

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité : Pharmaco-toxicologie



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Activité anti-ulcère in vitro des extraits de
Clematis flammula et de Fraxinus angustifolia*

Présenté par :

NABET Thin Hinan et MOKRANE Celia

Soutenu le : **Jeudi 16 Septembre 2021**

Devant le jury composé de :

Mme. ABDERRAHIME Sabiha
Mme. BERBOUCHA Meriem
Mr. BRIBI Noureddine

MCB
MAA
MCA

Présidente
Encadreur
Examineur

Année universitaire : 2020 / 2021

Remerciements

Notre respectueuse gratitude et nos sincères remerciements vont tout d'abord à notre promotrice Mme Berboucha. M, pour avoir accepté de nous encadrer, de nous avoir transmis tout son savoir et ses compétences et de nous avoir prodigué un enseignement de qualité. Ce fut un plaisir de travailler avec elle. Un grand merci pour son dévouement.

Nous remercions Mme Abderrahime. S, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider ce jury.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Mr Bribi. N, pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons aussi à remercier tous les doctorants ainsi que toute l'équipe du laboratoire de génétique pour nous avoir apportés leur aide, en particulier Mlle Belkhir Sarah pour tout le temps et l'attention qu'elle nous a consacré.

Nous remercions également Mme Atmani. D pour sa présence et sa gentillesse.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*A mes parents,
A mon grand frère,
A ma petite sœur,
A toute ma famille,
A tous mes ami(e)s.*

NABET.T

Dédicaces

*A mes parents,
A ma grande sœur,
A ma petite sœur,
A toute ma famille,
A tous mes ami(e)s.*

MOKRANE.C

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre I : Revue bibliographique | |
| I. 1. Anatomohistologie de l'estomac | 2 |
| I. 1. 1. Anatomie | 2 |
| I. 1. 2. Histologie | 3 |
| I. 2. Physiopathologie de l'estomac | 4 |
| I. 2. 1. Physiologie | 4 |
| I. 2. 2. Pathologie | 6 |
| I. 3. Facteurs inducteurs de l'ulcère | 6 |
| I. 3. 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) | 6 |
| I. 3. 2. <i>Helicobacter pylori</i> | 6 |
| a. Cytotoxines Vac A et Cag A | 7 |
| b. Uréase | 8 |
| I. 4. Traitements de l'ulcère gastrique | 11 |
| I. 4. 1. Traitements synthétiques | 11 |
| I. 4. 2. Traitements naturels | 13 |
| a. <i>Clematis flammula</i> | 15 |
| b. <i>Fraxinus angustifolia</i> | 16 |
| Chapitre II : Matériel et méthodes | |
| II. 1. Matériel | 17 |
| II. 1. 1. Matériel non biologique | 17 |
| II. 1. 2. Matériel biologique | 17 |
| II. 2. Méthodes | 17 |
| II. 2. 1. Préparation des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et <i>Clematis flammula</i> | 17 |
| II. 2. 2. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'uréase par les extraits de <i>F.angustifolia</i> et <i>C.flammula</i> , <i>in vitro</i> | 19 |
| II. 2. 3. Analyse statistique | 20 |
| Chapitre III : Résultats et discussion | |
| III. 1. Résultats | 21 |
| III. 1. 1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la molécule de référence, acide borique, sur l'activité enzymatique de l'uréase de Jack Bean (<i>Canavalia ensiformis</i>), <i>in vitro</i> | 21 |
| III. 1. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de <i>Clematis flammula</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase de Jack Bean (<i>Canavalia ensiformis</i>), <i>in vitro</i> | 22 |
| III. 1. 3. Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase de Jack Bean (<i>Canavalia ensiformis</i>), <i>in vitro</i> | 25 |
| III. 1. 4. Détermination des IC ₅₀ | 28 |
| III. 2. Discussion | 30 |
| Conclusion | 35 |
| Références bibliographiques | |

Liste des abréviations

- **AB** : Acide borique
- **AQ CHL** : Extrait aqueux du chloroforme
- **AQEAE** : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle
- **ATP** : Adénosine triphosphate
- ***C.flammula*** : *Clematis flammula*
- **Cag A** : Gène associé à la cytotoxine A
- **Cf** : *Clematis flammula*
- **CHL** : Extrait chloroformique
- **COX** : Cyclo-oxygénase
- **EAE** : Extrait d'acétate d'éthyle
- **ETH** : Extrait éthanolique
- ***F.angustifolia*** : *Fraxinus angustifolia*
- **Fa** : *Fraxinus angustifolia*
- ***H.Pylori*** : *Helicobacter pylori*
- **H⁺/ K⁺ ATPase** : Hydrogène potassium ATPase
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice médiane à 50%
- **IL** : Interleukine
- **IPP** : Inhibiteurs des pompes à protons
- **ND** : Non déterminé
- **NF κ B** : Facteur nucléaire kappa B
- **PBS** : Phosphate buffer solution
- **pH** : Potentiel d'hydrogène
- **R²** : coefficient de corrélation
- **Vac A** : Cytotoxine vacuolisante A

Liste des figures

| | |
|---|-----------|
| Figure 1 : Anatomie générale de l'estomac | 2 |
| Figure 2 : Les différentes couches tissulaires de l'estomac | 3 |
| Figure 3 : Anatomie de la muqueuse gastrique | 5 |
| Figure 4 : Schéma représentatif des facteurs de virulence d' <i>Helicobacter pylori</i> et leurs effets majeurs lors de l'infection..... | 7 |
| Figure 5 : Réaction d'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase..... | 8 |
| Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'uréase | 9 |
| Figure 7 : Représentation simplifiée du mécanisme catalytique de l'uréase | 10 |
| Figure 8 : Photographies des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> (A) et de <i>Clematis Flammula</i> (B) | 16 |
| Figure 9 : Schéma récapitulatif de la procédure d'extraction..... | 17 |
| Figure 10 : Etapes du protocole du test d'inhibition enzymatique..... | 19 |
| Figure 11 : Effet inhibiteur de l'acide borique sur l'activité enzymatique de l'uréase <i>in vitro</i> | 20 |
| Figure 12 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>C.flammula</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase <i>in vitro</i> | 21 |
| Figure 13 : Effet inhibiteur des fractions, organique de l'acétate d'éthyle (EAE Cf), aqueux de l'acétate d'éthyle (AQ EAE Cf), organique du chloroforme (CHL Cf) et aqueux du chloroforme (AQ CHL Cf) des feuilles de <i>C.flammula</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase, <i>in vitro</i> | 23 |
| Figure 14 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>F.angustifolia</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase, <i>in vitro</i> | 24 |
| Figure 15 : Effet inhibiteur des fractions, organique de l'acétate d'éthyle (EAE Cf), aqueux de l'acétate d'éthyle (AQ EAE Cf), organique du chloroforme (CHL Cf) et aqueux du chloroforme (AQ CHL Cf) des feuilles de <i>F.angustifolia</i> sur l'activité enzymatique de l'uréase, <i>in vitro</i> | 25 |

Liste des tableaux

Tableau I : Activité anti-uréasique de quelques plantes médicinales **14**

Tableau II : Valeurs des IC₅₀, coefficients de corrélations et pourcentages d'inhibitions à 150 µg/mL, pour les différents extraits de *C.flammula*, *F.angustifolia* et acide borique. **28**

Introduction

Depuis plus d'un siècle, l'ulcère gastrique est l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité à travers le monde, et bien que sa physiopathologie n'ait pas encore été totalement élucidée, les scientifiques ont clairement identifié l'infection à *Helicobacter pylori* comme facteur jouant un rôle clé dans la pathogenèse de l'ulcère gastrique (Feder et al., 2018). En effet, grâce à l'uréase, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée pour la production d'ammoniac, la bactérie réussit à survivre à l'acidité stomacale suite à l'alcalinisation du milieu et s'attaque ainsi à la muqueuse gastrique (Follmer, 2010).

L'éradication de la bactérie s'est alors avérée être d'une importance capitale pour minimiser les complications liées aux ulcères gastriques. Et suite à l'apparition de l'antibiorésistance ainsi que de nombreux effets secondaires dus à l'utilisation de ces médicaments synthétiques, l'efficacité des traitements actuels s'est vu être considérablement restreinte. Par conséquent, la guérison complète n'est pas toujours atteinte avec la thérapie conventionnelle (Sharma et al., 2011). Les chercheurs se sont alors tournés vers des agents thérapeutiques alternatifs de source naturelle, avec peu ou pas d'effets indésirables, visant à inhiber la bactérie *Helicobacter pylori* ou encore son enzyme, l'uréase, responsable de sa persistance (Zhou et al., 2017).

Les plantes médicinales sont considérées comme la principale source de nouveaux médicaments, car elles ont moins ou pas d'effets secondaires. Les médicaments à base de plantes sont considérés comme sûrs, économiques, efficaces, relativement moins toxiques et utilisables à grande échelle (Gupta et al., 2021). En effet, les plantes sont couramment utilisées comme traitements alternatifs aux thérapies conventionnelles. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), jusqu'à 80% de la population des pays développés utilise des plantes médicinales ou des extraits obtenus de celles-ci, pour les soins de santé primaires notamment pour traiter les symptômes liés à l'ulcère gastrique ou à la gastrite (Aydin Dadfar, 2020).

Clematis flammula et *Fraxinus angustifolia* sont deux plantes locales couramment utilisées pour leurs nombreuses activités biologiques. Elles sont très recherchées pour des fins phytothérapeutiques grâce aux nombreux composés phytochimiques qu'elles contiennent (Sarfaz et al., 2017 ; Saidi et al., 2019).

En vue du rôle vital joué par l'uréase dans la protection et la survie de la bactérie, ce travail s'est concentré sur le suivi et l'évaluation du potentiel inhibiteur des extraits de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* sur l'uréase de l'haricot vert.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. 1. Anatomohistologie de l'estomac

I. 1. 1. Anatomie

Situé dans le quadrant supérieur gauche de la cavité abdominale, caudalement au foie et au centre de la coupole diaphragmatique, l'estomac, appelé également gaster est un segment dilaté du tractus digestif qui se présente en forme de sac allongé. Il fait suite à l'œsophage au niveau du cardia et se prolonge jusqu'au pylore pour déboucher sur l'intestin grêle. Sa face postérieure est couverte par le grand omentum et entre en contact avec les anses digestives et le côlon transverse (Hammoudi, 2014 ; Zeitoun *et al.*, 2017).

Selon **Marieb et Hoehn, (2014)**, l'estomac est divisé en plusieurs régions :

- **Le Cardia** : région située autour de l'orifice du cardia par lequel la nourriture provenant de l'œsophage pénètre dans l'estomac ;
- **Le fundus** : appelé également grande tubérosité de l'estomac est la région en forme de dôme qui se niche sous le diaphragme et fait saillie au-dessus et à côté du cardia ;
- **Le corps de l'estomac** : est la portion moyenne qui se prolonge vers le bas par la partie pylorique constituée de l'antré pylorique, le canal pylorique et du pylore, qui à son tour communique avec le duodénum et est fermé par le muscle sphincter pylorique régissant l'évacuation gastrique (**Figure 1**).

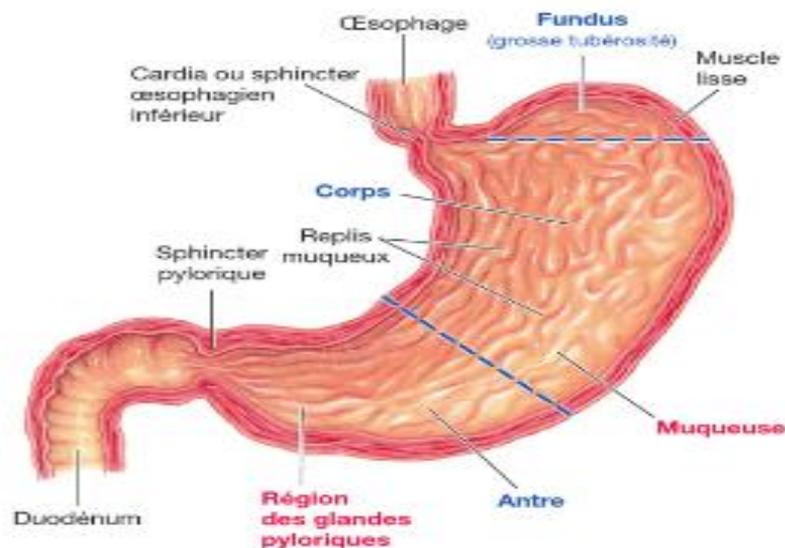


Figure 1 : Anatomie générale de l'estomac (Sherwood, 2015).

I. 1. 2. Histologie

La paroi de l'estomac est très épaisse. Selon **Hammoudi (2014)**, elle comprend de la superficie à la profondeur :

- **La séreuse** : c'est la couche qui permet de maintenir la fixité de l'estomac. Très mince et adhérente, elle est représentée par les deux feuillets du péritoine viscéral, qui tapissent sa face antérieure et postérieure, et qui forment des replis au niveau des courbures gastriques.
- **La musculuse** : elle est très développée en raison de sa motricité constante impliquée dans la digestion des aliments et comprend trois couches superposées (**Waugh et Grant, 2011**) :
 - Une couche musculaire superficielle constituée de fibres longitudinales ;
 - Une couche musculaire moyenne constituée de fibres circulaires ;
 - Une couche musculaire profonde constituée de fibres obliques.
- **La sous-muqueuse** : est un plan de glissement lâche situé entre la muqueuse et la couche musculaire profonde. Elle comprend les éléments vasculaires et nerveux de l'estomac. C'est cette vascularisation qui permet l'irrigation des cellules gastriques.
- **La muqueuse** : elle représente la première couche en contact direct avec les aliments ingérés. Elle est très épaisse et caractérisée par des reliefs à sa surface appelés les plis gastriques. Ils sont longitudinaux et bien visibles en endoscopie (**Figure 2**).

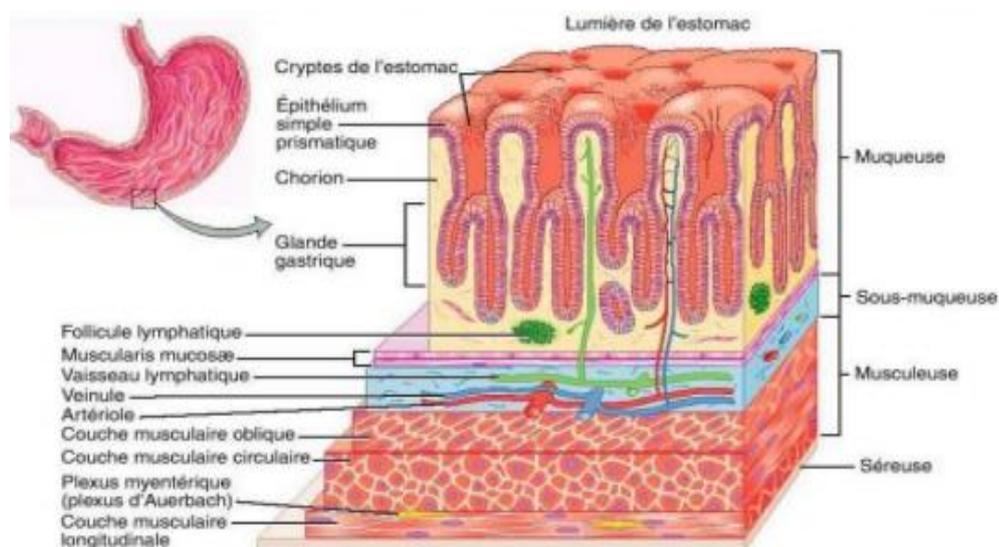


Figure 2 : Les différentes couches tissulaires de l'estomac (**Tortora et Derrickson, 2010**).

I. 2. Physiopathologie de l'estomac

I. 2. 1. Physiologie

La muqueuse gastrique citée ci-dessus est constituée de différents types cellulaires formants des glandes appelées les glandes gastriques. Celles-ci diffèrent en fonction du type de muqueuse et permettent de distinguer deux régions fonctionnelles, la région des glandes oxyntiques ou fundiques, et la région des glandes pyloriques (**Figure 3**). La muqueuse de type fundique est située dans le fundus et le corps de l'estomac et concerne 80 % de la surface gastrique (**Schubert et Peura, 2008**). Elle est composée des cellules suivantes :

- **Les cellules pariétales** : Situées dans la partie apicale des glandes, elles sont responsables de la sécrétion de l'acide chlorhydrique, facteur indispensable pour la digestion et également impliqué dans l'élimination des nombreuses bactéries ingérées avec les aliments (**Marieb et Hoehn, 2014**) ;
- **Les cellules principales** : Situées majoritairement dans la région basale des glandes gastriques, elles sécrètent le pepsinogène, précurseur de la pepsine qui catalyse la protéolyse lors de la digestion. Le pepsinogène est activé par le HCl (**Dunn, 2001**) ;
- **Les cellules à mucus** : Elles sont responsables de la sécrétion du mucus qui protège la paroi gastrique contre l'autodigestion (**Allen et Flemström, 2005**) ;
- **Les cellules endocrines** : Appelées également les endocrinocytes gastro-intestinaux sont quant à elles situées plus en profondeur dans les glandes. Elles sont responsables de la sécrétion de l'histamine ainsi que la somatostatine, médiateurs chimiques impliqués dans la régulation hormonale de l'acidité gastrique (**Marieb et Hoehn, 2015**).

Par ailleurs, la muqueuse de type pylorique se situe dans l'antrum. Les cellules des glandes pyloriques sont composées de cellules exocrines et endocrines, constituées respectivement des cellules à mucus et des cellules sécrétrices de gastrine (**Schubert et Peura, 2008**).

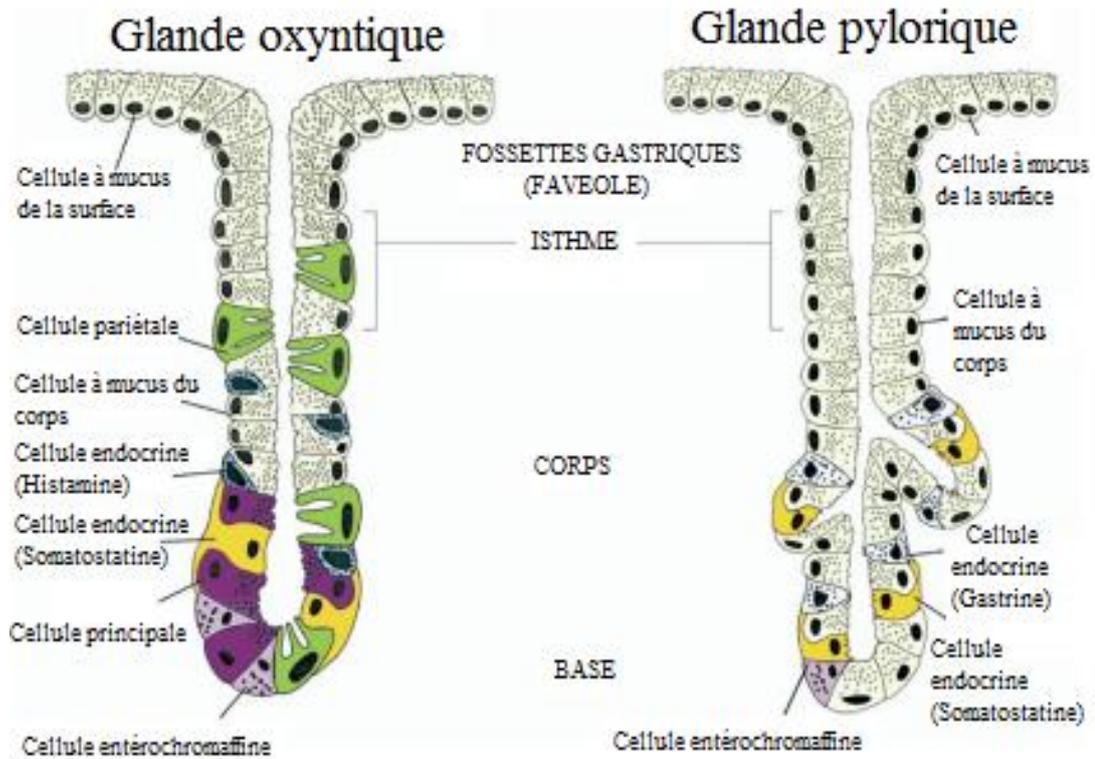


Figure 3 : Anatomie de la muqueuse gastrique (Schubert et Peura, 2008).

➤ Régulation de l'acidité gastrique

La sécrétion acide au niveau de l'estomac est régie par une action coordonnée de réseaux neuronaux (reflexes longs et courts), hormonaux et paracrines. Ces trois types de régulation sont respectivement assurés par l'acétylcholine, l'histamine et la gastrine. L'inhibition est quant à elle assurée par la somatostatine qui intervient pour inhiber et stopper la sécrétion acide. Ils ont tous une action directe sur les cellules pariétales, siège des pompes à protons. Les stimulus responsables de la régulation de la sécrétion gastrique proviennent de trois régions principales : l'encéphale, l'estomac et l'intestin grêle (Waldum *et al.*, 2014 ; Bazin et Lamarque, 2018).

Une fois libérée, l'histamine se lie aux récepteurs H_2 de l'estomac, ce qui active l'adénylate cyclase pour générer de l'AMP cyclique (AMPc). Ensuite, la gastrine se lie aux récepteurs CCK_2 qui activent la phospholipase C induisant la libération du calcium cytosolique. L'augmentation de ce dernier va induire le couplage de l'acétyl choline (ACH) aux récepteurs M_3 , liaison ayant pour effet l'inhibition de la somatostatine. Une cascade de signalisation cellulaire dépendante de l'AMPc et du Ca^{2+} est alors initiée induisant l'activation de la pompe à proton H^+/K^+ ATPase. La sécrétion de somatostatine est quant à elle stimulée par l'augmentation du taux d'HCl au niveau gastrique. Lorsque celui-ci devient trop élevé, il exerce une retro inhibition et induit l'arrêt de la sécrétion acide (Makhlouf et Schubert, 1990).

Grâce à sa physiologie cellulaire, l'estomac permet d'assurer une partie de la digestion par des fonctions mécaniques et chimiques. Son pH varie entre 1,5 et 5 et permet de digérer divers types d'aliments. Dans le cas physiologique normal, l'estomac ne se digère pas elle-même grâce aux cellules sécrétrices de mucus qui tapissent et protègent sa paroi. Cependant, si ces cellules viennent à céder, l'acide chlorhydrique sécrété par les cellules pariétales s'attaque à la paroi gastrique induisant des ulcérations (Lewin, 1995 ; Mustapha, 2011).

I. 2. 2. Pathologie

➤ Ulcère gastrique

L'ulcère gastrique est une perte de substance atteignant la musculature. Il est localisé vers l'antrum, plus précisément dans la région de transition entre le corps de l'estomac et l'antrum. Il est lié à un déséquilibre entre les facteurs d'agression et les facteurs de protection de la muqueuse. L'ulcère est à différencier des érosions et abrasions qui touchent la muqueuse et les ulcérations qui touchent la sous-muqueuse, atteintes plus superficielles puisqu'elles n'atteignent pas la musculature. Deux agents éventuellement associés sont à l'origine de la très grande majorité des ulcères gastroduodénaux : les anti-inflammatoires non stéroïdiens et *Helicobacter pylori* (Mustapha, 2011 ; Zeitoun *et al.*, 2017).

I. 3. Facteurs inducteurs de l'ulcère

I. 3. 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont une classe de médicaments hétérogènes largement utilisés en tant qu'analgésiques et antipyrétiques. Ce sont des médicaments symptomatiques qui n'agissent pas sur la cause de l'inflammation. Leur action consiste à diminuer la production des prostaglandines en inhibant l'activité des deux isoformes de cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2). Les prostaglandines sont des molécules cytoprotectrices, initialement impliquées dans la stimulation de la sécrétion du mucus gastrique, l'inhibition de ces dernières induit une diminution du mucus protecteur de la paroi stomacale, la rendant vulnérable aux attaques acides (Wallace, 2000).

I. 3. 2. *Helicobacter pylori*

En 1982, deux chercheurs australiens, J. Robin Warren anatomopathologiste et Barry J. Marshall gastro-entérologue ont cultivé des organismes issus d'estomac de patients souffrant de différentes maladies gastroduodénales. A partir de là, ils ont identifié une bactérie, qu'ils ont nommé tout d'abord *Campylobacter pyrolydis* en raison de sa ressemblance au genre *Campylobacter* puis *Campylobacter pylori* par la suite.

Mais suite au séquençage de son ADN, cette bactérie a été classée dans un nouveau genre. En raison de son aspect hélicoïdal elle sera rebaptisée *Helicobacter pylori* (Marshall et Warren, 1984). C'est la première bactérie reconnue oncogène chez l'homme. Toutefois, seuls 10 à 20 % des individus infectés développent une pathologie gastrique (Hunt, 1998). Elle arrive à coloniser l'estomac par le biais des facteurs de virulence suivants :

a. Cytotoxines Vac A et Cag A

La virulence de *Helicobacter pylori* dépend de plusieurs facteurs, notamment des facteurs Cag A (Gène associé à la cytotoxine A) et Vac A (Cytotoxine vacuolisante A), des protéines issues de l'expression de leurs gènes respectifs Cag A et Vac A (Robinson et al., 2007). En effet, la cytotoxine vacuolisante A est une protéine de haut poids moléculaire ayant pour rôle la formation de canaux membranaires au niveau des cellules épithéliales gastriques. Ces derniers pénètrent dans la membrane des endosomes et des mitochondries, provoquant la vacuolisation puis l'apoptose des cellules épithéliales gastriques. La formation de ces canaux favorise également la diffusion de l'urée à travers l'épithélium et ainsi, permet à l'uréase d'assurer ses fonctions et de maintenir la prolifération bactérienne (Montecucco et De Bernard, 2003).

La Cag A, quant à elle, est une protéine appartenant à un complexe protéique nommé Cag-T4SS (Système de Sécrétion Cag de Type IV). Celui-ci est codé par le gène Cag Pal situé au niveau de l'îlot de pathogénicité de la bactérie. Le complexe assure la translocation de la Cag A vers les cellules épithéliales où elle subit une phosphorylation par les kinases cellulaires au niveau d'un résidu tyrosine. Une fois phosphorylée, la cytotoxine s'associe aux protéines cellulaires et entraîne l'activation de cascades moléculaires aboutissant à une prolifération cellulaire et des remaniements du cytosquelette. La CagA active également la voie du NF- κ B qui induit une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'interleukine IL-8, ce qui déclenche la réaction inflammatoire au niveau du foyer infectieux (Figure 5) (Brandt et al., 2005 ; Backert et al., 2015).

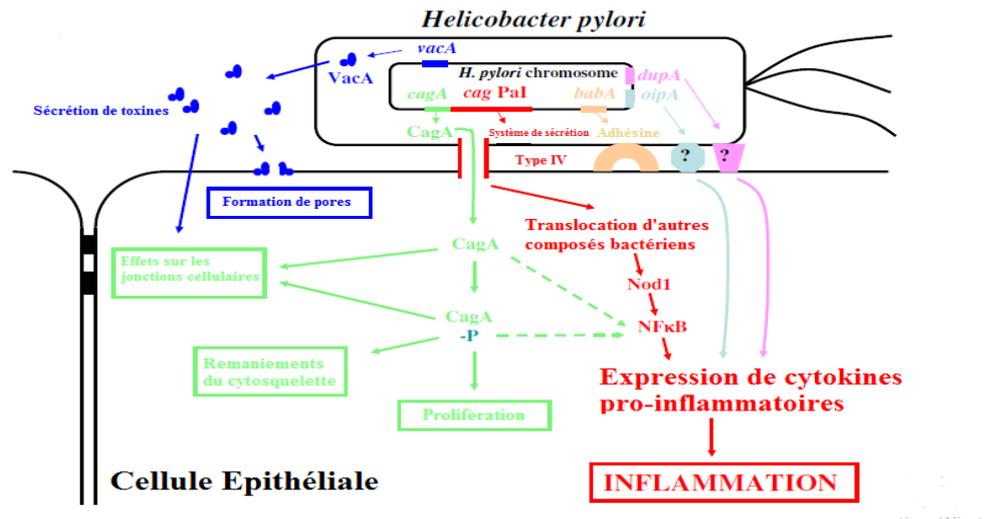


Figure 4 : Schéma représentatif des facteurs de virulence d'*Helicobacter pylori* et leurs effets majeurs lors de l'infection (Robinson et al., 2007).

Helicobacter pylori possède également un riche équipement enzymatique lui permettant de survivre et de coloniser la muqueuse gastrique. L'uréase est une enzyme clé bénéficiant à la bactérie *H. pylori* en rendant sa persistance possible dans l'environnement acide de l'estomac et par conséquent, provoque des maladies gastro-intestinales, en l'occurrence l'ulcère gastroduodéal (Sobhani et al., 1991 ; Mégraud, 1994).

b. Uréase :

L'uréase est une métalloenzyme nickel dépendante, synthétisée par une large variété d'organismes vivants à savoir les plantes, les bactéries et les champignons. Cependant, aucune uréase d'origine animale n'a encore été mise en évidence (Mobley et Hausinger, 1989 ; Ligabue-Braun et al., 2013).

L'uréase de l'haricot vert (*Canavalia ensiformis*) a été la première enzyme à être cristallisée, prouvant que les enzymes sont de nature protéique. Elle appartient à la super famille des aminohydrolases et des phosphotriesterases et exerce une fonction catalytique aboutissant à l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone. La première étape est une dégradation enzymatique de l'urée en ammoniac et carbamate. Ce dernier est ensuite spontanément hydrolysé formant une deuxième molécule d'ammoniac et du dioxyde de carbone (Figure 6). Cette réaction a pour résultat une augmentation du pH due à la production d'ammoniac, molécule de nature basique (Dixon et al., 1975 ; Sujoy et Aparna, 2013).

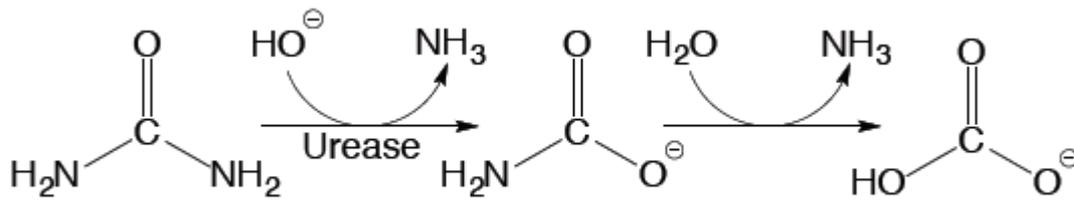


Figure 5 : Réaction d'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase (Ciurli *et al.*, 1999).

- Structure

L'uréase existe sous forme d'homotrimères qui peuvent s'associer pour former des hexamères de sous-unités identiques de 90 kDa contenant deux ions de nickel par sous-unité (**Figure 7**). Les uréases végétales sont constituées d'un polypeptide à chaîne unique, dont la structure se présente sous forme d'un marteau ou encore d'un « T ». Cet homotrimère à chaîne unique se compose de quatre domaines : le domaine $\alpha\beta$ N-terminal (1–134) formant la poignée du marteau, qui est reliée à un autre domaine $\alpha\beta$ (135–285) qui forme quant à lui l'extrémité de la tête du marteau. Le deuxième domaine $\alpha\beta$ est connecté à un domaine β (286–401 et 702–761), la région médiane de la tête du marteau. Cette dernière est suivie d'un domaine en barillet C-terminal ($\alpha\beta$) (402–701 et 762–840), formant l'autre extrémité de la tête de marteau contenant le site actif (Follmer, 2008 ; Balasubramanian et Ponnuraj, 2010).

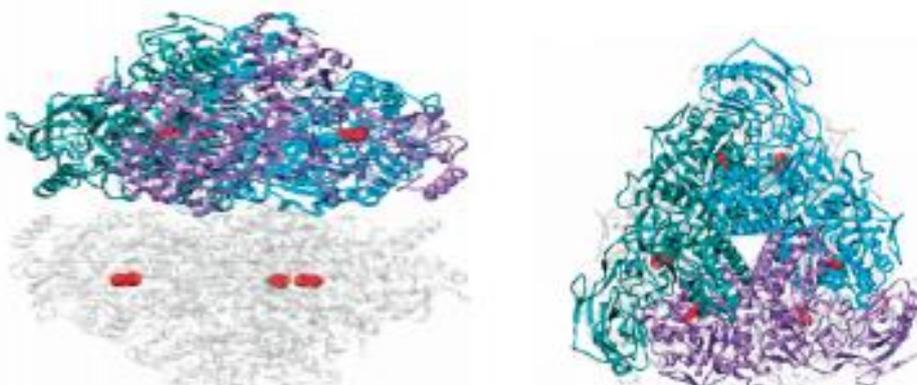


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'uréase (Zambelli *et al.*, 2011).

Le site catalytique de l'uréase de Jack Bean est très similaire à celui des uréases bactériennes. Il contient deux atomes de nickel Ni₁ et Ni₂ situés au niveau du centre de l'enzyme. Un mécanisme réactionnel d'hydrolyse a été proposé stipulant qu'un des ions nickel a pour fonction de se lier au substrat pendant que le deuxième ion se lie à un ion hydroxyle. Ce dernier agit comme un puissant nucléophile qui attaque le carbone carbonyle du substrat (**Dixon et al., 1980**).

Selon **Takishima et ses collaborateurs (1988)**, parmi les 25 résidus histidine constitutifs de l'uréase, 13 sont regroupés dans une région située entre les résidus 479 et 607, suggérant que cette région pourrait être le site de liaison à l'atome de nickel. En effet, les résidus His519, His545, et Lys490 sont liés à l'atome Ni₁ chargé de la liaison au substrat, tandis que les résidus His407, His409, Asp633, et Lys490 sont liés au Ni₂.

De plus, chaque atome de nickel est lié à une molécule d'eau et le pontage entre les deux atomes de nickel est assuré par une troisième molécule d'eau associée au résidu Lys490 carbamylé (**Balasubramanian et Ponnuraj, 2010**).

- Mécanisme d'action

Afin d'activer l'ion Ni₁, l'urée se lie à ce dernier par l'intermédiaire de l'oxygène carbonyle et prend la place des molécules d'eau 1 et 3 présentes au niveau du site actif de l'uréase, induisant ainsi une augmentation du potentiel électrophile du carbone du substrat le rendant plus sensible à l'attaque nucléophile citée auparavant. Ensuite, l'urée se lie à l'ion Ni₂ par le biais d'un de ses atomes d'azote aminé et établit une liaison bidentée avec l'uréase. Cette liaison permet de faciliter l'attaque nucléophile de l'eau sur le carbone carbonyle, ayant pour résultat la formation d'un intermédiaire tétraédrique, à partir duquel l'ammoniaque et le carbamate sont libérés (**Figure 7**) (**Sirko et Brodzik, 2000**).

Il existe cependant une divergence de points de vue en ce qui concerne l'attaque nucléophile. En effet, selon **Benini et son équipe (1999)** l'attaque nucléophile est réalisée par l'hydroxyle de pontage qui fournit le carbamate, tandis que **Karplus et ses collaborateurs (1997)** ont soutenu que c'est un résidu Histidine qui est responsable de cette attaque. Quant à **Estiu et Merz (2007)**, ils se sont basés sur des modèles informatiques simplifiés pour le site actif et ont proposé que l'hydrolyse et l'élimination puissent se produire de manière compétitive dans les uréases, dans lesquelles une élimination assistée par la protéine serait plus représentative.

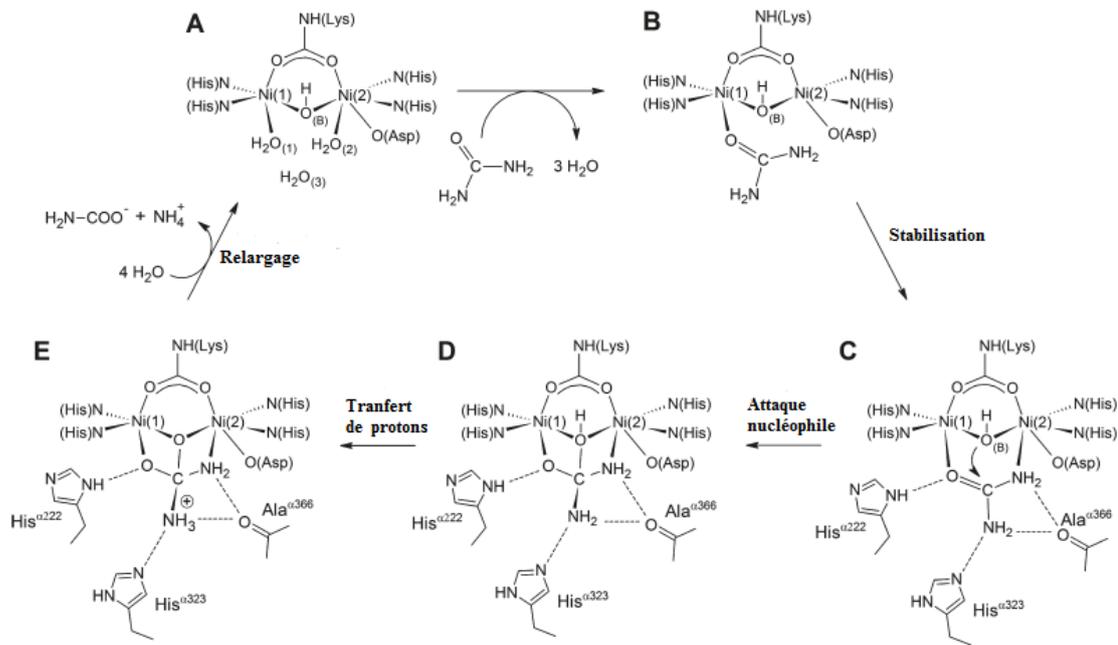


Figure 7 : Représentation simplifiée du mécanisme catalytique de l'uréease (Zambelli et al., 2011).

I. 4. Traitements de l'ulcère gastrique

I. 4. 1. Traitements synthétiques

Le traitement des manifestations ulcéreuses combine deux aspects : la diminution de l'hypersécrétion d'acide chlorhydrique et l'éradication d'*Helicobacter pylori*. Le traitement utilisé est donc une association d'un ou de plusieurs antibiotiques avec un anti-sécrétoire.

✓ **Inhibiteurs des pompes à protons (IPP ou anti-sécrétoires) :** L'oméprazole a été le premier IPP mis sur le marché en 1980 et est depuis le médicament le plus utilisé dans le traitement des troubles gastriques liés aux sécrétions acides. Il a par la suite été suivi par le lansoprazole, le pantoprazole, l'ésoméprazole et le rabéprazole. Ces molécules agissent en se liant de façon covalente avec la sous-unité α de la pompe H^+/K^+ ATPase, ce qui induit son inhibition de manière totale et irréversible, donc une diminution des protons H^+ atteignant la cavité stomacale (Lewin, 1995 ; Bisch et al., 2009).

✓ **L'amoxicilline :** C'est un antimicrobien bêta-lactamine à large spectre Gram positif et négatif. Elle appartient au groupe des pénicillines A caractérisées par une excellente diffusibilité cellulaire. Elle exerce un effet bactéricide en se liant aux protéines de liaison aux pénicillines induisant la lyse de la paroi bactérienne (Douša et Hosmanová, 2005).

✓ **Clarithromycine** : La clarithromycine est un macrolide à large spectre positif et négatif dont la stabilité et la pharmacocinétique sont considérablement améliorés en milieu acide. Il diffuse remarquablement bien dans les tissus et les compartiments cellulaires (Ferrero *et al.*, 1990 ; Brown *et al.*, 1992).

✓ **Tétracycline** : Les tétracyclines (ou encore cyclines) sont des antibiotiques dérivés de la tétracycline. Elle exerce un effet bactériostatique et inhibe la synthèse des protéines en bloquant spécifiquement le cycle d'élongation, empêchant ainsi l' aminoacyl-ARNt entrant (aa-ARNt) de se lier au site ribosomique A (Brodersen *et al.*, 2000).

✓ **Métronidazole** : Le métronidazole (MTZ) est un dérivé synthétique du nitroimidazole qui a été largement utilisé pour le traitement de plusieurs infections bactériennes et parasitaires. Doté d'une excellente diffusibilité tissulaire, le métronidazole interagit avec des électrons à faible potentiel redox, induisant sa réduction en composés actifs et cytotoxiques (Finegold, 1980 ; Adil *et al.*, 2018).

Les stratégies thérapeutiques employées sont la trithérapie standard, la quadrithérapie séquentielle, la quadrithérapie concomitante et la quadrithérapie bismuthée. Une bithérapie associant l'oméprazole à l'amoxicilline ou la clarithromycine a initialement été proposée. Celle-ci présente, en effet, des avantages non négligeables, notamment en termes de coûts, mais reste cependant moins intéressante en termes d'efficacité que les thérapies actuelles (Carrère *et al.*, 1996).

La thérapie de première ligne est la trithérapie standard. Elle combine l'oméprazole à l'amoxicilline et la clarithromycine administrés pendant une durée de sept à 14 jours. Une éradication de 80 % a été observée chez les patients traités, faisant de la thérapie standard l'association de référence pour le traitement de l'ulcère. Néanmoins, l'apparition d'une résistance à la clarithromycine a entraîné une diminution non négligeable de l'efficacité du traitement (Papastergiou *et al.*, 2014).

La quadrithérapie séquentielle a été proposée comme alternative à la trithérapie standard pour l'éradication de *H.pylori*. L'objectif principal étant de surmonter la résistance à la

clarithromycine. Cette thérapie associe un IPP à l'amoxicilline pendant une durée de cinq jours, puis l'IPP à la clarithromycine et au métronidazole pendant les cinq jours qui suivent. Un traitement de 7 ou de 14 jours peut être également prescrit dans certains cas (**Bensaada et al., 2019**).

La quadrithérapie concomitante associe, quant à elle un IPP, l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole pendant toute la durée du traitement. Elle est recommandée en première intention pour traiter les patients présentant une haute résistance aux antibiotiques administrés (**Malfertheiner et al., 2017**).

Enfin, la quadrithérapie bismuthée combine un IPP, du subcitra de Bismuth ainsi que deux antibiotiques à savoir la tétracycline et le métronidazole pendant une période variant entre 7 à 14 jours. Le taux d'éradication de cette thérapie est supérieur à 90% et aucun effet secondaire grave n'a été observé chez les patients (**O'Connor et al., 2010**).

Le taux d'éradication est évidemment un paramètre clé dans la comparaison des multi-thérapies envisagées et détermine en grande partie l'efficacité du traitement. Aujourd'hui, la résistance de *H.pylori* aux macrolides, aux fluoroquinolones et aux nitroimidazoles s'accroît progressivement en raison de l'utilisation généralisée de ces antibiotiques, ce qui a considérablement modifié l'incidence de l'ulcère gastroduodénale (**Cover et Blaser, 2009**).

I. 4. 2. Traitements naturels

L'augmentation de l'antibiorésistance diminue l'efficacité des thérapies actuelles contre *H.pylori* et peut laisser présager des difficultés futures dans notre capacité à traiter l'ulcération gastrique avec des antibiotiques (**Cover et Blaser, 2009**).

Actuellement, une des meilleures alternatives qui se présente est la phytothérapie. En effet, plusieurs études antérieures ont démontré les propriétés inhibitrices d'un grand nombre de plantes médicinales suggérant que celles-ci pourraient être des traitements alternatifs de choix face aux ulcères gastriques.

Tableau I : Activité anti-urésique de quelques plantes médicinales.

| <i>Plantes</i> | <i>Extraits</i> | <i>IC50</i> | <i>Type d'inhibition</i> | <i>Effet antibactérien</i> |
|--|---|------------------|---|---------------------------------|
| <i>Paeonia lactiflora</i> (Ngan et al., 2012) | Méthyl gallate | 1,33 mM | ND | Bactéricide |
| | Acide benzoïque | 17,95 mM | | |
| <i>Radix Scutellariae</i> (Tan et al., 2013) | Baicaline | 2,74 ± 0,51 µM | Compétitive et concentration dépendante | ND |
| <i>Coptis chinensis</i> (Zhou et al., 2017) | Palmatine | 0,53 ± 0,01 mM | Non compétitive et concentration dépendante | Bactériostatique |
| <i>Indigofera gerardiana</i> Wall. (Tariq et al., 2011) | Indigoférine – B | 23,33 ± 0,11 µM | ND | ND |
| | Indigoférine – C | 49,7 ± 0,40 µM | | |
| <i>Rhizoma coptidis</i> (Tan et al., 2017) | Epiberberine | 2,3 ± 0,01 µM | Compétitive et concentration dépendante | ND |
| <i>Hypochaeris radicata</i> (Abu-Izneid et al., 2020). | Composés phytochimiques | 180.11 ± 2.00 µM | ND | ND |
| | Sesquiterpènes (guaiane) | 27.18 ± 0.80 µM | | |
| | Conferine | 24.12 ± 0.2 µM | | |
| | Scopoletine | 30.12 ± 1.10 µM | | |
| <i>Hibiscus rosa sinensis</i> (Trung et al., 2020) | Nargénine | 0,575 mM | ND | Bactéricide et bactériostatique |
| | Lutéoline | 0,402 mM | | |
| <i>Euphorbia decipiens</i> (Ahmad et al., 2003) | 3, 7, 15 - Tri- O – acetyl -5- O- nicotinoyl - 13,14 - dihydroxymyrsinole | 81,9 µM | Incompétitive | ND |

Dans le but de rechercher des substances à effet anti-ulcère, notre étude s'est intéressée au potentiel inhibiteur de deux plantes locales *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*, connues pour leurs diverses applications en médecine traditionnelle et dont les propriétés anti-inflammatoires ont déjà été mises en évidence.

a. *Clematis flammula*

- **Description**

Clematis flammula est une espèce ligneuse, grimpante et vigoureuse, d'environ 5m de long, à feuilles bipennées et caduques, composées de 5 à 7 folioles étroites. Elle présente des fleurs blanches et odorantes, à floraison en période estivale (de juin à aout) (Baba Aissa, 1999). Connue sous son nom kablye azenzou, ou encore Clématite brulante en français et Yasmine el-ber en arabe, cette plante est caractérisé par la présence de proto-anémone au niveau des feuilles, une molécule extrêmement irritante pour la peau et les muqueuses (Bézanger-Beauquesne, 1990).

- **Taxonomie**

Clematis flammula, appartient au genre *Clematis*, de la famille des Ranunculaceae, d'ordre des Ranunculales, Classe des Dicotylédones et embranchement des Spermaphytes, du règne Végétal (Subramanyam, 1996).

- **Distribution**

C.flammula est une plante caractéristique du bassin méditerranéen, très répandu dans les haies et les bois. Elle est cultivée en Europe du sud et en Afrique du nord comme plante médicinale et fait partie des 147 espèces de *Clematis* recensées en chine (Wu et al., 2001).

- **Utilisation**

La clématite est une source botanique de divers composants pharmacologiquement actifs, qui a longtemps été utilisée en médecine conventionnelle depuis le début de la civilisation chinoise. Traditionnellement, administrée par voie orale pour traiter la polyarthrite rhumatoïde, les troubles osseux, les maladies chroniques de la peau et est utilisé comme diurétique. Par ailleurs, la clématite est appliquée sur les surfaces corporelles pour les ampoules et est également utilisée comme cataplasme pour traiter les infections purulentes et les ulcères (Hao et al., 2013). Dans les revues de la littérature, l'effet anti-inflammatoire (Bremner et al., 2009) et le potentiel antioxydant des extraits de feuilles de *Clematis flammula* ont été étudiés (Atmani et al., 2009).

b. *Fraxinus angustifolia*

- **Description**

Fraxinus angustifolia, communément appelée en français, Frêne à feuilles étroite, en arabe Dardar, et en kabyle Aslen, est un arbre ou arbuste à feuilles adultes grandes, composées de 5 à 13 grandes folioles, ovales-lancéolées, et toutes similaire. Il est caractérisé par des inflorescences en grappes allongées et ramifiées, et des bourgeons brunâtres. Ses fruits sont de formes ovales, lancéolés, et aigus au sommet. Sa période de floraison est en Avril - Mai (Beloued, 2005).

- **Taxonomie**

Fraxinus angustifolia, appartient au genre *Fraxinus*, de la famille des Oléacées, d'ordre des Lamiales, Classe des Dicotylédones, sous-embranchement des Angiospermes, et embranchement des Spermaphytes, du règne Végétal (Wallander, 2008).

- **Distribution**

La répartition du frêne commun couvre le sud-ouest de l'Europe et le nord-ouest de l'Afrique, il pousse en bords des eaux, bords des bois et des habitations (Beloued, 2005).

- **Utilisation**

Le frêne est connu et très utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies. En effet, les feuilles sont efficaces pour la régulation des selles et contre les parasites intestinaux. L'écorce est utilisée contre les hémorragies passives, la goutte atonique, la lithiase biliaire et contre les fièvres intermittentes. Les semences possèdent des vertus antirhumatismales et antigoutteuses (Beloued, 2005).

Des investigations ont démontré les activités antidiabétiques et hépatoprotectrices des extraits de la plante (Medjahed et al., 2016). Les vertus cicatrisantes des extraits de feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* ont également été explorées par (Moulaoui et al., 2015).

L'objectif de notre travail est une contribution à l'effet anti-ulcère gastrique des extraits de *F.angustifolia* et *C.flammula*, en évaluant leur effet inhibiteur sur l'uréase de Jack Bean.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II. 1. Matériel

II. 1. 1. Matériel non biologique

- **Appareillage :** Lecteur de microplaque (Synergy HTX multi-mode Reader Biotek), incubateur (Post PST-60 HL Thermo Shaker), pH mètre (pH 209 HANNA instruments), balance de précision (RADWAG AS 220/C/2), plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA AM4 Multiple Heating Magnetic Stirrer), vortex (VELP) microplaques 96 puits, verrerie, micropipettes...
- **Réactifs :** Uréase de l'haricot vert, *Canavalia ensiformis* (SIGMA), méthanol (96%) (Faprolab), urée (CH₄N₂O), phénol (C₆H₆O), acide borique (H₃BO₃), albumine de sérum bovin, hypochlorite de sodium (NaClO), nitroprusside de sodium (C₅FeN₆Na₂O) (SIGMA), hydroxyde de sodium (NaOH), potassium phosphate dibasic trihydrate (HK₂O₄P), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) (BIOCHEM Chemopharma), eau ultra filtrée (Milli Q water, SIGMA).

II. 1. 2. Matériel biologique



A



B

Figure 8 : Photographies des feuilles de *Fraxinus angustifolia* (A) et de *Clematis Flammula* (B) (**originale**).

II. 2. Méthodes

II. 2. 1. Préparation des extraits de feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*

✓ Récolte

Les plantes utilisées, plus précisément les feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* (**Figure 8**), ont été respectivement récoltées en juillet 2018 à Chemini, Sidi Aich-Béjaia et en mai 2020 à Azru n Bechar, Amizour-Béjaia. Leur identification a été par la suite faite au sein du laboratoire de botanique de l'université de Béjaia.

✓ **Broyage**

Une fois les plantes identifiées, les feuilles sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique, ensuite tamisées pour obtenir une poudre fine de 0.63 nm de diamètre.

✓ **Extraction**

L'extraction appliquée dans cette étude est celle de **Chiang et ses collaborateurs (1993)** modifiée par **Atmani et ses collaborateurs (2009)**.

Une première étape d'extraction solide-liquide est préparée par macération des poudres fines obtenues des feuilles de *F.angustifolia* et *C.flammula* avec de l'éthanol à 96% (200 g de poudre pour 800 mL d'éthanol). La suspension éthanolique est laissée décantée, pendant une nuit. Par la suite, le surnageant est récupéré et séché sous hotte. L'extrait éthanolique obtenu est ensuite fractionné avec une solution d'acétate d'éthyle et d'eau distillée pour obtenir deux extraits, à savoir aqueux et organique d'acétate d'éthyle. Ce dernier est à son tour fractionné par une solution aqueuse de chloroforme, afin d'obtenir les deux derniers extraits aqueux et organique du chloroforme (**Figure 9**).

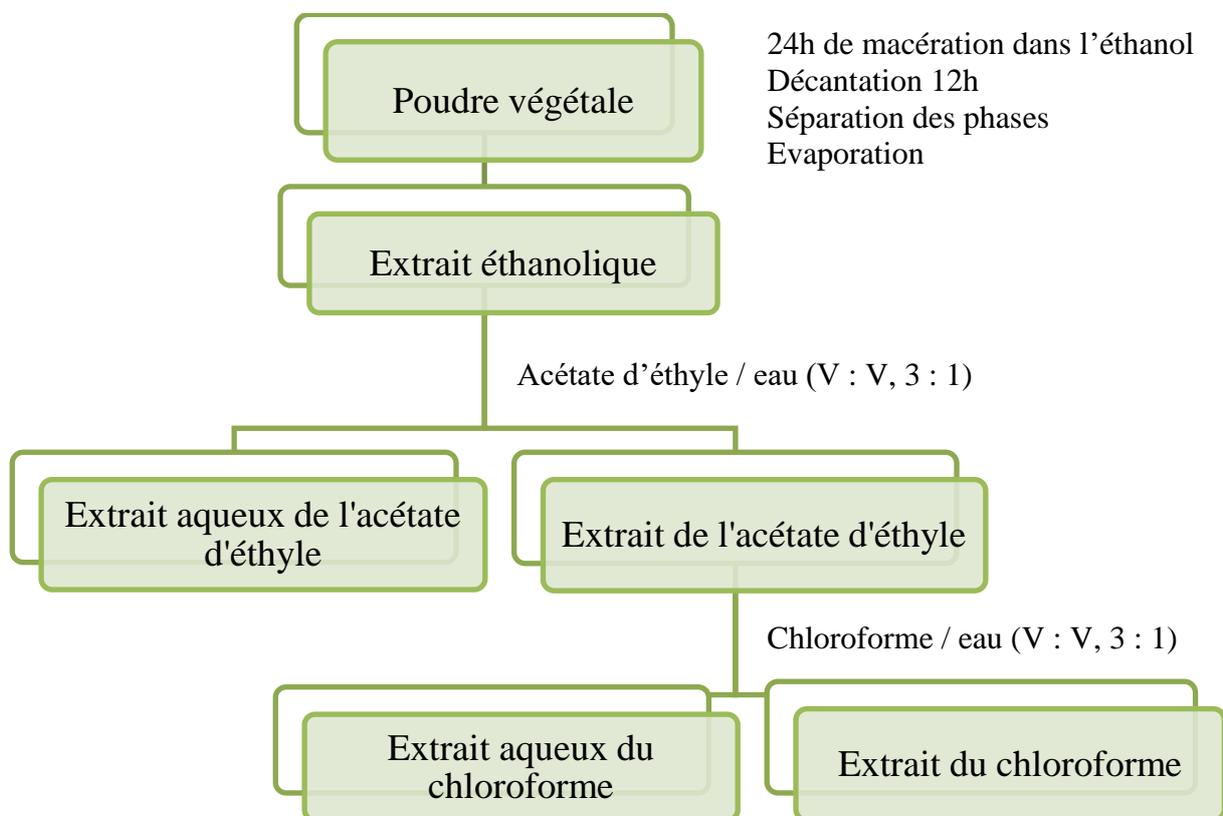


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la procédure d'extraction (**Atmani et al., 2011**).

II. 2. 2. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'uréase, par les pextraits de *F.angustifolia* et *C.flammula*, *in vitro*

✓ Mode opératoire

Afin de tester l'effet inhibiteur des extraits de *F.angustifolia* et *C.flammula* sur l'uréase, le protocole de **Weatherburn, (1967)** a été adopté.

Pour effectuer ce test, on injecte 25 µL d'uréase (4U), préalablement préparée dans une solution tampon PBS sur une microplaque à 96 puits. 15 µL des différents extraits des feuilles des deux plantes étudiées ou d'acide borique, à différentes concentrations (75–750 µg/mL) sont, par la suite ajoutés à l'enzyme et le tout est incubé à 30°C, pendant 15 minutes. Une fois le temps d'incubation écoulé, on ajoute 40 µL d'urée (100 mM) et on ré-incube à 30°, pendant 30 minutes. Par la suite, on ajoute 50 µL de phénol (1% de phénol + 0.005% de nitroprusside de sodium), puis 70 µL du réactif alcalin à 5% (0.5% de NaOH + 0.1% de NaOCl) au mélange réactionnel et on incube à 30°, pendant 50 minutes et on lance la cinétique enzymatique. L'absorbance est mesurée à 630 nm chaque 5 minutes, pendant les 50 minutes d'incubation (**Figure 10**).

Chaque concentration d'extrait a été testé trois fois (triplicatas), et leur pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Absorbance du control positif}) - (\text{Absorbance de l'extrait})}{(\text{Absorbance du control positif})} \times 100$$

Une corrélation entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations a été établie afin d'obtenir les concentrations inhibitrices à 50% de chaque extrait (IC₅₀). Une régression non-linéaire a été appliquée, à l'aide de GraphPad Prism 9 qui donne accès à cette valeur caractéristique de chaque extrait.



Figure 10 : Etapes du protocole du test d'inhibition enzymatique (**photos originales**).

II. 2. 3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism9 (GraphPad Software, Inc.). Les données sont exprimées en tant que moyennes \pm écart-type (SD) et les différences statistiques entre les groupes ont été calculées par une analyse de la variance à sens unique (ANOVA) suivie du test de Tukey. Les différences ont été considérées significatives à partir de * $p < 0.05$.

Chapitre III

Résultats et discussion

III. 1. Résultats

III. 1. 1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la molécule de référence, acide borique, sur l'activité enzymatique de l'uréase de Jack Bean (*Canavalia ensiformis*), *in vitro*

L'effet inhibiteur de l'acide borique sur l'activité de l'uréase, à différentes concentrations (75, 150, 300, 600, 750, 900 et 1050 $\mu\text{g/mL}$), est illustré dans l'histogramme ci-dessous.

Cet effet inhibiteur est calculé par rapport à un contrôle de l'enzyme uréase, effectué au préalable à chaque lancement du test et où une activité enzymatique maximale et reproductible a été constatée lors de l'incubation, ce qui a servi comme référence pour le calcul des pourcentages d'inhibition. De plus, ce contrôle d'enzyme nous confirme que l'enzyme est fonctionnelle et dotée d'une bonne activité catalytique.

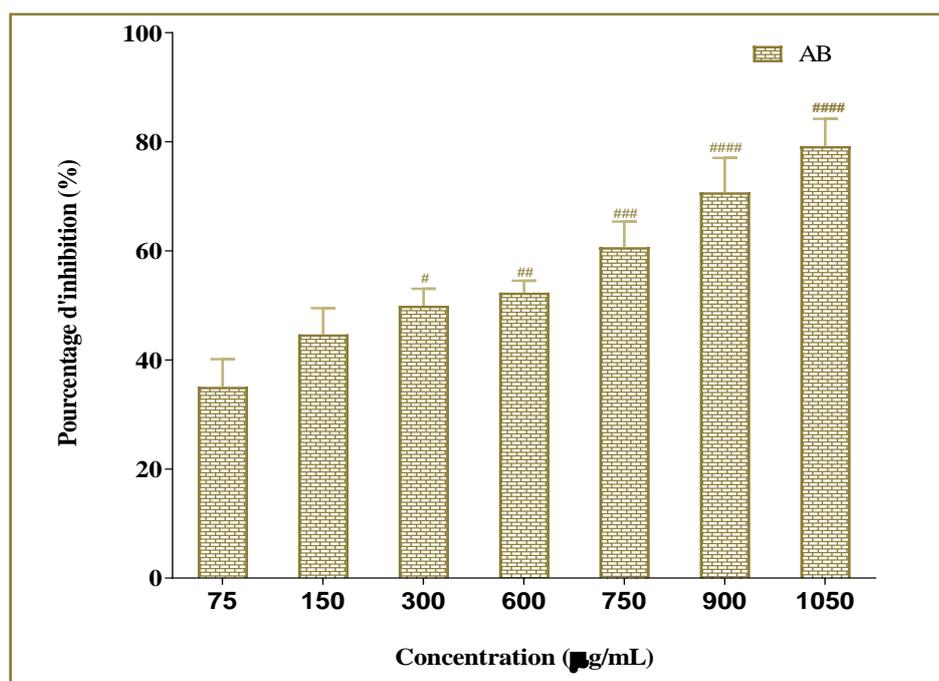


Figure 11 : Effet inhibiteur de l'acide borique sur l'activité enzymatique de l'uréase, *in vitro*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.D. (n=3). Les comparaisons sont faites par rapport à la concentration de 75 $\mu\text{g/mL}$ (#). Les valeurs sont considérées significatives à $P < 0.05$.

D'après les résultats obtenus, l'activité inhibitrice de l'acide borique est concentration dépendante. En effet, on observe une augmentation significative du pourcentage d'inhibition à partir d'une concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$ (49.96%).

L'activité maximale est révélée à une concentration de 1050 $\mu\text{g/mL}$ avec un très bon pourcentage d'inhibition de 80%. Par ailleurs, les concentrations de 75 et 150 $\mu\text{g/mL}$ exhibent des pourcentages respectifs de 35.09 et 44.70%.

III. 1. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *Clematis flammula* sur l'activité enzymatique de l'uréease de Jack Bean (*Canavalia ensiformis*), *in vitro*

L'effet anti-uréease, *in vitro*, de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula*, à des concentrations variables (75, 150, 300, 600, et 750 $\mu\text{g/mL}$) est rapporté dans la Figure 12. Les pourcentages d'inhibitions correspondants aux différentes concentrations sont comparés avec ceux exhibés par l'acide borique.

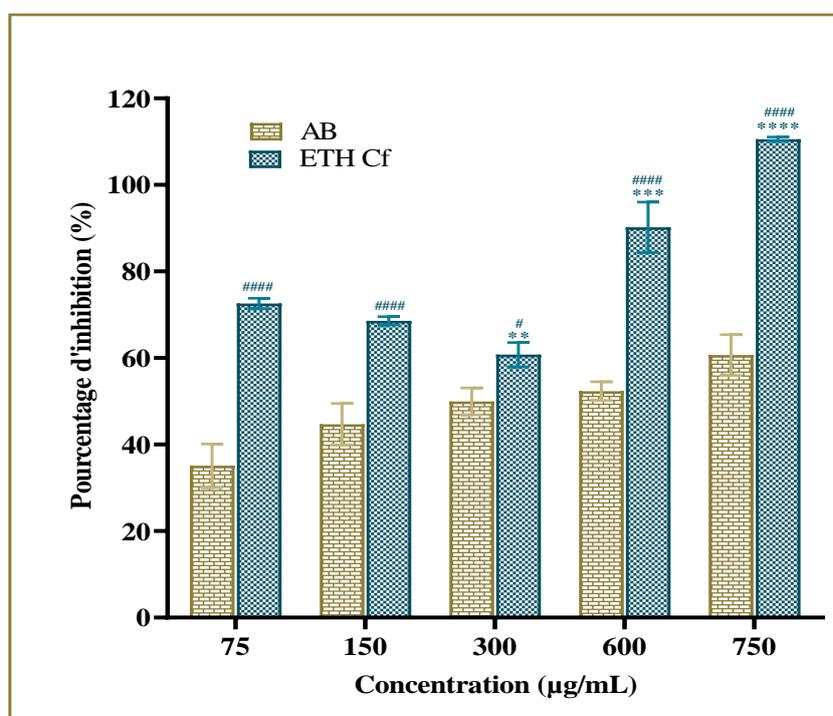


Figure 12 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *C.flammula* sur l'activité enzymatique de l'uréease, *in vitro*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.D. (n=3). Les comparaisons sont faites par rapport à la concentration de 75 $\mu\text{g/mL}$ (*) et par rapport à l'acide borique (#). Les valeurs sont considérées significatives à $P < 0,05$.

L'effet inhibiteur de l'extrait brut issu d'une extraction à l'éthanol des feuilles de *C.flammula* a présenté une puissante activité inhibitrice de l'uréease, qui s'observe dès la concentration la plus faible de 75 $\mu\text{g/mL}$, avec une inhibition de 72% et une inhibition totale (100 %) à 750 $\mu\text{g/mL}$ d'extrait brut.

Ces résultats sont significativement plus importants que ceux révélés par la molécule de référence testée, à savoir l'acide borique. Cependant, cet extrait éthanolique des feuilles de *C.flammula* ne présente pas une inhibition dose dépendante ; en effet celle-ci n'augmente pas en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait.

De plus, les résultats de l'évaluation, *in vitro* d'un potentiel effet inhibiteur sur l'uréase de jack bean, des quatre fractions issues de l'extrait brut des feuilles de *Clematis flammula*, à savoir la fraction d'acétate d'éthyle, l'aqueux d'acétate d'éthyle, la fraction chloroformique et l'aqueux du chloroforme, sont représentés dans les histogrammes de la **Figure 13**.

Les deux extraits organiques, à savoir l'acétate d'éthyle et l'extrait chloroformique, issus du fractionnement de l'extrait brut par une partition dans un mélange de solvants et d'eau distillée, ne révèlent aucune activité inhibitrice intéressante. En effet, tous les pourcentages d'inhibitions exhibés par les différentes concentrations testées des deux extraits n'atteignent pas les 20%, et significativement inférieurs à ceux exhibés par l'acide borique, aux mêmes concentrations.

La fraction aqueuse d'acétate d'éthyle, de sa part, illustre une activité modérée, avec un pouvoir inhibiteur qui s'observe seulement pour les deux concentrations les plus élevées de 600 et 750 µg/mL, avec des pourcentages de 37,80 et 31,04%, respectivement, des valeurs qui restent nettement inférieures à celles révélées par l'acide borique. En revanche, les concentrations inférieures ou égale à 300 µg/mL n'ont pas présenté d'effet concluant sur l'enzyme (<12%).

Par ailleurs, l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *C.flammula* s'est individualisé avec une activité significative et dose dépendante, en allant de 3,96 à 75% d'inhibition enzymatique, à partir de la plus faible concentration (75 µg/mL) jusqu'à la concentration la plus élevée (750 µg/mL). Cette inhibition est significativement meilleure que celle de l'acide borique, à partir de 600 µg/mL d'extrait.

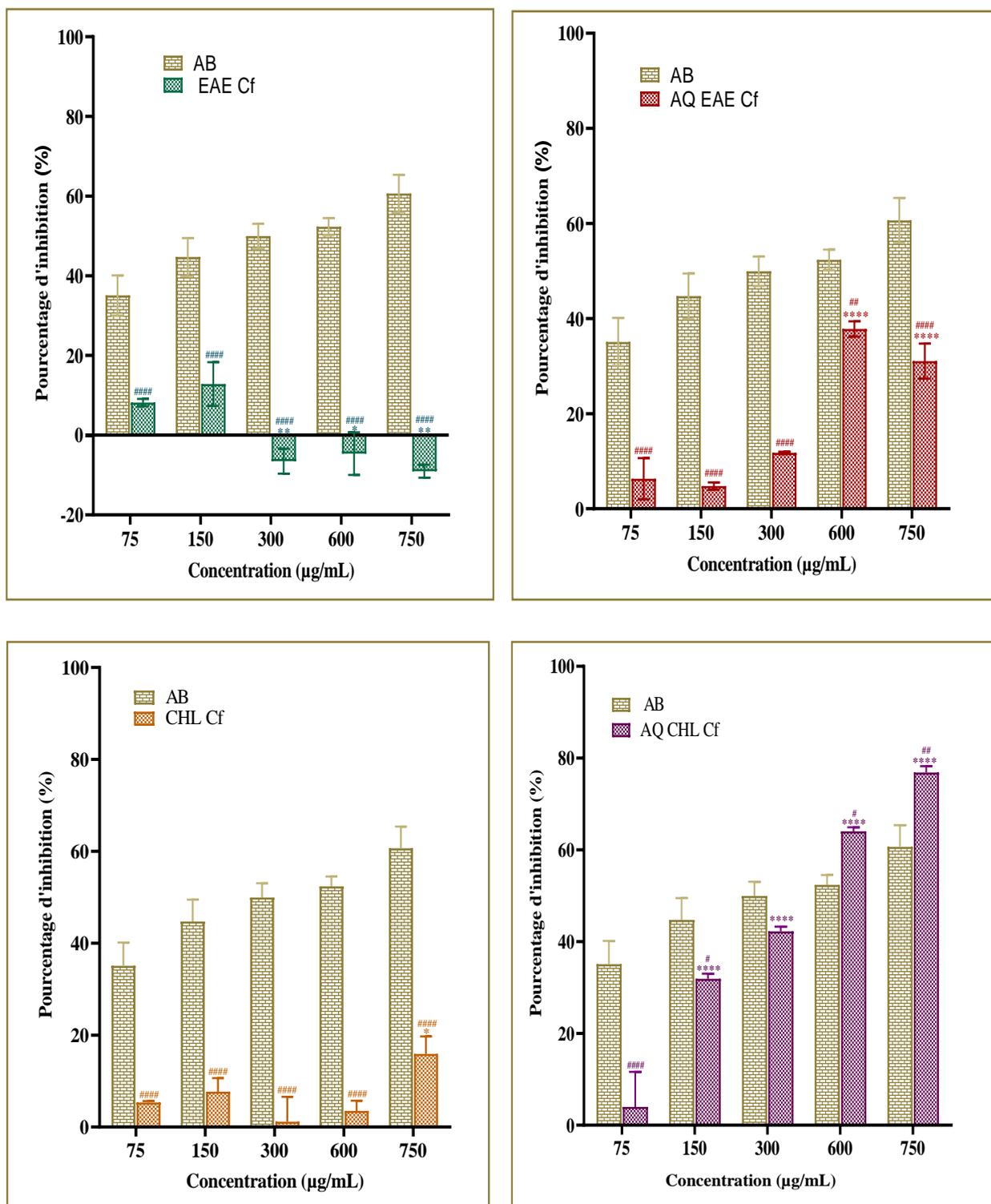


Figure 13 : Effet inhibiteur des fractions, organique de l'acétate d'éthyle (EAE Cf), aqueux de l'acétate d'éthyle (AQ EAE Cf), organique du chloroforme (CHL Cf) et aqueux du chloroforme (AQ CHL Cf) des feuilles de *C.flammula* sur l'activité enzymatique de l'urée, *in vitro*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.D. (n=3). Les comparaisons sont faites par rapport à la concentration de 75 $\mu\text{g/mL}$ (*) et par rapport à l'acide borique (#). Les valeurs sont considérées significatives à $P < 0,05$.

II. 1. 3. Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *Fraxinus angustifolia* sur l'activité enzymatique de l'uréase de Jack Bean (*Canavalia ensiformis*), *in vitro*

L'effet anti-uréase évalué, *in vitro*, de l'extrait brut (obtenu par une extraction à l'éthanol des feuilles de *Fraxinus angustifolia*), et des quatre fractions, à savoir l'organique de l'acétate d'éthyle, l'aqueux de l'acétate d'éthyle, l'organique du chloroforme et l'aqueux du chloroforme (obtenues par le fractionnement de l'extrait brut), à des concentrations de 75, 150, 300, 600 et 750 $\mu\text{g/mL}$, est représenté dans les **Figure 14 et 15**, respectivement.

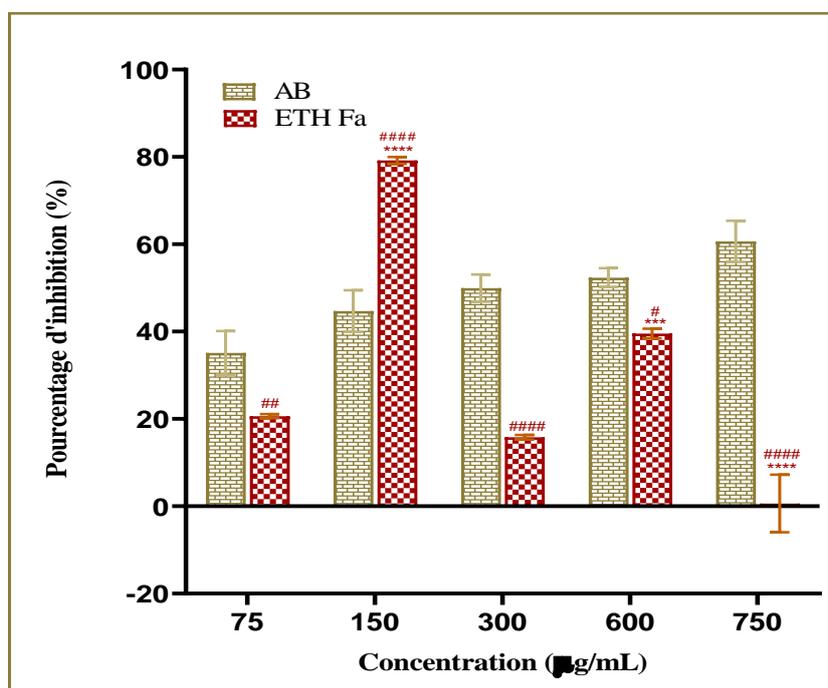


Figure 14 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *F.angustifolia* sur l'activité enzymatique de l'uréase, *in vitro*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.D. (n=3). Les comparaisons sont faites par rapport à la concentration de 75 $\mu\text{g/mL}$ (*) et par rapport à l'acide borique (#). Les valeurs sont considérées significatives à $P < 0,05$.

L'extrait éthanolique arbore une activité qui n'est pas dose dépendante. En effet, on remarque que seule la concentration de 150 $\mu\text{g/mL}$ s'est distinguée des autres, et présente un pourcentage très intéressant de 79.19%, qui est nettement supérieur à celui de l'acide borique à la même concentration ($p < 0.05$). Tandis que les autres concentrations de 75, 300, 600 et 750 $\mu\text{g/mL}$ ont présenté des activités inhibitrices aléatoires de 20.62, 15.79, 39.56 et 6.68%, respectivement, des valeurs qui restent inférieures à celles exercées par la molécule de référence ($p < 0.05$).

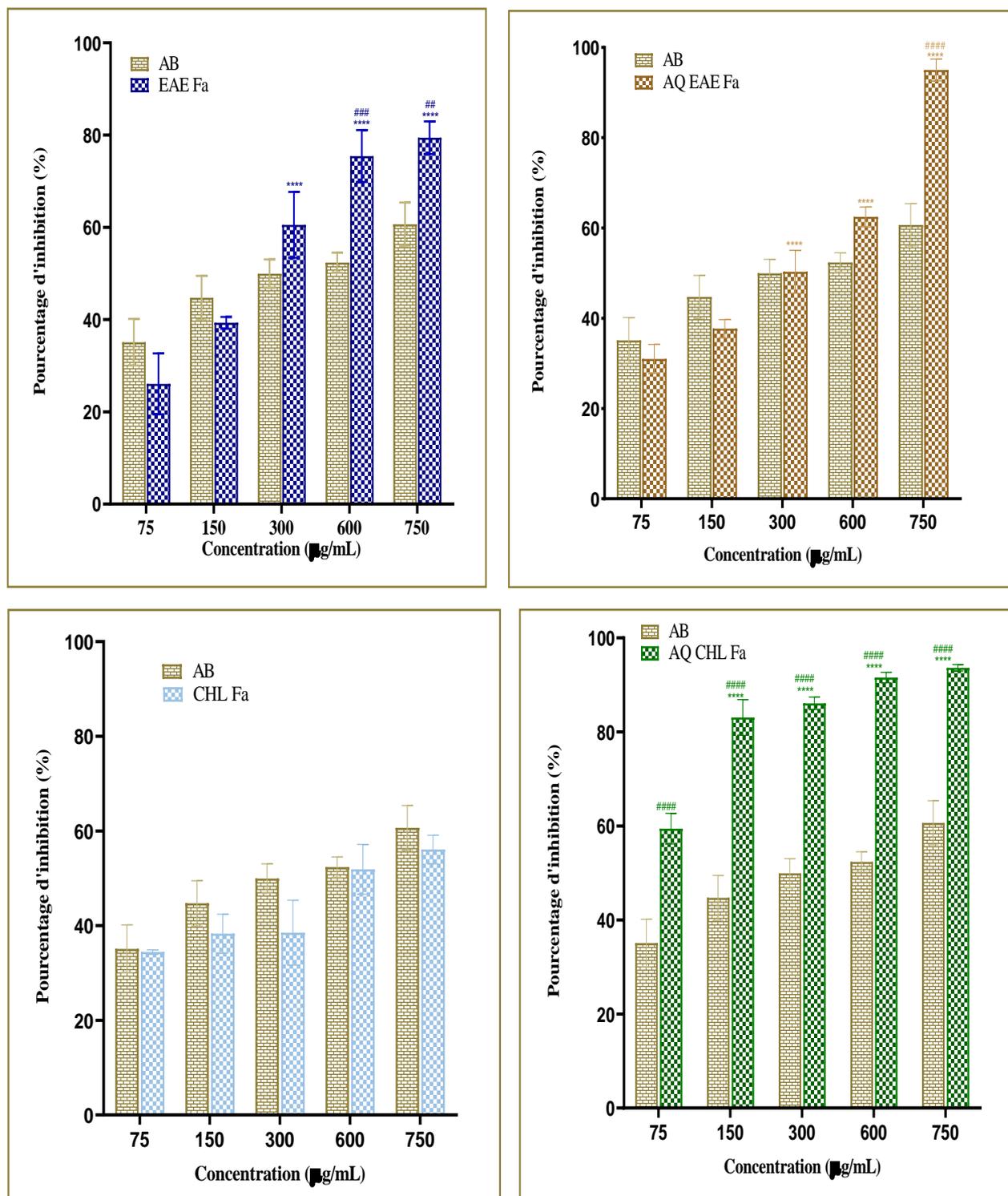


Figure 15 : Effet inhibiteur des fractions, organique de l'acétate d'éthyle (EAE Cf), aqueux de l'acétate d'éthyle (AQ EAE Cf), organique du chloroforme (CHL Cf) et aqueux du chloroforme (AQ CHL Cf) des feuilles de *F.angustifolia* sur l'activité enzymatique de l'urée, *in vitro*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.D. (n=3). Les comparaisons sont faites par rapport à la concentration de 75 µg/mL (*) et par rapport à l'acide borique (#). Les valeurs sont considérées significatives à $P < 0,05$.

D'après les résultats illustrés dans la figure 15, les quatre fractions testées, ont toutes exhibé, comme la molécule de référence, une inhibition dose dépendante, contrairement à l'extrait brut. La fraction organique d'acétate d'éthyle, présente une activité anti-uréase assez satisfaisante avec des pourcentages d'inhibitions significativement représentatifs, à partir d'une concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$ correspondant à un pourcentage d'inhibition de 60,54%, allant jusqu'à 79,43% pour la concentration la plus élevée de 750 $\mu\text{g/mL}$ et qui dépassent largement celle de la molécule de référence. Tandis que les deux concentrations les plus faibles de 75 et 150 $\mu\text{g/mL}$ ont montré des pourcentages assez similaires avec l'acide borique.

De même, la fraction aqueuse d'acétate d'éthyle exhibe une inhibition assez similaire à celle de l'acide borique pour les concentrations de 75, 150 et 300 $\mu\text{g/mL}$, et des valeurs nettement plus importantes que celles présentées par l'acide borique pour les deux concentrations les plus élevées, à savoir 600 et 750 $\mu\text{g/mL}$, avec un pourcentage d'inhibition remarquable d'une valeur de 94,99% pour la concentration la plus élevée testée de 750 $\mu\text{g/mL}$.

D'une autre part, la fraction organique du chloroforme exhibe une inhibition concluante, avec des pourcentages d'inhibitions comparables à ceux de l'acide borique. En effet, aucune différence significative n'a été enregistrée concernant les pourcentages d'inhibition avec toutes les concentrations utilisées. Cette fraction s'est avéré être l'inhibiteur le plus faible de l'uréase parmi les cinq fractions testées pour cette plante.

Enfin, l'extrait aqueux chloroformique s'est révélé être l'inhibiteur d'uréase le plus puissant pour cette plante, avec une très bonne inhibition de 59,44% à la plus faible concentration testée (75 $\mu\text{g/mL}$) et qui atteint à partir de 150 $\mu\text{g/mL}$ une inhibition supérieure à 80%. Celle-ci augmente pour atteindre une inhibition quasi-totale d'une valeur de 93,62% à une concentration de 750 $\mu\text{g/mL}$, significativement supérieure à celle de l'acide borique, dont le pourcentage exhibé par la concentration de 750 $\mu\text{g/mL}$ est comparable à celui de la plus faible concentration (75 $\mu\text{g/mL}$) exhibé par l'extrait.

III. 1. 4. Détermination des IC₅₀

La concentration inhibitrice de 50% de l'uréase est une mesure quantitative indiquant la quantité d'extrait nécessaire pour inhiber à moitié l'activité de l'enzyme. Cette évaluation montre l'efficacité de l'activité inhibitrice, *vis-à-vis* de l'uréase pour l'ensemble des extraits de *C.flammula* et *F.angustifolia* (Tableau II).

Tableaux II : Valeurs des IC₅₀, coefficients de corrélations et pourcentages d'inhibitions à 150 µg/mL, pour les différents extraits de *C.flammula*, *F.angustifolia* et acide borique.

| Extraits de plantes | IC ₅₀ (µg/mL) | R ² | Inhibition (%) à 150 µg/mL |
|------------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------|
| <i>Clematis flammula</i> | | | |
| ETH | 597,55±0.35 | 0,8581 | 68,56 |
| EAE | ND | ND | 12,83 |
| AQ EAE | 372,55±10.96 | 0,9270 | 4,79 |
| CHL | ND | ND | 7,69 |
| AQ CHL | 250,9±10.60 | 0,9294 | 31,88 |
| <i>Fraxinus angustifolia</i> | | | |
| ETH | ND | ND | 79,19 |
| EAE | 265,6±13.08 | 0,92 | 39,29 |
| AQ EAE | 424±25.03 | 0,85 | 37,68 |
| CHL | 463,25±41.08 | 0,65 | 38,30 |
| AQ CHL | 136,65±7.99 | 0,89 | 83,07 |
| Acide borique | 499.5±29.3 | 0,80 | 44,70 |

Les différents extraits de *C.flammula* ont présenté des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 250,9 et 597,55 µg/mL. L'extrait éthanolique a montré une IC₅₀ de 597,55 µg/mL, une valeur très élevée, qui dépasse largement celle de l'acide borique (499,5 µg/mL) et celles de tous les autres extraits, ce qui pourrait être désavantageux pour l'extrait s'il présentait une inhibition dose dépendante, mais ce n'est pas le cas, en effet à des concentrations inférieures à l'IC₅₀, l'extrait inhibe déjà considérablement l'enzyme (72,58 % d'inhibition à 75 µg/mL d'extrait éthanolique).

L'extrait aqueux de l'acétate d'éthyle présente une IC₅₀ d'une valeur de 372,55µg/mL, une valeur intéressante, car elle reste inférieure à celle de la molécule de référence. Cependant, l'extrait aqueux du chloroforme, de sa part, a exhibé une IC₅₀ de 250,9 µg/mL, une valeur significativement plus faible que celle de l'acide borique, inférieure à celle de l'extrait brut, et la plus faible de cette plante, indiquant que cette fraction est la plus intéressante.

Par ailleurs, les différents extraits de *F.angustifolia* ont quant à eux montré des valeurs d'IC₅₀ allant de 136,65 à 463,25 µg/mL. La fraction organique d'acétate d'éthyle a exprimé une IC₅₀ de 265,6 µg/mL, une valeur très intéressante en comparaison avec celle de l'acide borique. Par contre, l'aqueux d'acétate d'éthyle a révélé une IC₅₀ plutôt élevée de 424 µg/mL, mais qui reste un résultat meilleur que celui de la molécule testée.

La fraction chloroformique, de sa part, montre une IC₅₀ de 463,25 µg/mL, la valeur la plus élevée parmi les extraits de *F.angustifolia*, néanmoins elle reste inférieure à celle de la molécule de référence. Enfin, l'aqueux du chloroforme s'est caractérisé par une IC₅₀ de l'ordre de 136,65 µg/mL, la valeur la plus faible pour cette plante, un résultat significativement plus faible que celui de l'acide borique, ce qui fait de cet extrait le plus intéressant et le plus puissant de tous les extraits testés des deux plantes étudiées.

III. 2. Discussion

Le développement des ulcères gastriques peut être lié à un processus multifactoriel complexe. Néanmoins, aucun doute ne plane sur l'implication d'*Helicobacter pylori* dans ce processus. Parmi tous les facteurs de virulence de cette dernière, l'uréase est considérée comme une caractéristique biologique et un déterminant de virulence importants. De ce fait, l'uréase est une cible idéale pour le traitement des affections à *H.pylori* (Amin et al., 2012).

Les extraits de plantes médicinales sont aujourd'hui considérés comme une perspective prometteuse pour le traitement des troubles gastriques. En effet, ces plantes sont des réservoirs biologiques caractérisés par la présence d'une quantité remarquable de composés phytochimiques. Ces derniers ont la capacité de favoriser la réduction des effets des agents offensifs et le renforcement des facteurs défensifs.

Afin de mieux comprendre et d'évaluer la validité de la phytothérapie, différents extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* ainsi que l'acide borique, ont été testés comme inhibiteurs spécifiques de l'uréase.

Le mécanisme d'action de l'acide borique a été sujet à un grand nombre d'études. D'après les travaux de Breitenbach et Hausinger (1988), l'acide borique est un inhibiteur compétitif de l'uréase qui forme une liaison rapide et réversible avec l'enzyme, probablement avec l'un des ions Nickel au niveau du site actif. En effet, de nombreuses études suggèrent que l'acide borique se lie uniquement à l'enzyme libre plutôt qu'au complexe enzyme-substrat, ce qui met en évidence l'existence d'une compétition entre l'inhibiteur et le substrat enzymatique (Mobley et Hausinger, 1989 ; Lata, 2012).

D'une autre part, Benini et ses collaborateurs (2004), ont démontré que l'inhibition enzymatique est maximale dans un intervalle de pH de 6.2 à 9.3, laissant penser que c'est la forme neutre trigonale de l'acide borique $B(OH)_3$ et non pas la forme ionisée $B(OH)_4^-$ qui est impliquée dans l'inhibition de l'uréase.

L'acide borique a donc été testé en tant que molécule de référence de l'inhibition de l'uréase. En effet, différentes concentrations de l'acide borique ont été utilisées, afin d'étudier la relation entre la concentration de cette molécule et l'inhibition enzymatique. Tout au long du test, l'activité de l'enzyme diminue avec l'augmentation de la concentration d'acide borique. L' IC_{50} de ce dernier est estimée à 499.5 ± 29.27 $\mu\text{g/mL}$, correspondant à une perte de 50% de l'activité uréasique. Celle-ci est presque totalement perdue lorsque la concentration d'acide borique atteint une valeur de 1050 $\mu\text{g/mL}$, avec un pourcentage d'inhibition de 80%.

Nos résultats concordent avec ceux de **Monteiro et son équipe (2019)** qui ont évalué le potentiel inhibiteur de *Eugenia uniflora L.* sur *H.pylori* et son uréase. Ils ont obtenu des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 60% pour une concentration de 1024 µg/mL d'acide borique. Cependant, un nombre non négligeable de cas d'intoxication à l'acide borique a été enregistré et par conséquent, son utilisation a été écartée par la communauté scientifique (**Hadrup et al., 2021**).

Clematis flammula et *Fraxinus angustifolia* représentent les espèces les plus abondantes de leurs genres respectifs dans le nord algérien. Ce sont deux plantes largement utilisées en médecine traditionnelle par les populations rurales pour traiter une variété de troubles liés à l'inflammation, tels que les rhumatismes ou encore l'arthrite et la goutte (**Beloued, 1988 ; Chawla et al., 2012**). Ces nombreuses vertus font des deux plantes des sujets idéals pour tester leur activité anti-enzymatique. Nous avons alors testé les effets anti-uréase de différents extraits des feuilles de *F.angustifolia* et de *C.flammula*.

Les extraits de *C.flammula* ont arboré une activité anti-enzymatique plus modeste que celle de *F.angustifolia*, excepté pour les fractions éthanolique et aqueuse du chloroforme qui se sont démarqués avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 100 et 76%, à une concentration de 750 µg/mL. Selon les études menées par **Chawla et ses collaborateurs (2012)**, *C.flammula* est une plante caractérisée par la présence abondante de composés phytochimiques, à savoir les triterpénoïdes, les saponines, les flavonoïdes et les lignanes. Des molécules assez solubles dans les alcools, ce qui rend l'extrait éthanolique très riche en métabolites secondaires et justifie donc son activité inhibitrice remarquable.

Notre étude rejoint également celle de **Chohra et son équipe (2020)** qui ont testé l'activité inhibitrice des fractions méthanoliques de *Clematis cirrhosa L.* contre la tyrosinase, l'acétylcholine estérase (AChE), la butyrylcholine estérase (BChE), l' α -glycosidase et l' α -amylase. Les résultats obtenus arborent des pourcentages d'inhibition très satisfaisants pour l'AChE (69.03%) et la tyrosinase (82.34%), mais un peu plus modestes pour la BChE (47.67%) et l' α -glycosidase (14.03%) et l' α -amylase (36.63%). Ils ont alors constaté que l'activité inhibitrice était directement liée au taux de polyphénols contenus dans la plante.

Les extraits de *F.angustifolia* ont quant à eux exhibé une activité inhibitrice concentration dépendante et révèlent une activité significative, même à de faibles concentrations. Globalement, les meilleures inhibitions ont été obtenues à partir de l'extrait aqueux chloroformique, dont le pourcentage d'inhibition est de 83,07% à une concentration de 150 µg/mL et allant jusqu'à 93,62%

à une concentration de 750 µg/mL, indiquant que cet extrait contient potentiellement des quantités appréciables en métabolites secondaires polaires ou modérément polaires.

D'après les études réalisées par **Kostova et Iossiva (2006)**, les composés phytochimiques les plus abondants chez *F.angustifolia* sont les coumarines, les sécoiridoïdes, les phényléthanoïdes et la quercétine, des substances probablement responsables de l'effet inhibiteur de la plante. En effet, les travaux de **Boulanouar et Gherib (2014)** ont confirmé l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité biologique de huit plantes utilisées dans la pharmacopée algérienne, ce qui renforce notre hypothèse concernant l'implication des substances phytochimiques des plantes dans leurs activités biologiques.

De plus, les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les travaux menés par **Dehkharghanian et son équipe** en (2010). Ils ont rapporté que la différence de polarité entre les solvants est responsable de la variabilité du type, de la composition et des activités biologiques des composés phyto-chimiques. En effet, l'affinité que les molécules extraites présentent envers le solvant joue un rôle déterminant dans l'activité de ces composés. C'est ce qu'a observé, également, **Sabri et ses collaborateurs (2012)**, lorsqu'ils ont effectué la caractérisation phyto-chimiques des extraits éthériques, éthanoliques et aqueux de *Malva sylvestris L.* Ces derniers ont tous exhibé une composition phyto-chimique très variable, suggérant donc une extraction hautement dépendante de la solubilité ainsi que l'affinité des molécules aux solvants.

De même, au cours des études antérieures, les extraits éthanoliques se sont avérés très efficaces pour l'extraction de divers types de molécules polaires et non polaires (**Houghton et Raman, 1998 ; Yu Lin et al., 2009**). Les résultats obtenus par **Boisvert (2013)** ont montré que les fractions F2, F3, F4, F5 et F6 issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliques totaux de *Saccharina longicuris*, possèdent toutes une activité antioxydante supérieure à l'extrait initial. Cela peut s'expliquer par le phénomène d'encombrement stérique des molécules qui voient leurs activités biologiques réduites. Cela concorde avec les résultats obtenus dans notre étude et explique l'augmentation de l'activité inhibitrice des extraits aqueux et organiques de *F.angustifolia* après fractionnement de l'extrait brut éthanolique.

Le genre *Fraxinus* a, à plusieurs reprises, prouvé son potentiel inhibiteur envers divers enzymes. En 2012, c'est les travaux de **Ahn et ses collaborateurs** sur *Fraxinus rhynchophylla* qui ont démontré l'effet inhibiteur de la plante envers la lipase pancréatique. Une excellente activité inhibitrice a été obtenue, notamment pour la fraction aqueuse qui a totalement inhibé l'enzyme (100.4%), à une concentration de 100 µg/mL. Et dans la continuité de ce travail, l'équipe de **Huh (2015)** a mis en évidence l'activité inhibitrice de *F.rhynchophylla* sur la lipooxygénase, avec

des pourcentages d'inhibition allant de 10.10% à 47.43%. Ces études prouvent la validité des résultats que nous avons obtenus et confirment le potentiel anti-enzymatique de *Fraxinus angustifolia*.

Par ailleurs, l'activité inhibitrice de biomolécules et dérivées de l'urée a fait l'objet de plusieurs études précédentes. L'équipe de **Jadhav (2013)** a étudié l'effet inhibiteur de produits dérivés de la coumarine et ces derniers ont montré une inhibition enzymatique considérable avec des IC₅₀ variants entre 48.90 et 72.56 µM.

Juszkiewicz et ses collaborateurs (2004) ont, quant à eux, mis en évidence l'activité anti-uréasique de *Allium sativum* (l'ail). Celle-ci s'est avérée être directement proportionnelle à la teneur en alk(en)yl thiosulfonates (TS) présents dans l'extrait aqueux de l'ail.

D'une autre part, en **2017**, **Ayaz et ses collaborateurs** ont évalué l'effet gastroprotecteur de saponines isolées de *Polygonum hydropiper* L. Ces dernières ont arboré une remarquable inhibition de l'activité uréasique avec un pourcentage de 75,83% et une IC₅₀ de 98 mg/mL.

Des études plus poussées ont donc été menées pour mettre en évidence la relation entre la structure et l'activité assurée par certains composés phytochimiques. En effet, **Xiao et ses coéquipiers (2012)** ont à l'issue de leur recherche établie la relation structure-activité de la quercétine, dont l'analyse par amarrage moléculaire a révélé que l'élimination des groupements 5-OH, 3-OH, ou encore 3'-OH de la quercétine a induit une forte diminution de l'activité anti-uréasique de la molécule. Ces groupements ont donc été considérés comme des caractéristiques structurelles clés des composés actifs.

Aussi, de nombreuses études, notamment celle de **Griffin et al., (1999)**, ont démontré que la structure chimique, l'hydrophobicité, les liaisons hydrogènes ainsi que le poids moléculaire des tritérpenoïdes étaient fortement associés à leur effet antibactérien. Lorsque l'équipe de **Ngan (2012)** s'est penché sur l'effet antibactérien des extraits de *Paeonia lactiflora*, ils ont constaté que l'introduction des groupements hydroxyles ou méthyles dans le Paéonol a considérablement augmenté l'inhibition de la croissance bactérienne et de l'activité enzymatique de l'urée. Par ailleurs, l'ajout d'un groupement méthoxy n'a pas affecté l'activité antibactérienne. Les mécanismes

d'inhibition sont donc hautement définis par la relation structure-activité qui existe entre le site actif enzymatique et les molécules contenues dans les extraits des plantes testées.

Récemment, des études portées sur des dérivées synthétiques de la morine, un flavonoïde naturel, ont montré une inhibition très satisfaisante de l'uréase. Les composés N-((4E)-2-(2,4-dihydroxyphényl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromène-4-ylidène)-N-phénylthiourée (M2a), N-(2-chlorophényl)-N-((4E)-2-(2,4-dihydroxyphényl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromène-4-ylidène)thiourée (M2b) et N-(4-bromophényl)-N-((4E)-2-(2,4-dihydroxyphényl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromène-4-ylidène)thiourée (M2i) se sont révélés les plus puissants en termes d'inhibition et ont respectivement exhibé des IC_{50} de $10,74 \pm 0,018$, $11,12 \pm 0,033$ et $12,71 \pm 0,027$ μM . Des études d'amarrage moléculaire ont été effectuées sur ces 3 composés et le modèle de liaison observé a révélé que ces derniers se lient fermement à la cavité catalytique de l'enzyme, via la formation d'un grand nombre de liaisons hydrogène et hydrophobe. La position et l'alignement de substituants particuliers sur les molécules se sont avérés être responsables de la liaison parfaite des 3 molécules avec l'enzyme (**Kataria et Khatkar, 2019**).

De plus, **Liu et son équipe (2020)** se sont penché sur le potentiel inhibiteur des analogues de flavonoïdes et ont démontré que l'effet inhibiteur de ces composés était étroitement lié à la présence de résidus CYS322, ALA170, HIS323, NI798, ASP224 et HIS222, suggérant ainsi que la structure des inhibiteurs joue un rôle important dans leur mécanisme d'action.

Conclusion

Le traitement des ulcères gastriques a vu son efficacité s'amoinrir au fil du temps, suite à l'apparition d'une résistance bactérienne aux antibiotiques employés. L'alternative qui s'est imposée fut la phytothérapie. Celle-ci a connu un essor remarquable durant ces dernières années, non seulement dans le but de l'éradication de la bactérie, surtout les souches multi-résistantes, mais aussi afin de réduire les effets secondaires associés aux traitements médicamenteux.

Cette étude avait pour objectif d'évaluer, *in vitro*, le potentiel thérapeutique de deux plantes locales, *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*, en testant leur effet inhibiteur sur l'uréase, l'enzyme clé impliquée dans l'infection à *Helicobacter pylori*, principale cause de développement des ulcères. L'acide borique a été testé comme molécule de référence pour son inhibition de l'activité enzymatique de l'uréase.

Les résultats ont montré un remarquable effet inhibiteur dose dépendant de l'acide borique sur l'enzyme, avec une IC₅₀ de 499,5 µg/mL. Les extraits de *F.angustifolia* (75-750 µg/mL) ont tous exhibé des effets anti-urésique avec des intensités variables. Les extraits aqueux ont été les plus actifs avec des pourcentages d'inhibition significativement supérieurs à ceux de la molécule de référence et des IC₅₀ intéressantes. La fraction aqueuse du chloroforme a été la plus efficace avec la valeur d'IC₅₀ la plus faible (136,65 µg/mL).

En ce qui concerne *Clematis flammula*, le meilleur effet inhibiteur exposé par la plante était celui de l'extrait éthanolique (100%) et de l'aqueux chloroformique. Par contre, les extraits organiques n'ont révélé aucun effet inhibiteur. L'aqueux du chloroforme est la fraction la plus intéressante de cette plante avec une valeur d'IC₅₀ de 250,9 µg/mL.

Il a été démontré *in vitro*, que la majorité des extraits testés ont un pouvoir inhibiteur, *vis-à-vis* de l'uréase, et que les meilleurs extraits impliqués dans cette inhibition étaient les fractions aqueuses. En effet le fractionnement de l'extrait brut a permis de séparer les molécules apolaires des molécules polaires, celles-ci ayant un meilleur effet inhibiteur sur l'enzyme.

Ces extraits étant très efficaces, *in vitro*, il serait donc très intéressant de vérifier leurs pouvoirs inhibiteurs de l'uréase dans une étude *in vivo*, et d'effectuer des études complémentaires dans le but d'exploiter et d'utiliser ces extraits pour éradiquer l'infection à *Helicobacter pylori* après l'échec du traitement par les antibiotiques.

Références bibliographiques

- **Abu-Izneid, T., Rauf, A., Saleem, M., Mansour, N., Abdelhady, M. I., Ibrahim, M. M., & Patel, S. (2020).** Urease inhibitory potential of extracts and active phytochemicals of *Hypochoeris radicata* (Asteraceae). *Natural product research*, 34(4), 553-557.
- **Adil, M., Iqbal, W., Adnan, F., Wazir, S., Khan, I., Khayam, M. U., ... & Khan, I. N. (2018).** Association of metronidazole with cancer: a potential risk factor or inconsistent deductions?. *Current drug metabolism*, 19(11), 902-909.
- **Ahmad, V. U., Hussain, J., Hussain, H., Jassbi, A. R., Ullah, F., Lodhi, M. A., ... & Choudhary, M. I. (2003).** First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(6), 719-723.
- **Ahn, J. H., Shin, E., Liu, Q., Kim, S. B., Choi, K. M., Yoo, H. S., ... & Lee, M. K. (2013).** Secoiridoids from the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* with pancreatic lipase inhibitory activity. *Natural product research*, 27(12), 1132-1135.
- **Allen, A., & Flemström, G. (2005).** Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology-CellPhysiology*, 288(1), C1-C19.
- **Amin, M., Anwar, F., Janjua, M. R. S. A., Iqbal, M. A., & Rashid, U. (2012).** Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9923-9941.
- **Atmani, D., Begontilde, M., Ruiz-Sanz, J. I., Bakkali, F., & Atmani, D. (2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4), 589-598.
- **Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berboucha, M., Debbache, N., & Boudaoud, H. (2009).** Flavonoids in human health: from structure to biological activity. *Current Nutrition & Food Science*, 5(4), 225-237.
- **Ayaz, M., Junaid, M., Ullah, F., Sadiq, A., Shahid, M., Ahmad, W., ... & Syed, N. I. H. (2017).** GC-MS analysis and gastroprotective evaluations of crude extracts, isolated saponins, and essential oil from *Polygonum hydropiper* L. *Frontiers in chemistry*, 5, 58.
- **Aydin Dadfar, T. H. E. (2020).** Epidemiology of perforating peptic ulcer: A population-based retrospective study over 40 years. *World Journal of Gastroenterology*, 26(35), 5302.
- **Baba Aissa, F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident", Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger.
- **Backert, S., Tegtmeyer, N., & Fischer, W. (2015).** Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future microbiology*, 10(6), 955-965.
- **Bakchiche, B., & Gherib, A. (2014).** Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(1), 167.
- **Balasubramanian, A. And Ponnuraj, K. (2010).** Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of Molecular Biology*. 400(3):274–283
- **Bazin, T., & Lamarque, D. (2018).** La sécrétion acide : régulation, applications en clinique, actualités. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 25(4), 342-352.
- **Beloued, A. (1998).** Plantes Médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger, pp. 277
- **Beloued, A. (2005).** Plantes médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires.
- **Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S., & Mangani, S. (1999).** A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, 7(2), 205-216.
- **Bensaada, R., Bouani, B., Soussi, Y., & Yousfi, M. A. (2019).** Ulcère à *Helicobacter pylori*: efficacité du traitement et facteurs qui influencent la guérison. *Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien*, 54(4), 342-347.
- **Bézanger-Beauquesne, L. (1990).** New results in phytothérapie. Seventh review. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 24(2), 98-133.

- **Bisch, M., Weitten, T., Dietsch, P., Alt, M., & Andrès, E. (2009).** Thrombopénies aux inhibiteurs de la pompe à protons. *Médecine thérapeutique*, 15(4), 322-328.
- **Boisvert, C. (2013).** *Évaluation du potentiel antioxydant et antibactérien d'extraits de macroalgues du Saint-Laurent* (Doctoral dissertation, Université du Québec à Rimouski).
- **Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W., & Backert, S. (2005).** NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9300-9305.
- **Breitenbach, J. M., & Hausinger, R. P. (1988).** *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. *Biochemical Journal*, 250(3), 917-920.
- **Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M. A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., ... & Heinrich, M. (2009).** Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 295-305.
- **Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000).** The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103(7), 1143-1154.
- **Brown, B. A., Wallace Jr, R. J., & Onyi, G. O. (1992).** Activities of clarithromycin against eight slowly growing species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(9), 1987-1990.
- **Carrère, M. O., Lamouliatte, H., Ruzsniowski, P., Beresniak, A., & Slama, A. (1996).** Traitement de l'ulcère duodénal par éradication d'*Helicobacter pylori* en multithérapie: modélisation et analyse coût-efficacité. *Sciences sociales et santé*, 14(4), 37-64.
- **Chawla, R., Kumar, S., & Sharma, A. (2012).** The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 116-150.
- **Chohra, D., Ferchichi, L., Cakmak, Y. S., Zengin, G., & Alsheikh, S. M. (2020).** Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.). *South African Journal of Botany*, 132, 164-170.
- **Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., & Mangani, S. (1999).** Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coordination Chemistry Reviews*, 190, 331-355.
- **Cover, T. L., & Blaser, M. J. (2009).** *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, 136(6), 1863-1873.de
- **Dehkharghanian, M., Adenier, H., & Vijayalakshmi, M. A. (2010).** Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121(3), 863-870.
- **Dixon, N. E., Riddles, P. W., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1980).** Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian journal of biochemistry*, 58(12), 1335-1344.
- **Dixon, N-E. Gazzola, C. Blakely, R-L. Zerner, B. (1975).** Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society* 97, 4131-4133.
- **Douša, M., & Hosmanová, R. (2005).** Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 37(2), 373-377.
- **Dunn, B. M. (2001).** Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Current protocols in protein science*, 25(1), 21-3.
- **Estiu, G., & Merz, K. M. (2007).** Competitive hydrolytic and elimination mechanisms in the urease catalyzed decomposition of urea. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(34), 10263-10274.f
- **Feder, R., Posner, S., Qin, Y., Zheng, J., Chow, S. C., & Garman, K. S. (2018).** *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease: A retrospective analysis of post-treatment testing practices. *Helicobacter*, 23(6), e12540.
- **Ferrero, J. L., Bopp, B. A., Marsh, K. C., Quigley, S. C., Johnson, M. J., Anderson, D. J., ... & Cavanaugh, J. H. (1990).** Metabolism and disposition of clarithromycin in man. *Drug Metabolism and Disposition*, 18(4), 441-446.
- **Finegold, S. M. (1980).** Metronidazole. *Annals of Internal Medicine*, 93 (4), 585-587.
- **Follmer, C. (2008).** Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1), 18-28.

- **Follmer, C. (2010).** Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *Journal of clinical pathology*, 63(5), 424-430.
- **Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005).** Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-574). Springer, Boston, MA.
- **Golbabaeci, S., Bazl, R., Golestanian, S., Nabati, F., Omrany, Z. B., Yousefi, B., ... & Amanlou, M. (2013).** Urease inhibitory activities of β -boswellic acid derivatives. *DARU*
- **Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999).** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322-332.
- **Gupta, M., Kapoor, B., Gupta, R., & Singh, N. (2021).** Plants and phytochemicals for treatment of peptic ulcer: An overview. *South African Journal of Botany*, 138, 105-114.
- **Hadrup, N., Frederiksen, M., & Sharma, A. K. (2021).** Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 104873.
- **Hammoudi, S. S. (2014).** Anatomie, appareil digestif. Editions HS.
- **Hao, D., Gu, X., Xiao, P. et Peng, Y. (2013).** Recherche chimique et biologique des ressources médicinales de la clématite. *Bulletin scientifique chinois*, 58 (10), 1120-1129.
- **Houghton, P.J & Raman, A. (1998).** Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. New York: Chapman and Hall.
- **Huh, M. K., Cho, K. S., & Jeon, S. J. (2015).** Inhibitory effect of lipoxygenase and dpph radical scavenging activity of *Fraxinus rhynchophylla*. *European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences Vol*, 3(3).
- **Hunt, R., & Thomson, A. B. (1998).** Canadian *Helicobacter pylori* consensus conference. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 12(1), 31-41.
- **Jadhav, S. G., Meshram, R. J., Gond, D. S., & Gacche, R. N. (2013).** Inhibition of growth of *Helicobacter pylori* and its urease by coumarin derivatives: Molecular docking analysis. *journal of pharmacy research*, 7(8), 705-711. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 1-6.
- **Juszkiewicz, A., Zaborska, A., Łaptaś, A., & Olech, Z. (2004).** A study of the inhibition of jack bean urease by garlic extract. *Food chemistry*, 85(4), 553-558.
- **Karplus, P. A., Pearson, M. A., & Hausinger, R. P. (1997).** 70 years of crystalline urease: what have we learned?. *Accounts of chemical research*, 30(8), 330-337.
- **Kataria, R., & Khatkar, A. (2019).** Molecular docking, synthesis, kinetics study, structure–activity relationship and ADMET analysis of morin analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *BMC chemistry*, 13(1), 1-17.
- **Kostova, I., & Iossifova, T. (2007).** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, 78(2), 85-106.
- **Lata S. (2012).** Urease inhibitors. *Indian journal of biotechnology*, 11: 381-388.
- **Lewin, M. J. M. (1995).** Les inhibiteurs de la pompe à protons gastrique : mode d'action et intérêt thérapeutique.
- **Ligabue-Braun, R., Andreis, F. C., Verli, H., & Carlini, C. R. (2013).** 3-to-1 : unraveling structural transitions in ureases. *Naturwissenschaften*, 100(5), 459-467.
- **Lin, H. Y., Kuo, Y. H., Lin, Y. L., & Chiang, W. (2009).** Antioxidative effect and active components from leaves of *Lotus (Nelumbo nucifera)*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6623-6629.
- **Liu, H., Wang, Y., Lv, M., Luo, Y., Liu, B. M., Huang, Y., ... & Wang, J. (2020).** Flavonoid analogues as urease inhibitors: Synthesis, biological evaluation, molecular docking studies and in-silico ADME evaluation. *Bioorganic Chemistry*, 105, 104370.
- **Makhlouf, G. M., & Schubert, M. L. (1990).** Gastric somatostatin: a paracrine regulator of acid secretion. *Metabolism*, 39(9), 138-142.
- **Malferteiner, P., Megraud, F., O'morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... & El-Omar, E. M. (2017).** Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, 66(1), 6-30.
- **Marieb, E., & Hoehn, K. (2014).** *Anatomie et physiologie humaines : Livre+ eText+ plateforme numérique MonLab-Licence étudiant 60 mois*. Pearson Education France.

- **Marshall, B. J., & Windsor, H. M. (2005).** The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *Medical Clinics*, 89(2), 313-344.
- **Marshall, B., & Warren, J. R. (1984).** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, 323(8390), 1311-1315.
- **Medjahed, Z., Atman-Kilani, D., Fauconnier, M. L., Richard, G., & Atmani, D. (2016).** Hepatoprotective and antidiabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis. *Turkish journal of medical sciences*, 46(3), 910-920.
- **Mégraud, F. (1994).** Méthodes diagnostiques directes et indirectes de *Helicobacter pylori*. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 18(3), 217-222.
- **Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989).** Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological reviews*, 53(1), 85-108.
- **Montecucco, C., & de Bernard, M. (2003).** Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes and infection*, 5(8), 715-721.
- **Monteiro, J. R. B., Ardisson, J. S., Athaydes, B. R., Gonçalves, R. D. C. R., Rodrigues, R. P., Kuster, R. M., & Kitagawa, R. R. (2019).** Anti-*Helicobacter pylori* and Anti-inflammatory Properties of *Eugenia uniflora* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62.
- **Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M. L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., ... & Manconi, M. (2015).** Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: in vitro and in vivo wound healing potential. *European journal of medicinal chemistry*, 89, 179-188.
- **Mustapha, P. (2011).** *Etude des interactions entre Helicobacter pylori et les cellules épithéliales gastriques* (Doctoral dissertation, Université de Poitiers).
- **Ngan, L. T. M., Moon, J. K., Shibamoto, T., & Ahn, Y. J. (2012).** Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and-resistant strains of *Helicobacter pylori*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 9062-9073.
- **O'Connor, A., Gisbert, J. P., McNamara, D., & O'Morain, C. (2010).** Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2010. *Helicobacter*, 15, 46-52.
- **Papastergiou, V., Georgopoulos, S. D., & Karatapanis, S. (2014).** Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 5(4), 392.
- **Raymond, J. (2000).** Infection à *Helicobacter pylori*. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 3(5), 367-75.
- **Robinson, K., Argent, R. H., & Atherton, J. C. (2007).** The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 21(2), 237-259.
- **Saidi, R., Chawech, R., Baccouch, N., & Jarraya, R. M. (2019).** Study toward antioxidant activity of *Clematis flammula* extracts: Purification and identification of two flavonoids-glucoside and trisaccharide. *South African Journal of Botany*, 123, 208-213.
- **Sarfraz, I., Rasul, A., Jabeen, F., Younis, T., Zahoor, M. K., Arshad, M., & Ali, M. (2017).** *Fraxinus*: A plant with versatile pharmacological and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- **Schubert, M. L., & Peura, D. A. (2008).** Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*, 134(7), 1842-1860.
- **Sharma, R. K., Mandal, S., Rajani, G. P., Gupta, N., & Srivastava, D. P. (2011).** Antiulcer and antiinflammatory activity of fresh leave extracts of *Polyalthia longifolia* in rats. *Int J Drug Dev Res*, 3(1), 351-359.
- **Sherwood, L. (2015).** *Physiologie humaine*. Bruxelles : Edition De Boeck supérieur. 447-455 p.
- **Sirko, A., & Brodzik, R. (2000).** Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4), 1189-1195.
- **Sobhani, I., Flourié, B., Lavergne, A., Colimon, R., & Mignon, M. (1991).** *Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. I, Physiopathologie et méthodes de diagnostic. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 15(5), 405-411.
- **Subramanyam, N. S. (1996).** *Laboratory manual of plant taxonomy*, Vikas Publishing House PVT LTD, 2nd edition, p. 94-95(1999).

- **Sujoy, B., & Aparna, A. (2013).** Potential clinical significance of urease enzyme. *European Scientific Journal*, 9(21).
- **Takishima, K., Suga, T., & Mamiya, G. (1988).** The structure of jack bean urease: the complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, 175(1), 151-157.
- **Tan, L., Li, C., Chen, H., Mo, Z., Zhou, J., Liu, Y., ... & Su, Z. (2017).** Epiberberine, a natural protoberberine alkaloid, inhibits urease of *Helicobacter pylori* and jack bean: susceptibility and mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110, 77-86.
- **Tan, L., Su, J., Wu, D., Yu, X., Su, Z., He, J., ... & Su, Z. (2013).** Kinetics and mechanism study of competitive inhibition of jack-bean urease by baicalin. *The Scientific World Journal*, 2013.
- **Tariq, S. A., Ahmad, M. N., Obaidullah, Khan, A., Choudhary, M. I., Ahmad, W., & Ahmad, M. (2011).** Urease inhibitors from *Indigofera gerardiana* Wall. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 26(4), 480-484.
- **Tortora, Derrickson. (2010).** Manuel d'anatomie et de physiologie humaine. 2ème édition Bruxelles : De boek, 478.
- **Trung, H. T., Huynh, H. T. T., Thuy, L. N. T., Van Minh, H. N., Nguyen, M. N. T., & Thi, M. N. L. (2020).** Growth-inhibiting, bactericidal, antibiofilm, and urease inhibitory activities of hibiscus *Rosa sinensis* L. Flower constituents toward antibiotic sensitive-and resistant-strains of *Helicobacter pylori*. *ACS omega*, 5(32), 20080.
- **Waldum, H. L., Hauso, Ø., & Fossmark, R. (2014).** The regulation of gastric acid secretion—clinical perspectives. *Acta Physiologica*, 210(2), 239-256.
- **Wallace, J. L. (2000).** How do NSAIDs cause ulcer disease? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 14(1), 147-159.
- **Wallander, E. (2008).** Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*, 273(1), 25-49.
- **Waugh, A et Grant, A. (2011).** Chapitre 12 : système digestif. In : *Ross et Wilson ANATOMIE et PHYSIOLOGIE normales et pathologiques*. Paris : Elsevier Masson. 11ème édition. P 308- 310.
- **Weatherburn, M.W. (1967).** Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974.
- **Wu, Z. Y., & Raven, P. H. (2001).** Flora of China. 6, Caryophyllaceae Through Lardizabalaceae. Science Press.
- **Xiao, Z. P., Wang, X. D., Peng, Z. Y., Huang, S., Yang, P., Li, Q. S., ... & Zhu, H. L. (2012).** Molecular docking, kinetics study, and structure–activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(42), 10572-10577.
- **Zambelli, B., Musiani, F., Benini, S., & Ciurli, S. (2011).** Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of chemical research*, 44(7), 520-530.
- **Zeitoun, J. D., Chrystostalis-Kulundzic, A., & Lefèvre, J. (2017).** *Hépatologie, gastro-entérologie, chirurgie viscérale*. Éditions Vernazobres-Gregg.
- **Zhou, J. T., Li, C. L., Tan, L. H., Xu, Y. F., Liu, Y. H., Mo, Z. Z., ... & Xie, J. H. (2017).** Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by palmartine: investigation on the potential mechanism. *PLoS one*, 12(1), e0168944.

Résumé

L'ulcère gastrique est l'un des troubles gastro-intestinaux les plus répandus à travers le monde. Il résulte d'un déséquilibre entre facteurs défensifs et offensifs, majoritairement induit par l'infection à *Helicobacter pylori*. Celle-ci procède à la colonisation de l'épithélium gastrique par le biais de ses facteurs de virulence, notamment l'uréase, une enzyme indispensable à la survie de la bactérie. *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* sont deux plantes locales connues pour leurs nombreuses propriétés curatives et leur activité anti-ulcère. Le but de cette étude est l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de ces deux plantes sur l'activité catalytique de l'uréase. Tous les extraits ont présenté un effet inhibiteur concentration dépendant, mis à part les extraits organiques de *C.flammula* et l'extrait éthanolique de *F.angustifolia*. L'extrait aqueux du chloroforme de cette dernière a exhibé la meilleure activité anti-uréasique avec une IC₅₀ de 136,65 µg/mL, ainsi qu'un pourcentage d'inhibition de 83,07% à 150µg/mL d'extrait. Le meilleur potentiel inhibiteur a été démontré par les extraits aqueux, tandis que les extraits organiques ayant arboré des inhibitions peu ou pas concluantes. *F.angustifolia* et *C.flammula* pourraient être une source importante de biomolécules à activité anti-uréase et par conséquent anti-ulcère gastrique.

Mots clés : *Clematis flammula*, *Fraxinus angustifolia*, ulcère gastrique, uréase, extrait aqueux

Abstract

Peptic ulcer is one of the most common gastrointestinal disorders worldwide. It results from an imbalance between defensive and offensive factors, mainly induced by the *Helicobacter pylori* infection. This latter proceeds to colonize the gastric epithelium through its virulence factors, in particular urease, an enzyme that happens to be necessary for the survival of the bacterium. *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia* are two local plants known for their numerous curative properties and anti-ulcer activity. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of these two plants extracts on the catalytic activity of urease. All extracts showed a concentration-dependent inhibitory effect, except for *C.flammula* organic extracts and *F.angustifolia* ethanolic one. The aqueous chloroform extract of this latter exhibited the best anti-urease activity, with an IC₅₀ of 136.65 µg/mL, as well as an inhibition of 83.07% at 150 µg/mL of extract. The best inhibitory potential was demonstrated by the aqueous extracts, while the organic one showed little or no inhibition. *F.angustifolia* and *C.flammula* could be an important source of biomolecules with an anti-urease effect and therefore, an anti-peptic ulcer activity.

Key words: *Clematis flammula*, *Fraxinus angustifolia*, peptic ulcer, urease, aqueous extract.

المخلص

تعد قرحة المعدة من أكثر إضطرابات الجهاز الهضمي شيوعاً حول العالم. وينتج عن عدم التوازن بين العوامل الدفاعية والهجومية، الناجم بشكل رئيسي عن الإصابة بعدوى هيليكوباكتريلوري، بكتيريا تستعمر جدار المعدة من خلال عوامل ضراوتها، ولا سيما اليورياز، وهو إنزيم ضروري للحفاظ على نشاط البكتيريا في البيئة الحمضية للمعدة. *Clematis flammula* و *Fraxinus angustifolia* نباتان محليان معروفان بخصائصهما العلاجية العديدة ونشاطهما المضاد للقرحة. لذلك كان الهدف من هذه الدراسة تقييم التأثير المثبط لهذين النباتين على النشاط التحفيزي لليورياز. أظهرت جميع المستخلصات تأثيراً مثبطاً يعتمد على التركيز باستثناء المستخلصات العضوية من *Clematis flammula* والمستخلص الخام من *Fraxinus angustifolia*، بينما مستخلص الكلوروفورم المائي لهذا الأخير أظهر أفضل نشاط مضاد لليورياز بتركيز 136.65 ميكروغرام/المل كتركيز مثبط 50% من الإنزيم، بالإضافة إلى تثبيط بنسبة 83.07% بتركيز 150 ميكروغرام/المل. المستخلصات المائية لهذين النباتين أقوى من مستخلصاتها العضوية، وبالتالي يمكن أن تكون مصدر مهم لجزيئات حيوية ذات نشاط مضاد لليورياز وبالتالي مضاد للقرحة المعدية يجب إستغلاله.

الكلمات المفتاحية: *Clematis flammula*، المستخلصات المائية. اليورياز، القرحة المعدية *Fraxinus angustifolia*

