extérieur de la colonne. Plusieurs fractions de volume constant ont été recueillies et rassemblées. Chaque fraction est ensuite séchée à l'air libre, pesée puis dissoute dans le

solvant d'éluion. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support en verre. **(Heken., 1995).**

### 1.2.6 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage.

Pour analyser les fractions issues de la colonne de séphadex LH20 des différentes parties des deux plantes, une CCM sur plaques de silice avec un indicateur fluorescent (20×20 cm, 60 F254) a été utilisée. Les extraits ont été déposés à l'aide d'un capillaire et les dépôts ont été séchés à l'aide d'un séchoir à main. La plaque précédemment préparée a été placée verticalement dans une cuve à chromatographie préalablement saturée par les vapeurs du solvant de migration qui est constitué d'acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique et l'eau distillée (100 : 11 :11 :26 V/V/V). Lorsque le front de migration du solvant est arrivé à 6cm du bord supérieur de la plaque, la migration a été arrêtée. La plaque a été retirée de la cuve, puis séchée au moyen d'un séchoir à main et la révélation des chromatogrammes ont été réalisée par deux méthodes:

- ✚ La première consiste en l'examen des spots à la lumière ultra-violette sous une longueur d'onde égale à 254 ou à 366nm.
- ✚ La deuxième consiste à pulvériser sur la plaque du réactif à la vanilline sulfurique **(Wettasinghe, 1999, Marston et Hostettmann 2006).**

#### 1.2.6.1 Vanilline sulfurique

C'est un réactif à spectre large qui permet la détection des terpenoïdes, des dérivés de type phenylpropane et des phénols. Elle est obtenue à partir du mélange (v/v) d'une solution Ethanolique d'acide sulfurique 2% et d'une solution Ethanolique de vanilline à 1%. Les deux solutions sont préparées comme suit :

- ✚ Solution I : mélanger l'éthanol (2%) et l'acide sulfurique, volume de 100ml.
- ✚ Solution II : dissoudre 1g de vanilline dans 200ml d'éthanol (96%).

Après pulvérisation, la plaque a été chauffée à 85°C pendant une dizaine de minutes avant l'observation des taches obtenues sous UV (longueurs d'ondes  $\lambda=254\text{nm}$  et  $365\text{nm}$ ) **(Mabry et Ulubelen 1980)**. On détermine alors, pour chaque constituant, le rapport frontal (Rf):

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

✚ Le **Rf** est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support «phase stationnaire» donné.

### 1.2.7 Activité inhibitrice de la xanthine déshydrogénase de la XOR

#### 1.2.7.1 Préparation des solutions tests

Les différents extraits des plantes des différentes étapes obtenus ont été dissous dans 10mg/ml de méthanol afin d'obtenir une concentration finale dans le mélange réactionnel de 100µg/ml.

#### 1.2.7.2 Test d'inhibition des extraits sur l'activité NADH oxydase de la XOR

L'effet des extraits des trois plantes sur l'activité NADH oxydase de la XOR a été étudié spectrophotométriquement à 340nm. Le mélange réactionnel comporte 1760µl de tampon Bicine (50mM, pH=8.30), 200µl de solution NADH (1mM) (à une concentration finale de 100µM) et 20µl de solution de l'extrait dissout dans 1ml de méthanol. La réaction a été initiée par l'addition de 20µl d'enzyme (1mg/1ml) et la disparition de NADH a été mesurée à 340 nm chaque seconde pendant 3 minutes contre un blanc qui contient le méthanol à la place de l'extrait. Les extraits et les fractions d'extraits ont été testés à une concentration de 100µg/ml, les tests ont été répétés trois fois. L'activité inhibitrice de la XDH est exprimée en pourcentage, calculée comme suit :

$$\%D'inhibition = [(AE - AC)/AC]*100$$

✚ AE : absorbance à 340nm de l'extrait testé.

✚ AC : absorbance à 340nm du contrôle.

### 1.3 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD. La comparaison statistique de ces résultats a été effectuée en utilisant le Graph Pad Prism 4 software et la différence est considéré comme significative pour  $p < 0,05$ . Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA suivi du test de Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec les contrôles négatifs (en absence des extraits), et la comparaison des extraits entre eux.

## III- Résultats et discussions

### 1 Résultats et discussions

Les plantes médicinales sont couramment utilisées en Algérie dans le traitement de diverses pathologies. Ce travail avait pour but de compléter l'usage de quelques plantes utilisées en médecine traditionnelle et d'identifier leurs principes actifs.

Les conditions d'extraction, à savoir le volume, le type du solvant, la taille des particules et l'état du matériel végétal ont un impact sur l'extraction en influençant le taux et la nature des composés de l'extrait (**Nack et shahidi, 2006**).

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante et sous agitation contenue, permet d'extraire le maximum de composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable par la température élevée qui provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant, ainsi que leur quantification (**Hagerman et al., 2000**).

#### 1.1 Taux d'extraction

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et de feuilles de *Pistacia lentiscus*, en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs de révélation spécifiques.

La préparation des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et de feuilles de *Pistacia lentiscus* a été effectuée selon la méthode de **Atmani et al. 2009**, basée sur l'utilisation des solvants à polarité différente (ethanol, acétate d'éthyle et chloroforme). De ce fait, cinq extraits différents ont été obtenus, à savoir les extraits éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle, le chloroforme et aqueux du chloroforme. Le rendement de chaque extrait par rapport au poids initial est représenté dans le tableau (Tableau 5).

**Tableau 5: taux d'extractions des différents extraits de l'écorce de *F.angustifolia* et les feuilles de *P.lentiscus*.**

Solvant	% d'extraction de l'écorce de FA	% d'extraction des feuilles de PL
Ethanol	4,81%	17,07%
Acétate d'éthyle	14,43%	64,05%
Aqueux acétate d'éthyle	57,42%	79,18%
Chloroforme	70,35%	22,08%
Aqueux chloroforme	7,11%	2,063%

Les résultats obtenus montrent que parmi les cinq extraits de *F.angustifolia*, l'extrait de Chloroforme représente le rendement le plus élevé 70,35 %, suivi par l'extrait Aqueux acétate d'éthyle 57,42 %, alors que le reste des extraits possèdent des rendements bas, dont l'extrait d'Acétate d'éthyle 14,43% suivi par l'extrait aqueux chloroforme 7,11% et l'extrait éthanolique avec 4,81%.

Dans le cas des extraits des feuilles de *P.lentiscus*, c'est la deuxième étape d'extraction qui a donné le meilleur rendement d'extraction vu que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle représente 79,18% par rapport au poids total de l'extrait éthanolique, suivi par l'acétate d'éthyle 64,05 %. Les extraits chloroforme et éthanolique ont donné des taux presque similaires avec un pourcentage de 22,08% et 17,07%, respectivement, alors que l'extrait aqueux du chloroforme a marqué le rendement le plus faible 2,06%. À partir de ces résultats on déduit que les extraits de *Pistacia lentiscus* contiennent des composés de polarité variable.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des feuilles et d'écorce ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées. En plus de ces aspects quantitatifs, quelle que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité de l'extrait, autrement dit de la bio-activité de ses principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante permet d'obtenir le

maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

## 1.2 Teneur en polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. Tous les phénols, à de très rares exceptions (ex : la lignine) sont des métabolites énergétiques des échanges cellulaires et interviennent activement dans différents processus: photosynthèse, respiration, croissance, résistance aux maladies infectieuses (**Rakipov, 1987**).

### 1.2.1 Teneur en phénols totaux

Les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme ont donné les rendements les plus élevés  $218,75 \pm 3,50$  et  $244,27 \pm 0,61$  mg, respectivement suivi par les deux extraits, éthanolique et le chloroforme avec un rendement moyen de  $87,05 \pm 3,07$  et  $94,85 \pm 0,44$  mg/g d'extrait, respectivement, tandis que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle présente une quantité plus basse  $63,26 \pm 0,43$  mg.

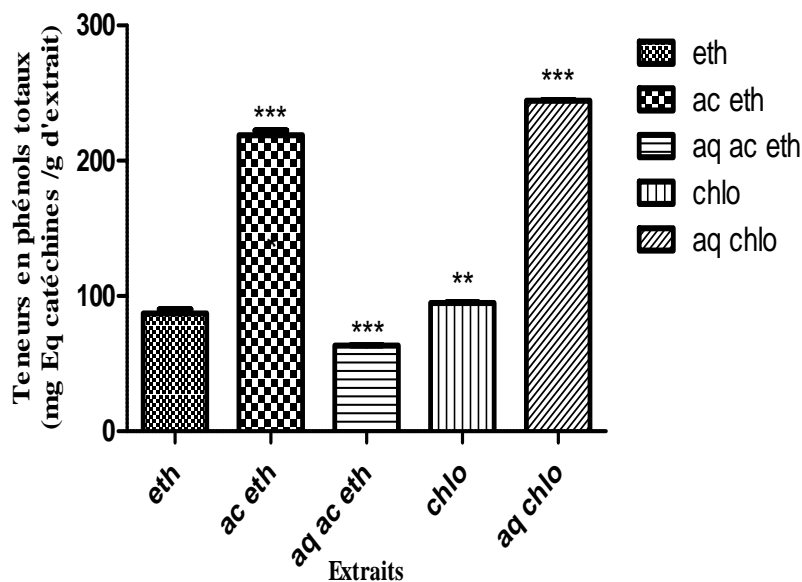


Figure 27: Teneurs en phénols totaux des extraits d'écorce de *F. angustifolia*

D'après les résultats obtenus on a remarqué que la quantité des composés phénoliques dans les extraits des feuilles de *P.lentiscus* est plus importante que celle des extraits d'écorce de *F.angustifolia*. On peut dire que les feuilles de cette plante constituent une source prometteuse en composés phénoliques (**Romani et al., 2002 ; Luigia et al., 2007**).

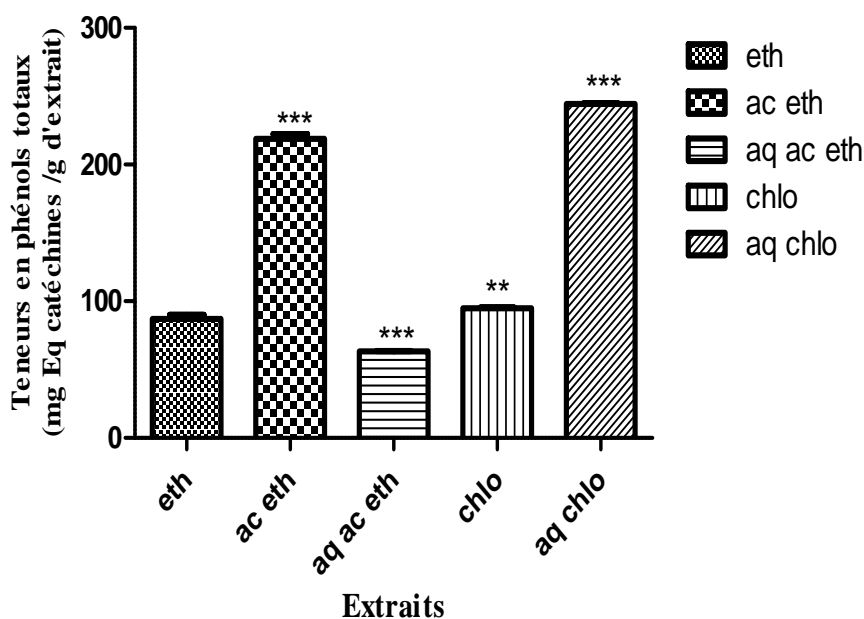


Figure 28: Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *P. lentiscus*. Barres verticales représentent les Ecart-type

La teneur des extraits  $92,11 \pm 0,27$  et  $432,26 \pm 0,26$  mg/g d'extract représente respectivement, les phases organique et aqueuse du chloroforme. Les extraits éthanolique et acétate d'éthyle présentent des valeurs très proches  $175,57 \pm 0,45$  et  $201,75 \pm 0,50$  mg respectivement, à l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui présente une quantité moyenne  $280,64 \pm 0,67$  mg /g d'extract.

D'après Atmani et al. 2009 qui ont étudié la teneur en polyphénols des extraits d'écorce de *F. angustifolia*, il a été établi que les rendements varient dans une large gamme entre 15,53 et 242,71mg. En comparant aux résultats obtenus dans cette étude qui varient entre 63,26 et 244,27mg, on constate une différence dans le rendement des polyphénols de la même espèce qui peut être expliquée par l'influence des facteurs climatique.

Les résultats du dosage des polyphénols ont montré que les organes des plantes étudiées (écorce de *F. angustifolia* et feuille de *P. lentiscus*) contiennent des polyphénols, avec des teneurs plus importantes dans les feuilles de *P. lentiscus* que dans l'écorce de *F. angustifolia*. Cette étude pourrait apporter une justification aux divers usages qui sont faites des plantes dans la médecine traditionnelle. Toutefois, une étude des différents constituants phénoliques pourrait caractériser de façon plus précise l'activité biologique des différentes drogues.

Dans la même espèce, le contenu biochimique des polyphénols trouvés dans les feuilles et les racines différent d'une manière significative. La présence et la concentration de certains constituants chimiques, changent également selon la saison et la maturation de la

plante (Chu et Kemper, 2001). Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend aussi de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee et al., 2003).

### 1.2.2 Teneur en flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* est réalisée par la méthode Mimica Dukié (1992), qui repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). La concentration des flavonoïdes est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenu en utilisant la rutine comme standard (Annexe 02).

A la lumière des résultats obtenus à partir de cette étude, il ressort que les extraits éthanolique, chloroforme et aqueux de chloroforme de *F. angustifolia* sont riches en flavonoïdes. En effet, ils possèdent des teneurs de l'ordre de  $63,21 \pm 1,45$ ,  $55,31 \pm 1,35$  et  $61,89 \pm 1,42$  mg par gramme d'extrait respectivement, par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle, aqueux et organique, qui ont marqué des quantités moyennes  $42,92 \pm 1,27$  et  $38,59 \pm 1,19$  mg, respectivement.

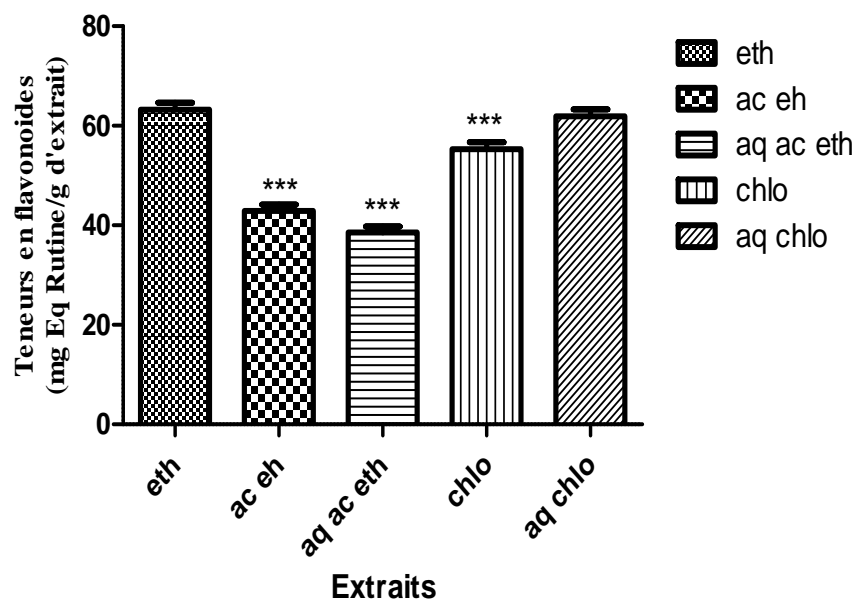
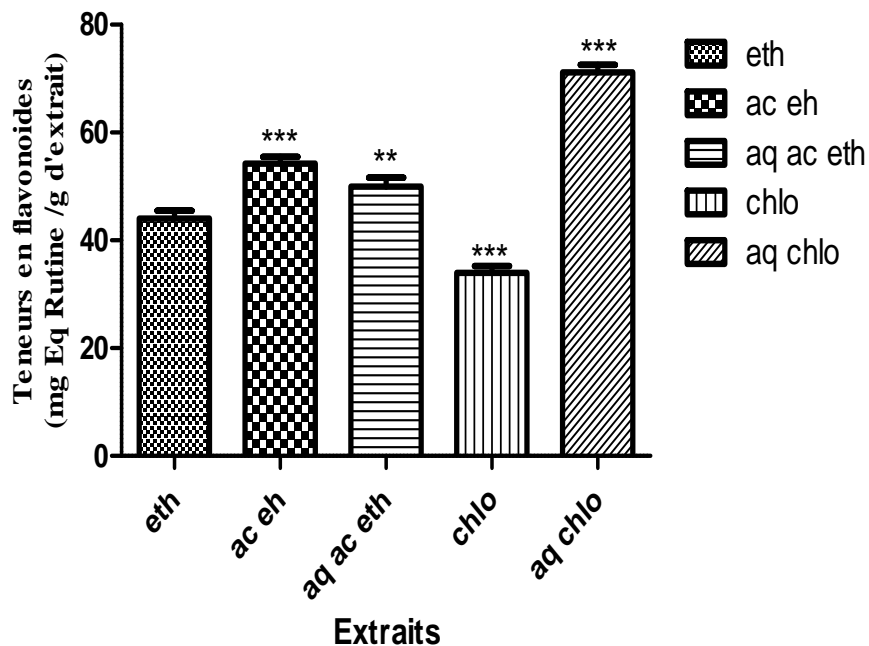


Figure 29: Teneurs en flavonoïdes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia*.  
Barres verticales représentent les Ecart-type

Par ailleurs, en ce qui concerne les extraits des feuilles de *P. lentiscus*, la variation est un peu plus importante entre  $71,15 \pm 1,42$  mg/g d'extrait présenté par l'extrait aqueux du chloroforme et  $33,97 \pm 1,27$  mg par sa phase organique. On peut dire que *P. lentiscus* est



riche en flavonoïdes pour les deux extraits d'acétate d'éthyle (organique et aqueux) qui ont marqué des teneurs de  $54,24 \pm 1,24$  et  $49,96 \pm 1,67$  mg /g d'extrait), respectivement alors que dans le cas de *F. angustifolia*, l'extrait éthanolique a donné un rendement inférieur par rapport à d'autre ( $44,02 \pm 1,45$  mg /gramme d'extrait).



**Figure 30: Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de *P. lentiscus*. Barres verticales représentent les Ecart-type**

Ce rendement permet de dire que la variation des flavonoïdes n'est pas relative à celle des polyphénols. Cela peut être expliqué par la prépondérance des polyphénols non flavonoidiques (acides phénols, phénols,...). Cette inégale répartition des flavonoïdes pourrait s'expliquer par le fait que les feuilles sont plus exposées à l'ensoleillement que les autres organes de la plante. En effet, les flavonoïdes assurent la protection des tissus de la plante contre les effets nocifs du rayonnement solaire.

### 1.2.3 Teneur en tannins

L'estimation de la teneur en tannins totaux contenus dans les extraits a été réalisée par la méthode de Hagerman et Butler (1989). La préparation des solutions utilisées est plus détaillée dans l'annexe N° (02). La concentration en tannins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique Annexe N° (01).

La variation de la teneur en tannins entre les différents extraits de l'écorce de *F. angustifolia* est très significative : elle est de  $876.91 \pm 48.29$  mg pour l'extrait organique du chloroforme, suivi par l'extrait éthanolique avec un rendement important de  $394,2 \pm 14,66$  mg. Des résultats inférieurs sont enregistrés par les extraits organique d'acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme  $65,8 \pm 1,67$  et  $45,43 \pm 13,35$  mg respectivement. Par contre, l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a marqué la quantité la plus faible  $23,21 \pm 7,07$  mg/gramme d'extrait.

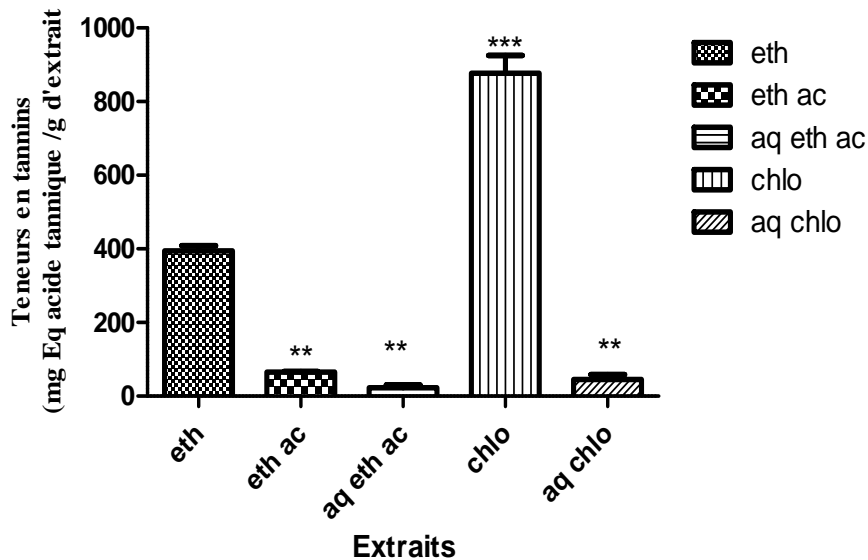
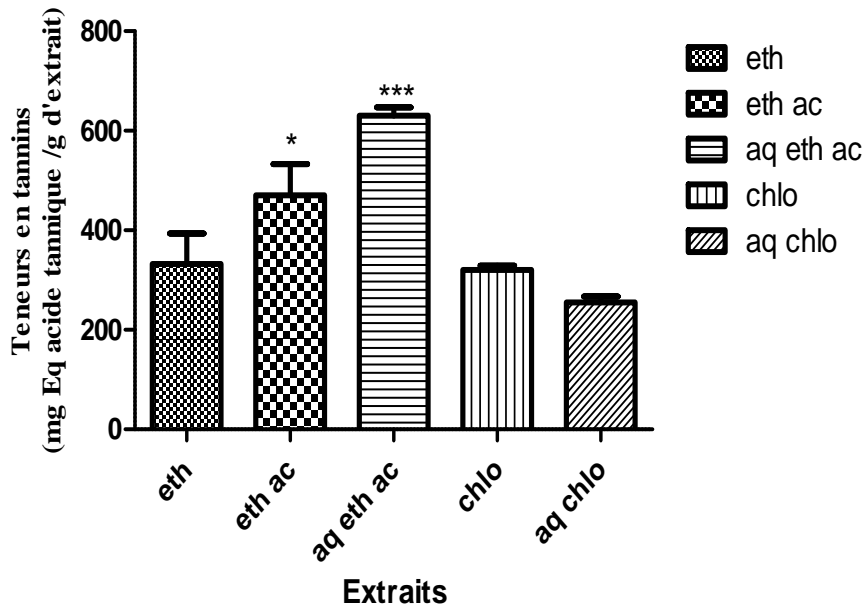


Figure 31: Teneurs en tannins des extraits d'écorce de *F. angustifolia*. Barres verticales représentent les Ecart-type

Cependant, cette différence est moins importante pour les extraits des feuilles de *P. lentiscus*. En plus, la quantité des tannins est supérieure à celle des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* pour la majorité des extraits, notamment les extraits acétate d'éthyle (organique et aqueux) et aqueux du chloroforme avec des teneurs importantes de  $470,12 \pm 63,11$ ,  $630,62 \pm 16,49$  et  $254,69 \pm 12,57$  mg /gramme d'extrait, respectivement. À l'exception de la phase organique du chloroforme qui a présenté une quantité non négligeable de  $320,12 \pm 8,90$  mg/gramme d'extrait et l'éthanolique qui a marqué un rendement proche de celui de l'écorce de *F. angustifolia*  $332,47 \pm 61,28$  mg/g d'extrait.

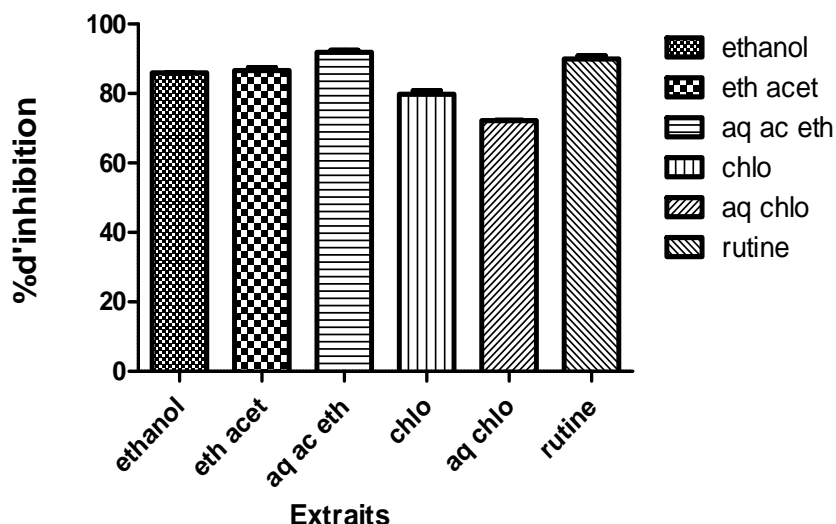


**Figure 32: Teneurs en tannins des extraits feuilles de *P. lentiscus*.  
Barres verticales représentent les Ecart-type**

L'explication de cette différence concernant les tannins réside dans le fait qu'ils sont synthétisés en abondance chez certaines plantes parasitées ou encore par l'attaque d'une plante voisine (Goffart, 2002). Nos résultats sont en concordance avec les travaux phytochimiques décrits par Atmani et al. 2009, Romani et al., 2002; Stocker et al., 2004. Par contre, la différence est notée pour le taux des polyphénols et plus précisément ces deux parties des deux plantes sont plus riches en flavonoïdes.

### 1.3 Évaluation du pouvoir antioxydant

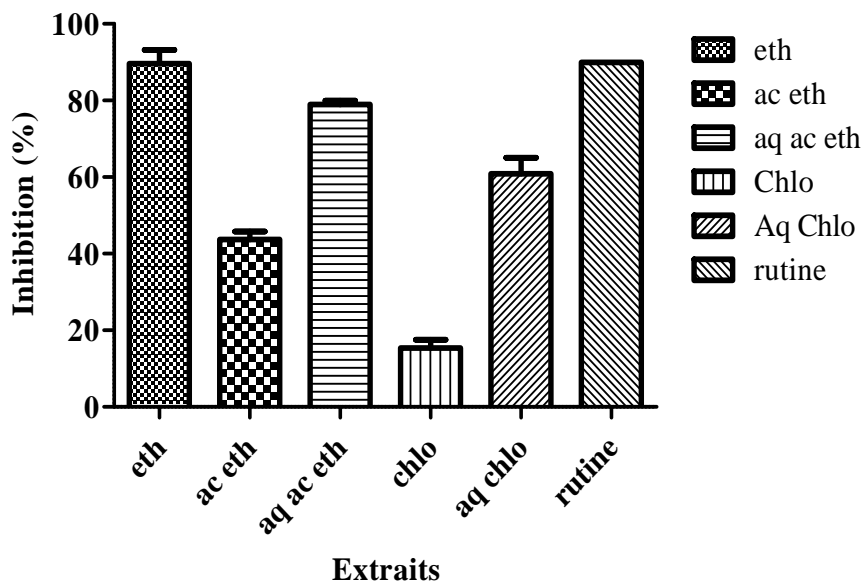
La mise en évidence du pouvoir anti-NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* et les feuilles *P. lentiscus* a été réalisée par spectrophotométrie UV - Visible, en mesurant la disparition du NADH et la diminution de l'absorbance à 340nm provoquée par la présence de l'extrait. D'après les résultats obtenus dans la figure 33, il apparaît que tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* sont actifs à des degrés différents, lié au contenu des extraits en substances à activité anti-NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase.



**Figure 33: Inhibition de l'activité NADH oxydase de la XOR par les extraits de l'écorce de *F. Angustifolia***

À des fins comparatives, cinq extraits et un standard ont été utilisés : il s'agit des extraits éthanolique, acétate d'éthyle et le chloroforme (organique et aqueux) en plus de la rutine. D'après la (Figure 33), tous les extraits ont montré une activité anti-NADH oxydase de la XOR très puissante, supérieure à 50%. L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle semble avoir l'effet inhibiteur le plus élevé, parmi les cinq extraits, en présentant le pourcentage d'inhibition le plus élevé  $91,65 \pm 0,57\%$ . Cette activité est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle de la rutine utilisée comme standard  $89,93 \pm 0,96\%$ .

Une activité anti NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase inférieure a été obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle  $86,82 \pm 0,79\%$  et l'extrait éthanolique  $85,82 \pm 0,07\%$  qui sont des activités significativement supérieures ( $p < 0,05$ ) à celle de l'extrait de chloroforme et aqueux de chloroforme  $79,83 \pm 0,94\%$  et  $72,18 \pm 0,12\%$ , respectivement qui représentent les extraits les moins actifs. À l'exception de l'extrait acétate d'éthyle, tous les extraits de *P. lentiscus* testés dans cette étude ont exhibé une inhibition de la xanthine déshydrogénase avec une variation allant de 15,41% à 89,65%.



**Figure 34: Évaluation de l'activité anti-NADH de la XOR par les extraits de feuilles de *P.lentiscus***

L'extrait éthanolique semble avoir l'activité anti-NADH oxydase de la XOR la plus importante avec un pourcentage de  $89,65 \pm 3,56\%$ , suivi par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et de chloroforme qui présentent des activités proches  $78,95 \pm 0,99\%$ ,  $60,86 \pm 4,21\%$  respectivement. En comparaison avec la quercétine, ces deux extraits s'avèrent moins actifs. Ce résultat trouve sûrement son explication dans l'effet entre les constituants de ces extraits, tandis que l'acétate d'éthyle a marqué un effet inhibiteur de la xanthine déshydrogénase de  $43,74 \pm 2,08\%$ . En outre, le pouvoir anti-NADH oxydase de la XOR de l'extrait de chloroforme est très faible  $15,41 \pm 2,12\%$ .

D'après les pourcentages d'inhibitions de l'activité xanthine déshydrogénase par les extraits de *Fraxinus angustifolia*, et le classement croissant schématisé dans la figure 34, on a remarqué que l'ensemble des extraits phénoliques ont un pouvoir antioxydant supérieur à 50%, une activité très puissante marquée dans la première et la deuxième étape d'extraction. De même les extraits polaires de *Pistacia lentiscus* sont aussi caractérisés par un pouvoir antioxydant important comparativement aux extraits apolaires se basant sur les résultats obtenus, on peut conclure que la variation de la capacité anti-NADH déshydrogénase de ces extraits comparativement à celle de la rutine pourrait être due à la présence de certaines molécules potentiellement actives. De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante, les flavonoïdes les plus

actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic et al., 2003).

## 1.4 Analyses chromatographiques

### 1.4.1 Chromatographie d'adsorption sur colonne de séphadex LH20

Le Séphadex LH20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophiles et hydrophiles. Le caractère lipophile de ce gel réticulé de dextrane dérive de la présence des groupements isopropyles obtenus par hydroxypropylation du Sephadex G-25. Son caractère hydrophile est dû aux nombreuses fonctions hydroxyles. En raison de sa nature, le Sephadex LH-20 gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation (Henke; 1995).

### 1.4.2 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale sur les métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées.

### 1.4.3 Observation sous UV à 366 nm des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia*.

L'examen sous lumière ultraviolette fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En effet, il apporte des indications particulières concernant les substitutions. L'observation des plaques dans une chambre noire a permis le fractionnement de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle en 02 taches fluorescentes, commune avec les fractions 2, 3, 4 et 5, déterminées après révélation par la vanilline. Ce type d'analyse a été réalisé dans le but d'avoir plus d'information sur la nature et le contenu des différents composés de cet extrait.

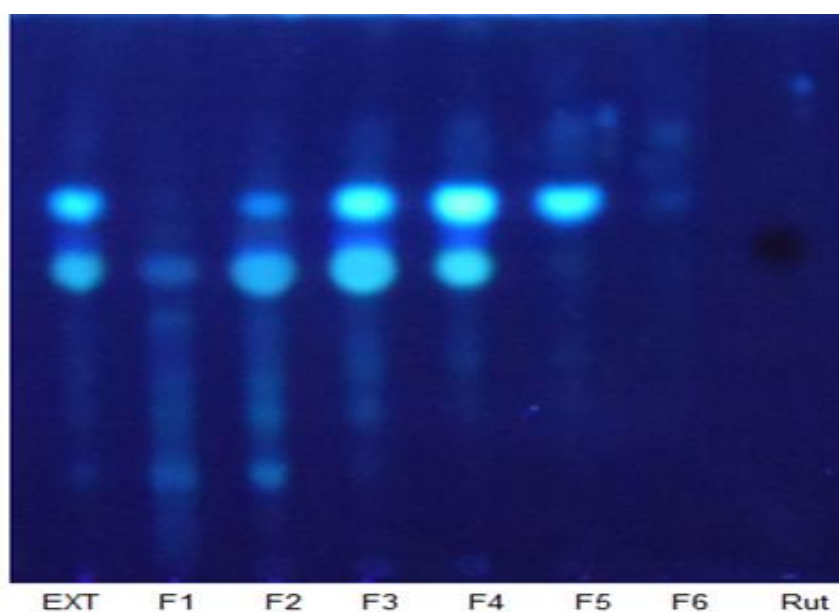


Figure 35: Observation sous UV des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

#### 1.4.4 Observation sous UV à 254 nm des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de *P.lentiscus*

L'observation des plaques de chromatographie sur couche mince de l'extrait éthanolique de *P. lentiscus* sous UV à 254 nm nous a permis de visualiser plusieurs tâches de fluorescence. Après une simple comparaison entre l'extrait et les différentes fractions, nous avons remarqué la présence des taches en commun, déterminées après révélation par la vanilline.

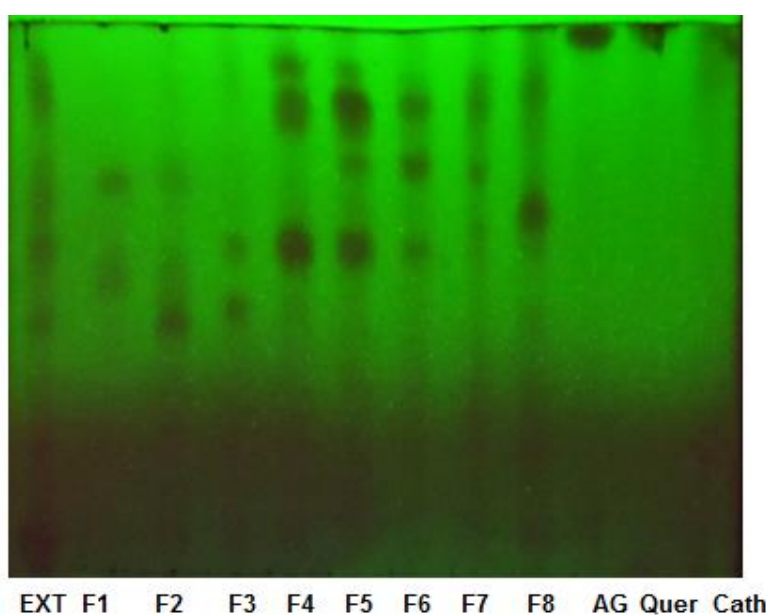
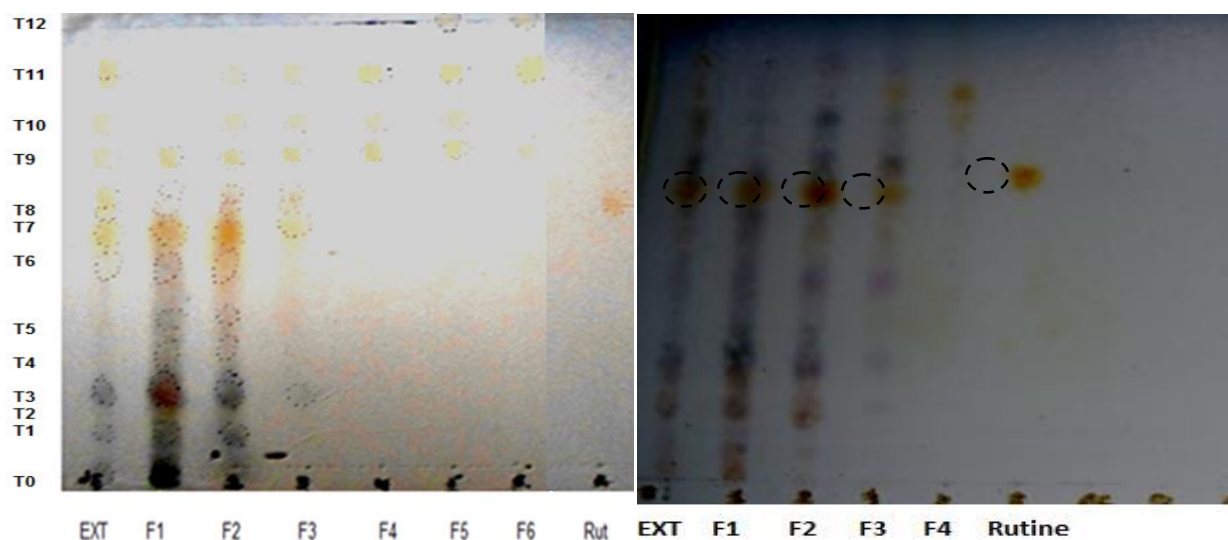


Figure 36: Observation sous UV à 254 nm des fractions de l'extrait

#### 1.4.5 Révélation des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F.angustifolia* par la vanilline sulfurique

L'extrait Aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia* est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement de tâches relativement pures.



**Figure 37: révélation des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *F.angustifolia***

Dans cette première étape, nous avons soumis ces extraits à une chromatographie d'exclusion/adsorption sur colonne de Sephadex LH20. Une deuxième chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée où le standard est un composé phénolique, la rutine (Rut). La migration du système permet de séparer les composés de l'extrait. A la fin de la migration, la plaque est séchée et examinée sous UV (254 et 366 nm) ; les différents spots sont mis en évidence après révélation par la vanilline préparée avec l'éthanol et l'acide formique.

pour les fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, plusieurs taches apparaissent avec des couleurs bleu, violet, roses, orange, jaune foncé, jaune, rouge, gris témoignant probablement la présence des acides phénols, flavones, la rutine et la quercétine, cathéchine, stéroïdes, respectivement (Tableau 6).

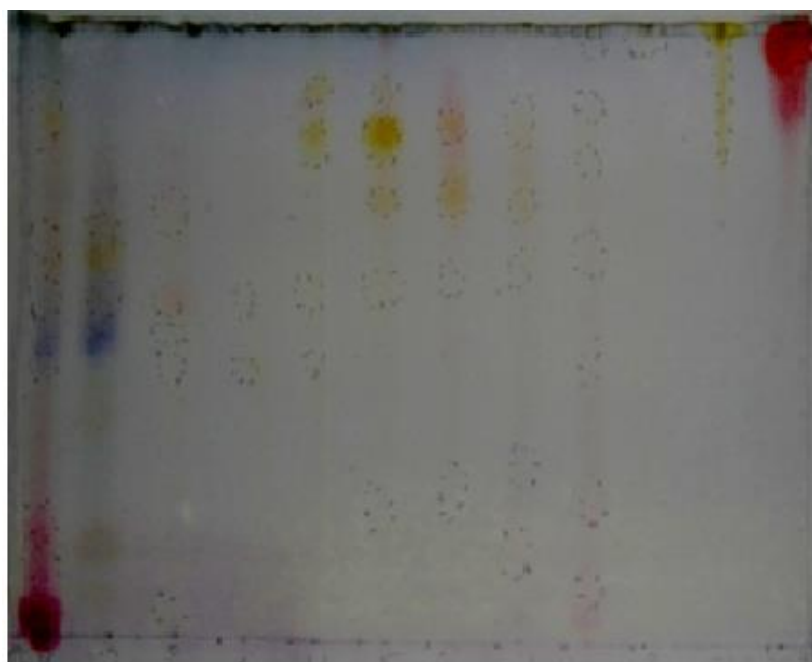


**Tableau 6: type de métabolites secondaire en fonction de la couleur des spots (Markham.,1982).**

Spots colorés	Types de métabolite secondaire
Rouge	Cathéchine
Rose	anthocynidine 3,5-diglycoside
Violet	flavones 5-OH et 4' -OH
	flavones 3-OR et 5-OH, 4' -OH
	flavones ou flavonols 5 -OH avec 4' -OH absent ou substitué en 3
	flavones 6- ou 8-OH
	Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu clair (fluorescent)	flavones sans 5 - OH libre
	flavonols sans 5 -OH libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune orangé	flavonols 3 -OH libre avec ou sans 5 -OH substitué
Gris	Stéroïdes
Jaune fluorescent	flavonols avec 3 -OH libre
Jaune pâle	Dihydroflavonols

#### 1.4.6 Révélation des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* par la vanilline sulfurique

La chromatographie sur couche mince de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* et ces fractions ont montré des taches de nombres, de couleurs et de distances de migrations différentes. Le screening phytochimique des feuilles a mis en évidence la présence de plusieurs composés chimiques réputés pour leurs activités biologiques intéressantes (Tableau 7). Il s'agit des substances polyphénoliques dont les tannins catéchiques et galliques, des flavonoïdes (anthocyanes, flavones et leucoanthocyanes), des stéroïdes et les triterpènes.



Ext F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 AG Quer Cath

**Figure 38: Révélation des fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de *P.lentiscus* par la vanilline sulfurique**

L'absence totale des hétérosides cyanogénétiques diminue fortement les risques toxicologiques liés à l'usage de *Pistacia lentiscus*, ce qui est en accord avec les résultats de l'enquête ethnobotanique rapportant que peu d'herboristes sont en faveur d'une toxicité du lentisque. D'autre part, la présence des flavonoïdes confirme l'effet hépatoprotecteur, antispasmodique, antimicrobien et veino-actif alloué aux feuilles de *Pistacia lentiscus* (Andersen and Markham, 2010).

**Tableau 7: Résultats du screening phytochimique des feuilles de *P.lentiscus* (Andersen and Markham, 2010)**

Métabolites secondaires	
Tanins	Catéchiques
	Galliques
Flavonoïdes	Anthocyanes
	Flavones
	Flavanones
	Flavanonols
	Leucoanthocyanes
	Catéchols
Composés réducteurs	Oses et holosides
	Mucilages
	Hétérosides cyanogénétiques
Terpénoïdes	Stérols et triterpènes
	Saponosides

### 1.4.7 Rapports frontaux et couleurs après révélation par la vanilline sulfurique

Les relations existant entre le  $R_f$  (rapport frontal ou facteur de rétention) et la structure des molécules apportent aussi des renseignements sur la structure des polyphénols séparés par CCM. Le comportement chromatographique en fonction de la composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux permet de mentionner les premières indications concernant la substitution de la molécule (Tableau 7).

L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F.angustifolia* est fractionné en 11 taches de couleur et de rapport frontaux différents qui indiquent la présence de plusieurs composés chimiques (Tableau 7). La CCM récapitulative sur plaque de gel de silice F254, avec comme révélateur la vanilline sulfurique suivi d'un chauffage de la plaque, montre une coloration violette pour cinq composés de l'extrait ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  et  $T_4$ ). Cette coloration, l'aspect physique des composés et leur solubilité nous amènent à penser qu'il s'agit de terpenoïdes.  $T_1$  ( $R_f$  : 0,08) est en commun dans les fractions 1 et 2,  $T_0$  et  $T_3$  sur la fraction 2 ont la même couleur, l'une sur la limite inférieure de la plaque ( $R_f$  : 0) et l'autre avec un  $R_f$  de 0.16. (Wichtl et Anton en 2003).

La fraction 1 contient trois composés différents de ceux de l'extrait et les autres fractions, la  $T_0$  qui n'as pas migré loin et s'est positionné juste après la ligne du dépôt. La révélation par la vanilline montre une couleur bleu qui peut correspondre à un acide phénolique, tandis que la  $T_3$  est le seul composé d'une couleur rouge similaire aux propriétés des anthocyanidines 3-glycoside. La  $T_4$  avec une couleur Grise montre la présence des stéroïdes. La tache 5 qui est répartie entre les trois premières fractions, la  $T_6$  et la  $T_4$  de la première et la deuxième fraction respectivement montre une couleur rose après pulvérisation par la vanilline qui peut correspondre à un anthocyanidine 3,5-diglycoside.

L'apparition de la couleur orange reflète la présence des tannins catéchiques (condensés) dans la première et la deuxième fraction et son absence total dans le reste des fractions. Les mêmes résultats sont trouvés par **Borgi et al. 2007**, où ils ont révélé la présence des tannins dans les extraits polaires (aqueux et méthanol), et leur absence dans l'extrait chloroforme.

**Tableau 8: Rapports frontaux et couleurs après révélation de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et ces fractions de l'écorce de *F.angustifolia* :**

Fraction Tache	Extrait		F1		F2		F3		F4		F5		F6		Rutine	
	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur
T0	0	Violet claire	0	bleu	0	Violet	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
T1	0,08	Violet	0,08	Violet	0,08	Violet	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
T2	0,11	Violet	0,11	jaune	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
T3	0,16	Violet	0,16	rouge	0,16	Violet	0,16	violet	/	/	/	/	/	/	/	/
T4	0,25	Violet	0,25	gris	0,25	Rose	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
T5	0,32	Jaune claire	0,32	rose	0,32	Rose	0,32	rose	/	/	/	/	/	/	/	/
T6	0,44	Jaune claire	0,44	rose	0,44	Orange	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
T7	0,51	Jaune claire	0,51	orange	0,51	Orange	0,51	jaune	/	/	/	/	/	/	/	/
T8	0,59	Jaune	0,59	Jaune	0,59	Jaune	0,59	jaune	/	/	/	/	/	/	0,59	jaune foncé
T9	0,69	Jaune	0,69	Jaune	0,69	Jaune	0,69	jaune	0,69	jaune	0,69	Jaune	0,69	jaune	/	/
T10	0,76	Jaune claire	/	/	0,76	jaune	0,76	jaune	0,76	jaune	0,76	Jaune			/	/
T11	0,90	Jaune claire	/	/	0,90	Jaune	0,90	jaune	0,90	jaune	0,90	Jaune	0,90	jaune	/	/
T12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	Jaune	1	jaune	/	/

L'intensité de la T<sub>8</sub> avec un rapport frontal de 0.59 est plus dense dans l'extrait et les fractions (1, 2 et 3), alors que nous avons remarqué l'absence de la tache au niveau des fractions (4, 5 et 6) qui correspond normalement à la rutine utilisé comme standard, confirmé après révélation par la vanilline sulfurique en donnant une couleur jaune foncé. Par contre, les quatre dernières taches (T<sub>9</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>11</sub> et T<sub>12</sub>) confirment la présence de la quercétine observée sur CCM (Markham, 1982).

**Tableau 9: Rapports frontaux et couleurs après révélation de l'extrait éthanolique et ces fractions des feuilles *Pistacia.lentiscus*.**

Fraction Tache	Extrait		F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		Rutine	
	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur
T0	0,03	Rose foncé	0,03	Jaune														
T1	0,12	Rose													0,12	Rose		
T2	0,15		0,15	jaune														
T3	0,19	Rose													0,19	Rose		
T4	0,44	Jaune					0,44	Jaune	0,44	Jaune	0,44	Jaune			0,44	Rose		
T5	0,50	Bleu violacé	0,50	Bleu violacé														
T6	0,55	Bleu	0,55	Bleu	0,55	Jaune	0,55	Jaune	0,55	Jaune	0,55	Jaune			0,55	Rose		
T7	0,65	Jaune	0,65	Jaune														
T8	0,70										0,70	Jaune	0,70	Jaune				
T9	0,79	Jaune											0,79	Rose	0,79	Rose		
T10	0,81								0,81	Jaune foncé	0,81	jaune foncé	0,81	Jaune	0,81	Rose		
T11	0,85	Jaune							0,85	Jaune	0,85	jaune	0,85	Rose				
T12	0,97																0,97	Jaune

La chromatographie de l'extrait éthanolique et les fractions des feuilles de *Pistacia lentiscus*, nous a permis de mettre en évidence environ 12 taches avec des couleurs et des rapports frontaux différents, on a remarqué la présence de quelques taches uniquement dans certains fractions et d'autres apparaissent dans plusieurs fractions telle que la T<sub>1</sub> et la T<sub>3</sub> en rose qui caractérisent uniquement l'extrait et la fraction 7 qui peut correspondre à un anthocyanidine 3,5-diglycoside. Par contre, la T<sub>4</sub> et la T<sub>6</sub> en couleur jaune partagé uniquement entre les trois fractions successives la F3, F4 et la F5, avec un rapport frontal de 0.44 et 0.55, respectivement. Cette dernière est observée au niveau de la fraction 2 comme une tache unique de la même couleur.

Par contre la T<sub>10</sub> et la T<sub>11</sub> sont réparties entre les fractions 4, 5 et 6 avec un rapport frontal de 0.81 et 0.85, jaune foncé qui caractérise la présence des flavonoïdes à l'exception

de T<sub>11</sub> au niveau de la fraction 6 qui a pris une couleur différente qui est le rose qui signifie la présence d'un composé différent de celui des fractions 4 et 5 qui indique l'apparition d'un anthocyanidine 3,5-diglycoside. En dehors du jaune et du rose, nous avons observé l'apparition du bleu violacé et du bleu au niveau de la T<sub>5</sub> et la T<sub>6</sub> respectivement sur l'extrait et la première fraction qui sont proche avec un rapport frontal de 0.50 et 0.55 qui peuvent être des flavones et des acides phénoliques (Markham, 1982).

## 1.5 Évaluation de pouvoir antioxydant des fractions

### 1.5.1 Évaluation de pouvoir antioxydant des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Afin d'étudier l'activité antioxydante des fractions vis-à-vis de l'activité NADH-déshydrogénase de la XOR, nous avons suivis l'influence de leurs composition chimique sur le pouvoir d'inhibition. Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa richesse en composés. Dans le cas où l'inhibition diminue avec l'augmentation des composés, donc l'inhibiteur joue le rôle d'un pro-oxydant.

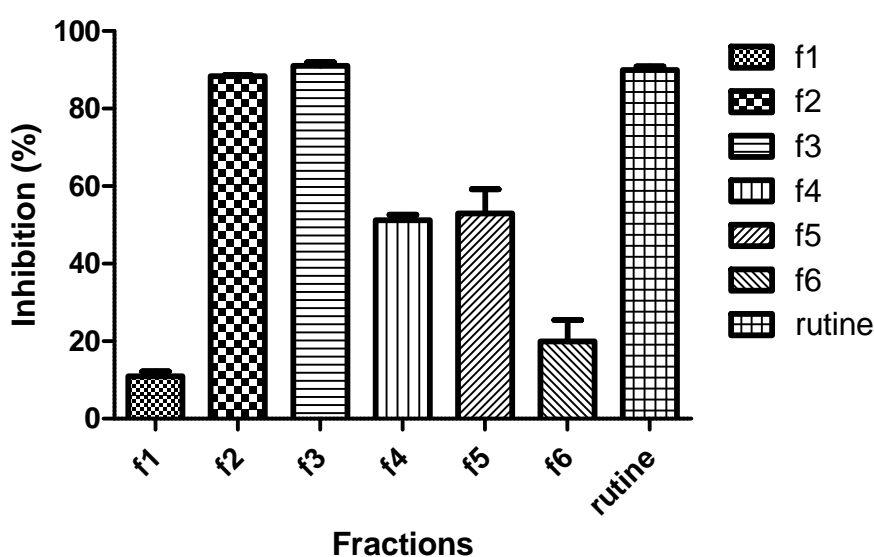


Figure 39: Évaluation de l'activité anti NADH-déshydrogénase de la XOR des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de l'écorce de *F.angustifolia*

D'après les résultats obtenus (Figure 39), on remarque que la fraction (1) malgré sa richesse en composés chimiques a provoqué une action inhibitrice faible ( $10,97 \pm 1,22\%$ ). La fraction (3) s'est avéré la plus puissante avec un pourcentage de  $90,01 \pm 0,98\%$  et la fraction (2) montre une activité inhibitrice de  $88,41 \pm 0,22\%$  proche de celle de la rutine qui est à  $89,93 \pm 0,96\%$ . Cependant, les deux fractions (4 et 5) présentent des activités similaires et inférieures à celle de la rutine ( $51,23 \pm 1,37\%$ ), ( $52,97 \pm 6,27\%$ ) respectivement. D'autre part, la

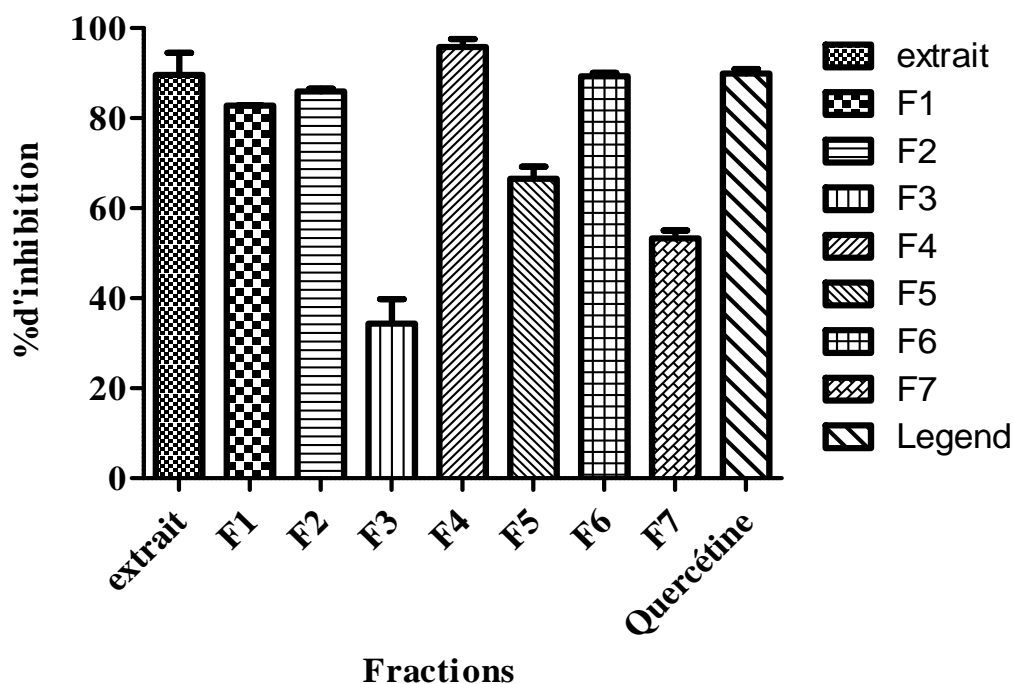
fraction (6) présente l'effet inhibiteur le plus bas avec un pourcentage de  $(19.97 \pm 5.49\%)$ . Cette différence d'activité peut être due à l'effet de la diversité des composés dans le milieu réactionnel.

Les recherches effectuées sur les différents extraits révèlent la présence importante des métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les terpenoïdes et les tannins qui caractérisent les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Du point de vue biologique, Ce groupe est constitué de principes potentiellement actifs rencontrés dans toute ou une partie de la plante. Ce sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique.

En comparant les résultats de la CCM et les pourcentages d'inhibition, on peut déduire que la rutine a marqué un effet inhibiteur très puissant par rapport à la quercétine qui est présente dans les différentes fractions, en particulier la F4, F5 et la F6 avec un pourcentage moyen. D'autre part, nous avons remarqué que la richesse des deux fractions 2 et 3 en composés chimique tels que les flavonoïdes, la rutine, la quercétine, les terpènes et la catéchine a marqué l'effet inhibiteur le plus élevé en comparant à la fraction 1 qui présente presque les même composés avec une légère différence au niveau de T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> qui sont remplacé respectivement par l'acide phénolique, les anthocyanidines 3-glycoside et l'apparition des stéroïdes. Donc on peut déduire que la présence de l'effet pro-oxydant de certains composés de cette fraction a pu supprimer l'effet inhibiteur des autres. Soit l'inhibition de l'enzyme par certains composés est presque négligeable par rapport à son activation par d'autre ou bien, il y a une interaction entre les composés de l'extrait qui induit l'effet activateur de l'enzyme.

### **1.5.2 Évaluation de l'activité anti-NADH oxydase par les fractions de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus***

Des activités inhibitrices différentes sont notées entre l'extrait éthanolique et les différentes fractions des feuilles de *P. lentiscus* sur la xanthine déshydrogénase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de cette enzyme à une concentration de 100µg/ml, en comparaison avec l'inhibiteur de référence : la quercétine (Figure 40) une excellente activité inhibitrice  $(89.93 \pm 0.96\%)$ .



**Figure 40: Inhibition de l'activité NADH deshydrogenase de la XOR par les fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus***

La fraction 4 a exercé une forte inhibition sur la NADH déshydrogénase avec un pourcentage de  $(95.82 \pm 1.74\%)$ . Les fractions 1, 2, 6 et 7 sont aussi efficaces contre cette enzyme mais reste inférieure par rapport à la fraction 4. Leur pouvoir inhibiteur est de l'ordre de  $(82.76 \pm 0.11\%)$ ,  $(85.97 \pm 0.61\%)$ ,  $(89.28 \pm 0.83\%)$ ,  $(89.93 \pm 1.82\%)$  respectivement. Les fractions 3 et 5 présentent un effet inhibiteur anti-NADH oxydase avec une activité très modeste en comparaison avec les fractions citées ci-dessus. Le pourcentage d'inhibition n'est que de  $34.35 \pm 5.48\%$  et  $66.56 \pm 2.64\%$ , respectivement.

La composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de glycosides de flavonols comme la quercétine, myricétine, luteoline ainsi que l'isoflavone genistéine (Romani et al., 2002; Stocker et al., 2004; Vaya et Mahmood, 2006). Elle contiennent 6 à 7% du gallotannin de faible poids moléculaire, à savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3, 4,5-O-trigalloyl (Romani et al., 2002).

Ces résultats nous permettent de déduire le rôle important des polyphénols des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* dans l'activité anti-NADH oxydase de la XOR, où leur noyau phénolique leur confère une activité antioxydante puissante (Peronny, 2005).



D'après les résultats du classement croissant du nombre des composés phénoliques dans la fraction, nous avons remarqué que ce classement est inversement proportionnel aux pourcentages d'inhibitions dans la fraction 1 de l'écorce de FA. Ce résultat peut être expliqué par la présence des composés ayant des effets activateurs de la NADH-oxydase de la XOR et varie dans le même sens dans les deux fractions 2 et 6 de PL et FA respectivement, où elles présentent des pourcentages inférieurs à 50%. En outre, le reste des fractions sont plus riches en espèces chimiques avec une activité inhibitrice très puissante.

La seule explication de l'indépendance de l'activité anti-NADH oxydase de la XOR du nombre des espèces chimiques dans la fraction peut être interprétée par l'existence de certaines molécules particulières responsables de cette inhibition ou son activation. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Cos et ses collaborateurs 1998 qui ont rapporté qu'il y a une relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la XO. Ils ont montré que la présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 et l'absence du groupe hydroxyle en C3 des flavonoïdes augmentent leur activité inhibitrice. Ils ont aussi montré que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des flavonoïdes non glycosylés ; par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.

Havsteen en 2002 a confirmé l'importance de la structure des flavonoïdes dans le mécanisme d'inhibition, puisque la plupart des procédés de transfert d'électrons nécessitent des coenzymes du type nucléotides (flavines, ptéridines...) lié à la fonction catalytique de l'enzyme par une liaison phosphodiester. Les flavonoïdes ressemblent structurellement aux nucléotides et rentre en concurrence avec eux sur le site de liaison. Dans d'autre cas, ils interagissent directement dans l'état de transition des radicaux libres et cette dernière activité est l'une des occupations favorites des flavonoïdes. Les résultats obtenus par notre étude nous ont permis de conclure que les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et les feuilles de *Pistacia lentiscus* contiennent des composés phénoliques qui ont la capacité à inhiber la NADH oxydase de la XOR relativement élevée. Ce qui explique et confirme les utilisations de ces plantes dans la médecine traditionnelle et surtout comme plante anti- inflammatoire et anti- rhumatoïde.

## IV- Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* montrent que ces deux plantes possèdent un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires. Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets.

Le travail de ce mémoire a été focalisé sur les inhibitions de la xanthine oxydoréductase et en particulier sur l'importance de trouver des principes actifs pour les utiliser au cours de la conception de nouvelles molécules à action thérapeutique et sur la nécessité de les identifier le plus précocement possible dans le processus de développement.

Au cours de nos travaux, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires des deux espèces citées ci-dessus. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solides-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince, chromatographie par filtration sur le gel de Sephadex LH-20). Le fractionnement de l'extrait éthanolique des feuilles de *P.lentiscus* et l'aqueux d'acétate d'éthyle de *F.angustifolia* qui présente l'effet inhibiteur le plus élevé, suivi par des tests d'inhibitions des différentes fractions. Comme nous avons effectué aussi des dosages de polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.

Les analyses phytochimiques sur les extraits des végétaux est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leur activités physiologiques et possédant des vertus médicinales. Les recherches effectuées sur les différents extraits révèlent la présence d'importants métabolites secondaires comme les polyphénols sont caractérisés les extraits de deux espèces : *P.lentiscus* et *F.angustifolia*. De point de vue biologique, Ce groupe est constitué de principes

potentiellement actifs rencontrés dans toute ou une partie de la plante. Ce sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique.

Les tests réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes dans les extraits des deux plantes. Le dosage des différents composés phénoliques les plus abondant dans nos plantes nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins, dont le rendement le plus remarquable est celui des feuilles de *P.lentiscus*.

La teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins entre les différents extraits de l'écorce de *F.angustifolia* et les feuilles de *P.lentiscus* est variable. La teneur la plus élevée des phénols totaux est constatée dans l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *P.lentiscus* ( $432.26 \pm 0.26$  mg/g d'extrait) suivi par celui de *F.angustifolia* ( $244.27 \pm 0.61$  mg). Concernant les flavonoïdes, nous avons observé des teneurs rapprochées entre les extraits des deux plantes, les teneurs les plus importante sont ( $71.15 \pm 1.42$ ) mg Eq/g d'extrait pour l'aqueux du chlorofome des feuilles de *P.lentiscus* et ( $63.21 \pm 1.45$ ) mg marqué par l'extrait éthanolique de l'écorce de *F.angustifolia*. Pour le dosage des tanins, les teneurs obtenues sont classées comme suit : l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *P.lentiscus* suivi par le chloroforme de l'écorce de *F.angustifolia* qui sont de l'ordre de ( $630.62 \pm 16.49$ ) et ( $876.91 \pm 48.29$ ) mg Eq/g d'extrait respectivement dont nous avons remarqué que la teneur enregistrée dans les feuilles de *P.lentiscus* est la plus importante pour la majorité des extraits.

On peut conclure que les extraits des feuilles de *P.lentiscus* sont particulièrement riches en phénols totaux et en tanins par rapport à l'écorce de *F.angustifolia* qui représentent une teneur plus ou moins importantes, tandis que les flavonoïdes présentent des teneurs moyenne, un peu proche entre les extraits des deux plantes. Ces résultats importants reflètent les rendements élevés et la richesse de chaque partie de la plante en polyphénols.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par une méthode spectrophotométriquement à 340nm. La capacité d'inhibition de la xanthine oxydoréductase est remarquable dans l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle ( $91.65 \pm 0.57\%$ ) de l'écorce de *F.angustifolia* qui est supérieur à la capacité de l'extrait éthanolique ( $89.65 \pm 3.56\%$ ) des feuilles de *P.lentiscus*.

L'étude du pouvoir antioxydant a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les extraits de l'écorce de *F.angustifolia* et les feuilles de *P.lentiscus*, toutes les fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *F.angustifolia* et l'éthanolique des feuilles de *P.lentiscus* étudiée ont la capacité d'inhiber la xanthine oxydoréductase qui augmente en fonction de la nature des composés chimiques. Comme nous avons remarqué que la fraction 4 de ce dernier présentent une capacité intéressante par rapport aux autres qui atteint ( $95.82 \pm 1.74\%$ ), supérieur à celle de la quercétine utilisé comme standard ( $89.93 \pm 0.96\%$ ) par contre la fraction 3 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F.angustifolia* qui représente le pourcentage le plus élevé ( $90.01 \pm 0.98\%$ ) qui est inférieur à celle de la fraction 4 de PL.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les extraits des feuilles *P.lentiscus* et l'écorce de *F.angustifolia* ont une bonne activité antioxydante et une capacité d'inhiber la xanthine oxydoréductase intéressante en particulier la fraction 3 de l'écorce FA et la fraction 4 des feuilles de PL. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique.

L'analyse des différents extraits par les méthodes chromatographique sur couche mince, nous conduira dans la perspective future de notre étude, de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée.

Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydoréductase en utilisant des techniques d'identification plus performantes.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité inhibitrice de la xanthine oxydoréductase par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.

## V- Références bibliographique

### Bibliographie :

- Ali-Shtayeh M.S., Abu Ghdeib S.I. (1999): “Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes”, *Mycoses*; 42(11-12):665-72. PubMed PMID: 10680445
- AL-Saghir.M, Porter.D (2012): Taxonomic Revision of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3, 12-32.
- Atmani D., Benboubetra M. and Harrison H. (2004). “Goat’s milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum”. *J. Dairy Res.* 71, 7-13.
- Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. journal homepage : *Food Chemistry* 112 (2009) 303–309.
- Atsushi Fukunari, Ken Okamoto, Takeshi Nishino, Bryan T. Eger, Emil F. Pai, Miho Kamezawa, Ichimaro Yamada, And Norihisa Kato, (2004), Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-Dimethylpropoxy)Phenyl]-1h-Pyrazole-4-Carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor With Hepatic Excretion, *The Journal Of Pharmacology And experimental therapeutics*, Vol. 311, No. 2, 519-528
- Bamforth C.W., « Beer haze. », dans *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 57, no 81–90, 1999
- Berry, C.E., Hare, J.M. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555 (3): 589-606.
- Berthod A Bellardello B et Geoffroy S. (1999) polyphenols in concurrent chromatography. An example of large scale separation1. *Ana lysis EDP science, Wiley-VCH.* 27, 750-757.
- Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khenouf, S., Arrar, L. (2009) Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis*L. root extracts. *Phytotherapy Research.* 23: 283-288.

- Bray R.C. (1975). Molybdenum iron-sulfer flavin hydroxylases and related enzymes. In " Boyer P.D (Eds.), The enzymes" 3rd Ed. Academic Press, New York. pp: 299-419.
- BRUNETON,J. 1996 - Plantes toxiques- Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et Documentation Lavoisier. 529 p. Paris.
- Buchmann. M, Kesselring.U.W (1981) Séparation des produits de décomposition du diméthindènesur Sephadex G-10 et LH-20. Journal of Chromatography, 213 5 15-522.
- Cheynier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex then often thought. American Journal of Clinical Nutriment, 81:22-39.
- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. Journal of Enzyme Inhibitions 8, 61-71.
- Cowan M. M. (1999) plant products as antimicrobial Agent. Clinical Microbiology Reviews.12 (4), 564-582.
- Danny E.C. Van Hoorn, Robert J. Nijveldt, Paul A.M. Van Leeuwen, Zandrie Hofman, Laura M'rabet, Dries B.A. De Bont, Klaske Van Norren, (2002). Accurate Prediction Of Xanthine Oxidase Inhibition Based On The Structure Of Flavonoids , European Journal Of Pharmacology 451 (2002) 111–118.
- Della Corte E. and Stirpe F. (1968). The regulationof rat liver xanthine oxidase: activation by proteolytic enzymes. European Journal of Biochemistry Letters. 2, 83-84.
- Della Corte, E., Gozzetti, G., Novello, F., Stirpe,F. (1969) Properties of the xanthineoxidase from human liver. Biochim. Biophys. Acta. 191: 164–166.
- Dubey V. S. , Bahala R.et Luthra R. (2003).An overview of the non mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. J. Biosci. 28(5),637.
- Ehon, G. B. Callahan. S.. Nathan. H., Bieber, S., Rundles, R. W. And Hitchngs, G. H. (1963) Potentiation By Inhibition Of Drug Degradation: 6-Substituted Purines And Xanthine Oxidase. Biochem. Pharmacol. 12: 85- 93.
- Gertrude B. Elion, Sandra Callahan, R. Wayne Rundles, And George H. Hitchings, (1963) , Relationship Between Metabolic Fates And Antitunior Activities Of Thiopurines, Vol. 23, 1207-1217
- Hadi M (2004) la quercétine et ses dérivés: molécules a caractère prooxydant ou capteur de radicaux libres, étude et application thérapeutiques. Thèse présentée en

- vue de l'obtention du de docteur en science de l'université Louis Pasteur Domaine pharmacochimie.155P.
- Hammerstone J. F., S. A. Lazarus, H. H. Sehmitz, Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods, *J Nutr* 130(2000) 2086-2092S.
  - Hancock J.T., Salisbury V., Ovejero-Boglione M.C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. (2002). Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46, 3308-3310.
  - Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine.* 33, 774-797.
  - Hedqvist, H. Metabolisme of soluble proteins by Rumen Micro organisms and the Influence of Condensed Tannin son Nitrogen Solubility and Degradation. Thèse de doctorat, 2004.
  - Henke, H. (1995). Preparative gel chromatography on Sephadex LH-20. Heidelberg: Hütig GmbH.
  - Herman M. Kalckar, Niels Ole Kjeldgaard, And Hans Klenow, (1950), Amino-4-Hydroxy-6-Formylpterine Dione, An Inhibitor Of Purine And Pterine Oxidases, *Biochimica Et Biophysica Acta*, Vol 5, 586-594
  - Hille, R., Massey, V. (1981) Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 256: 9090–9095
  - Hille, R., Nishino, T. (1995), Xanthine oxidase and xanthine deshydrogenase. *FASEB. J.* 9: 995–1003.
  - Huang Y.T., Ghio A.J., Nozik-Grayck E. and Piantadosi C.A. (2001). Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *American Journal of Physiology.* 280, 474-481.
  - Janakat S, Al-Merie H. (2002): Evaluation of Hepatoprotective Effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca, *Ethnopharmacol* ; 83(1-2):135-8. PubMed PMID: 12413719
  - Jean Bruneton, Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales, Editions Tec & Doc, internationales, 1999, 1120P ( ISBN 2-7430 -0315-4).
  - Katsiotis. A, Hagidimitriou.M, Drossou1.A, Pontikis.C, Loukas.M (2003) Genetic relationships among species and cultivars of Pistacia using RAPDs and AFLPs. *Euphytica* 132: 279–286. 1Department of Genetics and 2Pomology Laboratory,

- Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece; (\*Author for correspondance: e-mail: katsioti@aua.gr)
- Kooij A., Bosch K.S., Frederiks W.M., Van Noorden C.J.F. (1992) High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* 62, 143-150.
  - Kostova et Iossifova (2007) Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* 78 (2007) 85–106.
  - Krenitsky, T.A., Tuttle, J. V., Cattau, E.L., Wang,P. (1974) , A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 49: 687–703.
  - Lamarti A. Badoc A. , Diffieu G. et Card G. P. (1974) Biogénèse des monoterpenes. *Bull Soc. Pharma. Bordeaux.*133, 69- 118.
  - Laughton M. (1991). « Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability », dans *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, no 1673-1681.
  - Laura M. Lyman, Kyle Copps, Luca Rastelli, Richard L. Kelly And Mitzi I. Kuroda, (1997), *Drosophila Male-Specific Lethal-2 Protein: Structure/Function Analysis And Dependence On Msl-L For Chromosome Association*, *Genetics* 147: 1743-1753 ;
  - Manachc., Scalbert A., Morand C. ,Remesy C. and Jimenezl. Polyphénols: food sources and bioavaibility. *Amj. Clin. Nutr.* , 2004, N° vol.79, p.727-747.
  - Markham K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.
  - Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R. (2004) Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent, *INFECTION AND IMMUNITY*. 72: 4933–4939.
  - Massey, V., Edmondson, D. (1970), On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* 245: 6595-6598.
  - Mc Cord J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. 312, 159-163.
  - More D. et White J., (2005).*Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde*, Flammarion, pp 18 ; 797



- Nakamura M. and Yamazaki I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *The Journal of Biochemistry* 92, 1279-1286.
- Nishino, T., Nishino, T. (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residue with fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* 272: 29859–29864.
- Okuda, T. Yoshida, T. et Hatano, T. (1995). Hydrolyzable Tanins and Related Polyphenols, *prog. Chem.. Org. Nat. Prod. Cannas, A. Polyphenols*, 1996, p.1-19.
- Orgogozo (J.M.), Dartigues (J.F.), Lafont (S.), et al. – Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area - *Rev. Neurol.* 1997, 153, 185-192.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C. (2006) Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.*58: 87-114.
- Pal Pacher, Alex Nivorozhkin, And Csaba Szabo, (2006), Therapeutic Effects Of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half A Century After The Discovery Of Allopurinol, *Pharmacol Rev*58:87–114, Vol. 58, No. 1.
- Parks, D.A., Granger, D.N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution, and physiology. *Acta. Physiol. Scand.* 548: 87–99.
- Pietta p., Simonetti p., Mauri p. Antioxidant activity of selected medicinal plants *J. Agric. Food Chem.* 46, 4487, 1998.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J. (1999). Evaluation du stress oxydant, une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Coeur, Poumon* 4 : 148-154.89-
- pstova J. Lasovsky J. et Vicar J. (2003) Metal-chelating properties, electrochemical Behavior, scavenging And cytoprotective Activity of Six Natural phenolics. *Biomed. Papers* 147(2), 157-153. Richter G. (1993) les composés phénoliques. *Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie)*, édition Dunod :317-399.
- Raven, Evert, Eichhorn, 2003, livre biologie végétale, édition de Boeck université. ISBN 2-7445-0102-6.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O. et Regeat F. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med et Nut.*1996 ; 32 (1) : 17-27.
- Rundles, R. W., Wyngaarden, J. B., Hitchings, G. H. And Elion, G. B. (1969). *Drugs And Uric Acid. Annu. Rev. Pharmacol.* 9: 345-362.

- Sarni-Manchado, P. Chenier V., Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & doc, 2006, 398 p. (ISBN 2-7430- 138-9).
- Schreck R. and Baeuerle P.A. (1991). A role for oxygen radicals as second messengers. Trends in Cellular Biology. 1, 39-42.
- shahidi F., Naczki M. (2004). Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press, 2 : 1-113.
- Stevens, C.R., Millar, T.M., Clinch, J.G., Kanczler, J., Bodamyali, T., Blake, D.R. (2000) Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. Lancet. 356: 829–830
- Takeo Shimo, Naoki Ashizawa, Koji Matsumoto, Takashi Nakazawa, And Osamu Nagata, (2005), Simultaneous Treatment With Citrate Prevents Nephropathy Induced By Fyx-051, A Xanthine Oxidoreductase Inhibitor, In Rats, Toxicological Sciences 87(1), 267–276
- Takeo Shimo, Naoki Ashizawa, Koji Matsumoto, Takashi Nakazawa, And Osamu Nagata, (2005), Simultaneous Treatment With Citrate Prevents Nephropathy Induced By Fyx-051, A Xanthine Oxidoreductase Inhibitor, In Rats, Toxicological Sciences 87(1), 267–276
- Todd D. Engerson, T. Greg Mckelvey, Darryl B. Rhyne, Elizabeth B. Boggio, Stephanie J. Snyder, And Harold P. Jones, (1987), Conversion Of Xanthine Dehydrogenase To Oxidase In Ischemic Rat Tissues, J. Clin. Invest. Volume 79, June 1987, 1564-1570.
- Vaya J, Mahmood S., (2006): Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (*Ficus carica* L.), Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and Pistachio (*Pistacia lentiscus* L.), Biofactors.;28(3-4):169-75. PubMed PMID: 17473377.
- Vercauteren, J., Cheze, C. AND Triaud, J. Polyphenols 96. Ed: INRA, 1996 , p.31-43.
- Vernon Hollis Booth, (1938).The Xanthine Oxidase-Aldehyde System , Biochemical And Physiological Laboratories, Cambridge
- William F. Cleere And Michael P. Coughlan, (1975), Avian And Xanthine Dehydrogenases--I. Isolation Characterization Of The Turkey Liver Enzyme, Comp. Biochem. Physiol, Vol 5013, Pp. 311 To 322
- Xia, M., Dempski, R., Hille, R. (1999) The reductive half-reaction of xanthine oxidase – reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. J. Biol. Chem. 274: 3323–3330.

- Yasuhiro Takano, Kumiko Hase-Aoki, Hideki Horiuchi, Lin Zhao, Yoshinori Kasahara, Shiro Kondo, Michael A. Becker, (2004) . Selectivity Of Febuxostat, A Novel Non-Purine Inhibitor Of Xanthine Oxidase/Xanthine Dehydrogenase ; Life Sciences 76 (2005) 1835–1847.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechine in foods. Food Science and Technology, p.64-71.
- Yoshio Osada, Masahiro Tsuchimoto, Hisashi Fukushima, Katsushi Takahashi, Shiro Kondo, Masaichi Hasegawa And Keiji Komoriya, (1993). Hypouricemic Effect Of The Novel Xanthine Oxidase Inhibitor, Tei-6720, In Rodents. European Journal Of Pharmacology, 241 (1993) 183-188.
- Yu, T.-F. And Cutman, A. B. (1964} Effect Of Allopurinol (4-Hydroxyl~Yrazolo[3,4-D]Pyrimidine) On Serum And Urinary Uric Acid In Primary And Secondary Gout. Am. J. Med. 37: 885-898.

# 1 Annexe

## 1.1 Annexe N°1 : Courbes d'étalonnages

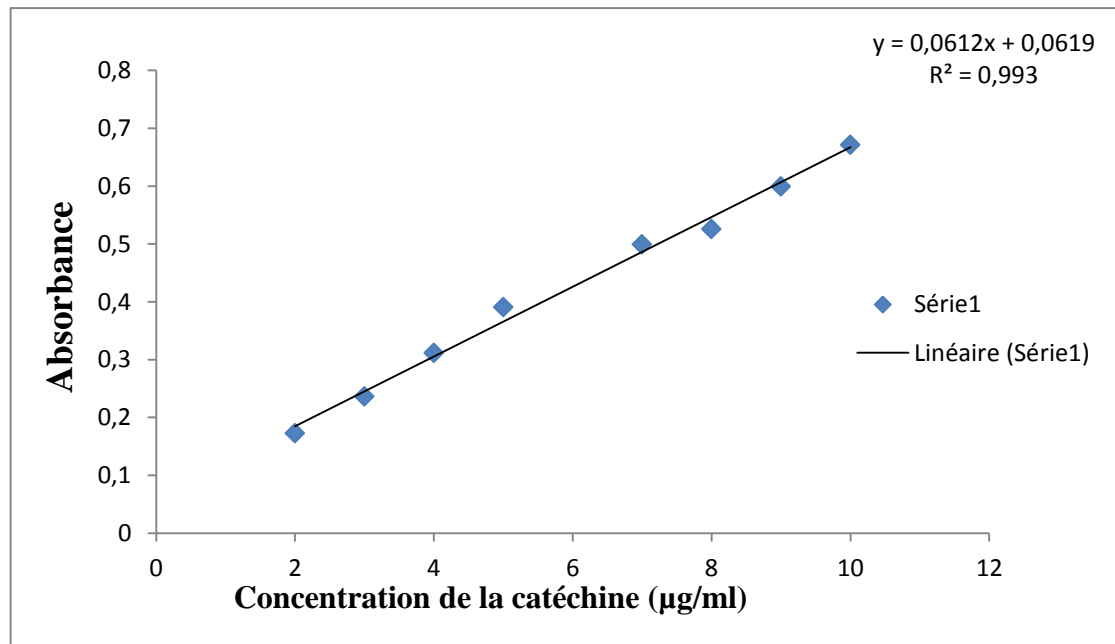


Figure 41: Courbe d'étalonnage de la catéchine

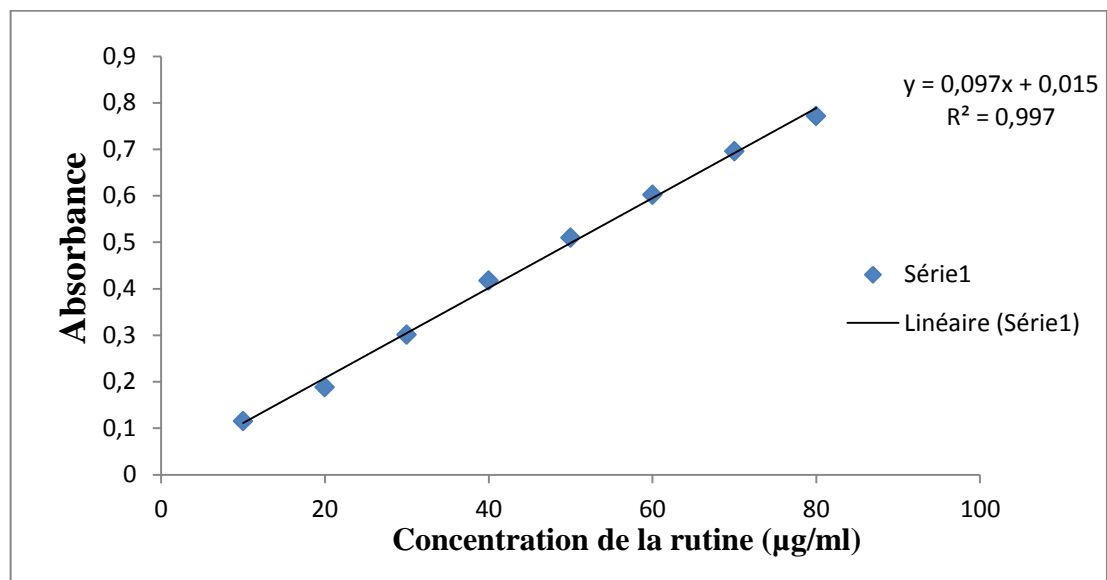


Figure 42: Courbe d'étalonnage de la rutine

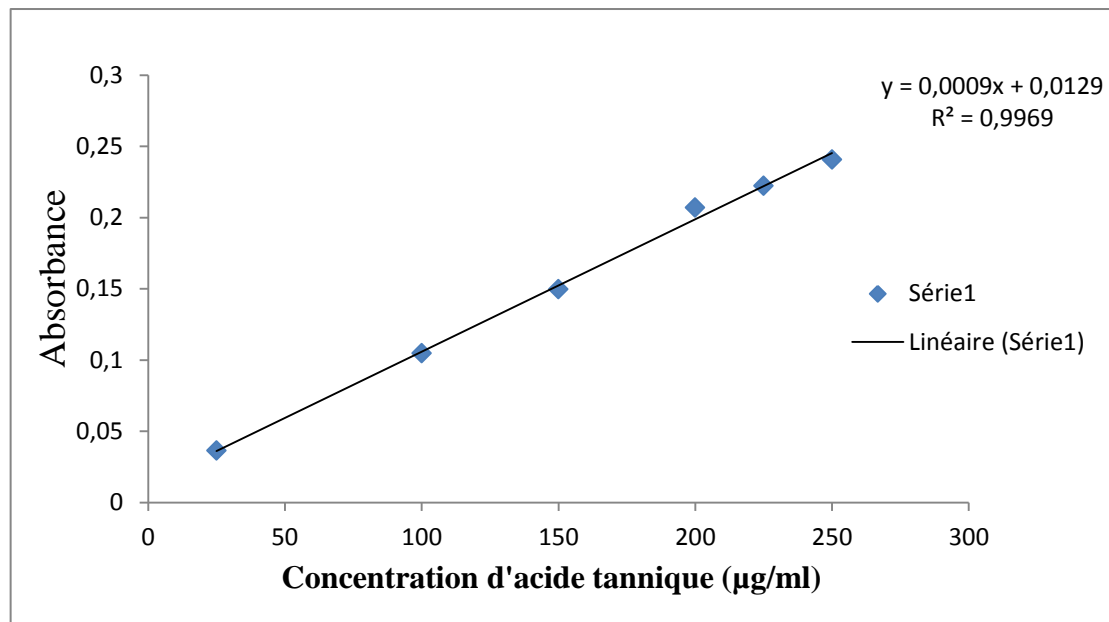


Figure 43: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

## 1.2 Annexe N°2 : Préparation des solutions utilisées pour le dosage des tannins totaux :

- **Solution de BSA** : 1 g de BSA / 1 L de tampon A.

- **Tampon acétate (tampon A) à pH 4,9** : - Acide acétique à 0,20M ;

- chlorure de sodium à 0,17 M ;

- pH Ajusté à 4,9.

- **Solution SDS** : - 2.5 ml de triethanolamine ;

- 0.5 g SDS dans 25ml d'eau distillée.

- Compléter à 50ml d'eau distillée.

- **Solution de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>)** : Solution de 0,01M de FeCl<sub>3</sub> préparée par dissolution de 0.032 g de FeCl<sub>3</sub> à 0,01 M dans 20ml d'HCl à 0,01 M.

## 2 Annexe

### 2.1 Annexe N°1 : Courbes d'étalonnages

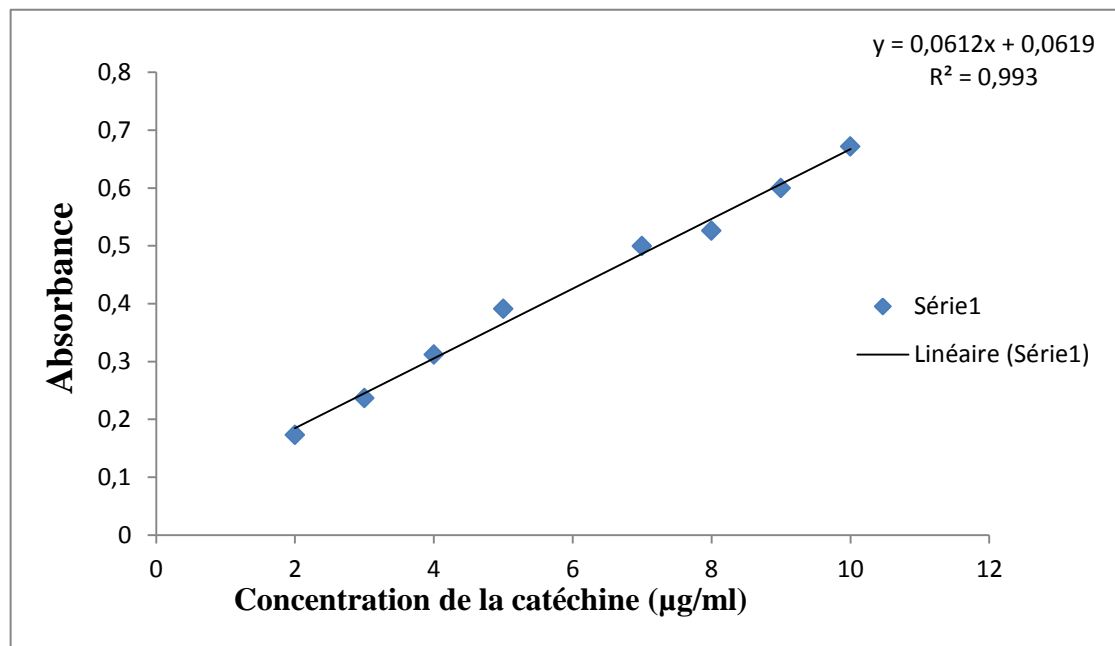


Figure 44: Courbe d'étalonnage de la catéchine

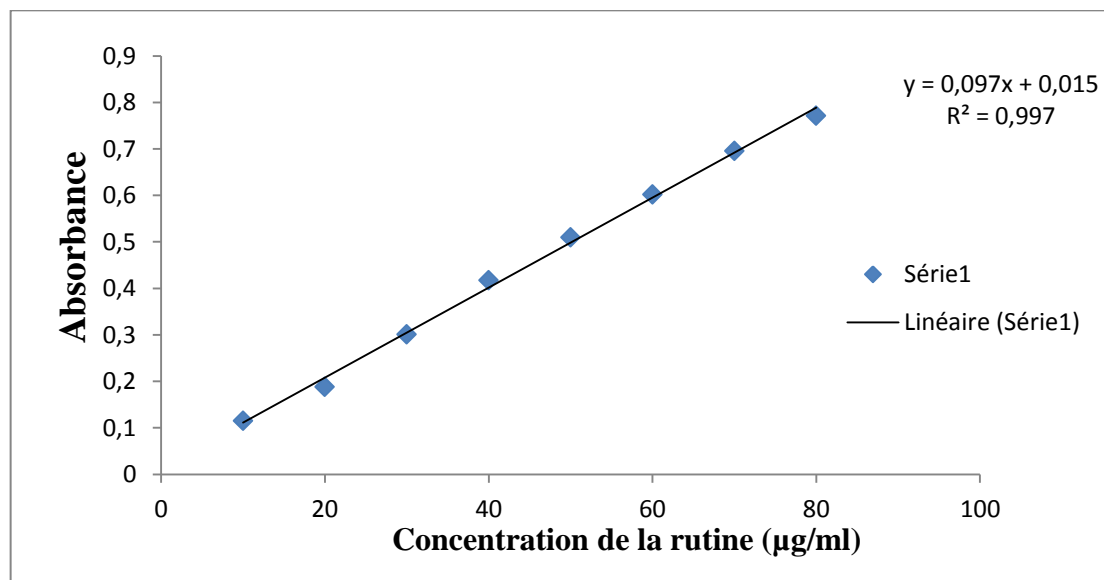


Figure 45: Courbe d'étalonnage de la rutine

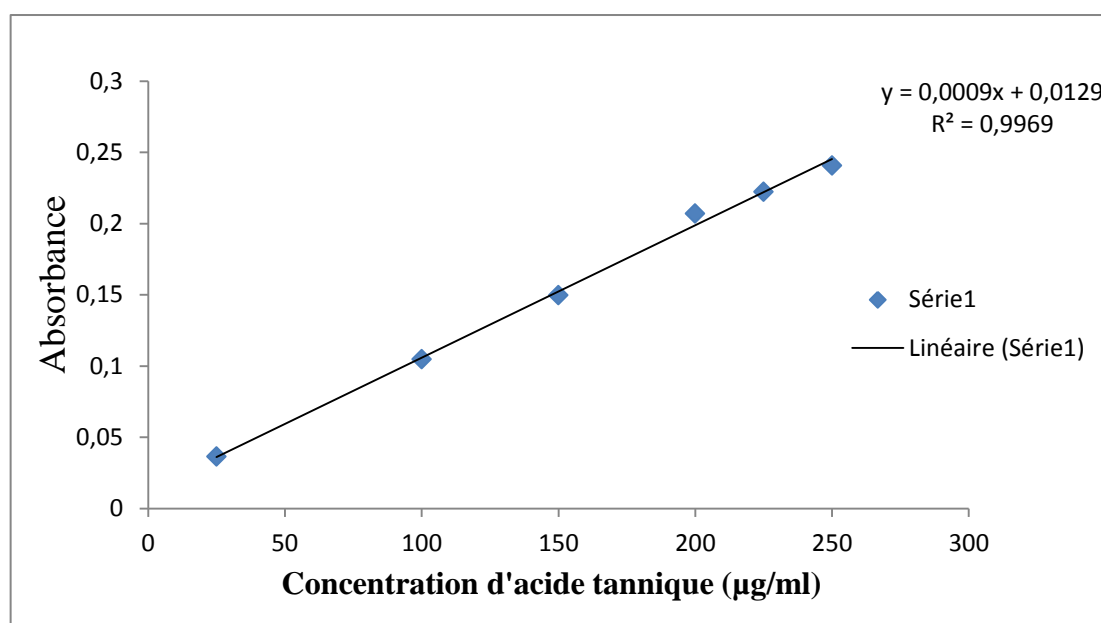


Figure 46: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

## 2.2 Annexe N°2 : Préparation des solutions utilisées pour le dosage des tannins totaux :

- **Solution de BSA** : 1 g de BSA / 1 L de tampon A.

- **Tampon acétate (tampon A) à pH 4,9** : - Acide acétique à 0,20M ;

- chlorure de sodium à 0,17 M ;

- pH Ajusté à 4,9.

- **Solution SDS** : - 2.5 ml de triethanolamine ;

- 0.5 g SDS dans 25ml d'eau distillée.

- Compléter à 50ml d'eau distillée.

- **Solution de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>)** : Solution de 0,01M de FeCl<sub>3</sub> préparée par dissolution de 0.032 g de FeCl<sub>3</sub> à 0,01 M dans 20ml d'HCl à 0,01 M.

## 2.3 Produits et réactifs chimiques

Les solvants organiques utilisés dans cette étude sont de grade analytique (Le méthanol, l'éthanol, le chloroforme ont été fournis par Sigma- Aldrich, et l'acétate d'éthyle par Fisher Laboratory). Les différents acides: l'acide acétique (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et l'acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont fournis par Biochem.

Les réactifs chimiques, le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) ont été fournis par Fluka, le Folin-Ciocalteu (FCR). Les sels: Bicarbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Chlorure de Sodium

(NaCl), le Chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), Ferricyanide de Potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , et le gel de Silice par Prolabo, le phosphate de sodium monobasique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) et dibasique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), la rutine, la vanilline, la catéchine et la quercétine ont été fournis par Sigma.

Pour l'évaluation de l'activité anti-NADH on a utilisé les produits suivants ; Dithiothreitol (DTT), bicine, sulfate d'ammonium, xanthine, NADH déshydrogénase, NADH, Parmi l'appareillage utilisé: rotavapeur (BÜCHI), centrifugeuse 3-K30 (Sigma) et le spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Techcomp).



## Résumé

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques. Aux quels sont attribuées diverses activités biologiques. Dans la présente étude on a tenté d'évaluer l'activité inhibitrice de la xanthine déshydrogénase des extraits des feuilles de *P.lentiscus* et l'écorce de *F.angustifolia*. L'analyse qualitative des extraits par chromatographie sur colonne de séphadex LH20 et sur couche mince a révélé la présence probable de polyphénols, flavonoïdes et des tanins. L'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) et des tanins (par la méthode au trichlorure de fer) a montré que les extraits de *P.lentiscus* sont les plus riches en ces composés.

L'inhibition de la xanthine déshydrogénase a montré une activité antioxydante considérable pour l'extrait éthanolique des feuilles de *P.lentiscus* ( $89.65\% \pm 3.56$ ) et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *F.angustifolia* ( $91.65 \pm 0.57\%$ ). Afin d'étudier l'activité antioxydante des fractions des deux extraits vis-à-vis de l'activité NADH-déshydrogénase de la XOR, nous avons suivis l'influence de leurs composition chimique sur le pouvoir d'inhibition. Selon l'ensemble des résultats obtenus, la fraction 3 de l'extrait AC Eth de FA et fraction 4 de l'extrait éthanolique de PL qui présentent le pouvoir antioxydant le plus élevé ( $95.82 \pm 1.74\%$ ,  $90.01 \pm 0.98\%$ ) respectivement.

**Mots clés :** NADH-déshydrogénase, *Fraxinus angustifolia*, *Pistacia lentiscus*, xanthine oxydoréductase.

## ABSTRACT

Various biological activities are attributed to a great variety of phenolic compounds isolated from natural plants. This study presents an attempt to evaluate the inhibitive activity of xanthine déshydrogénase by extracts prepared from the leaves of *P.lentiscus* and bark of *F.angustifolia*. Qualitative analysis of extracts by chromatography on Sephadex LH20 column and CCM revealed the probable presence of polyphenols, flavonoids and tanins. The quantitative estimation of total polyphenols (by the Folin-Ciocalteu method), total flavonoids (by the method of aluminium trichloride) and condensed tannins (by the method of iron trichloride) showed that the leaves of *P.lentiscus* extracts are richer in these compounds.

The inhibition of xanthine dehydrogenase showed a considerable antioxidant activity for ethanolic extract from the leaves of *P.lentiscus*  $89,65\% \pm 3,56$  and the aqueous extract of ethylacetate *F.angustifolia*  $91,65 \pm 0,57\%$ . To investigate the antioxidant activity of extracts of the two fractions with respect to the NADH dehydrogenase activity of the XOR, we followed the influence of their chemical composition on the inhibiting power. According to the overall results, the fraction 3 AC Eth of F. a extract and fraction 4 of the ethanol extract of P.l that have the highest antioxidant power  $95,82 \pm 1,74\%$   $90,01 \pm 0,98\%$  respectively.

**Keywords:** NADH-dehydrogenase, *Fraxinus angustifolia*, *Pistacia lentiscus*, xanthine oxidoreductase.

## ملخص

المستخلصات النباتية الطبيعية تحتوى على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية، والتي يتم تخصيصها للأنشطة البيولوجية المختلفة. في هذه الدراسة سعينا لتقييم النشاط المثبط للأنزيم كزانتين ديزدروجيناز من طرف مستخلصات الاوراق P.lentiscus وجذور F.angustifolia. التحليل النوعي للمستخلصات بالكروماتوغرافيا العمودية بوجود مادة السيـفادكس (LH20) الطبقة الافقية أظهر احتمال وجود مستخلصات فينولية، فلافونودية و tanins. الاحتمال الكمي للمستخلصات الفينولية (بطريقة كاشف Folin-Ciocalteu)، الفلافونويد ( بطريقة المركب trichlorured' aluminium و (بمركب trichlorure de fer) بيّن ان مستخلصات P.lentiscus هي الأغنى من ناحية هذه المستخلصات.

وقد اظهر النشاط المضاد للأكسدة نتائج معتبرة من طرف المستخلصات الايثانولية لأوراق P.lentiscus (89,65±3,56%) والمستخلص المائي اللاستات إيثل لجذور F.angustifolia (91,65±0,57%). لدراسة النشاط مضاد للاكسدة من طرف أجزاء المستخلصين ضد الأنزيم، تابعنا تأثير المكونات الكيميائية على نشاط التثبيط. وفقا للنتائج المحصل عليها، الجزء 3 من مستخلص الأستات إيثل لجذور F.angustifolia والجزء 4 من مستخلص الإيثانول لأوراق P.lentiscus التي تمثل النشاط التثبيطي الأكبر (92,82±1,75% ، 90,01± 0,08 % بالترتيب).

**كلمات المفتاح:** كزانتين ديزدروجيناز، مران رفيع الأوراق، بطم عدسي، كزانتين أوكسيدوريدوكتاز.