

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



Réf :

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Effet des extraits de *Fraxinus angustifolia* sur
les enzymes lysosomales d'un modèle animal
d'arthrite goutteuse aigue**

Présenté par :

HASSANI SYLIA

Soutenu le : 16 Juin 2016 à 13H00

Composition du jury

M ^{me} ALIOUI-ZEMMOURI S.	MAA	President
M ^{elle} AYOUNI K.	MAA	Encadreur
M ^r HAMMOUM M.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

On profite de cette opportunité pour remercier en premier lieu le bon DIEU tout puissant, de nous avoir offert le courage et la volonte de réaliser ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à ma promotrice M^{elle} « Ayouni K. » Pour son bon encadrement, sa disponibilité, sa patience, ses conseils fructueux qu'elle n'a cessé de nous prodiguer et sa remarque pertinente pour la pérennité de cet écrit.

Je tiens à remercier également les membres du jury :

M^{me} Zemmouri- Alioui S. d'avoir fait l'honneur de présider ce jury et M^r Hammoum M. d'avoir accepté de faire partie du jury et de consacrer de leur temps pour examiner ce travail

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes du département de Biochimie Appliquée de l'université de Bejaia, en particulier M^r et M^{me} Atmani qui nous ont ouvert les portes du laboratoire de génétique

Je tiens à remercier aussi profondément M^{me} Rahmani-Berboucha pour son aide, son encouragement et ses conseils ainsi que son binôme avec qui j'ai partagé ce travail

Mes remerciements s'adressent aussi à M^{elle} Remila S. de m'avoir encouragé depuis le début de ce travail

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce travail

Tous d'abord à mes très chers parents, la principale cause de ma réussite par leurs amours, leurs sacrifices, leurs encouragements durant toutes mes années d'étude et leurs soutiens dans toutes les circonstances, ils ont toujours su me supporter et me guider.

A mon très cher frère, Walid, pour son aide précieuse

Et à mon adorable petite sœur, Lyna

A toute ma grande famille, oncles, tantes, cousins, cousines sans exception en particulier mes deux grand-mères, que Dieu, le tout puissant leurs procure santé et longue vie.

A toutes mes amies : Farah, Siham, Chahinez, Souad, Lydia, Sonia

A toute la promotion Master 2 Biochimie Appliquée 2015/2016

SYLIA H.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Introduction.....	01
CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique	
I.1.1. Hyperuricémie et goutte.....	02
I.1.2. Physiopathologie de l'arthrite goutteuse.....	03
I.1.3. Inflammation aigue et mécanisme d'action.....	04
I.1.4. Déclenchement de l'accès aigu.....	04
I.1.4.1. La phagocytose	04
I.1.4.2. Interaction cellules-cristaux.....	04
I.1.5. Recrutement de nouvelles cellules et sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.....	05
I.1.6. Inflammasome et immunité innée.....	06
I.1.7. Résolution spontanée de l'inflammation aigue.....	07
I.2. Les enzymes lysosomales et le espèces réactives de l'oxygène dans l'inflammation.....	08
I.2.1. Les enzymes lysosomales dans l'arthrite goutteuse.....	10
I.2.1.1. β -galactosidase.....	10
I.2.1.2. Phosphatase acide.....	12
I.2.1.3. Cathepsine D.....	13
I.2.2. Libération des espèces réactives de l'oxygène.....	14
I.3. Traitement de l'arthrite goutteuse.....	14
I.3.1. Colchicine	15
I.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	15
I.3.3. Inhibiteurs de la synthèse de l'acide urique.....	16

I.3.4. Les uricosuriques.....	16
I.3.5. Inhibiteurs de l'IL-1 (Anakinra).....	16
I.4. Traitements naturels de l'arthrite goutteuse.....	17
I.4.1. Présentation de <i>Fraxinus angustifolia</i>	18
I.4.2. Composition phytochimique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	19
I.4.3. Activités biologiques et utilisation traditionnelle de <i>Fraxinus angustifolia</i>	22

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.....	24
II.1.1.Appareillages et verrerie.....	24
II.1.2. Réactifs chimiques.....	24
II.1.3. Matériel végétal de <i>Fraxinus angustifolia</i>	24
II.1.4. Les échantillons de foie et de rates.....	25
II.2. Méthodes.....	25
II.2.1. Etude phytochimique.....	25
II.2.1.1. Dosage des phénols totaux.....	25
II.2.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
II.2.1.3. Dosage des tannins.....	26
II.3.1. Préparation des homogénats de rates et de foies.....	27
II.3.2. Dosage des protéines totales	28
II.3.3. Dosage de l'activité enzymatique β -galactosidase dans les homogénats de foies et de rates.....	29
II.2.4. Analyse statistique	29

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.1.Résultats des dosages des composés phénoliques (phénols totaux ; flavonoïdes et tannins).....	30
III.1.1. Résultats de dosage des phénols totaux.....	30
III.1.2. Résultats de dosage des flavonoïdes.....	31
III.1.3. Résultats de dosage des tannins.....	31

III.2. Résultats de l'effet des extraits de <i>F. angustifolia</i> sur la libération de la β - galactosidase chez des souris induites par les UMS.....	31
III.2.1. Effets des extraits des feuilles et des écorces de <i>F. angustifolia</i> dans le foie	32
III.2.1.1. Effets des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i>	32
III.2.2.2. Effets des extraits des écorces de <i>F. angustifolia</i>	33
III.2.2. Effets des extraits des feuilles et des écorces de <i>F. angustifolia</i> dans la rate.....	34
III.2.2.1. Effets des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i>	34
III.2.2.2. Effets des extraits des écorces de <i>F. angustifolia</i>	35
III.3. Discussion.....	36
Conclusion.....	41
Références bibliographiques.....	42
Annexes	

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens.

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD.

F.E.A : *Fraxinus* Ecorce Aqueux.

F.E.E : *Fraxinus* Ecorce Ethanolique.

F.F.A : *Fraxinus* Feuilles Aqueux.

F.F.E : *Fraxinus* Feuilles Ethanoliques.

Ig G : Immunoglobuline Gamma.

IL 10 : Interleukine 10.

IL 6 : Interleukine 6.

IL 8 : Interleukine 8.

IL-1 β : Interleukine-1 β .

LAMP : lysosome-associated membrane proteins) et les LIMP (lysosome-integral membrane protein.

LIMP : lysosome-integral membrane protein.

M6P : Mannose-6-phosphate.

MA : Macroautophagie.

MYD88 : Protéine adaptatrice de différenciation myéloïde facteur 88.

N.O.S : Espèces réactives de nitrogène.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NOS : Nitrite oxydase synthase.

ONP : O-nitrophénol.

ONPG : 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside.

PNN : Polynucléaire neutrophiles.

R.E : Réticulum endoplasmique.

R.O.S : Espèces réactives de l'oxygène.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

LISTE DES ABREVIATIONS

TEA : Triethanolamine.

TGF : Tumor Growth Factor.

TLR : Toll Like Receptor.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α .

UMS : Cristaux urate monosodiques.

XOR : Xanthine oxydoréductase.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	(A) Arthrite aigue de la première articulation métatarsophalangienne du gros orteil droit, (B) Goutte tophacée.	03
02	Représentation schématique de l'inflammation uratique au cours du temps : Entre les accès aigus une inflammation inter-critique est probable dont la répétition induit des accès chroniques.	03
03	Etapes de déclenchement de l'inflammation lors de l'arthrite goutteuse (Traduit de l'anglais).	06
04	Résolution de la crise de goutte	08
05	Fonctions du lysosome (Traduit de l'anglais)	09
06	Structure tridimensionnelle de β -galactosidase	11
07	Structure tridimensionnelle de la phosphatase acide	12
08	Structure cristalline de la cathepsine D	13
09	Photographie originale : (A) : de l'arbre <i>Fraxinus angustifolia</i> ; (B) : écorce et feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	18
10	Schéma du protocole d'extraction	25
11	Etapes de préparation des homogénats	28
12	Réaction catalysée par la β -galactosidase	29
13	Effets des extraits ethanologiques et aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> , la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans le foie chez un modèle animal d'arthrite goutteuse	32
14	Effets des extraits des écorces ethanologiques et aqueux de <i>F. angustifolia</i> , la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans le foie chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue	34
15	Effets des extraits des feuilles ethanologiques et aqueux de <i>F. angustifolia</i> , la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans la rate chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue	35
16	Effets des extraits des écorces ethanologiques et aqueux de <i>F. angustifolia</i> , la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans la rate chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue	36

N°	Titre	Page
I	Quelques plantes médicinales utilisées dans le cas de l'arthrite goutteuse.	17
II	Structure chimique des phénols totaux.	20
III	Structure chimique des flavonoïdes.	20
IV	Structure chimique des coumarines.	20
V	Structure chimique des lignanes.	21
VI	Structure chimique des phényléthanoides glycosylés.	21
VII	Structure chimique des secoiridoïdes glycosylés.	22
VIII	Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins dans les extraits ethanoliques et aqueux des écorces et des feuilles de <i>F. angustifolia</i> .	30

- **Arthropathie microcristalline** : C'est une inflammation due au dépôt des cristaux d'urate monosodique dans les articulations.
- **Articulation métatarsophalangienne** : est une articulation qui unit la tête des os métatarsiens (du métatarse), à la base des premières phalanges des doigts du pied.
- **Coalescence** : est un phénomène par lequel deux substances identiques, mais dispersées, ont tendance à se réunir. Le phénomène principal qui entre en jeu est que le matériau optimise sa surface sous l'action de la tension superficielle, de manière à atteindre un minimum d'énergie.
- **Contenu crayeux** : C'est un contenu blanchâtre qui contient le carbonate de calcium.
- **Épanchements articulaires** : Présence en quantité anormale de liquide synovial dans une articulation. Lorsque la membrane synoviale est soumise à un processus irritatif (libération de substances suite à la dégradation du cartilage par exemple), elle devient inflammatoire et synthétise du liquide synovial en excès, provoquant un épanchement articulaire. Il contient des substances inflammatoires qui vont entretenir et parfois amplifier la poursuite du processus arthrosique. Il contient également moins d'acide hyaluronique, perd ainsi de la viscosité et est moins apte à protéger le cartilage vis-à-vis des agressions, favorisant la dégradation progressive du cartilage.
- **Kinines** : Le nom de **kinine** est un nom générique qui regroupe plusieurs polypeptides du plasma. Ceux-ci sont libérés à partir du kininogène, sous l'action de la kallikréine. Leur métabolisme est dû à la kininase II. Les deux principales kinines sont la bradykinine et la kallidine. Ils ont une action de relâchement de la musculature lisse provoquant une vasodilatation artérielle. Ils agissent sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins pour en augmenter leur perméabilité, et ainsi faciliter la migration des leucocytes. Le résultat de leur action est une hypotension et une douleur.
- **La néphrite rénale** : est une maladie dans laquelle les espaces entre les tubules rénaux enflent d'où inflammation. Cette dernière peut affecter la fonction des reins, y compris leur capacité à filtrer les déchets.
- **Oponisation des cristaux** : est un processus biochimique par lequel une molécule (dite opsonine) recouvre la membrane d'une cellule cible (une bactérie ou une cellule du corps infectée par un pathogène) pour favoriser sa phagocytose par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines.

- **Survenue nocturne** : Apparition des facteurs qui favorisent la précipitation des cristaux d'urate monosodique dans les articulations.
- **Tophus goutteux** : sont des concrétions uratiques qui se forment sous la peau dans le cas d'une goutte chronique, le plus souvent au niveau des mains, des pieds, des poignets, des chevilles et des oreilles. Les tophus ont l'aspect de bosses dures sous la peau et ne sont généralement pas douloureux, sauf pendant les attaques de goutte, car ils deviennent enflammés et gonflés. Au fur et à mesure de leur croissance, les tophus peuvent éroder les tissus des articulations, causant des dommages et éventuellement l'usure des articulations jusqu'à leur destruction totale.

INTRODUCTION

L'arthrite goutteuse est une maladie métabolique liée à l'augmentation de la concentration sérique des cristaux d'urate monosodique dans les articulations. Elle est caractérisée par une douleur intense, rougeur et gonflement. Le dépôt de cristaux d'urate monosodiques dans le tissu synovial et le cartilage peut favoriser l'inflammation chronique, qui conduit à des dommages tissulaires tels que la destruction du cartilage et la formation de tophus (**Sabina et al.,2012**).

Le marqueur pathologique primaire de la goutte est l'infiltration massive des neutrophiles dans le liquide articulaire. Au contact des cristaux d'urate monosodique, la phagocytose est activée, ce qui induit la libération des médiateurs de la réaction inflammatoire tels que la génération des radicaux libres, la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes, la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et la libération des hydrolases acides (β -galactosidase, phosphatase acide, cathepsine D, β -glucuronidase et N-acétyl- β -glucosaminidase) du lysosome (**Shi et al., 2010**). Cet organe est le carrefour du système vacuolaire de la cellule dont les fonctions sont étroitement inter-régulées.

La goutte est devenue plus courante et cliniquement plus complexe ces dernières années. Cependant, la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les uricosuriques, les inhibiteurs de l'uricosynthèse et les agents anti-interleukines 1- β sont utilisés pour le traitement de l'inflammation induite par les cristaux d'UMS (**Richette, 2011**).

Bien que ces molécules sont généralement efficaces, elles présentent également des effets secondaires graves : la toxicité rénale ou gastro-intestinale et des saignements gastro-intestinaux (**Wallace, 1974 ; Lioté et al., 2007**). Ce qui fait appel à une médecine alternative qui utilise des substances naturelles mieux tolérées par l'organisme. En effet, depuis l'antiquité les humains se soignent avec les plantes médicinales qui possèdent des propriétés antalgiques, analgésiques et anti-inflammatoires. Ces dernières doivent leurs activités biologiques aux métabolites secondaires, incluant la famille des composés phénoliques (**Sabina et al.,2012**).

Fraxinus angustifolia est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen, en particulier dans le Nord algérien. Elle est utilisée traditionnellement par les magrébins dans le traitement de l'accès aigu de la goutte (**Quezél et Santas, 1963**).

Le but principal de ce travail consiste à étudier la composition phytochimique de cette plante et d'évaluer l'effet des extraits ethanologiques et aqueux des feuilles et des écorces sur l'activité des enzymes lysosomales d'un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue.

CHAPITRE I

*SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I.1.1. Hyperuricémie et goutte

L'hyperuricémie découle de l'excès de production de l'acide urique. Ce dernier est issu du catabolisme des acides nucléiques cellulaires, la dégradation des acides nucléiques alimentaires par la xanthine oxydase et la synthèse *de novo* des purines dans le foie à partir de ribose-5-phosphate (Agudelo *et al.*, 2001 ; Ea, 2011a ; Paragasam et Rasool, 2013). L'accumulation et le stockage de l'acide urique dans l'organisme, ainsi que certains facteurs génétiques et environnementaux entraînent l'hyperuricémie qui peut être à l'origine de plusieurs pathologies telle que la goutte (Bennesser *et al.*, 2010 ; Roddy, 2010).

L'acide urique est un acide faible dont le pKa est au voisinage de 5,8, il se précipite rapidement dans les milieux aqueux, tels que les urines et le liquide synovial pour former des cristaux d'urate monosodiques (UMS) (Kuntz *et al.*, 2003). Le dépôt de ces derniers dans les articulations dépendent du pH du milieu, en effet, la diminution du pH favorise leur précipitation, une basse température favorise leur dépôt dans la partie froide du corps en particulier les articulations, et l'hydratation des tissus explique la survenue de l'accès nocturne dans les tissus (Bennesser *et al.*, 2010).

La goutte est une arthropathie microcristalline due à la saturation du plasma en urates (Kuntz *et al.*, 2003). Ces derniers provoquent des manifestations cliniques très variées allant de l'hyperuricémie asymptomatique où le taux d'acide urique atteint le point de saturation, les cristaux peuvent se déposer dans les tissus et induire des dommages tissulaires, à la crise de goutte aiguë caractérisée par le déclenchement de la première crise de goutte aiguë, qui semble être associée à une variation rapide de la concentration sanguine d'acide urique plutôt qu'à l'atteinte d'un seuil critique. Les intervalles libres se caractérisent par la résolution spontanée de la crise de goutte après quelques jours, définie comme une période de latence entre deux crises. Finalement, un état inflammatoire persistant évolue vers la goutte chronique à l'origine de destructions tissulaires (Kuntz, 1978 ; Chia *et al.*, 2008 ; Shi *et al.*, 20010).

L'inflammation aiguë et monoarticulaire (Figure 01 A) se caractérise par la douleur, la rougeur, la chaleur et le gonflement typiquement dans une articulation métatarsophalangienne, et elle a une durée limitée (Schlienger, 2011).

La goutte chronique tophacée (Figure 01 B) se caractérise par des concrétions uratiques qui s'accumulent sous la peau sous forme isolées ou réunies en une masse irrégulière et bosselée, mou au début puis durcissent et parfois même s'ulcèrent spontanément ou après un

traumatisme, en laissant s'échapper un contenu crayeux blanchâtres. Dans les stades avancés de l'inflammation, les dépôts uratiques détériorent les articulations, ce qui évoque un rhumatisme inflammatoire (Schlienger, 2011).

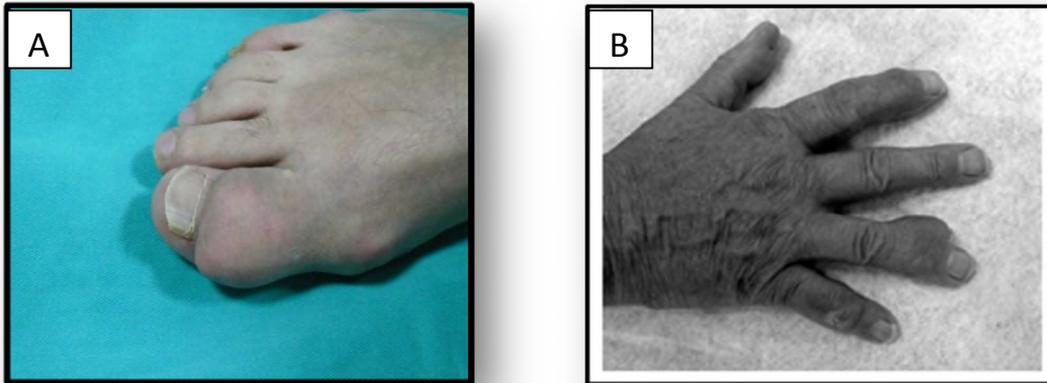


Figure 01 : (A) Arthrite aiguë de la première articulation métatarsophalangienne du gros orteil droit (Alici *et al.*, 2013). (B) Goutte tophacée (Schlienger, 2011).

I.1.2. Physiopathologie de l'arthrite goutteuse

La conception physiopathologique actuelle de l'accès goutteux fait intervenir trois phases : Une phase initiatrice brutale, faisant suite à la formation et à la présence de microcristaux d'UMS; une phase d'amplification et de propagation et une phase de résolution spontanée (Figure 02) (Alaoui *et al.*, 2013).

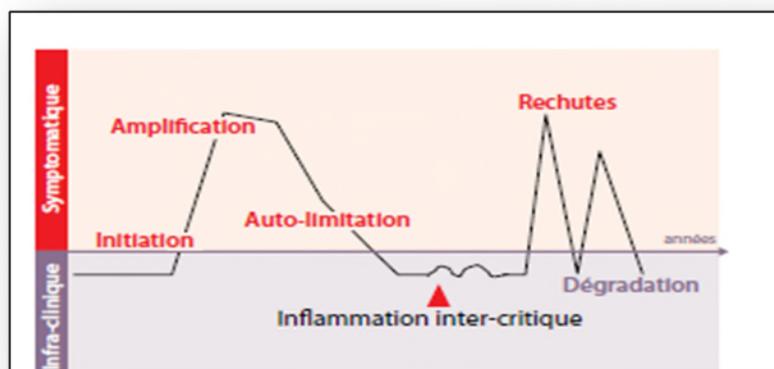


Figure 02 : Représentation schématique de l'inflammation uratique au cours du temps : Entre les accès aigus une inflammation inter-critique est probable dont la répétition induit des accès chroniques. (Lioté, 2011).

I.1.3. Inflammation aigue et mécanisme d'action

La réaction inflammatoire microcristalline dans la crise de goutte résulte de l'interaction entre les cristaux d'UMS, les synoviocytes de type B (fibroblastiques), les synoviocytes de type A (macrophagiques) et les leucocytes infiltrants, ce qui induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, tels que l'interleukine-1 β (Il-1 β), le TNF- α (Tumor necrosis factor- α), l'interleukine 6 (Il-6) et l'interleukine 8 (Il-8) (**Martinon *et al.*, 2002 ; Schroder et Tschopp, 2010**). Certains de ces médiateurs jouent un rôle primordial dans l'infiltration massive de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la cavité articulaire et provoquent leur activation, ce qui amplifie la réaction inflammatoire (**Pascual *et al.*, 2013**).

I.1.4. Déclenchement de l'accès aigu

Il est provoqué par le détachement des cristaux d'UMS des articulations dans le liquide synovial et la sursaturation du liquide synovial en UMS (**Alaoui *et al.*, 2010**). Les cristaux libérés peuvent ensuite activer les cellules par différents mécanismes (Figure 03):

I.1.4.1. La phagocytose : Les cristaux d'UMS présentent une grande affinité pour les immunoglobulines de type G (Ig G), des protéines matricielles (fibronectines) et des fractions du complément. L'opsonisation des cristaux facilite leur phagocytose par les macrophages puis par les PNN. Ceci pourrait aussi être favorisé par la liaison avec les récepteurs membranaires TLR-2 et TLR-4 (Toll Like Receptor) (**Ea, 2011b**).

La phagocytose induit la libération des enzymes lysosomales et la production de cytokines inflammatoires et de radicaux libres. Cela conduit à la maturation de l'Il-1 β et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Choi *et al.*, 2005**).

I.1.4.2. Interaction cellules-cristaux

Selon le type des cristaux on distingue soit une interaction directe entre les cellules et les cristaux nus (non recouverts de protéines) ou une interaction entre les cellules et les cristaux revêtus de protéines.

L'activation des cellules suite à l'interaction directe entre cellules et cristaux non recouverts de protéines se fait selon deux modes d'action :

- Une liaison électrostatique entre les charges négatives des cristaux d'UMS et les composants de la membrane cytoplasmique induit un influx calcique, une modification de la perméabilité

membranaire, un stress mécanique de cisaillement et stimulation de mécanorécepteurs comme les intégrines (**Shi et al., 2010 ; Al-Nahain et al., 2014**).

-Une liaison directe des cristaux d'UMS nus avec un récepteur membranaire provoque l'activation de la phosphorylation des protéines Pyk-2 et FAK qui sont situées juste en aval des intégrines (**Liu et al., 2004**) et induit l'expression d'une molécule membranaire exprimée par les cellules myéloïdes et de stimuler les molécules situées en aval des récepteurs TLR-2 et TLR-4, ou en aval du récepteur d'IL-1 β (**Chen et al., 2006**).

Cependant, l'activation des cellules par l'interaction directe entre cellules et cristaux revêtus de protéines se fait par l'intermédiaire d'une protéine adsorbée à la surface des cristaux (**Ginsberg et al., 1977**). Plusieurs auteurs ont rapporté la présence de protéines adsorbées sur les surfaces des cristaux, tel que la réponse des PNN stimulés par des cristaux d'UMS est inhibée en présence d'un anticorps anti-CD11a dont le fragment FcR $\text{III-}\gamma$ peut être adsorbé sur ces cristaux (**Lioté et al., 2007 ; Ea, 2011a**).

I.1.5. Recrutement de nouvelles cellules et sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires

Les monocytes et les neutrophiles infiltrés dans la cavité articulaire s'interagissent et s'activent au contact des cristaux, reconnus comme signal de danger. Ils aboutissent à la synthèse d'IL-1 β et d'IL-8 (**Martinon et al., 2002**). Cette dernière est une chimiokine ayant un rôle important dans le recrutement et l'activation des neutrophiles dans des modèles animaux d'arthrite goutteuse. Elle est capable aussi d'induire la synthèse d'autres facteurs chimiotactiques, tel que les leucotriènes et la destruction de la membrane des phagolysosomes. Ils déversent ainsi leur contenu enzymatique (relargage des enzymes lysosomales) et pro-IL-1 β dans la cavité synoviale (**Busso et So, 2010**).

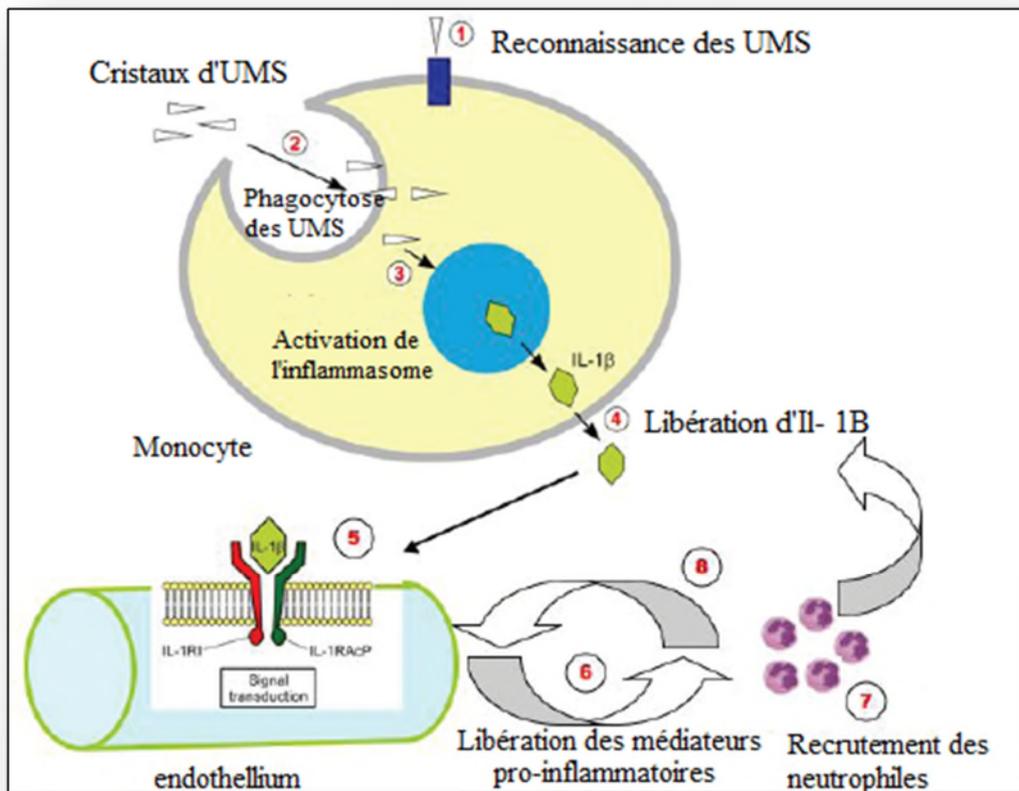


Figure 03 : Etapes de déclenchement de l'inflammation lors de l'arthrite goutteuse (Traduit de l'anglais) (Busso et So, 2010).

I.1.6. Inflammasome et immunité innée

Plusieurs recherches ont impliquées l'inflammasome et l'immunité innée dans la réponse inflammatoire aux cristaux d'UMS (Popa-Nita *et al.*, 2009 ; Kingsbury *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2014). L'immunité innée dépend des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, PNN). Ces cellules reconnaissent les UMS comme un signal de danger capable de stimuler la maturation des cellules dendritiques et l'activation de l'inflammasome (Shi *et al.*, 2003). Ce dernier, est un complexe moléculaire composé essentiellement de NLRP-3, de l'ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) et de la caspase-1 dont l'activation conduit à la synthèse d'IL-1β (Ea, 2011b).

Les cristaux d'UMS activent l'inflammasome selon plusieurs mécanismes : soit par liaison avec les récepteurs TLR (Josteen *et al.*, 2011) ; ou par désorganisation des phagolysosomes après la phagocytose et libération des enzymes lysosomales telle que la cathepsine B et des radicaux libres dérivés de l'oxygène (R.O.S) (Richette, 2010 ; Paragasam et Rasool, 2013).

Le NLRP-3 appartient à la famille des NOD-Like récepteurs (NOD-Like récepteurs) actif se lie à la protéine adaptatrice ASC, qui à son tour active la caspase-1 induisant la synthèse d'Il-1 β (31 KDa) activée après clivage du précurseur pro-Il-1 β (37 KDa) (Martinon, 2010), dont la libération permet l'activation de l'inflammasome et par conséquent les caspases. L'Il-1 β produite se lierait ensuite à ses récepteurs Il-1R pour stimuler la production de cytokines inflammatoires et de chimiokines par transduction du signal via MYD88 (Protéine adaptatrice de différenciation myéloïde facteur 88) ou via la voie NF- κ B (Joosten, 2010 ; Ea, 2011b).

I.1.7. Résolution spontanée de l'inflammation aigue

Après les étapes d'initiation et d'amplification de l'inflammation, la crise de goutte se caractérise par une résolution spontanée qui fait intervenir différents mécanismes (Figure04):

- Modification des cristaux par réduction de leur taille, de leurs charges électriques de surface et de leur revêtement protéique pour les rendre incapable de déclencher une réponse inflammatoire (Kuntz, 2003 ; Lioté *et al.*, 2007);
- La différenciation des monocytes en macrophages (Switch) après la phagocytose des cristaux d'UMS. Ce changement s'accompagne d'une perte de capacité à produire les cytokines pro-inflammatoires (Il-1, Il-6, TNF- α) et d'une production accrue de cytokines anti-inflammatoires (Il-10 et TGF- β). Le TGF- β , stimulé par l'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages, agit en réduisant l'activation des cellules endothéliales, limitant ainsi le recrutement des PNN et des monocytes dans le tissu synovial (Lioté *et al.*, 1996);
- Les cristaux d'UMS pourraient simplement se dissoudre à la suite d'une diminution de la concentration sérique d'acide urique due aux variations de pH (Cotten *et al.*, 2013).

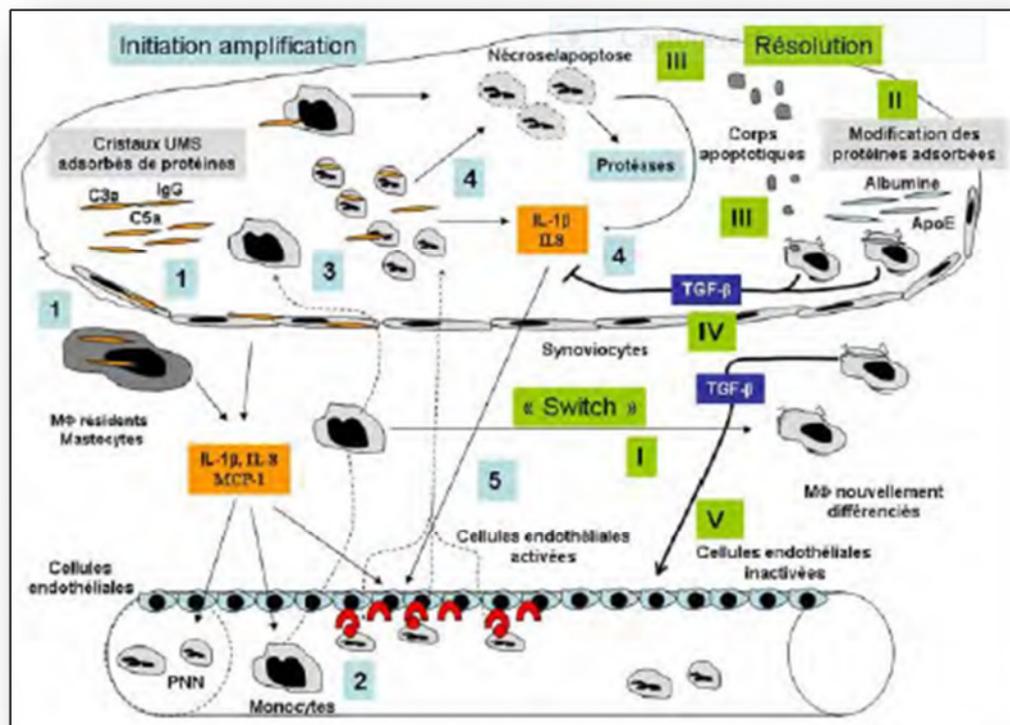


Figure 04 : Résolution de la crise de goutte (Ea, 2011b).

I.2. Les enzymes lysosomales et espèces réactives de l'oxygène dans l'inflammation

Le lysosome est un organe intracytoplasmique, présent dans toutes les cellules nucléées, assurant la dégradation et le recyclage de composants intra- ou extracellulaires. Il est très hétérogène dans sa taille et son aspect et renferme essentiellement de 50 à 60 hydrolases (phosphatases, glycosidases, lipases, nucléases, sulfatases et protéases) actives à pH acide (5,2 à 5,5). Les hydrolases sont isolées du reste de la cellule par une membrane simple de composition spécifique comprenant des glycoprotéines fortement glycosylées qui la protègent des hydrolases: les LAMP (lysosome-associated membrane proteins) et les LIMP (lysosome-integral membrane protein) et permettent ainsi la régulation de l'homéostasie cellulaire. Cette membrane contient une pompe à protons (ATP dépendante) qui maintient un pH acide dans cet organe (Maire, 2012).

Les enzymes solubles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et transportées à travers l'appareil de Golgi où elles subissent toute une série de modifications post traductionnelles, conduisant à l'acquisition d'un marqueur mannose-6-phosphate (M6P) qui permettra leur liaison à deux récepteurs reconnaissant le M6P (M6PR46 et MPR300)

concentrés dans les régions de *trans* Golgi qui vont bourgeonner pour donner une vésicule de transport. Cette dernière va ensuite fusionner avec un endosome tardif (LE) pour donner un endolysosome où les hydrolases acides sont dissociées de leurs récepteurs (recyclés vers le trans-Golgi) ou partiellement adressées à la membrane plasmique pour produire la configuration active (**Crine et al., 1987**).

Plusieurs voies de dégradation convergent au niveau du lysosome, y compris la phagocytose et l'autophagie (Figure 05). La première voie dégrade les composants à partir du milieu extracellulaire (hétérophagie), tandis que les macro-, micro- et chaperons à médiation autophagie dégradent des composants intracellulaires. La MA est un processus par lequel les protéines cytosoliques hébergeant un motif spécifique avec des séquences d'acides aminés sont incorporés dans les lysosomes grâce à l'action combinée d'un chaperon (généralement Hcs70) et le récepteur lysosomal Lamp-2A. Ces vacuoles autophagiques ont été appelés cytolysomes. Elles ont été observées dans les cellules plasmatiques et dans une des cellules de type de la membrane synoviale dans le cas de l'arthrite rhumatoïde (**Chayen et Lucille Bitensky, 1971**).

En tant que principal organite catabolique dans la cellule, les lysosomes dégradent une multitude de composés, y compris les récepteurs de surface, macromolécules, des organelles et des agents pathogènes, ainsi que certaines protéines de demi vie courte qui ne sont pas dégrader par le protéasome (**Perez-Sala et al., 2009**).

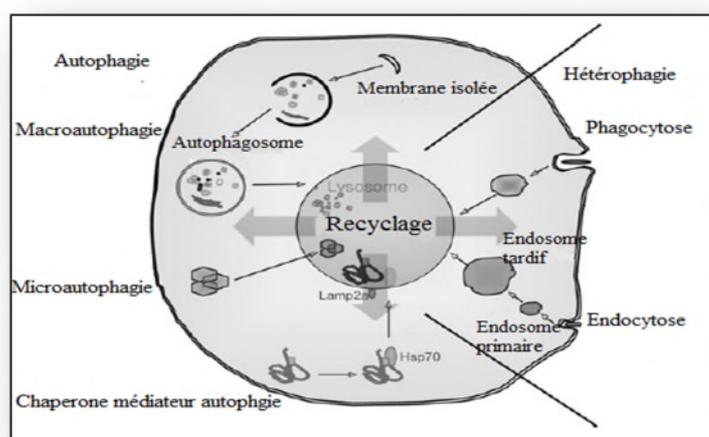


Figure 05 : Fonctions du lysosome (Traduit de l'anglais) (**Boya, 2012**).

Chayen et Lucille Bitensky (1971) ont rapporté que la coalescence des lysosomes et les membranes cellulaires jouent un rôle majeur dans la sécrétion des enzymes lysosomales dans

la matrice intercellulaire. Il estime que, dans la vie du tissu conjonctif, ces enzymes dégradent la matrice dans le microenvironnement immédiat de la cellule dans lequel elles ont été extrudées et la cellule prend par la suite le matériel dégradé par endocytose.

I.2.1. Les enzymes lysosomales dans l'arthrite goutteuse

Dans le cas de l'arthrite goutteuse, les cristaux sont phagocytés par les polymorphes et les leucocytes mononucléaires dans une vacuole d'endocytose et les cellules dégranulées. Ce processus semble impliquer la fusion des granules, à savoir les lysosomes avec la vacuole d'endocytose pour former un phagolysosome (**Chayen et Lucille Bitensky, 1971**).

Certaines études ont démontré que lorsque les lysosomes prennent les particules indigestibles ils peuvent fuir leurs enzymes dans la cellule. Les lysosomes seront donc enflés et il y aura synthèse des enzymes lysosomales qui seront libérés dans le milieu de culture. Ce qui indique que les enzymes libres dans le liquide synovial viennent probablement de la désintégration des cellules, en particulier des polynucléaires qui ont ingérés les cristaux d'UMS (**Chayen et Lucille Bitensky, 1971**).

Les urates ainsi que toutes les particules chargées négativement, y compris le pyrophosphate et le verre, activent le facteur XII (facteur de Hageman) du liquide articulaire chez les humains, et induit la conversion des kallikreinogène en kallibréine; cela modifie les kininogènes en kinines actives. Ces dernières se trouvent dans les articulations chez les goutteux, dans les épanchements articulaires provoquent la dilatation des vaisseaux sanguins et éventuellement, induisent l'excitation des récepteurs de douleur.

Le facteur Hageman est également activé par des enzymes protéolytiques libérées lors de la phagocytose par les polynucléaires. De même, la digestion de cartilage par des enzymes lysosomales libère la chondroïtine sulfate qui active aussi ce facteur. D'autres enzymes lysosomales semblent agir directement sur les kininogènes pour libérer les kinines. Ces dernières attirent plus de leucocytes et induisent ainsi la prolifération du processus inflammatoire ((**Chayen et Lucille Bitensky, 1971**)).

I.2.1.1. β -galactosidase

Cette hydrolase lysosomale (Ec 3.2.1.23) est responsable du clivage du résidu β -galactose terminal des glycoprotéines, des sphingolipides et des glycoconjugués (**Suzuki et al., 1995**).

Ohto et al (2012) a démontré que la β -galactosidase existe sous forme de dimère actif à pH 4,5 (Figure 06 A) et sous forme de monomère à pH neutre (Figure 06 B).

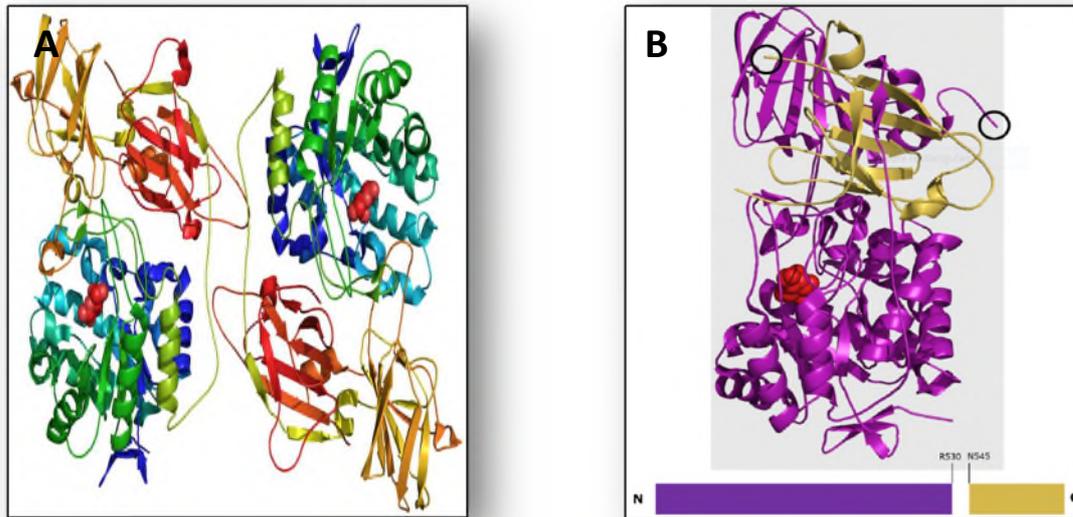


Figure 06 : Structure tridimensionnelle de β -galactosidase. (A) : Structure cristalline du dimère avec son substrat en rouge trempé dans le site actif; (B) Structure cristalline du monomère (les régions N-terminales en violet et les régions C-terminale en jaune pale) (Ohto *et al.*, 2012).

L'activité enzymatique de la protéase acide a été mesurée *in vivo* chez des animaux atteints d'une inflammation en présence de son substrat synthétique colorimétrique, 2,4-dinitrophényl- β -D-galactoside. Cette réaction a montré une libération importante du produit 2,4-dinitrophényl (Howard *et al.*, 1977).

L'administration des agents pathogènes tels que l'acide urique dans les articulations provoque une réaction inflammatoire. Cette dernière induit l'augmentation de la fluidité membranaire par sécrétion des lysophospholipides qui possèdent un potentiel chimiotactique et stimulent par conséquent la libération de β -galactosidase dans les lymphocytes B et de sialidase dans les lymphocytes T (Venkateswara *et al.*, 1994).

L'augmentation de la libération de la β -galactosidase active induit l'hydrolyse d'un facteur sérique (DBP humaine : Vitamine D3 binding protein), qui contient une chaîne O-liée composée d'un galactose terminal ou d'un acide sialique (Einstein, 1996). Ce clivage permet la production du facteur d'activation des macrophages (GC-MAF) avec un fragment N-acétylgalactosamine (Nobuto *et al.*, 1998). GC-MAF possède plusieurs activités biologiques *in vivo*, telles que l'activation des macrophages, l'activité anti-angiogénique et l'activité anti-tumorale. Cependant, les macrophages ont la capacité de phagocytter les antigènes via le fragment Fc des immunoglobulines et de générer l'anion superoxyde (Uto *et al.*, 2015).

I.2.1.2. Phosphatase acide

La phosphatase acide des mammifères (EC 3.1.3.2) (Figure 07) est une glycoprotéine résistante au tartrate, elle est donc communément appelée TRACP. Elle existe sous deux isoformes distincts : TRACP-5a, un polypeptide glycosylé avec le N-acétyl neuraminique et lié à l'acide sialique contenu dans la chaîne oligosaccharidique N-liée, et TRACP-5b, un hétérodimère issu de la protéolyse par les cystéines protéases afin d'activer cette phosphatase (Antony *et al.*, 2007).

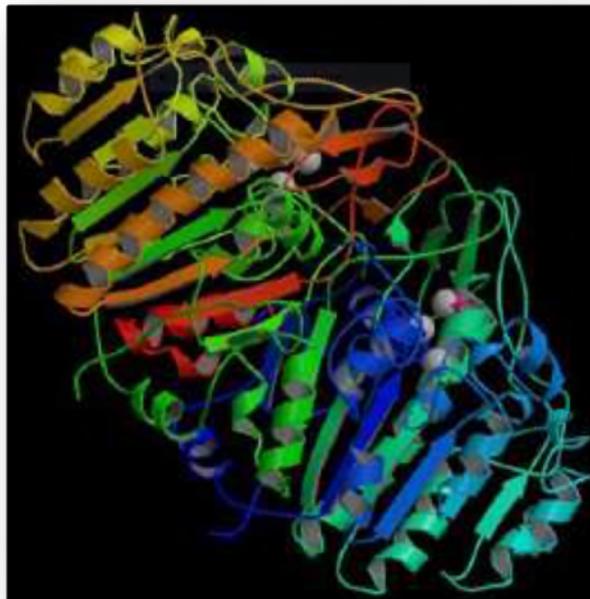
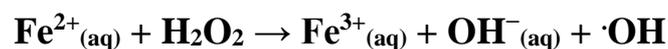


Figure 07 : Structure tridimensionnelle de la phosphatase acide.

Le centre de fer binucléaire présent dans le site actif de TRACP permet de transmettre une activité catalytique et la liaison d'un substrat phosphorylé dans le site actif dans un environnement acide. TRACP catalyse les réactions d'oxydoréduction par participation des formes interconvertibles $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, selon la réaction de Fenton :



Il a été montré que les réactions de peroxydation conduisent à l'apparition des espèces réactives de l'oxygène, des molécules effectrices lors de la phagocytose (Bune *et al.*, 2001 ; Basta *et al.*, 1999). La TRACP est également exprimée par les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et affecte la phosphorylation des composants qui interviennent dans la signalisation cellulaire (McCullough *et al.*, 1997).

Le dosage de cette enzyme dans le sérum des patients atteints d'une inflammation granulomateuse solide ou les réactions qui font intervenir les polynucléaires incluant la sarcoïdose et les zones à centre nécrotiques tels que les kystes et les nodules rhumatoïdes expriment une activité élevée de TRAPC contrairement à l'inflammation aiguë (**Essner et al., 1961**). La phosphatase acide exprimée par ces cellules contribue probablement à la phagocytose donc elle participe à l'immunité innée et adaptatrice lors des infections microbiennes (**Bune et al., 2001**).

I.2.1.3. Cathepsine D

La cathepsine D (EC 3.4.23.5) est une endopeptidase aspartique active sous forme ubiquitaire (Figure 08). Elle est capable de cliver les protéines et les peptides structuraux et fonctionnels, en particulier les résidus hydrophobes, à savoir la dégradation des métabolites, l'activation et la dégradation des hormones polypeptidiques et des facteurs de croissance, l'activation des précurseurs enzymatiques et la régulation de la mort cellulaire programmée (**Saku et al., 1990**).

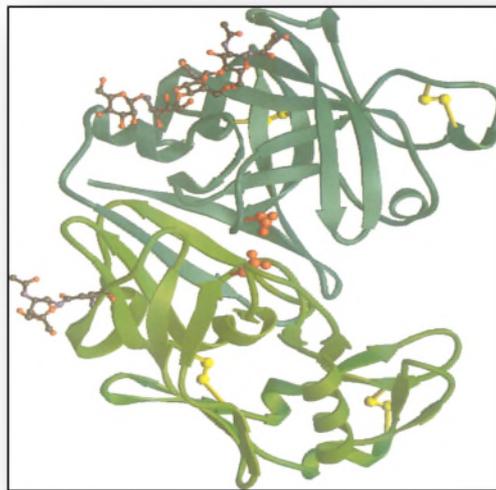


Figure 08 : Structure cristalline de la cathepsine D : le domaine N-terminal est représenté en bleu et le domaine C-terminal en vert. Le site actif qui contient des résidus aspartates figure en rouge et les ponts disulfures sont représentés en jaune (**Metcalf et Fusek, 1993**).

La cathepsine D a été caractérisée dans le cartilage de différentes espèces (lapin, poulet et Homme) atteintes de polyarthrite rhumatoïde. Des études ont découvert que le prétraitement avec l'antisérum spécifique à la cathepsine D l'a inhibé à 98% au cours des 4 premières

heures, et diminue dans les périodes prolongées. L'inhibition est dose-dépendante et a été confirmé pour la dégradation autolytique du cartilage (**Chayen et Lucille Bitensky, 1971**).

La libération de la cathepsine D durant l'inflammation dans les granules azurophiles, après phagocytose des agents pathogènes induit l'activation de l'apoptose des neutrophiles. La protéase aspartique permet l'activation de la caspase 8 dans les fibroblastes, induisant l'activation de Bax dans les lymphocytes T, la libération du cytochrome C des mitochondries, la synthèse d'un récepteur de mort cellulaire et l'activation du granzyme B. La perméabilité des membranes des granules azurophiles régule la mort cellulaire programmée et par conséquent, la résolution des réponses immunitaires exagérées (**Conus et al., 2008**).

I.2.2. Libération des espèces réactives de l'oxygène

La phagocytose par les polynucléaires induit une augmentation de la consommation de l'oxygène par ces cellules, à l'origine de la formation de radicaux libres oxygénés. Cette production est dépendante de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire O₂ à l'anion superoxyde. Ce dernier est éventuellement converti en d'autres formes réactives de l'oxygène, incluant le peroxyde d'oxygène (H₂O₂), l'oxygène singulet et l'acide hypochlorique (HOCl), qui participent activement à la destruction des pathogènes (**Shetty et al., 2008**).

Le monoxyde d'azote est un radical produit par oxydation de l'arginine sous l'action des NO synthases (NOS). L'activation de certaines de NOS inductibles au cours de l'inflammation génère des quantités importantes de NO. Ce dernier possède des propriétés pro-inflammatoires comme la vasodilatation, l'œdème et l'érythème (**Beaudeau et al., 2006**).

Afin d'inhiber la libération des enzymes lysosomales dans le milieu extracellulaire et de stabiliser la membrane cytoplasmique différents traitements ont été mis en évidence tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et la colchicine.

I.3. Traitement de l'arthrite goutteuse

Le traitement de la crise de goutte a pour objectif de maintenir l'urécémie de façon prolongée en dessous du point de saturation de l'urate de sodium afin de lutter contre l'inflammation (**Richette, 2011**). Cette prise en charge comprend deux grands axes thérapeutiques avec dans un premier temps le traitement de l'accès aiguë et dans un deuxième temps la prise en charge de l'hyperuricémie.

I.3.1. Colchicine

La colchicine est un alcaloïde isolé des graines et des bulbes de *Colchium autumnale* (**Robert et Hood, 1994 ; Nuki, 2008 ; Le Bellec et al., 2009**). Elle est connue depuis l'antiquité dans le traitement de l'inflammation et considérée comme le traitement de référence de la crise de goutte (**Borstad et al., 2004 ; Bennesser et al., 2010 ; Sabina et al., 2011**).

Cette molécule permet de réduire la réaction inflammatoire liée aux microcristaux d'UMS par différents mécanismes :

- Inhibition de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales (E-selctines) pour permettre la diminution de l'afflux des PNN dans le site inflammatoire (**Cronstein et al., 1995**);
- Blocage de l'interaction entre les microcristaux d'UMS diminuant ainsi la production et la sécrétion de l'IL-1 β active (**Martinon et al., 2006**);
- Diminution de la production de l'acide lactique via le maintien d'un ph locale à des valeurs normales moins propice à la cristallisation (**Wallace, 1994**);
- La colchicine empêche également la polymérisation de la microtubuline par sa fixation à la tubuline et la migration des chromosomes. Il en résulte le blocage des PNN en métaphase lors de la mitose ce qui participe le blocage de la réaction inflammatoire ;
- Elle possède aussi de nombreuses autres propriétés telles qu'une action sur l'agrégation plaquettaire, sur la libération des prostaglandines par les macrophages et de l'histamine par les mastocytes, sur la synthèse de collagène (**Chang et Malawista, 1975-1976**).

I.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont également le traitement de première ligne de l'arthrite goutteuse avec la colchicine. Ce sont des molécules à effet thérapeutique très efficace lors d'une crise de goutte, on cite principalement l'indométacine (**Lafforgue et Legré, 2005**).

Ils exercent une activité anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique par inhibition de la cyclooxygénase (COX) impliquée dans la formation des prostaglandine à partir de l'acide arachidonique (**Nicolas et al., 2001**).

I.3.3. Inhibiteurs de la synthèse de l'acide urique

L'allopurinol, inhibiteur purinique de la xanthine oxydase, est le traitement hypourécémiant historique de première intention (**Lioté et Bardin, 2007**). C'est un analogue structural de l'hypoxanthine. Il empêche la dégradation de l'hypoxanthine et la xanthine en acide urique par la xanthine oxydoréductase (XOR). Par son action, l'allopurinol favorise ainsi la dissolution des microcristaux d'UMS et prévient leur formation grâce au maintien de l'uricémie sous le seuil de saturation de l'urate (**Klein et al., 1996**).

Le Febuxostat est un nouvel hypourécémiant indiqué dans le traitement de l'hyperurécémie chronique symptomatique chez l'adulte en cas d'intolérance à l'allopurinol ou aux uricosuriques. Ce composé est un dérivé de 2-arylthiazole, il est considéré comme un inhibiteur non purinique, puissant et sélectif de la xanthine oxydase ce qui permet la diminution de l'uricémie (**Lioté et Bardin, 2007**).

I.3.4. Les uricosuriques

Deux exemples largement utilisés en thérapeutique à savoir le Probenécide et la Benzbromarone. Ces substances permettent la diminution de l'uricémie en augmentant l'excrétion urinaire de l'acide urique d'où le risque de lithiase urique (**Alaoui et al., 2010**).

I.3.5. Inhibiteurs de l'IL-1 (Anakinra)

La mise en évidence de l'inflammasome et de l'IL-1 β dans l'inflammation a mené au développement d'inhibiteurs de cette cytokine (**Lioté, 2007**). L'anakinra est un antagoniste du récepteur membranaire de l'IL-1 β se lie avec une grande affinité à celui-ci mais ne transmet aucun signal d'activation cellulaire (**Ea, 2011**). Il est utilisé à la posologie de 100 mg par voie sous cutanée pendant 3 jours et permet d'atténuer les symptômes inflammatoires dès la première injection, ce qui fait de lui un bon traitement en thérapeutique (**Pétrilli et Martinon, 2007**). Son inconvénient est sa demi vie brève qui nécessite d'avoir recours à des injections sous cutanées quotidiennes (**Dubost et al., 2011**).

Ces différents traitements bien qu'ils soient efficaces ils présentent des effets secondaires d'ordre hématologique, digestif ou cutané par la colchicine (**Wallace, 1974**). L'inhibition de la formation des prostaglandines par les AINS induit l'érosion gastrique et un risque d'insuffisance rénale (**Lioté, 2007**). Les inhibiteurs de l'uricosynthèse (allopurinol et febuxostat) provoquent des intolérances cutanées, des complications neurologiques ainsi que

des troubles cardiaques et thyroïdiens (Ernest et Favel, 2009). Les uricosuriques ne sont pas utilisés en cas d'insuffisance rénale sévère (Lioté et Bardin, 2007).

Afin d'éviter toutes ces manifestations, il y-a eu recours à la phytothérapie qui utilise des traitements naturels substitutifs sans effets secondaires.

I.4. Traitements naturels de l'arthrite goutteuse :

Les plantes médicinales sont des drogues végétales possédant des propriétés thérapeutiques. La drogue végétale est une plante ou une partie de plante (feuille, écorce, racine, fruit, fleur, graine...) qui contient un principe actif composé de métabolites secondaires à savoir les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Ces substances sont considérées comme étant des antioxydants, anticancéreux et anti-inflammatoires capables de prévenir et de soigner plusieurs maladies, y compris les rhumatismes et la goutte (Nigrao, 2009 ; Chouhan *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2012).

Le tableau ci-dessous illustre quelques exemples de plantes médicinales ayant des propriétés anti-inflammatoires et antiarthritiques.

Tableau I : Quelques plantes médicinales utilisées dans le cas de l'arthrite goutteuse.

Plante	Partie utilisée	Composé actif	Effet anti-inflammatoire	Références
<i>Withania somnifera</i>	Racines et feuilles	Whithanolide	Effet stabilisant de la membrane lysosomale	Rasool et Varalakshmi, 2006
<i>Zingiber officinale</i> <i>Roscoe</i> (Ginger)	Racine	Ginger	Inhibition de la cyclooxygénase-2	Sabina <i>et al.</i> , 2009
<i>Jatropha isabellei</i>	Rhizomes	Alcaloïdes	Prévention de la formation de l'œdème et l'infiltration des neutrophiles au site inflammatoire	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Similax riparia</i>	Racines et rhizomes	Saponines : Similaxchinoside, protogracilin, riparoside	Inhibition de l'activité de la xanthine oxydase et régulation de l'hyperuricémie	Wu <i>et al.</i> , 2015
<i>Impatiens textori</i> Miq.	Feuilles et fleurs	Luteolin, apigénine, cosmosiin	Inhibition de la sécrétion de l'IL-1 β ce qui permet l'atténuation de l'inflammasome	Sun <i>et al.</i> , 2015

I.4.1. Présentation de *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus angustifolia est une espèce composée de substances naturelles à effet anti-inflammatoire. Le frêne est très utilisé par les populations méditerranéennes principalement pour le traitement des accès aigus de la goutte (**Quezél et Santas, 1963**).

Description

Cette espèce appartient à la famille des Oléacées. C'est un arbre majestueux qui peut atteindre jusqu'à 25m de hauteur et vivant de 150 à 200 ans (Figure 09 A) (**Rameau et Dumé, 1989 ; Prat et al., 2006**). Son écorce est de couleur grise, elle est amère et astringente. Les feuilles sont opposées et caduques ; elles sont composées de 5 à 13 folioles ; elles sont très étroites et de forme ovale lancéolées à bordure denté (Figure 09 B). Les fleurs sont généralement petites de couleur brunâtre. Elles sont regroupées en panicules amples, allongées, longues et ramifiées ; la corolle est nulle, ne contient ni pétales ni sépales. Elles sont hermaphrodites. Les fruits sont des samares. Chaque graine est munie d'une aile membraneuse latérale (**Ait Youcef, 2006**).



Figure 09 : Photographie originale : (A) : de l'arbre *Fraxinus angustifolia* ; (B) : écorce et feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Le genre *Fraxinus* comprend environ 70 espèces ligneuses (**Lee et al., 2012**). Il a été décrit pour la première fois par **Linnaeus (1753)**, mais une nouvelle classification a été établie par

Wallander (2008) suite à une étude phylogénétique moléculaire. La position systématique de *F. angustifolia* est comme suit :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Oléacées

Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus venue du mot grecque « Fraxis » qui signifie la clôture, reconnue par le nom Frêne oxyphylle, en anglais « Narrow Leaved Ash », « Dardar » en arabe et par le nom berbère « Aslen » (**Rameau et Dumé, 1989**).

F. angustifolia est un arbre qu'on trouve régulièrement dans les zones méditerranéennes. C'est une espèce thermophile qui préfère les sols basiques à neutre, elle a besoin de l'humidité. Elle se trouve aux bords des rivières, des bois et des habitations. Elle se répartie dans les régions du sud et de l'est de l'Europe, l'ouest de la Russie ainsi que dans l'ouest de l'Asie (**Tonon et al., 2001 ; Temunovic et al., 2012**) et le nord africain, notamment l'Algérie, la Tunisie et le Maroc (**Quezel et Santas, 1963**).

I.4.2. Composition phytochimique de *Fraxinus angustifolia*

Le frêne est une espèce riche en composés phénoliques à savoir, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les lignanes, les phényléthanoïdes glycosylés et les secoiridoïdes glycosylés. La structure de ces composés sont illustrés dans les tableaux suivants.

Tableau II : Structure chimique des phénols totaux.

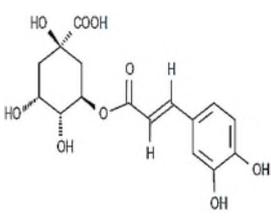
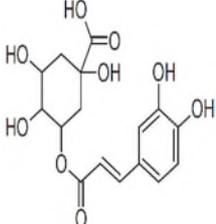
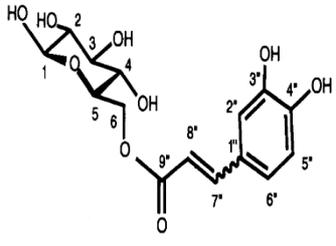
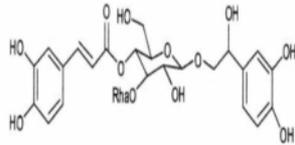
Phénols simples			Phénylpropanoïde
			
Acide 3-caffeoylquinique (Shahat et Marzouk 2013)	Acide 1-caffeoylquiniqu-e (Falé et al., 2013).	6-O-trans-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (Hosney, 1998).	Verbascoside (Wharf, 2011).

Tableau III : Structure chimique des flavonoides.

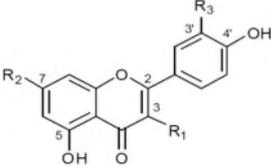
 (Wharf 2011).	Rutine	Quercétine-3-O-glucoside	Quercétine-3-O-galactoside	Kaempférol-3-O-Rutinoside	Isorhamnetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside
R1	O-Glu-Rha	OH	OH	OH	O-CH3
R2	OH	H	OH	OH	O-Rha
R3	OH	O-Glu	O-Gal	O-Glu-Rha	O-Glu

Tableau IV : Structure chimique des coumarines.

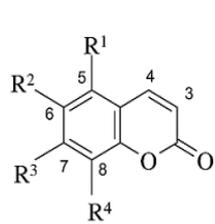
 (Kostova et Iossifova, 2007).	Escultine	Esculine	Cichorine	Scopoletine	Isosopoletine	Fraxetine	Fraxine	Fraxinol
R1	H	H	H	H	H	H	H	OMe
R2	OH	OGLE	OH	OMe	OH	OMe	OMe	OH
R3	OH	OH	OGLE	OH	OMe	OH	OH	OMe
R4	H	H	H	H	H	OH	OGLE	H

Tableau V : Structure chimique des lignanes.

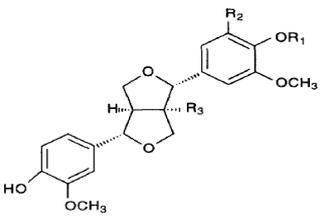
	(+)-pinoresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside (Hosney, 1998)	(+)-fraxiresinol-1-O-β-D-glucopyranoside (Kostova et Iossifova, 2007)	(+)-1-hydroxypinoresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside (Wharf, 2011)	
	R1	H	O-Glc	OH
	R2	Glu	H	Glu
	R3	H	OMe	H

Tableau VI : Structure chimique des phénylétanoïdes glycosylés **(Kostova et Iossifova, 2007)**.

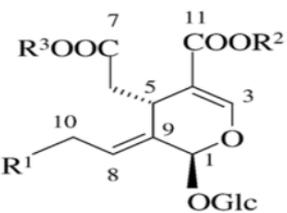
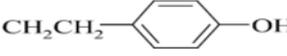
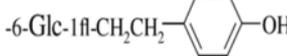
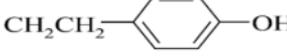
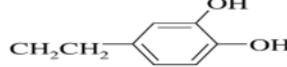
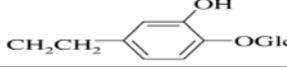
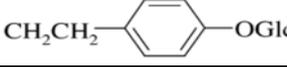
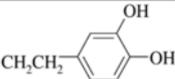
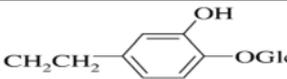
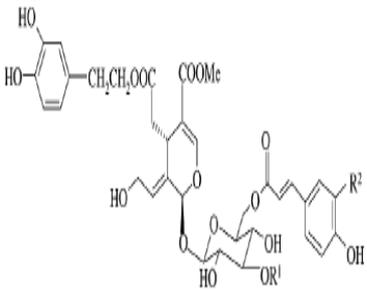
	R1	R2	R3
	Oleuropeine	H	Me
Ligstroside	H	Me/H	
Neuzhenide	H	Me	
10-Hydroxyligstroside	OH	Me	
10-Hydroxyoleuropeine	OH	Me	
Angustifolioside À	H	Me	
Angustifolioside B	H	Me	
Angustifolioside C	H		

Tableau VII : Structure chimique des secoiridoïdes glycosylés (Kostova et Iossifova, 2007).

	R1	R2
Fraxicarboside A	H	H
Fraxicarboside B	H	OH
Fraxicarboside C	Ac	OH

I.4.3. Activités biologiques et utilisation traditionnelle de *Fraxinus angustifolia*

Le frêne est utilisé depuis l'antiquité pour ces vertus médicinales, les différentes parties de la plante sont surtout utilisées pour traiter les maladies inflammatoires comme les rhumatismes et l'arthrite goutteuse (Beloued, 1998). Les feuilles et les samares sont très utilisées dans la décoction et l'infusion comme anti-rhumatisme (Baba-Aissa, 1991). Elles sont très efficaces contre la diarrhée et les parasites intestinaux (Gifa, 2012). Les feuilles sont aussi utilisées pour soigner les infections urinaires. Elles sont laxatives, sudorifiques et toniques (Baba-Aissa, 2011).

L'écorce est riche en composés phénoliques, elle est utilisée pour soigner les hémorroïdes (Baba-Aissa, 1999), les calculs et la lithiase biliaire, les hémorragies passives, les fièvres intermittentes et la goutte (Beloued, 1998 ; Djerroumi et Nacef., 2004). Elle est considérée comme un puissant antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire (douleurs articulaires et musculaires). Elle est aussi employée comme fébrifuge (Ait-Youcef, 2006).

La composition phytochimique de cette plante permet aussi la régulation du glucose sanguin en activant sa pénétration cellulaire (effet hypoglycémiant), de plus ces extraits limiteraient la différenciation des adipocytes (stockage des lipides), ce qui permet d'atténuer le diabète de type 2 en association avec un régime amaigrissant hypocalorique (Bellakhdar, 2011), et de diminuer le taux du cholestérol dans l'organisme (Falé *et al.*, 2014).

Au Maroc, *F. angustifolia* est utilisées pour de nombreuses autres fins traditionnelles dans le but de traiter les pathologies du système digestif, en dermatologie et les problèmes du système nerveux (**Flakchich et Elachouri, 2014**).

Cette plante médicinale sert également de fourrage pour le bétail dans certaines régions montagneuses (**Chevalier, 1927 ; Quezel et Santa, 1963 ; Abdelguerfi et Laouar, 2000**). La partie ligneuse constitue une source principale de bois de chauffage. Elle est aussi utilisée dans la fabrication des cannes pour les personnes âgées, les manches d'outils, les paniers de baskets et les rackettes de tennis (**Beloued, 1998**).

Ce présent travail vise à évaluer l'inhibition de la libération des enzymes lysosomales, via le dosage de l'activité de la β -galactosidase dans un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue induite par injection des MSU, par les extraits ethanologiques et aqueux de *Fraxinus angustifolia*.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Appareillages et verrerie

Une balance de analytique (RADWAG), une balance de précision (RADWA), une centrifugeuse (SIGMA), un spectrophotomètre UV-1800 (SHIMADZU), un homogénéisateur (HEIDOLPH), un pH mètre (HANNA), un vortex (VELP), une plaque agitatrice (VELP Scientifica), un bain marie (MEMMERT), cuves de spectrophotomètre (quartz, verre, plastique), micropipettes (EPPENDORF), verrerie (bêchers, éprouvettes, erlenmeyers, mortier), tubes Eppendorf.

II.1.2. Réactifs chimiques

Tris-HCl, sérum albumine du bovin (BSA), acétate de sodium, bleu de coomassie (G 250), méthanol, acide gallique, HCl, acide tannique et chlorure ferrique sont de marque Biochem Chemopharma, 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, 2-nitrophenol, NaCl sont de marque Sigma, folin-Ciocalteu et rutine sont de marque Sigma-Aldrich, acide acétique, triethanolamine sont de marque PROLABO, sodium dodecyl sulfate (PRS Panreac), NaOH (Riedel-de Haen), chlorure d'aluminium (Fluka), carbonate de sodium (Scharlau).

II.1.3. Matériel végétal de *Fraxinus angustifolia*

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en Juillet 2015 dans la forêt de Chemini, une localité située à 70 Km à l'ouest de la ville de Bejaia. L'identification de cette espèce a été réalisée par le Professeur Hacène Abdelkrim, Département de Botanique de l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques (ENSA) à El-Harrach en Algérie.

Les échantillons ont été séchés à une température ambiante dans un endroit aéré à l'abri de la lumière puis broyés à l'aide d'un broyeur électrique, et tamisés jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine de diamètre < 63 μ m.

Les extraits ethanoliqes et aqueux utilisés dans le traitement des animaux ont été obtenu par le protocole d'extraction de **Chiang et ses collaborateurs (1994)** modifié par **Atmani et al (2010)** illustré dans la figure 10.

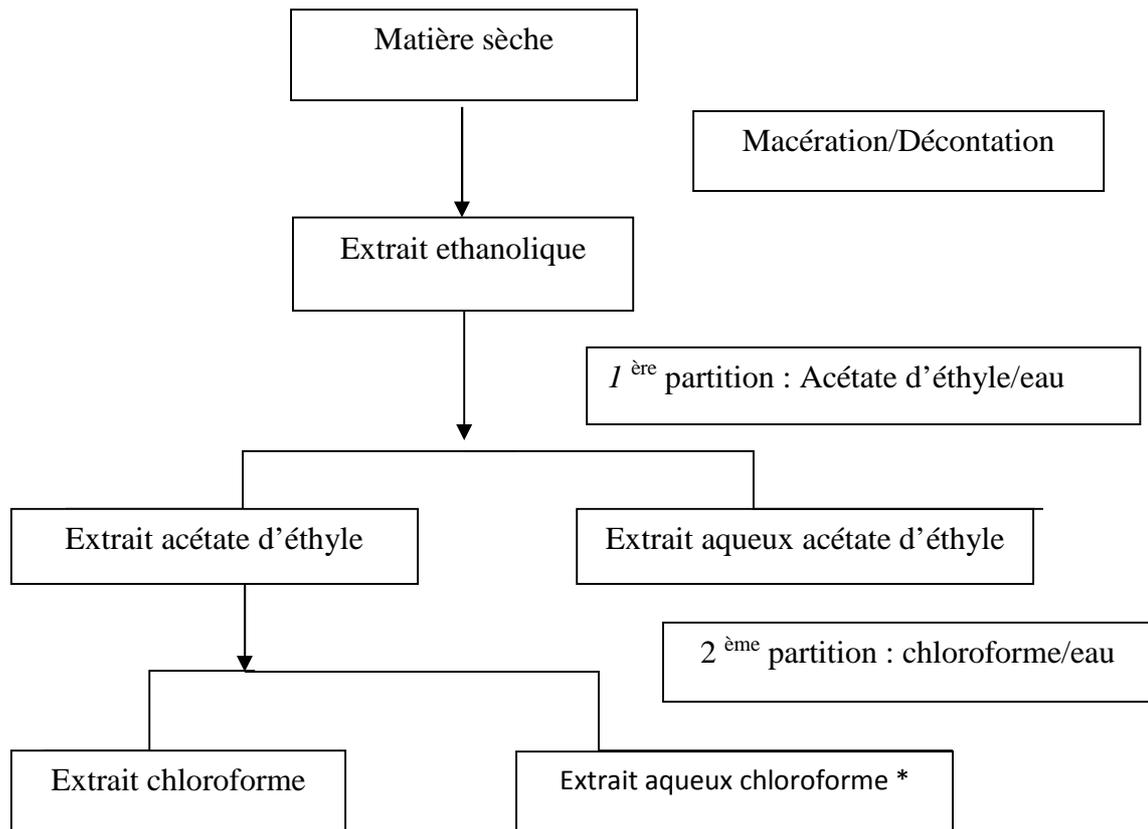


Figure 10 : Schéma du protocole d'extraction.

II.1.4. Les échantillons de foie et de rates

Après induction de l'arthrite goutteuse aux souris males par injection intradermique des cristaux d'UMS (4 mg/kg) (Sabina et al., 2008), à l'exception du contrôle positif tous les lots tests ont reçu un traitement soit médicamenteux par la colchicine (1mg/kg) et l'indométhacine (3mg/kg) ; soit par les extraits ethanologiques des feuilles et des écorces (100, 200 et 400mg/kg) et aqueux (50, 100, 200mg/kg) de *Fraxinus angustifolia*.

Les souris ont été sacrifiées sous une légère anesthésie à la vapeur du chloroforme après le dernier test du quatrième jour. Le foie et la rate ont été rapidement prélevés et lavés au KCl (0.15M) et également stockés à -80°C pour d'ultérieures utilisations.

II.2. Méthodes

II.2.1. Etude phytochimique

Afin de mesurer la teneur en composés phénoliques à savoir les phénols totaux, les flavonoides et les tannins dans les extraits ethanologiques et aqueux des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, trois protocoles de dosage colorimétriques ont été suivis :

II.2.1.1. Dosage des phénols totaux

La quantité de phénols totaux a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Kahkonen et al (1999)**.

Le principe de ce dosage est basé sur l'oxydation des ions phénolates par le Folin-Ciocalteu de couleur jaune après addition de carbonate de sodium à la solution d'extrait, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique de couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'extrait.

Un volume de 200 μ l d'extrait (5mg/ml) a été additionné à un volume de 1ml de Folin-Ciocalteu (0.1 N). Après 1 min d'incubation 800 μ l de carbonate de sodium (7.5%) ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après 2 h d'incubation à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 765nm.

La concentration en phénols totaux est exprimée en mg équivalent acide gallique par g d'extrait sec, calculée en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage réalisée par différentes concentrations d'acide gallique (**Annexe 01**).

II.2.1.2. Dosage des flavonoides

Le dosage des flavonoides a été effectué suivant le protocole de **Maksimovic et al (2005)**, en utilisant le réactif des chlorures d'aluminium ($AlCl_3$). Ces composés forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium, qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le maximum d'absorbance est à 430nm. 2ml de la solution d'extrait ont été ajoutés à 1 ml de réactif $AlCl_3$ (préparé par dissolution de 133mg d' $AlCl_3$ et 400mg d'acétate de sodium dans 100ml d'eau distillée). Après 10 min d'incubation la lecture des absorbances a été effectuée à 430nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec des concentrations croissantes de rutine (**Annexe 00**). Les teneurs en flavonoides ont été exprimées en mg équivalent rutine par g d'extrait sec.

II.2.1.3. Dosage des tannins

Le dosage des tannins a été réalisé selon le protocole de **Hagerman et Butler (1978)**. Le principe de ce protocole consiste à précipiter la protéine d'albumine du sérum bovin (BSA) par les tannins conduisant ainsi à la formation du complexe tannins-protéine.

Un volume de 1ml de la solution d'extrait a été additionné à 2ml d'une solution BSA (1mg/ml) préparée dans un tampon A (200mM d'acide acétique et 170Mm NaCl ajusté à pH 4.9). Après 24h d'incubation à 4°C, une centrifugation à 3000g durant 15 min a été effectuée afin de récupérer le culot formé du complexe tannins-BSA. Ce précipité a été dissout dans 4 ml de la solution SDS/TEA (5% Triethanolamine (v/v)+5% SDS (w/v)) et additionné de 1ml de réactif de chlorure ferrique FeCl₃ (10mM de FeCl₃ dans 0.01N HCl).

Le mélange réactionnel a été mis sous agitation, suivie d'une incubation pendant 15 min à température ambiante et l'absorbance a été mesurée à 510nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide tannique comme référence (annexe 00) et les concentrations en tannins sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait (mg eq AT/g d'extrait).

II.3.1. Préparation des homogénats de rates et de foies

Dans cette étude les rates et les foies ont été broyés à l'aide d'un mortier en porcelaine dans un tampon Tris-HCl (0.1M, pH 7,4) (1.5759g Tris-HCl dissout dans 100ml d'eau distillée) pour avoir 10% d'homogénat selon la méthode de **Sabina et al. (2012)**, puis ont été homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur électrique dans des eppendorfs de 2ml, tout en les gardant au froid. Les homogénats obtenus ont été par la suite centrifugés à 6000g durant 10min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et conservés à -80°C pour des utilisations ultérieures (Figure 11).

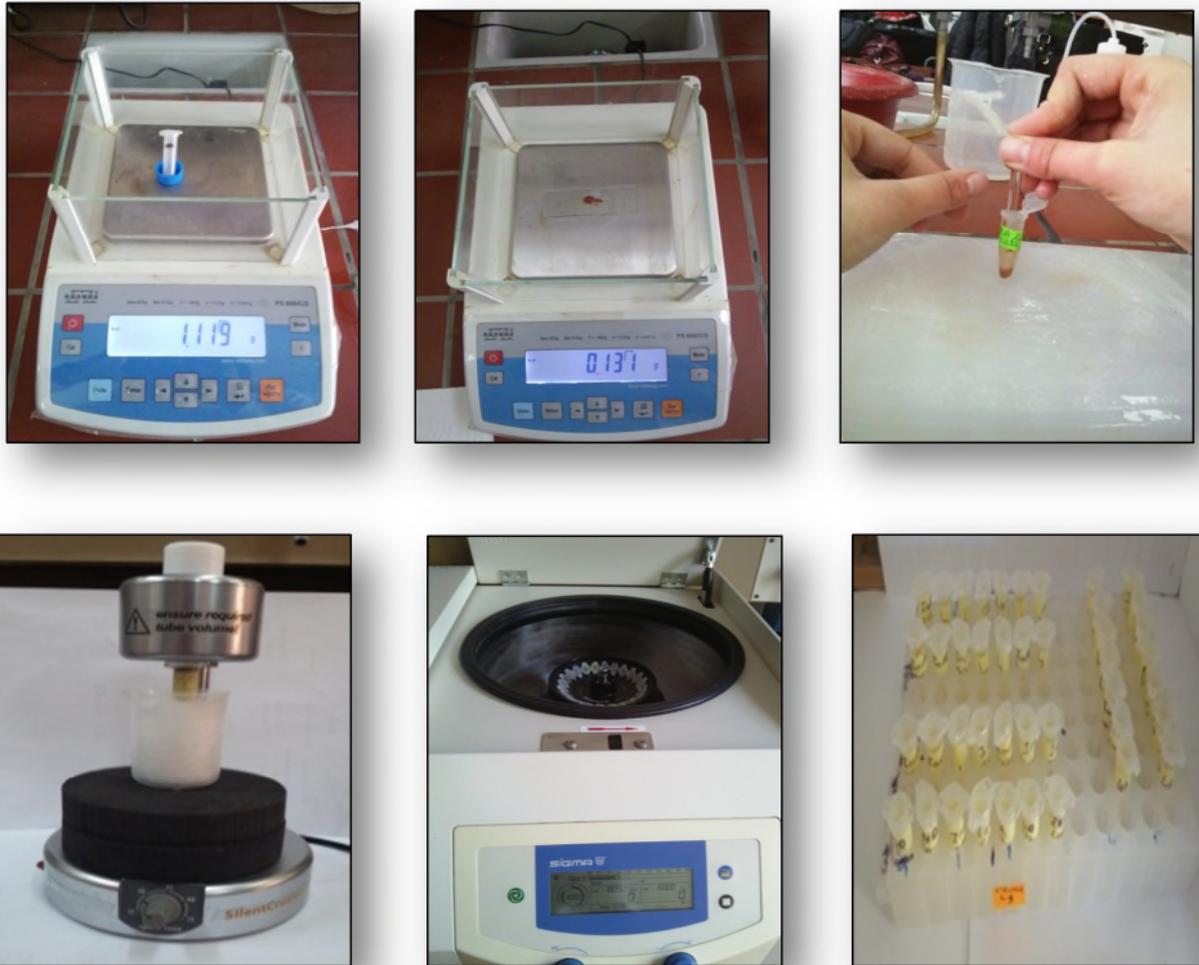


Figure 11 : Etapes de préparation des homogénats.

II.3.2. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines totales dans les homogénats de rates et de foies a été déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)**, qui consiste en l'utilisation de bleu de coomassie (G 250) comme réactif (100 mg/50 ml d'éthanol). Ce dernier réagit avec les groupements amine (NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. Les absorbances sont mesurées par spectrophotométrie après 10 min de réaction à 595 nm. L'intensité de la couleur correspond à la concentration des protéines qui sont déterminées par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (Annexe 04).

II.3.3. Dosage de l'activité enzymatique β -galactosidase dans les homogénats de foies et de rates

L'évaluation de l'activité de β -galactosidase a été réalisée suivant la procédure décrite par **Chougala (2012)**. Le principe de ce dosage est basé sur l'hydrolyse du substrat 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) par la β -galactosidase qui donne un produit de couleur jaune, il s'agit de O-nitrophenol (ONP) (Figure 12).

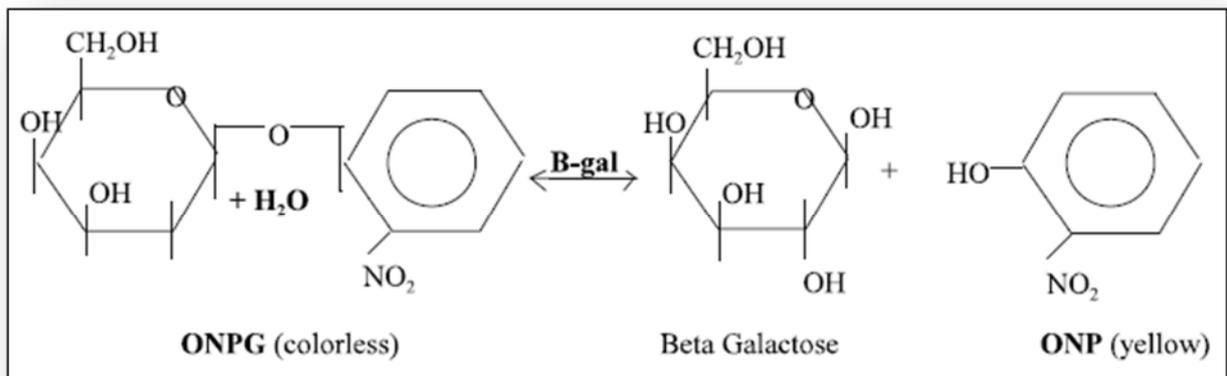


Figure 12 : Réaction catalysée par la β -galactosidase : ONPG : 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside ; ONP : O-nitrophenol ; Colorless : moins coloré ; yellow : jaune.

Dans cette étude, le dosage a été réalisé à 37.7°C pendant 15min, dans un mélange constitué d'un substrat (ONPG) préparé dans un tampon acétate pH 4.5 et une fraction d'homogénat (450 μl d'ONPG / 50 μl d'homogénat pour les homogénats de foie et 400 μl d'ONPG / 100 μl d'homogénat pour ceux des rates), puis la réaction a été arrêtée par ajout de 2ml de carbonate de sodium pH 7.8. La lecture des absorbances a été effectuée à une longueur d'onde de 405nm.

La concentration du produit dans cette réaction est déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée par des dilutions d'une solution stock (Annexe 05).

Les résultats ont été exprimés en unités d'enzyme ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) pour les homogénats.

II.2.4. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne ($M \pm \text{S.E.M.}$) pour chaque groupe. Les données ont été statistiquement analysées par le logiciel Graph Pad Prism5, en utilisant l'application ANOVA one way suivi du Tukey's Post test. Les résultats ont été considérés significatifs * $P < 0.05$ comparativement au contrôle négatif (CMC 0.8%) et # $P < 0.05$ comparativement au contrôle positif (UMS= 4mg/150 μl).

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats des dosages des composés phénoliques (phénols totaux ; flavonoïdes et tannins)

Dans le but de caractériser la teneur en composés phénoliques dans les extraits ethanologiques et aqueux préparés à partir des feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia*, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins a été effectué. Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et des tannins sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins dans les extraits ethanologiques et aqueux des écorces et des feuilles de *F. angustifolia*.

Les valeurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont exprimées par moyenne de deux essais avec \pm l'écart-type. mg Eq AG/g E : mg Equivalent acide gallique par g d'extrait ; mg Eq Rut/g E : milligramme équivalent rutine par g d'extrait. Les valeurs de dosage des tannins sont exprimées par moyenne de trois essais \pm l'écart-type. mg Eq AT/g E : mg équivalent acide tannique par g d'extrait.

Extraits	F.F.E	F.F.A	F.E.E	F.E.A
Phénols totaux (mg Eq AG/g E)	36,55 \pm 4,71	69,88 \pm 10,13	33,38 \pm 9,42	101,8 \pm 0,11
Flavonoïdes (mg Eq Rut/g E)	81,92 \pm 3,49	76,69 \pm 7,40	37,4 \pm 5,24	143,23 \pm 7,22
Tannins (mg Eq AT/g E)	/	0,025 \pm 0,18	/	75,68 \pm 4,32

III.1.1. Résultats de dosage des phénols totaux

Les résultats obtenus des dosages des phénols totaux dans les extraits ethanologiques et aqueux des feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* sont illustrés dans le tableau VIII.

La méthode colorimétrique utilisée dans ce dosage est celle du Folin ciocalteu ; ce dernier oxyde les phénols totaux en mélange de tungstène et de molybdène de couleur bleue proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés. Le taux de phénols totaux des extrais aqueux des écorces et des feuilles varient entre (101,8 \pm 0,11 à 69,88 \pm 10,13 mg Eq AG/g E) ; largement supérieurs à ceux enregistrés par les extraits ethanologiques des mêmes parties de la plante (33,38 \pm 9,42 à 36,55 \pm 4,71 mg Eq AG/g E). L'extrait aqueux des écorces a montré le meilleur taux avec une teneur de 101,8 \pm 0,11 mg Eq AG/g E, comparé à l'extrait ethanologique de la même partie de la plante et à ceux enregistrés dans les extraits des feuilles.

III.1.2. Résultats de dosage des flavonoïdes

Les résultats obtenus des dosages des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques et aqueux des feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* sont illustrés dans le tableau VIII.

La méthode de chlorure d'aluminium est la plus utilisée pour le dosage des flavonoïdes. L'incubation de l'extrait en présence de ce réactif montre une coloration jaunâtre dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Les extraits éthanoliques de feuilles ont montré une concentration élevée en flavonoïdes par rapport aux extraits aqueux ($81,92 \pm 3,49$ et $76,69 \pm 7,40$), respectivement, contrairement aux écorces qui ont montré une concentration plus importante en flavonoïdes dans l'extrait aqueux.

III.1.3. Résultats de dosage des tannins

Les résultats obtenus des dosages des tannins dans les extraits éthanoliques et aqueux des feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* sont illustrés dans le tableau VIII.

La méthode de dosage adaptée dans cette étude est basée sur la capacité des tannins à se combiner à l'albumine sérique bovine qui sera précipité par ces derniers. La teneur en protéines du précipité est déterminée après hydrolyse alcaline et réaction de l'hydrolysate avec le FeCl_3 .

Le taux des tannins dans les feuilles est très faible dans les extraits éthanoliques et aqueux. Concernant les écorces, l'extrait aqueux a exhibé les teneurs les plus élevées en tannins ($75,68 \pm 4,32$).

III.2. Résultats de l'effet des extraits de *F. angustifolia* sur la libération de la β -galactosidase chez des souris induites par les UMS

Plusieurs études récentes ont testé l'effet des extraits de plantes à propriétés anti-inflammatoires, antalgique et analgésique dans le traitement de différentes pathologies à caractère inflammatoire, y compris l'arthrite goutteuse. Les effets des extraits des feuilles et des écorces éthanoliques (100, 200, 400 mg/kg) et aqueux (50, 100, 200 mg/kg) de *F.angustifolia*, ainsi que les effets de la colchicine et l'indométhacine ont été évaluées sur l'activité de la β -galactosidase, dosée dans les foies et les rates d'un modèle animal d'arthrite goutteuse aigüe induite par injection des cristaux d'UMS.

III.2.1. Effets des extraits des feuilles et des écorces de *F. angustifolia* dans le foie

III.2.1.1. Effets des extraits des feuilles de *F. angustifolia*

Les résultats de l'effet des extraits des feuilles sur l'activité de β -galactosidase dans le foie sont illustrés dans l'histogramme de la figure 13.

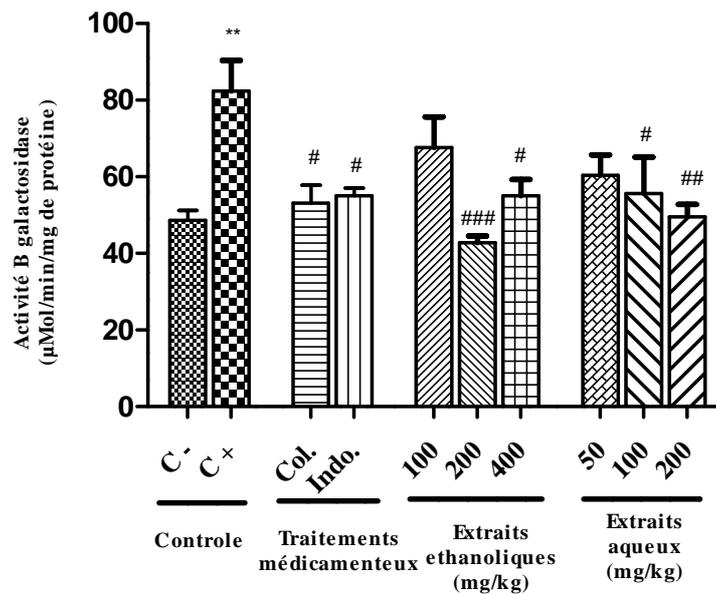


Figure 13 : Effets des extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*, la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans le foie chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aiguë. Les résultats sont représentés en moyennes \pm S.E.M. * $P < 0.05$ comparativement au contrôle négatif et # $P < 0.05$ comparativement au contrôle positif (UMS).

Le traitement des souris par les cristaux d'UMS a provoqué une inflammation qui s'est exprimée par une activité β -galactosidase élevée ce qui indique une libération importante des enzymes lysosomales dans le foie comparativement au contrôle négatif.

L'administration de la colchicine par voie orale (1 mg/kg), a montré une inhibition significative de l'enzyme (# $P < 0.05$). De même pour l'indométhacine qui est administré à une dose de 3mg/kg. Ces deux anti-inflammatoires n'ont pas inhibés complètement la β -galactosidase, donc la libération des enzymes lysosomales en comparaison avec le contrôle négatif.

Le traitement par les extraits ethanoliques à différentes concentrations (100, 200, 400 mg/kg) a présenté des effets variables. Les extraits de F.F.E à 200 mg/kg a permet la résolution de la réaction inflammatoire par inhibition complète de l'enzyme ($###P<0.05$). F.F.E à 400 mg/kg a donné un faible effet inhibiteur que F.F.E à 200 mg/kg et en comparaison au contrôle négatif ($#P<0.05$). Par contre, l'extrait F.F.E à 100 mg/kg n'a donné aucun résultat significatif en comparaison avec les deux contrôles.

Le traitement par les extraits aqueux testés à des concentrations variables allant de 50, 100 jusqu'à 200 mg/kg ont donné un effet inhibiteur important de l'enzyme, une relation proportionnelle entre ces doses et l'activité a été observé. D'ailleurs, l'extrait F.F.A. à 200 mg/kg a donné un effet comparable au contrôle négatif ($##P<0.05$) et meilleur que celui produit par F.F.A à 100 mg/kg ($#P<0.05$) ce qui indique que les effets de cet extraits varie en fonction de la concentration.

III.2.2.2. Effet des extraits des écorces de *F. angustifolia*

Les résultats de l'effet des extraits des écorces sur l'activité de β -galactosidase dans le foie sont illustrés dans l'histogramme de la figure 14.

L'effet des extraits des écorces aqueux et ethanoliques a été testé sur l'inhibition de β -galactosidase dans le foie chez des souris atteinte d'une inflammation induite par injection des cristaux d'UMS.

Les traitements de référence à savoir la colchicine (1 mg/kg) et l'indométhacine (3 mg/kg) ont permet la réduction significative de l'inflammation. Ils ont montré un effet similaire au contrôle négatif.

Le traitement par les extraits des écorces ethanoliques à des concentrations croissantes (100, 200, 400 mg/kg) a présenté des effets approximativement semblables chez les trois groupes avec réduction de l'activité de l'enzyme un peu plus forte par l'extrait F.E.E 200mg/kg. Cependant, leur effet est comparable à celui du contrôle négatif.

Par contre, les extraits aqueux à des concentrations allant de 50, 100 à 200mg/kg ont exhibés un effet inhibiteur très intéressent puisqu'à chaque fois qu'on augmente la dose, il y-a réduction significative de l'inflammation sauf pour l'extrait F.E.A (50 mg/kg) qui a accentué l'activité de l'enzyme ($###P<0.05$) et ($***P<0.05$).

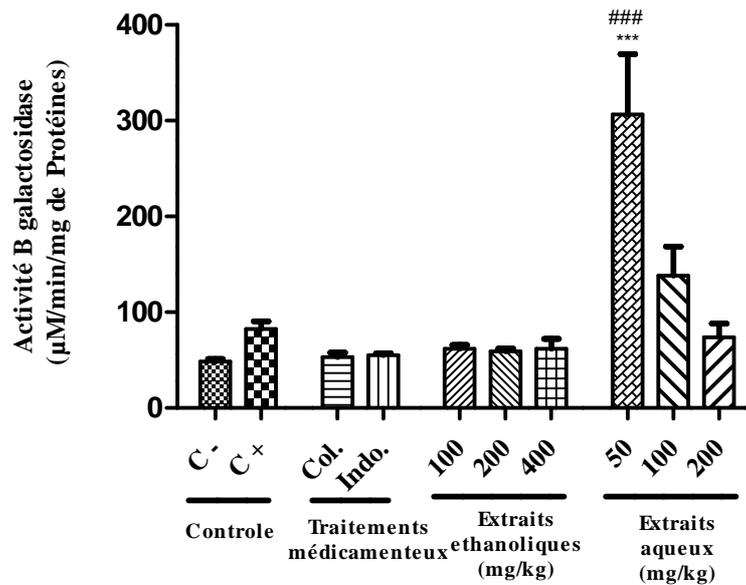


Figure 14 : Effets des extraits des écorces ethanoliques et aqueux de *F. angustifolia*, la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans le foie chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aiguë. Les résultats sont représentés en moyennes \pm S.E.M. * $P < 0.05$ comparativement au contrôle négatif et # $P < 0.05$ comparativement au contrôle positif (UMS).

III.2.2. Effets des extraits des feuilles et des écorces de *F. angustifolia* dans la rate

III.2.2.1. Effets des extraits des feuilles de *F. angustifolia*

Les résultats de l'effet des extraits des feuilles sur l'activité de β -galactosidase dans la rate sont illustrés dans l'histogramme de la figure 15.

La libération de la β -galactosidase est réduite dans les échantillons de rates traités par la colchicine et l'indométhacine ($150,30 \pm 92,23$ et $165,08 \pm 11,788$, respectivement). Par ailleurs, les extraits ethanoliques des feuilles ont montré une variation dans les effets. F.F.E (200 mg/kg) ($117,15 \pm 7,42$) a présenté une inhibition de l'enzyme comparable au contrôle négatif ($92,154 \pm 11,18$), et plus intéressante que l'activité exercée par F.F.E (100 mg/kg) ($138,78 \pm 7,76$). Par contre, il y a une activation intense de la β -galactosidase dans les rates traitées par l'extrait F.F.E (400 mg/kg) ($161,95 \pm 5,30$).

D'autres part, le traitement par les extraits aqueux 50 et 200 mg/kg ont permis de diminuer l'inflammation ($111,54 \pm 9,33$ et $113,39 \pm 7,19$ respectivement). Contrairement à l'extrait F.F.A (100 mg/kg) qui a amplifié l'inflammation (### $P < 0.05$) et (***) $P < 0.05$)

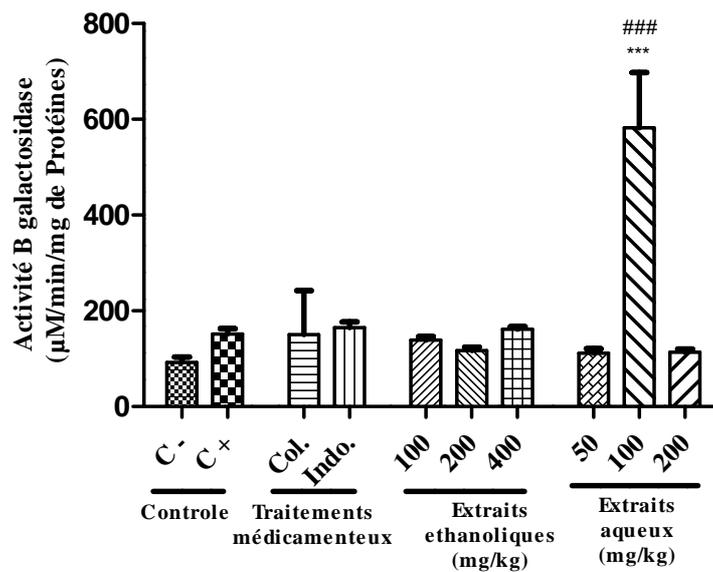


Figure 15 : Effets des extraits des feuilles éthanoliques et aqueux de *F. angustifolia*, la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans la rate chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aiguë. Les résultats sont représentés en moyennes \pm S.E.M. * $P < 0.05$ comparativement au contrôle négatif et # $P < 0.05$ comparativement au contrôle positif (UMS).

III.2.2.2. Effets des extraits des écorces de *F. angustifolia*

Les résultats de l'effet des extraits des écorces sur l'activité de β -galactosidase dans la rate sont illustrés dans l'histogramme de la figure 16.

En comparaison au contrôle négatif ($92,15 \pm 11,18$), les traitements médicamenteux (colchicine et indométhacine) n'ont pas inhibé l'enzyme ($150,30 \pm 92,23$ et $165,08 \pm 11,78$). Cependant les extraits éthanoliques 200 et 400 mg/kg ont exercé un effet inhibiteur approximativement similaire ($128,51 \pm 6,66$ et $128,06 \pm 8,79$), respectivement.

Les extraits aqueux ont exercé des effets variables sur l'activité de la β -galactosidase dans la rate. F.E.A (50 mg/kg) s'est montré avec une activité élevée indiquant un état inflammatoire prononcé avec libération élevée des enzymes lysosomales (# $P < 0.05$) et (***) $P < 0.05$). Les extraits F.E.A 100 et 200 mg/kg ont permis de réduire l'activité de l'enzyme ($101,19 \pm 3,93$ et $113,35 \pm 9,92$) comparable au contrôle négatif. F.E.A (100 mg/kg) est l'extrait qui a donné une inhibition meilleure par rapport aux traitements médicamenteux et aux autres extraits éthanoliques et aqueux, suggérant que cet extrait contient des métabolites impliqués dans l'un des mécanismes d'inhibition de libération des enzymes lysosomales.

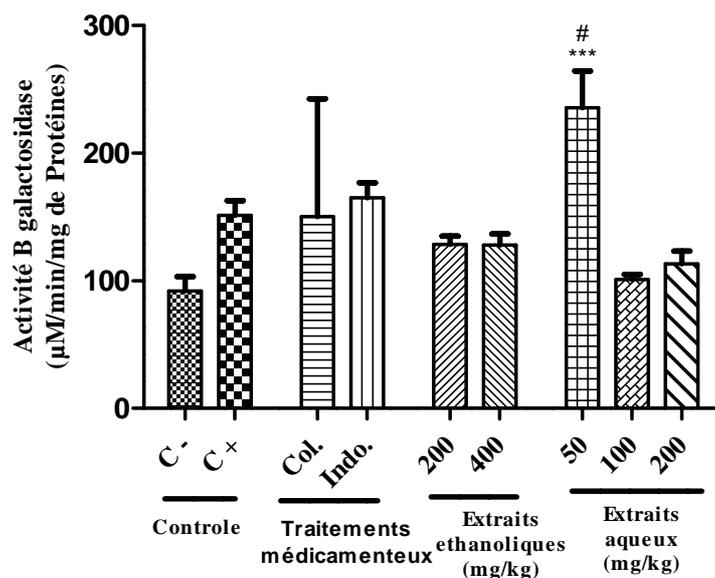


Figure 16 : Effets des extraits des écorces éthanoliques et aqueux de *F. angustifolia*, la colchicine et l'indométhacine sur l'activité de β -galactosidase dans la rate chez un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue. Les résultats sont représentés en moyennes \pm S.E.M. *P<0.05 comparativement au contrôle négatif et #P<0.05 comparativement au contrôle positif (UMS).

III.3. Discussion

L'excès de l'acide urique provoque une hyperuricémie due à un défaut d'élimination dans l'organisme. Par conséquent, une augmentation permanente de son taux peut mener à sa précipitation sous forme de cristaux d'urate monosodique dans les articulations, qui à son tour va causer une inflammation qui persiste dans le temps et se traduit par une crise de goutte aiguë ou chronique (**Sabina et al., 2011**).

Cette étude est consacrée à évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* chez des souris atteintes d'une inflammation induite par injection des cristaux d'UMS.

L'étude quantitative des extraits éthanoliques et aqueux de *Fraxinus angustifolia*, par les dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins. Le choix de ces substances n'était pas arbitraire, plusieurs activités biologiques à savoir les propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et antalgique des plantes ont été attribuées à cette classe de composés. Les méthodes colorimétriques de dosage sont principalement utilisées pour leur simplicité et leur sensibilité élevée.

D'après les résultats de dosage des phénols totaux on remarque que les extraits d'écorce et des feuilles aqueux sont plus riches que les extraits éthanoliques. Ceci est probablement dû à la solubilité de ces composés dans l'eau, donc leur polarité. La répartition inégale des phénols totaux dans l'écorce et les feuilles dépend de plusieurs facteurs, tels que leur origine, les conditions de croissance, le processus de maturation, les techniques d'échantillonnage et les conditions du stockage (**Bergonzi et al., 2001 ; Wang et Zheng, 2001**).

Les flavonoïdes contenus dans les feuilles se sont concentrés dans la phase éthanolique que aqueuse, ceci s'explique par le fait que les composés contenus dans les feuilles tel que la rutine est insoluble dans la phase aqueuse. Concernant ceux des écorces, les extraits aqueux sont plus riches en flavoboides que les extraits éthanoliques, car les dérivés de la quercétine et du kaempférol sont des composés polaires (**Havsteen, 2002**).

Le taux des tannins est très faible dans l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles, ceci s'explique par la pauvreté de cette partie végétale en tannins. L'extrait aqueux de l'écorce a exhibé la teneur la plus élevée en tannins contrairement à l'extrait éthanolique, ceci est peut être dû à la complexation des tannins avec d'autres protéines que la BSA, ce qui a masqué leur présence.

La répartition de ces métabolites secondaires dans les différents solvants, se sont exprimés par les différences des activités anti-inflammatoires entre les extraits ethanoliques et aqueux sur le modèle d'arthrite goutteuse.

L'injection des cristaux d'UMS dans les articulations induit l'accumulation des neutrophiles dans le site inflammatoire qui est associé à la libération des médiateurs pro-inflammatoires tels que la libération des prostaglandines et des leucotriènes, des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (Il-1 et TNF- α) et la libération des enzymes lysosomales (**Sabina et Rasool, 2007 ; Sabina et al., 2010 ; Sun et al., 2015**).

En effet, le lysosome et les enzymes lysosomales sont les principaux facteurs qui jouent un rôle vital dans le tissu conjonctif. Ils sont impliqués dans le processus inflammatoire, la phagocytose, la dégénérescence, le cancer et dans l'arthrite goutteuse (**Maire, 2012**).

Il a également été rapporté que les enzymes lysosomales sont libérées dans les maladies qui stimulent la synthèse des prostaglandines. Par conséquent, la libération extracellulaire des enzymes lysosomales est cruciale pour la pathogenèse d'une lésion tissulaire et pour l'amplification de l'inflammation (**Sabina et al., 2009**).

Wallingford et McCarty (1971) ont émis l'hypothèse que les sites donneur d'hydrogène présents sur le cristal se fixent à des sites accepteurs dans la surface externe de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. L'interaction entre les cristaux et la membrane cellulaire induit la modification du métabolisme cellulaire, et provoque la sécrétion des médiateurs inflammatoires. Ainsi, les cristaux d'urate peuvent induire la libération des enzymes lysosomales des leucocytes en l'absence de phagocytose.

Les enzymes lysosomales sont des macromolécules ubiquitaires biologiquement actives, qui peuvent dégrader les protéines, les glycosaminoglycanes, les acides nucléiques et les lipides (Dean et Bandt , 1976). Il est probable donc que les leucocytes libèrent les enzymes lysosomales comme une conséquence d'une intense endocytose qui sera à l'origine de lésions articulaires (**Sabina et al., 2008**). En effet, la réduction de la libération de ces enzymes peut être bénéfique.

Le traitement de l'arthrite goutteuse par des molécules synthétiques induit une diminution significative de l'inflammation.

La colchicine est un puissant alcaloïde utilisé contre l'arthrite goutteuse, Elle agit par inhibition de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et donc recrutement des PNN liés probablement aux facteurs intervenant dans l'amplification de l'inflammation, ce qui mène à l'inhibition de la libération des enzymes lysosomales, inhibe la production de

l'anion superoxyde en réponse aux cristaux d'UMS, la diminution de l'inflammation est aussi liée à l'inhibition de l'inflammasome NLRP 3, la production d'Il-1 β et le recrutement dans le site inflammatoire (**Chang et al., 1976 ; Sabina et al., 2011**).

Par ailleurs, la réduction de l'inflammation chez les souris traitées par l'indométhacine est due à l'inhibition de la cyclooxygénase responsable de la formation des médiateurs pro-inflammatoires (prostaglandines) et empêche la migration des leucocytes et monocytes-macrophages du sang vers la cavité synoviale (**Nicolas et al., 2001**). Cependant, ces deux anti-inflammatoires présentent des effets secondaires, tels que l'insuffisance rénale et l'insuffisance hépatique (**Wallace, 1974 ; Lioté, 2007**), ce qui implique le retour à la médecine traditionnelle qui fait appel aux traitements naturels.

Dans cette étude les extraits ethanoliqes et aqueux de *Fraxinus angustifolia* sont utilisés dans l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires via l'inhibition de la libération des enzymes lysosomales.

En effet, les extraits ethanoliqes des feuilles et des écorces ont présenté des effets variables sur le processus inflammatoire. La réduction de la libération de la β -galactosidase est peut être due à l'implication de ses métabolites dans la résolution de l'inflammation. A une dose de 400mg/kg, l'extrait ethanoliqi des feuilles n'a pas empêché la libération des enzymes lysosomales, ceci serait du au phénomène de saturation.

L'évaluation des extraits aqueux sur l'inflammation a indiqué une relation étroite entre les doses et les effets anti-inflammatoires. Ceci revient à dire que les composés phénoliqes seraient très efficaces lorsque la quantité de l'extrait est élevée.

La baisse de l'effet de ces extraits dans la rate revient au passage des extraits par un métabolisme hépatique, puis les déchets arrivent dans la rate où ils exerceront leurs effets anti-inflammatoire.

La présence de la catéchine, la quercetine, le kaempferol et la lutéoléine inhibent les enzymes COXs et LOX ce qui inhibe la synthèse des prostaglandines (**Ahmed et al., 2010**). Ils inhibent également la xanthine oxydase, une enzyme qui catalyse le métabolisme de l'hypoxanthine en acide urique, ce qui génère le radical O $_2^-$ et H $_2$ O $_2$ à partir de l'O $_2$ (**Lee et al., 2004**). Ces derniers ont un rôle dans la stabilité oxydative, c'est le cas des flavonoïdes (quercetine et kaemferol) qui bloquent les ions métalliques pro-oxydants (Fer, Cu), lors de la réaction de Fenton. Il apparait également que ces flavonoïdes diminueraient la production de NO \cdot par inhibition des protéines induisant la synthèse des espèces réactives du nitrogène, notamment par inhibition de l'activation de NF- κ B (**Mladinka et al., 2010**).

Ils ont été aussi considérés comme de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, cet effet antiprolifératif pourraient s'expliquer par la capacité des flavonoïdes à inhiber l'activité de certaines enzymes impliquées dans l'inflammation (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (**Mookerjee et al., 1986**). Les flavonoïdes sont des modulateurs de l'expression génique. Cependant, il est évident que les flavonoïdes présentent une activité anti-inflammatoire, au moins en partie, par la suppression de ces expressions de gènes pro-inflammatoires (**Kim et al., 2004**).

CONCLUSION

Fraxinus angustifolia est utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies à caractère inflammatoires, incluant les accès aigus de goutte. Les extraits ethanologiques et aqueux ont fait l'objet des tests anti-inflammatoires chez un modèle animal d'arthrite goutteuse induite par les MSU à des concentrations croissantes (100, 200 et 400 mg/kg), (50, 100, 200), respectivement. L'effet de ces extraits a été comparé aux molécules de références à savoir la colchicine (1 mg/kg) et l'indométhacine (3 mg/kg).

La plupart des extraits ont montré un effet inhibiteur de la β -galactosidase indiquant un effet inhibiteur de la libération des enzymes lysosomales. Les extraits aqueux se sont avérés plus efficace que leurs extraits ethanologiques, qui deviennent toxiques à une certaine dose (400 mg/kg). En effet, les extraits aqueux des feuilles et des écorces ont montré une activité maximale à une dose de 200 mg/kg où l'inhibition significative de l'activité enzymatique.

Les résultats obtenus après dosage de l'activité enzymatique chez les animaux traités par ces extraits sont comparables à ceux obtenus par les traitements médicamenteux. Ceci constitue une première étape dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de la plante étudiée, qui permet de suggérer cette plante pour une suite d'investigations scientifiques, tels que la libération des autres médiateurs pro-inflammatoires tel que le TNF- α .

Il serait également intéressant d'élargir l'application de ces tests anti-inflammatoires sur l'activité des autres parties de *Fraxinus angustifolia* tels que les samares, également utilisée traditionnellement pour traiter les douleurs articulaires

Identifier ces molécules actives et élucider leur mode d'action dans le liquide synovial serait une suite approfondie de cette étude, suivie de la vérification de l'absence de l'effet cytotoxique des extraits de cette plante médicinale par différents tests d'évaluation de la toxicité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdelguerfi, A et Laouar, M. (2000). Le Frêne (*Fraxinus spp.*) et le Bétoum (*Pistacia atlantica*): écologie et utilisation en Algérie. In : *Fodder Shrubs Development in Arid and Semi-Arid Zones*. In: G. Gintzburger, M. Bounejmate and A. Nefzaoui, Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-Arid Zones, 27 Oct-2 Nov 1996. Hammamet, Tunisia. ICARDA, Aleppo, Syria.2, p 385-389.

Ahmed, T., Ferdous, A., Biswas S.K. et Sharif. F. (2010). Assessment of Dissolution Profile of Aceclofenac. Tablets Available in Bangladesh. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences* 3(1): 1-3.

Agudelo, C et Wise, C.M. (2001). Gout : Diagnosis, pathogenesis and clinical manifestation. *Current Option in Rheumatology*. 13, p.234-239.

Ait Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Paris. Ibis Press, p.146-148.

Alaoui, H. B., Mezalek, Z.T., Harmouche, H., Aouni, M et Maaouni, A. (2010). La goutte : nouvelles recommandations. *J. Health Syst. Pharm*, 57, p.225-237.

Alici, T., Imrenb, Y., Erdil M et Gundesc H. (2013). Gouty arthritis at interphalangeal joint of foot after sildenafil use : A case report. *International Journal of Surgery Case Reports*. 4, p.11– 14.

Al-Nahaim, A., Jahan, R et Rahmatullah, M. (2014). Zingiber officinale : A potential plant against rheumatoid arthritis. *Hindawi Publishing Corporation Arthritis*. Article ID 159089.P.8.

Anthony, J., Janckila, Ph.D., Stephen, P., Slone, M.D., Sheron, C., Lear, H.T.L., Alvin M, M.D et Lung T.(2007). Tartrate-Resistant Acid Phosphatase as an Immunohistochemical Marker for Inflammatory Macrophages. *Am J Clin Pathol* .127, p.556-566.

B

Baba-Aissa, F. (2011). Encyclopédie des Plantes Utiles. El-Maarifa, Alger, p.157–158.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Basta, S., Sonja, M., Knoetig, Spagnuolo-Weaver G.A et Kenneth C et McCullough. (1999).** Modulation of Monocytic Cell Activity and Virus Susceptibility During Differentiation into Macrophages. *J Immunol* .162, p.3961-3969.
- Beaudeau, J-L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J. et Legrand, A. (2006).** Sources cellulaires des especes reactives de l'oxygene et de l'azote. *Annales. Pharmaceutique Francaises* 64: 373-381.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J. et Younos, C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology* .35(2), p. 123-143.
- Beloued, A. (1998).** Plantes Médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger, p. 277.
- Benesser, H., Tazi, Z.M., Harmouche, H., Aouni, M et Maaouni, A. (2010).**La goutte : nouvelle recommandation .*Revue du Rhumatisme*. 17, P.119-133.
- Boya, p. (2012).** Lysosomal Function and Dysfunction: Mechanism and Disease. *.Antioxidants & Redox Signaling*. (17).
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Morgenni, F., Mazzi, G., & Vincieri, F. F. (2001).** Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *International journal of pharmaceutics*, 213(1), 199-208.
- Bune, A.J ., Hayman, A.R., Evans, M.J., Cox, T.M. (2001).** Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disordered macrophage inflammatory responses and reduced clearance of the pathogen, Staphylococcus aureus. *Immunology*. 102, p.103-113.
- Busso N et So A. (2010).** *Arthritis Research & Therapy*, 12:206 <http://arthritisresearch.com/content/12/2/206>.

C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chang, Y.H et Malawista, S.E. (1975-1976). Mechanism of action of colchicine. *Inflammatory*.1(2), p.143-153.

Chen, C.J., Shi, Y., Hearn, A., Fitzgerald, K., Golenbock, D et Reed, G. (2006). MyD88-dependent IL receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest*. 116, p. 262-271.

Chayen, J., & Bitensky, L. U. C. I. L. L. E. (1971). Lysosomal enzymes and inflammation with particular reference to rheumatoid diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, 30(5), 522.

Chevalier, A. (1927). Les frênes comme plantes fourragères dans l'Afrique du Nord. In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*. 7^e année, bulletinno. 71, p. 467-471.

Chia, E.W et Grainger, R. (2008). Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis : rationale for use of low-dose colchicines. *British journal of pharmacology*.153, p.1288-1295.

Chougala, M. B., Bhaskar, J. J., Rajan, M. G. R., & Salimath, P. V. (2012). Effect of curcumin and quercetin on lysosomal enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical nutrition*, 31(5), 749-755.

Choi, H.K., Mount, D.B et Reginato, A.M. (2005). Pathogenesis of gout. *Ann InterMed*. 143, p.499-516.

Chouhan, H.S., Sridevi, K., Singh, N.K et Singh, S.K. (2012). Anti-inflammatory activity of ethanol extract of Vitex glabrata leaves. *Paka. J.Pharm.Sci*. 25, p.131-134.

Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters C., Scapozza, L., Yousefi S et Simon, H. (2003). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 205 (3), p. 685-698.

Cotten, A., Pascart, T et Cortet, B. (2013). Affections microcristallines. In cotten, A. Imagerie Musculosquelettique : pathologie générales. *Elsevier Masson*. P.23-58.

Crostein, B.N., Molad, Y., Reibman, J., Balahane, E., Levin, R.I et Weissman, G. (1995). Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *J Clin Invest*. 96 (2), p : 994-1002.

D

Djerroumi, A et Nacef, M. (2004). 100 Plantes Médicinales d'Algérie. Palais de livre, p. 45–110.

Dubost, J., Mathieu, S et Soubrier, M. (2011). Traitement de la goutte : la Revue de médecine interne. 32, p.751-757.

E

Ea, H.K. (2011) a. De l'hyperuricémie à la goutte : physiopathologie. Revue du Rhumatisme.78, p.103-108.

Ea, H.K. (2011) b. physiopathologie de l'inflammation goutteuse. Arthropathies microcristallines.40, p.836-843.

Ernest, M et Favel, M. (2009). Febuxostat : A selective xanthine-oxidase/xanthine-dehydrogenase Inhibitor for the Management of Hyperuricemia in Adults With Gout. *Clinical Therapeutics*.31, p : 2503-2518.

F

Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Cleto, P., Madeira, P.J.A., Florêncio, M.H., Frazão, F.N. et Serralheiro, M.L. (2013). Antioxidant and anti-acetylcholin-esterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Medicinal Plants Research* .7, p.1370-1378.

Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Frazão, F.N et Serralheiro, M.L.M. (2014). Studies on the molecular mechanism of cholesterol reduction by *Fraxinus angustifolia*, *Peumus boldus*, *Cynara cardunculus* and *Pterospartum tridentatum* infusions. *J. Med. Plants Res.* 8 (1), p. 9–17.

Fakchich, J et Elachouri, M. (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.*154, p. 76–87.

Frazão, F.N. et Serralheiro, M.L. (2013). Antioxidant and anti-acetylcholin-esterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7, p.1370-1378.

G

Ginsberg, M.H., Kozin, F., O'Malley, M et McCarty, D.J. (1977). Release of platelet constituent by monosodium urate crystals. *J Clin Invest.* 60, p.999-1007.

GIFA, 2012. Guide Illustré de la Flore Algérienne: (IGAF) Illustrated Guide of the Algeria n Flora. Les presses de l'Imprimerie Moderne de l'Est, Paris, pp. p. 51.

H

Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 809-812.

Hausmann, M., Obermeier, F., Schreiter, K., Spottl, T., Falk, W., Scholmerich, J., Herfarth, H., Saftig, P et Rogler G.(2004). Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin Exp Immunol.* 136 (1), p. 157–167.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96: 67-202.

Hosny, M., 1998. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus oxycarpa*. *Phytochemistry*.47, p.1569–1576.

Howard A. Kaplan and James C. Jamieson. (1977). The effect of inflammation on rat liver β -galactosidase and β -N-Acetylglucosaminidase. *Life Sciences.* 21, p. 1311-1316.

J

Joosten, L.A., Netea, M.G et Mylona, E. (2010). Engagement of fatty acids with toll-like receptor 2 drives interleukin-1 β production via the ASC/caspase pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheumatisme.* 62, p.3237-48.

K

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.

Klein, A.S., Joh, J.W., Rangan., Wang, D et Bulkley, G.B. (1996). Allopurinol discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radical Biology and Medicine*.21 (5), p.713-717.

Kostova, I et Iossifova, T. (2007). Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia* .78(2), p. 85-106.

Kuntz, D et Lioté, F. (2003). Goutte. *Encycl Méd Chir*, Appareil locomoteur, 14-270-A.10, p.23.

Kurt, V.F et Andrej H. (1986).Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55, p.167-193.

L

Lafforgue, P et Legré. (2005). Maladies et grands syndromes-arthropathies micro-cristallines. Faculté de médecine de marseille.p.1-20.

Le Bellec, M.L. Gastine, B., Mosquet, B., Godde, F., Ze Bekolo, R., Gloro, R., Leterrier, C et Coquerel, A. (2009). Risque d'intoxication à la colchitine chez les personnes âgées et moyens de prévention : à propos de quatre observations : Colchitine intoxication in four elderly patients : How to prevent it ? *Revue de médecine interne.* 30, p.783-788.

Lee, D.H., Folsom, A.R., Harnack, L., Halliwell, B. et acobs, D.R.Jr. (2004). Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1194-2000.

Lee, H.S., Park, S.H., Wallander et Chang, C.S. (2012). A flavonoid survey of Fraxinus (Oleaceae) in eastern Asia, and the overlooked species Fraxinus hopeiensis T. Tang in northern China.*Biochemical Systematics and Ecology.* 41, p.150-156.

Lioté, F. (2011). Physiopathologie et traitement de l'inflammation goutteuse. *Revue du Rhumatisme.* 78, p.122-128.

Lioté, F et Bardin, T. (2007). Traitement de la goutte. *Revue du Rhumatisme.* 74, p.160-167.

Lioté, F., Prudhommeaux, F et Schiltz, C. (1996). Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* 39, p.1192-8.

Liu, R., Lioté, F., Rose, D.M., Merz, D et Terkeltaub, R. (2004). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheumatisme.* 50, p.247-58.

M

Maksimović, Z., Malenčić, Đ., Kovačević, N., 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Biores. Technol.* 96, 873–877.

Martino, F., Burns, K et Tschopp, J. (2002). The Inflammasome : A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell.* 10, p.416-426.

Martino, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel et Tschopp, J.(2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature plant.* 440, p.237-241.

Maire, I. (2012). Le système lysosomal dans la protéolyse : panorama des maladies lysosomiales. *Bull. Acad. Natle Méd.* 196 (8), p. 1561-1574.

Mccarty, D. J. (1968). On the trail of a crystal, in *Vistas in Connective Tissue Diseases*, ed. J. C. Bennett, p. Thomas, Springfield.(3). p. 194.

Meisler, M et Rattazzi, M. (1974). Immunological Studies of β Galactosidase in Normal Human Liver and in GM1 Gangliosidosis. *Am J Hum Genet.* 26, p.683-691.

Metcalf P et Fusek M. (1993). Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *The EMBO Journal.* 12 (4), p. 1293 – 1302.

Mookerjee, B.K., Lee, T.P., Logue, G.P., Lippes, H.A. et Middleton, E. (1986). The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Progress in Clinical and Biological Research* 213: 511-520.

N

Negrao, R et Faria, A. (2009). Natural polyphenols as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic agents in the metabolic syndrome. Springer Science Business Media B V.P.1476180.

Nicolas, J.F., Cousin, F et Thivolet, J. (2001). Immunologie clinique et allergologie Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext*.p.55-58.

Nobuto .Y et Venkateswara, R.N. (1998). Structurally well-defined macrophage activating factor derived from vitamin D₃-binding protein has a potent adjuvant activity for immunization. *Immunology and Cell Biology* .76, p. 237–244.

Nuki, G. (2008). Colchicine : its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports*. 10, p.218-227.

P

Pascual, E., Martinez, A et Ordonez, S. (2013). Gout : The mechanism of urate crystal nucleation and growth. A hypothesis based in facts. *Revue du Rhumatisme*.80 (30), p.193-199.

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

Perez-Sala, D., Boya, P., Ramos, I., Herrera, M et and Stamatakis, K. (2009). The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS One* 4: e8117.

Popa-Nita, O., Maroie, L., Paré, G et Naccache, P.H. (2009).Crystal-Induced Neutrophil Activation. *Arthritis et rheumatism*.183 (3).p.2104-14.

Pragasam, S.J et Rasool, M. (2013). Dietary component p-coumaric acid suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Inflamm.Res*.62, p.489-498.

Prat, D., Rampant, P.F et Prado, E. (2006).Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières. Institut nationale de la recherche ergonomique. Paris.p.282.

Q

Quézel, P et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II, CNRS, p. 567-1170.

R

Rameau, J.C et Dumé, G. (1989). Flore forestière française : Tome 1. Plaines et collines. Institut pour le développement forestier.p.457-459.

Rasool, M et Varalakshmi, P. (2006). Suppressive effect of withania somnifera root powder on experimental gouty arthritis : An in vivo and in vitro study. *Chemico-Biological Interactions*.164, p.174-180.

Rasool, M., Sabina, E. P., & Lavanya, B. (2006). Anti-inflammatory effect of Spirulina fusiformis on adjuvant-induced arthritis in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(12), 2483-2487.

Rasool, M., & Sabina, E. P. (2007). Antiinflammatory effect of the Indian Ayurvedic herbal formulation Triphala on adjuvant-induced arthritis in mice. *Phytotherapy Research*, 21(9), 889-894.

Richette, P. (2010). Goutte. Séminaires de réflexions rhumatologie.p.40.

Richette, P. (2011). Goutte : mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant.Revue du Rhumatisme.7, p.142-147.

Robert, M et Hood, L. (1994). Cholchitine poisoning. *Journal of Emergency Medicine*.12, p.171-177.

Roddy, E et Doherty, M. (2010). Epidemiology of gout .Roddy and Doherty Arthritis Research and Therapy.12, p.223.

S

Sabina, E. P., Chandal, S., & Rasool, M. K. (2008). Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by withaferin A. *J Pharm Pharm Sci*, 11(4), 46-55.

Sabina, E. P., Rasool, M., Mathew, L., EzilRani, P., & Indu, H. (2010). 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation—An in vivo and in vitro study. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 229-235.

Sabina, E.P., Nagar, S et Rasool, M.(2011). A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation an experimental model of gouty arthritis. *Inflammation*. 34, p.184-192.

Sabina, E. P., Indu, H., & Rasool, M. (2012). Efficacy of boswellic acid on lysosomal acid hydrolases, lipid peroxidation and anti-oxidant status in gouty arthritic mice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(2), 128-133.

Saku, T., Sakai, H., Tsuda, N., Okabe, H., Kato, Y et Yamamoto K. (1990). Cathepsins D and E in normal, metaplastic, dysplastic, and carcinomatous gastric tissue: an immunohistochemical study. 31, p.1250-1255.

Schlienger, J.L. (2011). Hyperuricémie et goutte. In : Nutrition clinique pratique. *Elsevier Masson*. p.201-204.

Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M., Wolf, D. H., CHIANG, H. L., & SCHEKMAN, R. (1994). SITE OF CATABOLITE INACTIVATION. AUTHORS'REPLY. *Nature*, 369(6478), 283-284.

Schroder, K et Tschopp. (2010). The Inflammasomes Cell. 140, p : 812-832.

Shetty, N.P., Jorgensen, H.J.L., Jensen, J.D.Colling, D.B. et Shetty, H.S. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 267-280.

Shi, Y., Evans, J.E et Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alert the immune system to dying cells. *Nature*. 425, P.516-21.

Shi, Y., Mucsi, A.D et Ng, G. (2010). Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Revue*. 233, p.203-17.

Silva, C.R., Frohlich, J. K., Oliveira, S.M., Cabreira TN et al. (2013). The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model. *Journal of Ethnopharmacology* .145, p.205–213.

Sun, X., Shim, D.W., Han, J. W et Shin, W.Y. (2015). Anti-inflammatory effect of Impatiens textori Miq. extract via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in vitro and in vivo Experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*.

T

Termunovic, M., Franjic, J., Satovic, Z., Grgurev, M., Frascaria-lacoste, N et Fernandez-Manjarres, J.F. (2012). Environmental heterogeneity explains the genetic structure of continental and mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* vahl. *PLOS ONE*. (7).

Tonon, G., Capuana, M et Di Marco, A. (2001). Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by in vitro shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae*. 87, p.291-301.

U

Uto, Y., Kawai, T., Sasaki, T et Hamada, K. (2015). Degalactosylated/Desialylated Bovine Colostrum Induces Macrophage Phagocytic Activity Independently of Inflammatory Cytokine Production. *Anticancer Reserch*. 35, p. 4487- 4492.

W

Wallace, S.L. (1974). Colchicine. *The Reverend Sydney Smith and Rheumatism*.3 (4).

Wallander, E. (2008). Systematics of *Fraxinus* (oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*. 273, p. 25-49.

Wallingford, W. R., & McCarty, D. J. (1971). Differential membranolytic effects of microcrystalline sodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate. *The Journal of experimental medicine*, 133(1), 100-112.

Wharf, B., & Levitt, K. L.(Eds.). (2011). *Challenge of Child Welfare*. UBC Press.

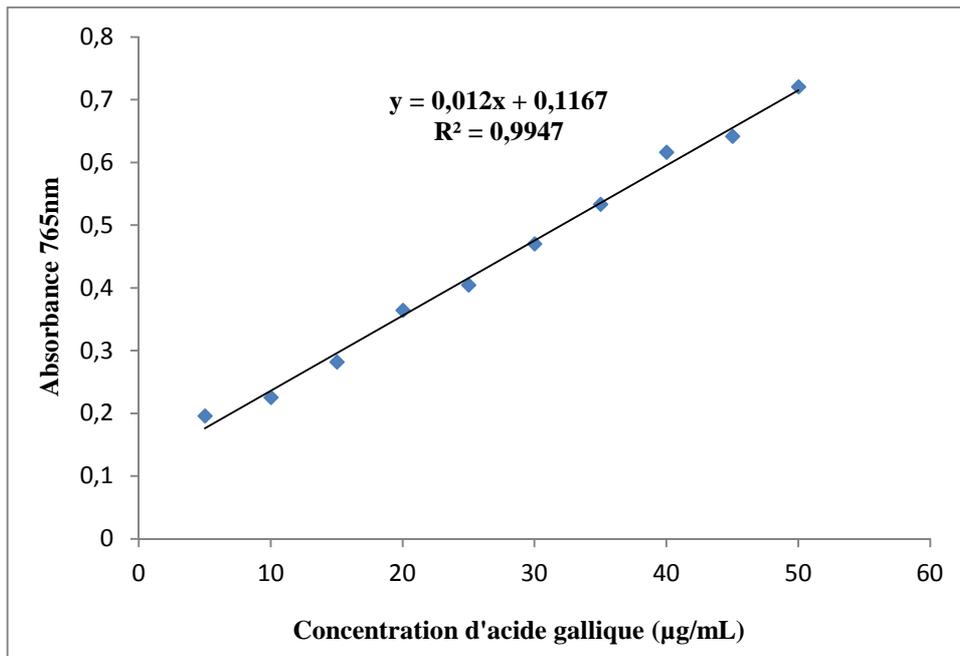
Wei, H., Hu, C., Xie, J., Yang, C., Zhao, Y., Guo, Y., Mei, Z., Chen, L et Lan, Z.(2014). Doliroside attenuates monosodium urate crystals-induced inflammation by targeting NLRP3 inflammasome. *Europaen Journal of Pharmacology*.740, p.321-328.

Wu, X.H., Wang C.Z., Wang , S.Q ., ChaoMi ., YiHe., Zhang J., Zhang ,Y.W., Anderson, S et Yuan, C.H.(2015). Anti-hyperuricemia effects of allopurinol are improved by Smilax riparia, a traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*.162, p.362–368.

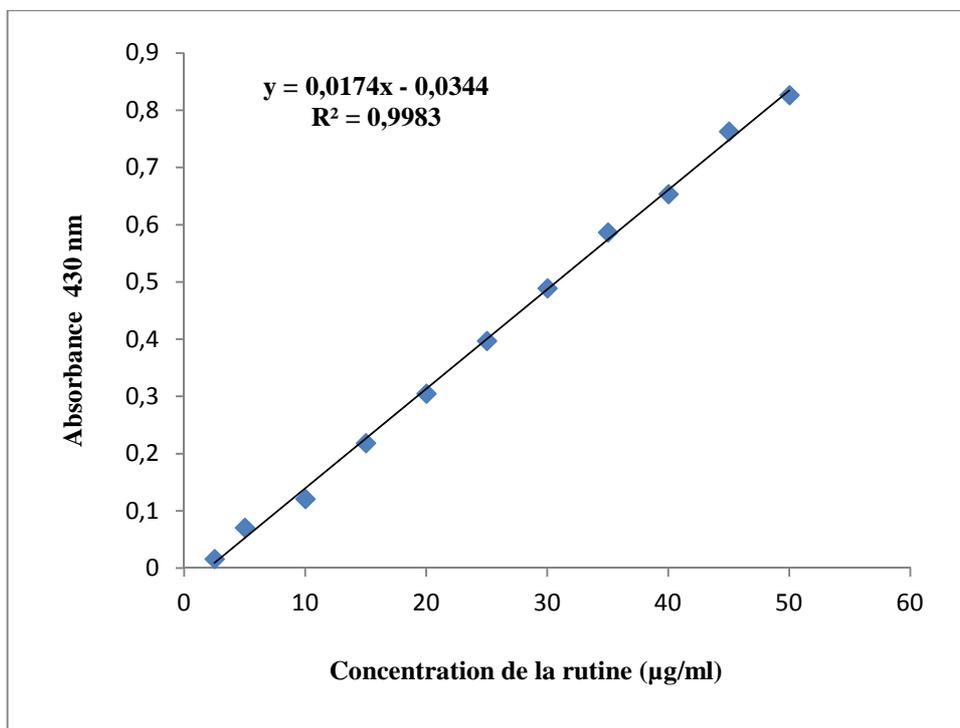
Y

Yang Z and Klionsky DJ. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 22, p. 124–131.

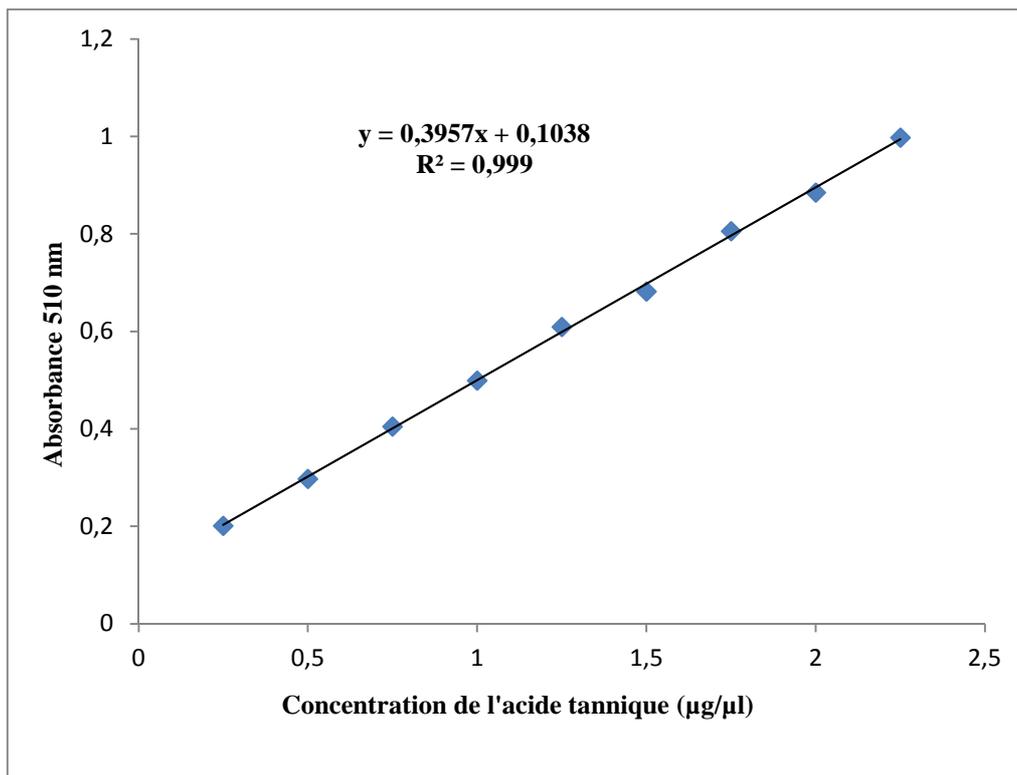
ANNEXES



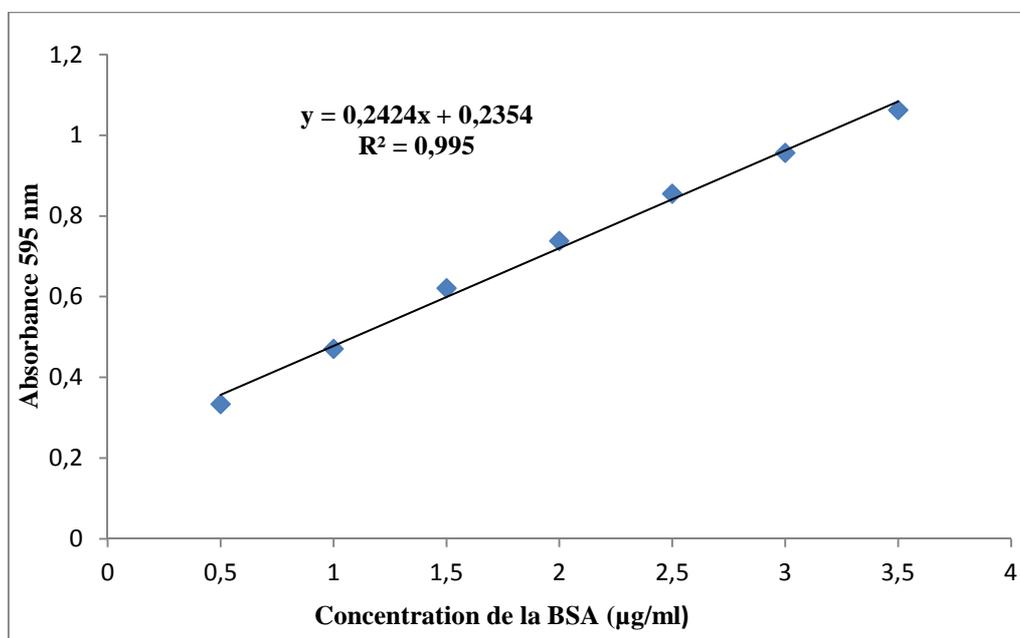
Annexe N°01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



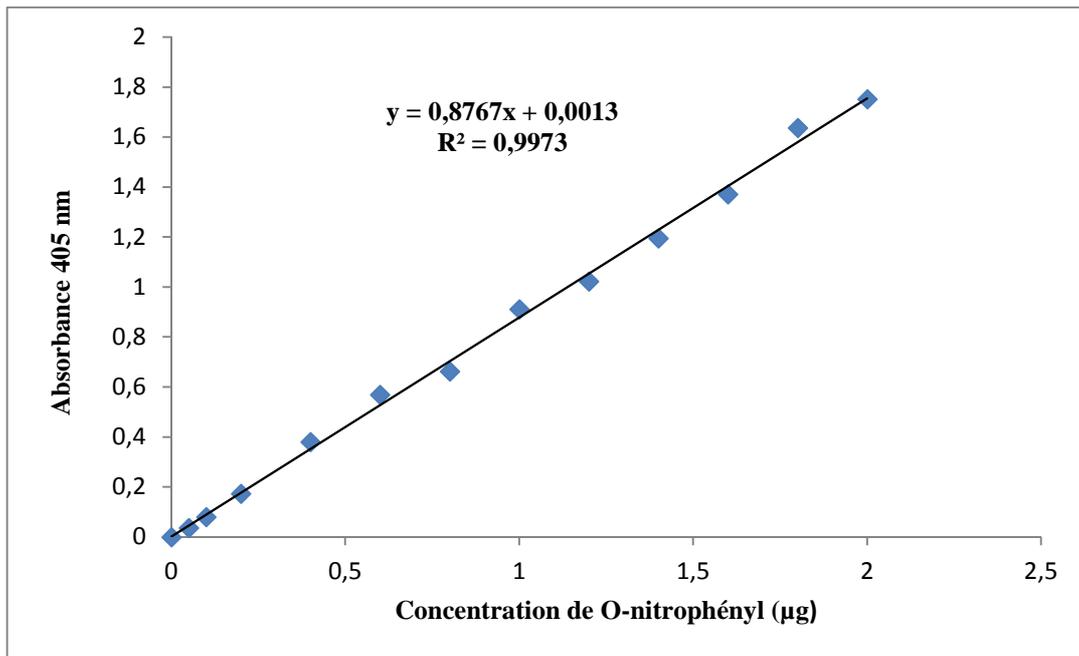
Annexe N°02 : Courbe d'étalonnage de rutine pour le dosage des flavonoïdes.



Annexe N°03 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tannins.



Annexe N°04 : Courbe d'étalonnage de l'albumine du sérum bovin (BSA) pour le dosage des protéines totales.



Annexe N°05 : Courbe d'étalonnage de O-nitrophényl (ONP) pour le dosage de l'activité de la β -galactosidase.

Résumé

Dans cette étude les extraits ethanoliques et aqueux des feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* ont été évalués sur l'activité des enzymes lysosomales, représentées dans ce cas par la β -galactosidase d'un modèle animal d'arthrite goutteuse aigue, induite par injection des cristaux d'UMS. Le traitement par les extraits ethanoliques aux doses, 100, 200 et 400 mg/kg et aqueux à 50, 100 et 200 mg/kg des feuilles et des écorces ont montré une inhibition significative de l'activité enzymatique, en particulier, l'extrait aqueux à une concentration de 200 mg/kg, qui a indiqué un effet anti-inflammatoire hautement significatif. Cependant, l'effet de ces extraits est comparable à celui des molécules de référence, la colchicine (1 mg/kg) et l'indométhacine (3 mg/kg). De ce fait, ces résultats valident en partie l'usage traditionnel de *Fraxinus angustifolia* dans le traitement de l'arthrite goutteuse et suggèrent qu'elle serait donc une source potentielle de substances anti-inflammatoires.

Mots clés : Arthrite goutteuse, cristaux d'urate monosodique (UMS), inflammation, β -galactosidase lysosomale, *Fraxinus angustifolia*.

Abstract

In this study we evaluated the effects of native ethanol extract and their respective aqueous fractions of leaves and barks of *Fraxinus angustifolia* on the activities of lysosomal enzymes, such as β -galactosidase in an animal model of gouty arthritis induced by injected UMS crystals. The treatment by ethanolic (100, 200 and 400 mg/kg) and aqueous extracts (50, 100 and 200 mg/kg) of leaves and barks showed a significant inhibition of this lysosomal enzyme release. In particular, the aqueous extract at 200 mg/kg indicated a significant anti-inflammatory effect. While, the effect of this extracts is comparable to reference molecules, colchicine (1 mg/kg) and indomethacin (3 mg/kg). So, these results validate in part *Fraxinus angustifolia* traditional use in gouty arthritis treatment and can be suggested as a potential source of anti-inflammatory substances.

Keywords : Gouty arthritis, monosodium urate crystals (MSU), inflammation, lysosomal β -galactosidase , *Fraxinus angustifolia*.