

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de la Biologie Physico-Chimique  
Filière : Biologie  
Option : Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

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

## MASTER

### *Thème*

**Evaluation de l'activité anti-inflammatoire  
*in vivo* des extraits de feuilles et d'écorce de  
*Fraxinus angustifolia* :  
Cas de l'arthrite goutteuse**

Présenté par :

**CHEMACHE FAHIMA & FEREDJ BADRIA**

Soutenu le : **16 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Melle.TAHIRI O.	M.A.A.	Présidente
Melle. AYOUNI K.	M.A.A.	Encadreur
Mme. BERRI-BENNAI Y.	M.A.A.	Examinatrice
Mme. BERBOUCHA-RAHMANI M.	M.A.A.	Invitée

**Année universitaire : 2014 / 2015**

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de la Biologie Physico-Chimique  
Filière : Biologie  
Option : Pharmacologie Moléculaire



## **Autorisation de Soutenance**

L'étudiante: CHEMACHE FAHIMA  
est autorisée à soutenir son mémoire de fin de cycle en vue de  
l'obtention du diplôme de master le : 16 Juin à 10h30

Thème :

### **Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* : Cas de l'arthrite goutteuse**

Devant le jury composé de :

Melle.TAHIRI O.	M.A.A.	Présidente
Melle. AYOUNI K.	M.A.A.	Encadreur
Mme. BERRI-BENNAI Y.	M.A.A.	Examinatrice
Mme. BERBOUCHA-RAHMANI M.	M.A.A.	Invitée

L'encadreur

Le chef de département

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de la Biologie Physico-Chimique  
Filière : Biologie  
Option : Pharmacologie Moléculaire



## **Autorisation de Soutenance**

L'étudiante: FEREDJ BADRIA  
est autorisée à soutenir son mémoire de fin de cycle en vue de  
l'obtention du diplôme de master le : 16 Juin à 10h30

Thème :

### **Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* : Cas de l'arthrite goutteuse**

Devant le jury composé de :

Melle.TAHIRI O.	M.A.A.	Présidente
Melle. AYOUNI K.	M.A.A.	Encadreur
Mme. BERRI-BENNAI Y.	M.A.A.	Examinatrice
Mme. BERBOUCHA-RAHMANI M.	M.A.A.	Invitée

L'encadreur

Le chef de département

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de la Biologie Physico-Chimique  
Filière : Biologie  
Option : Pharmacologie Moléculaire



## **Autorisation de dépôt**

L'étudiant : FEREDJ BADRIA

est autorisée à déposer son mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master après vérification des corrections apportées suite aux recommandations du jury.

Thème :

**Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*  
des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus  
angustifolia* : Cas de l'arthrite goutteuse**

Le président du jury

Le chef de département

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de la Biologie Physico-Chimique  
Filière : Biologie  
Option : Pharmacologie Moléculaire



## **Autorisation de dépôt**

L'étudiant : CHEMACHE FAHIMA

est autorisée à déposer son mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master après vérification des corrections apportées suite aux recommandations du jury.

Thème :

**Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*  
des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus  
angustifolia* : Cas de l'arthrite goutteuse**

Le président du jury

Le chef de département

# Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères tous d'abord au « Bon Dieu » de nous avoir donné le courage, la patience et la santé tout au long de notre parcours.*

*Nous aimerons exprimer notre profond respect notre sincère gratitude et nos remerciements les plus vifs à :*

*Notre promotrice M<sup>elle</sup> Ayouni Karima d'avoir accepté de nous encadrer, et pour son aide, ses conseils, son orientation, sa grande gentillesse, sa disponibilité et tout ses efforts.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury :*

*M<sup>elle</sup> Tahiri O. pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et Mme Berri-Bennai Y. d'avoir accepté de faire partie du jury et de consacrer de leur temps pour examiner ce travail.*

*Nos remerciements sont également exprimés à toutes les personnes de laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université de Bejaia, en particulier à Mme Berboucha-Rahmani M. et son binôme «Chicha et Faty» avec qui nous avons partagé beaucoup de bons moments tout au long de ce travail.*

*Nos remerciements sont adressés également à tous ceux qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin.*

# *Dédicaces*

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

Allah unique, éternel, le tout puissant et son prophète Mohamed (S.A.W.)

- A mes très chers parents, la principale cause de ma réussite par leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements, pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées, pour leur soutien et leur confiance durant mes études. Que Dieu leur procure bonheur, santé et longue vie MERCI papa et maman.
- A ma très chère grand-mère.
- A mon adorable frère Hillal.
- A mes très chères sœurs Zakia, Linda, Hanifa et leurs maris Hachemi, Cherif et Hamoud.
- A mes chères petites Siham, Sandrina, Sabiha, Massi Cilia.
- A mes petits coucous Youba, Lamisse, Malak, Didin, Sami.
- A mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.
- A tout ma grande famille.
- A mes amis Mouna, Aida, Nihad, Linda, Souad, Bassema, Chicha, Faty.
- Grosse dédicace à ma binôme Badria et toute sa famille pour l'effort qu'elle a fourni durant toute la durée de ce travail.
- A mes copines de chambre Akila, Kenza, Wissam, Rima, Sonia.
- A tout mes enseignants du primaire jusqu'à l'université.
- A toute la promotion pharmacologie moléculaire 2014/2015.

*Fahima*

# *Dédicaces*

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

Allah unique, éternel, le tout puissant et son prophète Mohamed (S.A.W.)

A ma très chère grand-mère.

A mes très chers parents, la principale cause de ma réussite par leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements, pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées pour leur soutien et leur confiance durant mes études.

A mes très chers frères Allaoua et Chérif.

A ma très chère sœur Lamia.

A mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

A toute ma grande famille

A mes amies Imane, Fahima, Yasmina, Wareda, Karima, Lila, Lamia, Chicha,  
Faty.

Grosse dédicace à ma binôme Fahima et toute sa famille pour l'effort qu'elle a fourni durant toute la durée de ce travail.

A tout mes enseignants de primaire jusqu'à l'université.

A tout la promotion Pharmacologie Moléculaire 2014/2015.

*Badria*



## Liste des abréviations

ABCG2: ATP-binding cassette subfamily G2

AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdiens

ATP: Adénosine triphosphate

Cas-1: Caspase-1

CD-11: Complément d'adsorbance 11

CMC: Carboxyméthyle cellulose

COX2: Cyclo-oxygénase 2

FAK: Focal adhesion kinase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

IgG: Immunoglobuline G

IL-1 $\beta$  : Interleukine-1 $\beta$

IL-8: Interleukine 8

MyD88: Myeloid differentiated proteins factor 88

NF-KB: Nuclear facteur kappa B

NLRP3: NOD-like receptor (NLR) superfamily, pyrin domain containing 3.

OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Économiques

P2X7: Récepteur à anticorps monoclonal

PEG: Prostaglandine

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

PyK-2: Protein tyrosine kinase 2

ROS: Reactive oxygen species

SEM: Standard error of the mean

SLC2A9: Solute carrier family 2

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$

TLR: Toll-like receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

UMS : Urate mono-sodique

URAT 1 : Urate monosodique Transporteur1

## Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
I	Exemples de plantes dotées d'un pouvoir anti-inflammatoire utilisées dans le traitement traditionnel de l'arthrite goutteuse.	14
II	Structures chimiques des principaux composés phénoliques de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	17
III	Répartition des groupes et leurs traitements respectifs.	24
IV	Rendements de l'extraction à partir des feuilles et des écorces de <i>F. angustifolia</i> .	29
V	Résultats du dosage de l'activité phosphatase acide totale dans les sérums.	35

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
01	Structure chimique de l'acide urique et de l'urate mono-sodique	03
02	Goutte aigue du gros orteil et Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille.	04
03	Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire.	07
04	Structure du probénécide.	10
05	Structure de la colchicine.	11
06	Mécanisme d'action de la colchicine.	12
07	Mode d'action de l'anakinra.	13
08	Photographie de l'arbre de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	15
09	Modèle de mécanisme d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes.	19
10	Photographies originales des feuilles et d'écorce de <i>F. angustifolia</i> .	20
11	Cage des souris.	21
12	Schéma du protocole d'extraction.	22
13	Photographies originales montrant les deux voies d'administration des traitements (A) et des UMS (B).	23
14	Photographie de la mesure de l'épaisseur de l'œdème (A) induit au niveau de la patte droite de la souris (B).	25
15	Photographie de la mesure de la température rectale.	25
16	Dissection et prélèvement des organes des souris sacrifiées pour une observation macroscopique des viscères.	28
17	Effets anti-inflammatoires des extraits ethanologique et aqueux des feuilles de <i>F.angustifolia</i> , la colchicine et l'indométacine sur l'inflammation induite chez les souris.	31
18	Représente l'effet anti-inflammatoire des extraits ethanologique et aqueux d'écorce de <i>F.angustifolia</i> , la colchicine et l'indométacine sur l'inflammation induite chez les souris par des UMS (contrôle positif).	33
19	Représente les variations de la température corporelle des souris en parallèle avec l'inflammation induite par des UMS chez les souris et traitées par l'indométacine, la colchicine et les extraits ethanologique et aqueux.	34
20	Représente le suivi de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés par souris par jour pendant 14 jours.	36
21	Représente le suivi de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés par souris par jour pendant 14 jours.	37
22	Photographies des foies, rates et reins (de gauche à droite) des souris mâles et femelles testés pour la toxicité des extraits éthanologique de feuilles (FF)(B) et d'écorces (FE)(C) de <i>F.angustifolia</i> .	38
23	Photographie d'un foie et d'un rein de souris altérés	39
24	Photographies des organes (Foies, Rates, Reins) des souris mâles et femelles issues du test de confirmation de la toxicité aiguë.	40



# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

## CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. HISTORIQUE ET DÉFINITION DE LA GOUTTE.....	02
I.2. FACTEURS ASSOCIÉS AU RISQUE DE GOUTTE.....	02
I.3. FORMATION DES CRISTAUX D'URATE MONOSODIQUES.....	03
I.4. SYMPTÔMES DE LA GOUTTE.....	04
I.5. MÉCANISME DE L'INFLAMMATION AIGUE.....	05
I.5.1. DÉCLENCHEMENT DE L'ACCÈS AIGUE.....	05
I.5.2. INFLAMMASOME ET IMMUNITÉ INNÉE.....	06
I.5.3. AMPLIFICATION DE LA RÉACTION INFLAMMATOIRE.....	07
I.5.4. RÉSOLUTION SPONTANÉE DE L'INFLAMMATION AIGUE.....	07
I.6. LA THÉRAPIE DE L'ARTHRITE GOUTTEUSE.....	08
I.6.1. TRAITEMENTS NON PHARMACOLOGIQUES.....	08
I.6.2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES.....	08
I.7. TRAITEMENT PAR LES PLANTES MÉDICINALES.....	13
I.7.1. <i>FRAXINUS ANGUSTIFOLIA</i> .....	15
I.7.1.1. TAXONOMIE ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE.....	15
I.7.1.2. CLASSIFICATION BOTANIQUE ET NOMS VERNACULAIRES.....	16
I.7.1.3. COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DE <i>F. ANGUSTIFOLIA</i> .....	16
I.7.1.4. INTÉRÊT PHARMACOLOGIQUE.....	18
I.7.2. MÉCANISMES D'ACTION ANTI-INFLAMMATOIRES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES.....	18
I.8. OBJECTIF DU TRAVAIL.....	19

## CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIELS.....	20
II.1.1. APPAREILLAGES ET VERRERIE.....	20
II.1.2. PRODUITS CHIMIQUES.....	20
II.1.3. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	20
II.1.4. ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION.....	21
II.2. MÉTHODES.....	21
II.2.1. PRÉPARATION DES EXTRAITS ÉTHANOLIQUE ET AQUEUX.....	21
II.2.2. PRÉPARATION DES CRISTAUX D'URATE DE MONOSODIUM.....	22

<b>II.2.3. TEST <i>IN VIVO</i> D’EVALUATION DE L’ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE INDUIT PAR DES CRISTAUX UMS .....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.3.1. INDUCTION L’INFLAMMATION PAR LES UMS .....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.3.2. CARACTERISATION DE L’INFLAMMATION ET LES EFFETS ANTIINFLAMMATOIRE DES TRAITEMENTS.....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.3.2.1. MESURE DE L’EPAISSEUR DE LA PATTE.....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.3.2.2. MESURE DE L’EPAISSEUR DE LA TEMPERATURE CORPORELLE.....</b>	<b>25</b>
<b>II.2.3.2.3. DOSAGE DE L’ACTIVITE PHOSPHATASE ACIDE TOTALE (PAT).....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.4. TEST DE TOXICITE AIGUE .....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.4.1. PROCEDURE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.2. OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES ANIMAUX.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.3. MESURE DU VOLUME D’EAU ET DE LA QUANTITE DE NOURRITURE CONSOMMES .....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.4. ÉTUDE DE L’EVOLUTION PONDERALE DES SOURIS.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.5. SACRIFICE ET DISSECTION DES ANIMAUX.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS .....</b>	<b>28</b>

## **CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. RESULTATS DE L’EXTRACTION.....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. EVALUATION DES EFFETS DES EXTRAITS DE <i>F. ANGUSTIFOLIA</i> SUR L’INFLAMMATION INDUITE PAR DES UMS CHEZ LA SOURIS.....</b>	<b>30</b>
<b>III.2.1. EFFETS DES EXTRAITS DE FEUILLES DE <i>F. ANGUSTIFOLIA</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>III.2.2. EFFETS DES EXTRAITS D’ECORCE DE <i>F. ANGUSTIFOLIA</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>III.2.3. MESURE DE LA TEMPERATURE CORPORELLE.....</b>	<b>36</b>
<b>III.2.4. DOSAGE DE L’ACTIVITE DE LA PHOSPHATASE ACIDE.....</b>	<b>38</b>
<b>III.3. TEST DE TOXICITE AIGUE DE <i>F. ANGUSTIFOLIA</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>III.3.1. OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES ANIMAUX .....</b>	<b>39</b>
<b>III.3.2. MESURE DE LA QUANTITE DE NOURRITURE ET LE VOLUME D’EAU CONSOMMES .....</b>	<b>39</b>
<b>III.3.3. ÉTUDE DE L’EVOLUTION PONDERALE DES SOURIS.....</b>	<b>40</b>
<b>III.3.4. OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES ORGANES .....</b>	<b>41</b>
<b>III.4. DISCUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>51</b>

La goutte est une maladie métabolique fréquente, liée à un désordre du métabolisme des purines (**Bardin, 2007 ; Bennesser et al., 2010**). C'est la conséquence d'une hyperuricémie prolongée (**Rasool et Varalakshmi, 2006 ; Lee et al., 2013**), qui peut être secondaire soit à un excès de production, soit à un défaut d'élimination d'acide urique (**Bennesser et al., 2010**). C'est la plus fréquente des arthropathies inflammatoires chez l'Homme (1 à 2%) (**Richette et Bardin, 2010**), elle se caractérise par un dépôt des cristaux d'urate monosodique dans les articulations. Ils provoquent une réponse inflammatoire douloureuse, caractéristique de la crise de goutte aiguë (**Roberge et al., 1991 ; Dalbeth et al., 2010**).

La thérapie de la goutte fait appel à des substances de synthèse ou purifiées d'une origine animale ou végétale (allopurinol, indométacine, probénécide, PEG-uricase, colchicine,...), agissant par différents modes d'action. Bien que ces molécules sont efficaces, elles présentent le plus souvent des effets indésirables (insuffisances rénale et hépatique), qui peuvent limiter leur utilisation à long terme (**Bjarnason et al., 1990 ; Foster et Barret, 1993 ; Falcini et al., 1996 ; Steinmeyer, 2000 ; Triebkorn et al., 2004**). Ce qui ne cesse d'accroître le besoin de nouveaux traitements alternatifs, aussi efficaces et mieux tolérés par l'organisme, afin d'améliorer la prise en charge des cas pathologiques difficiles (**Dubost, 2011**).

Dans les pays en voie de développement, les plantes sont souvent utilisées comme une thérapeutique alternative à la médecine moderne, pour plusieurs de leurs propriétés, à savoir antiseptiques, analgésiques et anti-inflammatoires. En effet, approximativement 80% de la population africaine ont considéré les plantes médicinales la principale source de leur soins, ceci pour leurs meilleure accessibilité et moindre toxicité en général (**Bellik, 2012**).

Dans le Nord algérien, *Fraxinus angustifolia* est une plante utilisée traditionnellement dans le traitement de l'accès aigu de la goutte, notamment dans la région de la Kabylie. Néanmoins, aucune investigation scientifique n'a été effectuée concernant son activité anti-goutte et l'inflammation qui lui est associée. C'est dans cette perspective que s'inscrit ce présent travail, qui consiste à étudier l'activité anti-inflammatoire, *in vivo*, des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* dans le cas de l'arthrite goutteuse induite et évaluer leurs toxicité aiguë par voie orale.

## I.1. HISTORIQUE ET DEFINITION DE LA GOUTTE

La goutte était déjà connue dans l'antiquité, elle a été décrite pour la première fois par les égyptiens, 2600 ans avant J.-C (**Ghaemi-Oskkoule et Shi, 2011**). Des médecins grecs lui ont donné le nom de "podagre" qui signifie: prise au piège par le pied (**Busso et So, 2010**). Vers le IX<sup>ème</sup> siècle, est apparu le mot "Goutte", expliquant qu'un poison contenu dans les humeurs ne pénètre goutte à goutte dans Les jointures. En 1854, *Garrod*, un physicien anglais a montré que le sérum des gouteux contenait une substance pénétrant dans les articulations, entraînant leur inflammation et s'accumulent dans d'autres tissus pour former des tophus (**Benesser et al., 2010**). Deux docteurs de la faculté de médecine (Hahnemann) et l'hôpital (Philadelphia), Dr James S. Faires et Dr Daniel J. Mc-Carty ont prouvé la nature de cette substance par l'injection des cristaux d'urate monosodique (UMS) dans leurs articulations et conclure, que cette substance provoque les mêmes symptômes avec ses cristaux qui sont la cause principale de la goutte. (**Davis, 1962**).

C'est une maladie métabolique fréquente, liée à un désordre du métabolisme des purines (**Schumacher, 1996**). C'est la conséquence d'une hyperuricémie prolongée symptomatique de l'arthrite goutteuse. Elle est caractérisée par un dépôt d'acide urique au niveau des articulations, qui peut être secondaire soit à un excès de sa production provenant du catabolisme des purines alimentaires et des acides nucléiques cellulaires et de la transformation directe en acide urique d'une partie des nucléotides puriniques issus de la purino-synthèse *de novo*, ou bien à un défaut de son élimination, qui est dans le cas normal à environ 70% par le rein et 30% par voie digestive (**Agudelo et al., 2001 ; Ryu et al., 2005 ; Bardin, 2007 ; Bennesser et al., 2010 ; Ea, 2011 ; Kingsbury et al., 2011 ; Peng et al., 2012 ; Fang et Waizy, 2013 ; Paragasam et Rasool 2013 ; Wei et al., 2014**).

## I.2. FACTEURS ASSOCIES AU RISQUE DE GOUTTE

L'hyperuricémie représente le facteur de risque majeur pour l'apparition de la pathologie de la goutte (**Benesser et al., 2010 ; Roddy, 2010**). Néanmoins plusieurs autres facteurs peuvent être liés à son origine ou interviennent pour favoriser ses manifestations pathologiques à savoir :

- **Les facteurs génétiques** comme l'action régulatrice des concentrations sériques d'urates par les transporteurs rénaux d'acide urique (SLC2A9 et ABCG2) (**Benesser, 2010 ; Chalès, 2011 ; So et Busso, 2012**).



- **L'Age** : La prévalence de la goutte augmente avec l'âge, en effet la lenteur de formation des dépôts cristallins pathogènes d'urate monosodique conduit à l'apparition des symptômes chez des sujets âgés (**Bardin et Richette, 2011**).
- **Le sexe**: Les estrogènes ont un effet uricosurique qui protège la femme jusqu'à la ménopause, ce qui rend l'uricémie plus faible chez la femme adulte non ménopausée que chez l'homme (**Lioté, 2010**).
- **Le Régime alimentaire et la masse corporelle** : L'incidence de la goutte augmente avec l'apport journalier de viande ou de produits de la mer et la consommation de boissons, notamment alcoolisées. Tandis, que les produits laitiers ont un effet protecteur en favorisant l'excrétion de l'acide urique (**Chalès, 2011**). De plus, le risque de goutte augmente avec le poids corporel (**Bardin et Richette, 2011**).
- **La prise des Médicaments** : Certains médicaments utilisés en thérapeutique, particulièrement chez les sujets âgés, sont réputés pour diminuer l'excrétion de l'acide urique comme les diurétiques et l'aspirine à faible dose (**Chalès, 2011**).

### I.3. FORMATION DES CRISTAUX D'URATE MONOSODIQUES

L'acide urique est un acide faible dont la constante de dissociation (pKa) est de 5,8 (Figure 01 A). A un pH urinaire inférieur à son pKa, l'acide urique est principalement sous forme non dissocié, peu soluble et susceptible de précipiter pour former des calculs (**Lioté et al., 2007**). Dans le plasma sanguin, il existe à 98% sous forme plus soluble : l'urate monosodique (Figure 01 B) (**Kuntz et al., 2003 ; So et Thorens, 2010**).

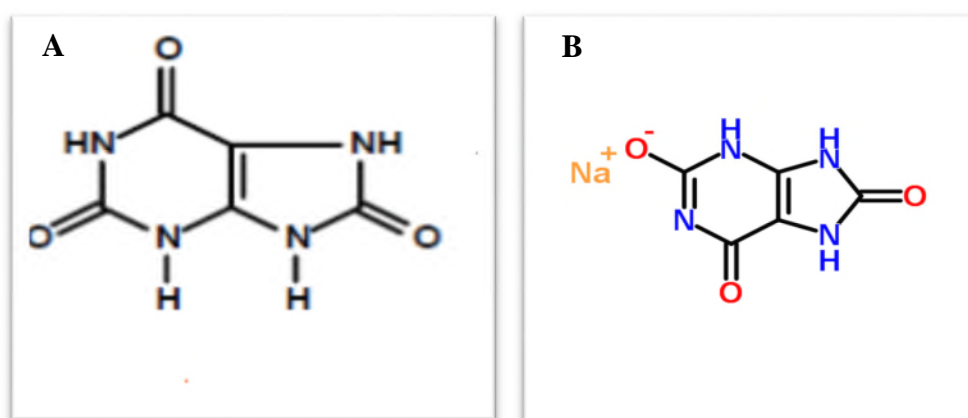


Figure 01 : Structure chimique de l'acide urique (A) (**Anthony et al., 2012**) et de l'urate monosodique (B) (**RSC, 2015**).

Il est classiquement libre, mais une partie de l'urate plasmatique peut être liée à des protéines plasmatiques, en particulier à l'albumine et plus fortement à l'alpha globuline (Godeau *et al.*, 2004). Cependant, des microcristaux se forment en cas des sursaturations des liquides biologiques en urate de sodium. Ce phénomène survient à partir d'une concentration de 70 mg d'acide urique/L. Ce taux correspond à la limite supérieure de la solubilité sanguine de l'urate. Toute concentration supérieure favorise le processus de cristallisation (Kuntz *et al.*, 2003) et le dépôt de cristaux d'urate de sodium dépend d'autres facteurs tels que la température corporelle, les variations de pH et l'état de vascularisation des tissus (Wilcox et Khalaf, 1972 ; Bennesser *et al.*, 2010).

#### **I.4. SYMPTOMES DE LA GOUTTE**

Elle se traduit par des manifestations aiguë et chronique : la goutte aiguë est une conséquence d'une réaction inflammatoire consécutive à la précipitation d'UMS dans l'articulation : l'arthrite microcristalline qui entraîne une douleur, une inflammation et un œdème importants qui nuisent à la qualité de vie (Chia *et al.*, 2008 ; Shi *et al.*, 2008 ; Donald-Blumer *et al.*, 2010). Au fil du temps, l'inflammation risque de causer une destruction articulaire surtout au niveau du gros orteil (Rozenberg, 2007) conduisant à une goutte chronique, qui est la conséquence d'une surcharge uratique chronique et prolongée. Ses signes sont principalement cutanée (les tophus sur le pourtour de l'oreille), articulaire et urinaire (Figure2) (Kuntz, 1979).

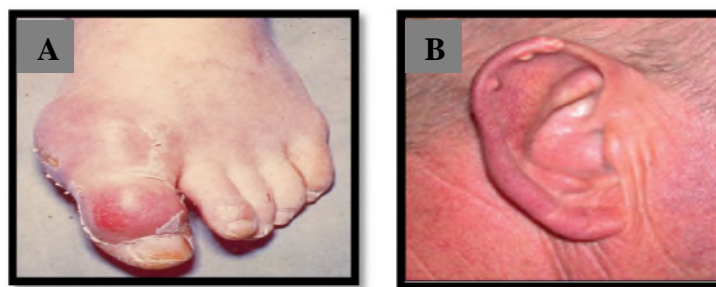


Figure 02 : Goutte aiguë du gros orteil (A) (Lespine, 2006) et Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille (B) (Richette, 2010).

L'apparition de sévères symptômes causés par les cristaux d'urate monosodique s'explique par un archétype de la réaction inflammatoire aiguë.

**I.5. MECANISME DE L'INFLAMMATION AIGUE**

La réaction inflammatoire microcristalline, en particulier dans la crise de la goutte résulte d'une interaction entre les cristaux et les cellules qui composent l'articulation (synoviocytes, macrophages et leucocytes infiltrant) (**Delbeth et al., 2005**). Elle Mettent en avant l'immunité innée et le complexe inflammasome ( **Kingsbury et al., 2011; Wei et al., 2014**), en particulier le rôle prépondérant de l'IL-1 $\beta$ , dans le déclenchement de la réaction, le rôle du Switch monocytes-macrophages et de l'apoptose dans la résolution de la crise (**Lioté et al., 2006** ). L'implication des récepteurs TLR (Toll ou Toll-like receptors) est essentielle dans l'immunité innée antimicrobienne et dans la réponse aux cristaux d'UMS (**Josteen et al., 2011**). Ce mécanisme se déroule en quatre principales étapes : Le déclenchement de l'accès aigu, l'implication de l'inflamasome et l'immunité innée, l'amplification de la réaction inflammatoire et enfin la résolution spontanée de l'inflammation aiguë (**Rose et Liu-Bryan, 2006 ; Lioté, 2011**).

**I.5.1. DECLENCHEMENT DE L'ACCES AIGUE**

La réaction inflammatoire aux cristaux d'UMS peut se décomposer en plusieurs phases : l'irruption intra-articulaire des cristaux depuis les dépôts cartilagineux ou synoviaux et activation des cellules de la membrane synoviale qui produisent des cytokines inflammatoires (IL-8) et des chimiokines, la stimulation des cellules endothéliales et capillaires et le recrutement des mastocytes, des monocytes sanguins et des polynucléaires neutrophiles (PNN) (**Lioté et al., 1996 Lioté et al., 2007 ; Sabina et Rasool, 2008 ; Paragasam et Rasool, 2013**).

Les microcristaux, libérés dans l'articulation à la faveur d'une variation de la température et du pH, peuvent activer les cellules selon deux mécanismes différents :

**1.5.1.1. LA PHAGOCYTOSE**

La phagocytose des cristaux d'UMS par les macrophages résidents, puis les PNN qui peut être favorisée par l'opsonisation des IgG ou par des fractions du complément induit une libération des enzymes lysosomales et une activation des cytokines inflammatoires (**Roberge et al., 1991 ; Choi et al., 2005**).

**1.5.1.2. INTERACTIONS CELLULES/CRISTAUX**

Selon la nature des cristaux, on distingue deux types d'interaction : l'interaction entre les cellules et les cristaux nus et l'interaction entre les cellules et les cristaux revêtus de protéines.

**a) Interaction entre les cellules et les cristaux nus**

Deux types de liaisons sont mis en œuvre pour ce type d'interaction :

- Une liaison électrostatique due aux charges négatives des cristaux leur permet ainsi de se lier aux composantes de la membrane, cette interaction provoque un influx calcique précoce et entraîne aussi une modification de la perméabilité membranaire, un stress mécanique de cisaillement et stimule un mécanorécepteur comme les intégrines (Shi *et al.*, 2010 ; Al-Nahain *et al.*, 2014).
- L'alternative est une liaison directe avec un récepteur membranaire où les cristaux d'UMS sont capables d'activer la phosphorylation des protéines PYK-2 et FAK situées en aval des intégrines (Liu *et al.*, 2004), d'induire l'expression d'une molécule membranaire exprimée par les cellules myéloïdes et de stimuler les molécules situées en aval des récepteurs TLR-2 et 4 (Murakami *et al.*, 2006) ou encore le récepteur de L'IL-1 $\beta$  (Chen *et al.*, 2006).

**b) Interaction entre les cellules et les cristaux d'UMS revêtus de protéines**

Cette interaction peut se faire par l'intermédiaire d'une protéine adsorbée à la surface des cristaux (Ginsberg *et al.*, 1977 ; Doherty *et al.*, 1983). En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence ce type d'interaction. La réponse des polynucléaires neutrophiles stimulés par des cristaux d'UMS est inhibée en présence d'un anticorps anti-CD11 (Lioté *et al.*, 2007 ; Lioté *et al.*, 2011; Ea, 2011).

**1.5.2. INFLAMMASOME ET IMMUNITÉ INNÉE**

Les cellules phagocytaires de l'immunité innée telle que les monocytes et les macrophages reconnaissent les UMS comme un signal de « danger » (Ghaemi-Oskouie *et Shi*, 2011) capable de stimuler la maturation des cellules dendritiques et l'activation de l'inflammasome (Ea, 2011 ; Kinsbury *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2014). Ces cristaux induisent la production et l'activation de l'IL-1 $\beta$  qui s'effectue en 3 étapes :

La production de précurseur pro IL-1 $\beta$ , la maturation de ce précurseur, puis sa sécrétion. Cette maturation se fait par l'intervention d'élastase, la chymase et la caspase-1 (cas-1). Cette dernière est activée via le récepteur P2X7, après un éfflus de potassium induit par l'ATP, ou via l'inflammasome NLRP3 activé après libération des enzymes lysosomales, telle que la cathepsine B et libération des espèces réactives de l'oxygène (après désorganisation des phagolysosomes). L'IL-1 $\beta$  sécrété se lierait ensuite à ses récepteurs pour stimuler la production de cytokines inflammatoires et des chimiokines via MyD88 et la voie de NF- $\kappa$ B (Figure 03) (Landis et al., 2002 ; Yagni et al., 2004 ; Rose et Liu-Bryan, 2006 ; Richette, 2010 ; Paragasam et Rasool, 2013).

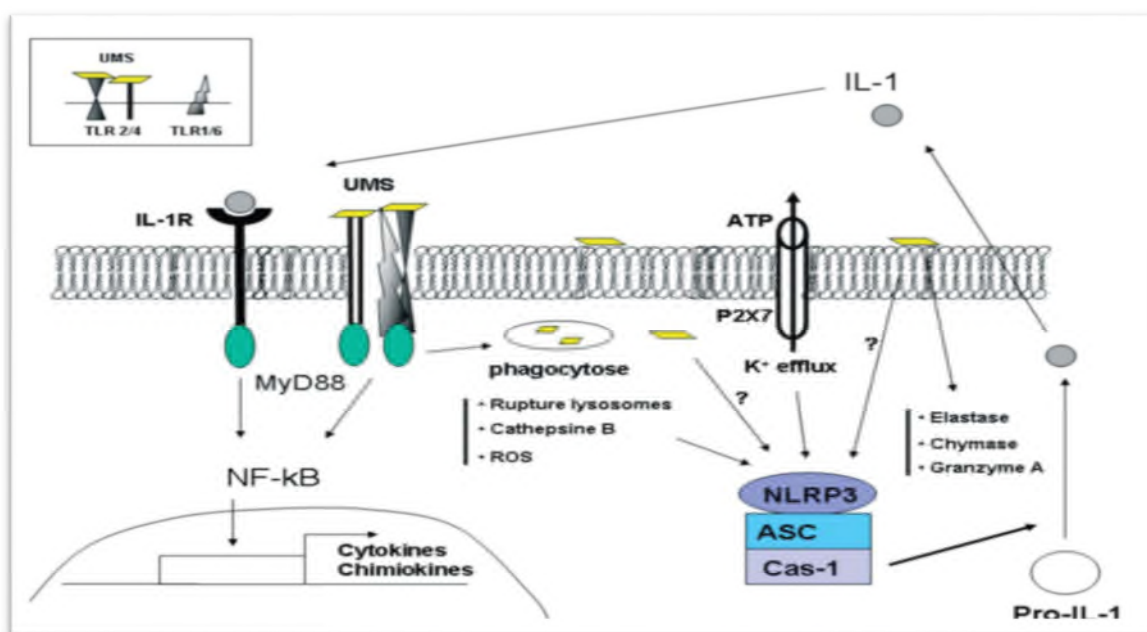


Figure 03 : Mécanisme de déclenchement de la réaction inflammatoire (Ea, 2011).

### I.5.3. AMPLIFICATION DE LA REACTION INFLAMMATOIRE

Des études *in vivo* ont montré que les monocytes sanguins et les mastocytes étaient les premières cellules activées (Landis et al., 2002 ; Lioté, 2006). Les mastocytes peuvent sécréter leurs granules préformés qui contiennent de l'histamine et des cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  et entraînent ainsi une activation des cellules endothéliales et favorisent le recrutement des PNN (Marshall, 2004 ; Peng et al., 2009).

### I.5.4. RESOLUTION SPONTANEE DE L'INFLAMMATION AIGUE

Curieusement, malgré la présence persistante des microcristaux dans le liquide articulaire et l'activation cellulaire, l'inflammation aigue goutteuse va s'interrompre spontanément (Lioté et al., 1995 ; Kuntz, 2003 ; Rose et Liu-Bryan, 2006).

Plusieurs mécanismes régulateurs ont été proposés : La dissolution des microcristaux par les variations de pH (**Benesser et al., 2010**), la modification du revêtement protéique par les lipoprotéines ou par d'autres facteurs produits localement en fin d'accès, réduisant leur potentiels inflammatoire, la nécrose des polynucléaires neutrophiles et la détersion des corps apoptotiques (**Lioté, 1999; Kuntz, 2003**). D'autres parts, les inhibiteurs naturels de la différenciation des monocytes pro-inflammatoires en macrophages sécrètent des molécules anti-inflammatoires, telles que le TGF- $\beta$ , le PPAR et le monoxyde d'azote NO. Et enfin la mort des PNN, soit par nécrose soit par apoptose (**Kuntz, 2003 ; Lioté et al., 2011**).

## **I.6. THERAPIE DE L'ARTHRITE GOUTTEUSE**

Le traitement hypouricémiant dans la goutte a pour objectif de maintenir l'uricémie de façon prolongée en dessous du point de saturation de l'urate de sodium, ce qui permet la dissolution des dépôts uratiques pathogènes, et donc la guérison (**Richette, 2011**). On distingue les traitements non pharmacologiques et les traitements pharmacologiques.

### **I.6.1. TRAITEMENTS NON PHARMACOLOGIQUES**

Ce traitement est basé sur certaines règles hygiéno-diététiques : la perte de poids par une restriction calorique en cas d'obésité (**Lafforgue et Legré, 2005**) où une perte de poids de plus de 10kg diminue l'uricémie d'environ 35  $\mu\text{mol/l}$ , mais cette perte doit être progressive, car l'amaigrissement rapide peut générer une cétose et augmenter l'uricémie (**Richette, 2011**), La modification des habitudes alimentaires, tels que l'arrêt définitif de la bière, des alcools forts et de sodas riches en fructose (**Lederer, 1978**), ainsi que la diminution de consommation des aliments riches en purines (la viande, les abats, les poissons gras et les crustacés) (**Dubost et al., 2011**) et éventuellement l'arrêt d'un médicament, en particulier les diurétiques, car ils provoquent une insuffisance rénale et par conséquent un effet hyperuricémiant (**Bardin, 2004**).

### **I.6.2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES**

Le but du traitement pharmacologique est de diminuer l'uricémie en dessous de 50–60 mg/L (300–360 $\mu\text{M}$ ) par la prise des hypouricémiants (**Reach, 2011**) comme les inhibiteurs de la xanthine oxydase (allopurinol, fébuxostat), les agents uricosuriques (probenécide), les traitements du calcul d'acide urique, les uricases (PEG uricase) et les anti-inflammatoires (colchicine, indométacine).

### **I.6.2.1. LES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE D'ACIDE URIQUE**

L'allopurinol (**ZYLORIC®**) est l'inhibiteur le plus prescrit pour la prévention des crises de l'arthrite goutteuse (**Owen et Johns, 1999**). C'est un composé aromatique possédant un cycle purine, (4-hydroxypyrazolo-(3,4-d) pyrimidine) isomère de l'hypoxanthine (**Faure, 2010**). Dans l'organisme et en présence de l'oxygène moléculaire, Il est métabolisé par la xanthine oxydase en oxypurinol, un inhibiteur non compétitif de la xanthine-oxydase, donnant naissance à des molécules de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Hitching, 1966 ; Klein et al., 1996 ; Dallwing, 2010**).

Certaines manifestations d'intolérance ont été signalées pour cette substance, Telles que la réaction d'hypersensibilité qui se manifeste par une éruption disquamative ou nécrotique avec fièvre, l'hépatite et l'insuffisance rénale (**Dubost et al., 2011**). D'ailleurs, l'allopurinol est contre indiqué chez les insuffisants rénaux et chez le transplanté d'organe (**Lioté, 2007 ; Rozenberg, 2007**).

### **I.6.2.2. LES URICOSURIQUES**

Ce sont des acides organiques qui exercent leur effets hypouricémiant en inhibant les transporteurs d'anions, notamment URAT1 (**Dubost et al., 2011**). Deux uricosuriques sont officiellement disponibles, le probénécide et la benzbromarone. Ils induisent le risque de lithiase urique qu'il faut prévenir en assurant une diurèse suffisante par le contrôle du pH urinaire qu'il faut maintenir au dessus de 6, ceci en alcalinisant si besoin les urines (**Lioté et Bardin, 2007**).

Le probénécide (**BENEMIDE®**) (Figure 04) est un médicament alternatif prescrit dans les cas d'intolérance à l'allopurinol (**Marié et al., 2005**). En favorisant l'élimination urinaire d'acide urique, il est indiqué dans le traitement des hyperuricémies, de la goutte tophacée ou non et contre indiqué lors d'une hypersensibilité aux sulfamides, d'une insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine < 30 mL/minute), d'une lithiase urique ou une hyperuraturie (**Faure, 2010**).

C'est un uricosurique inefficace chez les patients ayant une insuffisance rénale modérée à moyenne (**Perez-Ruiz, 2007**) et efficace quand la clairance de la créatinine est supérieure à 50 mL/min (**Dubost et al., 2011**). Cet inhibiteur de la réabsorption tubulaire d'acide urique à une demi-vie de 6 à 12 heures (**Bardin, 2004**). Il est prescrit à la dose de 250 mg à raison de 2 fois/j, qui peut être augmentée progressivement toutes les deux semaines jusqu'à un maximum de 2 g/j (**Richette, 2011**). Au-delà de cette dose, apparaît un risque de surdosage notamment

source de convulsions et autres effets Secondaires (Lioté, 2007). Le probénécide diminue l'excrétion rénale de nombreux médicaments dont l'héparine, l'aspirine, les AINS et la pénicilline (Bennesser et al., 2010 ; Garay et al., 2012).

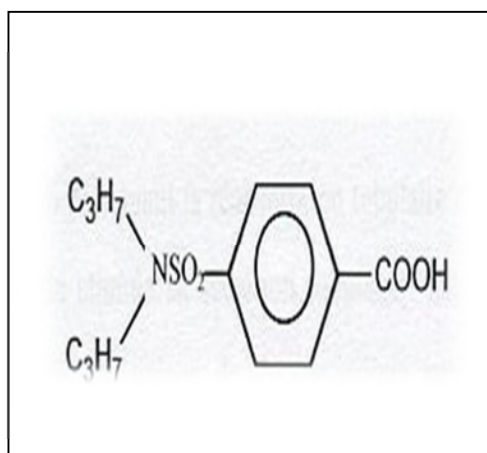


Figure 04 : Structure du probénécide (Wortmann et al., 1985).

### **I.6.2.3. LE TRAITEMENT DU CALCUL D'ACIDE URIQUE**

Le traitement consiste à une alcalinisation des urines. Celle-ci se fait per os par la prise de citrate de potassium, pendant une période qui varie selon le volume des calculs à dissoudre, avec surveillance de pH urinaire et augmentation des apports hydriques pour atteindre une diurèse au moins égale à 2 litres par jour (Hurtes, 2011).

### **I.6.2.4. LES URICASES**

Les uricases sont des enzymes hépatiques dont le gène est inactif chez l'Homme du fait d'une mutation « faux-sens » dans le gène codant pour cette enzyme (Izzedine et Deray, 2011), elles métabolisent l'acide urique en allantoiné, un composé plus soluble dans l'eau et plus aisément excrétée par le rein (Pétrilli et Martinon, 2007).

La PEG-uricase (PURICASE®) est une uricase porcine recombinante pégylée-PEG uricase-(péglicase) (Richette et al., 2011) produite par l'association du polyéthylène glycol à l'urate oxydase recombinante, ce qui permet une amélioration de ses propriétés pharmacocinétiques (demi-vie et tolérance) et la réduction de son antigénicité (Bennesser et al., 2010). Elle est indiquée chez les patients goutteux sévères réfractaires ou intolérants aux autres traitements hypouricémiants. Elle est utilisée en perfusion intraveineuse à 8 mg tous les 15 jours (Ea, 2011).



Ses effets indésirables sont des réactions allergiques, des événements cardiovasculaires, des accès aigus goutteux, des lithiases rénales, arthralgie, anémie, spasmes musculaires, dyspnée, céphalées, nausées et fièvre (**Garay et al., 2012**), elle est contre indiquée chez les patients ayant un déficit en G6PD (**Richette, 2011**).

### **I.6.2.5. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS (AINS)**

Ils sont utilisés pour soulager la douleur comme l'indométacine à la dose de 200mg par jour, et la phénylbutazone, à la dose quotidienne de 500 mg pendant 5 à 10 jours, puis diminués à la moitié de la dose suivant l'évolution clinique. Ils sont efficaces mais moins spécifiques de la goutte que la colchicine (**Lafforgue et Legré, 2005**) et ils sont formellement contre-indiqués en cas d'accès goutteux chez un greffé d'organe, rein et cœur en particulier : le risque rénal est majeur et peut se solder par une insuffisance rénale aiguë suivie d'un œdème aigu pulmonaire (**Lioté, 2007 ; Janus et al., 2012**).

### **I.6.2.6. LA COLCHICINE**

La colchicine est un alcaloïde extrait du colchique (**Nuki, 2008 ; Le Bellec et al., 2009**), de structure chimique  $C_{22}H_{25}NO_6$  (Figure 05) (**King et al., 1952**). Elle est douée de propriétés anti-inflammatoires dont l'un des mécanismes de son action est l'inhibition du recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation (Figure 06) (**Pétrilli et Martinon, 2007 ; Faure, 2010**).

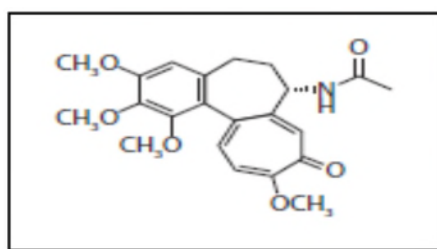


Figure 05 : Structure de la colchicine (**Robert et Hood, 1994**).

C'est le traitement habituel de la crise aigue de la goutte (**Borstad et al., 2004 ; Bennesser et al., 2010 ; Sabina et al., 2011**), sa posologie doit être adaptée à la fonction rénale et l'âge du patient (**Dubost et al., 2011**). Elle est prescrite par voie orale à une dose de 0,5 à 1 mg toutes les 2 à 4 heures le premier jour, sans dépasser 4 mg/j. Les jours suivants, la dose est diminuée en fonction de l'inflammation articulaire (**Lioté, 2007**). Elle est contre-indiquée en cas d'insuffisance rénale ou hépatique sévère (**Faure, 2010**).

Sa toxicité dépend de la dose et peut être toxique à faible dose lorsqu'elle est prescrite avec la ciclosporine ou un macrolide, qui entravent son élimination hépatique en inhibant la P-glycoprotéine, qui intervient dans le transport membranaire de la colchicine (**Bardin, 2007**).

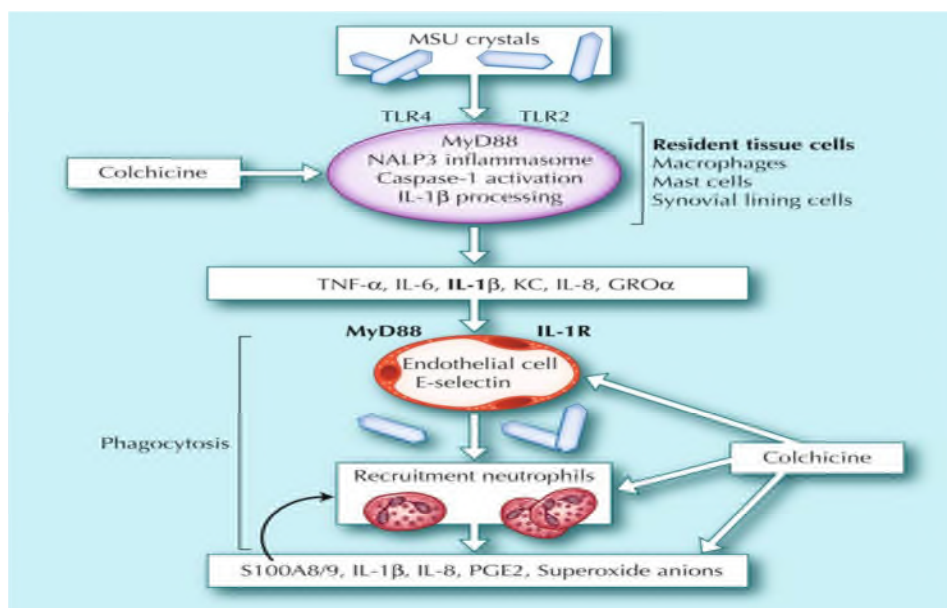


Figure 06 : Mécanisme d'action de la colchicine (**Nuki, 2008**).

**I.6.2.7. INHIBITEUR D'IL-1 (L'ANAKINRA) OU (IL-1RA)**

Actuellement, d'autres traitements sont disponibles contre l'arthrite goutteuse, tel que l'inhibiteur d'IL-1 (**Fang et Waizy, 2013**). Les cristaux d'urate de sodium stimulaient la sécrétion d'IL-1 par les macrophages et les monocytes (**Lioté, 2007**). L'anakinra antagoniste de récepteur de l'IL-1, bloque l'activité de l'interleukine-1β (IL-1β) par sa liaison avec une grande affinité au récepteur membranaire de l'IL-1, mais ne transmet aucun signal d'activation cellulaire (Figure 07) (**Ea, 2011**). Sa posologie est de 100 mg par jour, injecté par voie sous-cutanée, pendant 3 jours. (**Richette et al., 2011**). L'anakinra présente un inconvénient majeur qui réside en sa demi-vie brève qui favorise le recours à des injections sous-cutanées quotidiennes ( **Dubost et al., 2011**), néanmoins ses effets immédiats dans l'atténuation des symptômes inflammatoires dès la première injection font de lui un bon traitement utilisé en thérapeutique (**Pétrilli, et Martinon, 2007**).

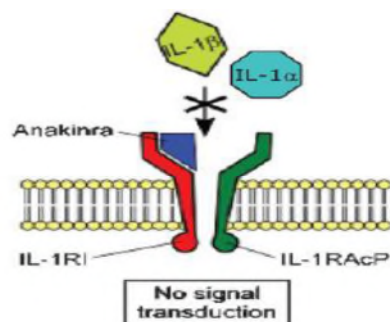


Figure 07 : Mode d'action de l'anakinra (Chalès, 2010).

Le traitement des maladies à caractère inflammatoire par les molécules synthétiques entraîne beaucoup d'autres pathologies chez les patients, telles que des perturbations métaboliques (l'ulcère) (Bjarnason *et al.*, 1990), la perturbation de la fonction rénale (Triebkorn *et al.*, 2004), la suppression de la réponse aux infections (Steinmeyer, 2000), l'ostéoporose (Falcini *et al.*, 1996) et la cataracte (Foster et Barret, 1993). Ce qui a stimulé le recours à des traitements naturels substitutifs aussi efficaces et mieux tolérés par l'organisme.

## I.7. TRAITEMENT PAR LES PLANTES MEDICINALES

Des plantes médicinales sont utilisées dans la médecine populaire pour le traitement de plusieurs types de maladies, y compris les rhumatismes et la goutte, ceci par l'application de leurs extraits contenant les principes actifs. Beaucoup d'investigations scientifiques sont actuellement consacré aux études des activités biologiques des plantes médicinales à intérêts pharmacologiques, tels que l'activité anti inflammatoire. Ces extraits de plantes ont permis de découvrir des molécules d'origine végétale avec un potentiel anti-inflammatoire préventif et /ou curatif dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules font souvent partie des métabolites secondaires des végétaux à savoir les composés phénoliques (Subhan *et al.*, 2007 ; Nigrao, 2009 ; Patra *et al.*, 2010 ; Goetz, 2011 ; Chouhan *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2012 ; Valli, 2012).

Le tableau IV représente certains exemples de plantes qui ont fait l'objet des activités anti-inflammatoires incluant le cas de l'arthrite goutteuse, tout en précisant le nom de la plante, la partie utilisée, la dose appliquée, l'effet anti-inflammatoire obtenu, ainsi que le principe actif attribué à cet effet.

Tableau I: Exemples de plantes dotées d'un pouvoir anti-inflammatoire utilisées dans le traitement traditionnel de l'arthrite goutteuse.

Les plantes	Partie utilisée	La dose appliquée	Effet anti- inflammatoire	Principe actif	Références
<i>Withania somnifera</i>	Racine	500mg/Kg	Inhibition de l'activation de l'expression des gènes NF-κB.	Withanolide	<b>Rassol et al., 2006</b>
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe(Ginger)	Racine	---	Inhibe la COX-2	Ginger	<b>Sabina et al.,2009</b>
<i>Commiphora mukul</i>	Plante entière	100mg/Kg 500mg/Kg	Inhibe l'expression de NF-κB	Guggulsterone	<b>Bardin,2011</b>
<i>Curcuma longa</i>	Plante entière	--	Inhibe la cyclo-oxygénase COX-2	Curcumin	<b>Jachson et al., 2006 ; Khanna et al., 2007</b>
<i>Boswellia serrata</i>	Racine	---	Inhibe l'activation de la transcription NF-κB et COX-2	Baswellia acid	<b>Khanna et al., 2007</b>
<i>Vitis vinifera</i>	Racine	---	Inhibition de l'expression NF-κB., et les gènes de production COX-2, IL-1β et IL-6	Resveratrol	<b>Khanna et al., 2007</b>
<i>Lychnophora trichocarpha</i>	Feuilles	LTE (125, 250mg/Kg), LTA (62,5, 125mg/Kg)	Inhibe l'enzyme xanthine oxydase Activité anti-hyperuricémique	Lupeol, steriod β-sitosterol	<b>De Souza et al., 2012</b>
<i>Ginger Rhizome</i> <i>Zingiber officinale</i>	Racine	10mg/Kg 20mg/Kg 30mg/Kg	Inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires, NF-κB, (prostaglandines PEG2) , cyclo-oxygenase (COX)	6-Shogaol	<b>Sabina et al., 2009</b>
<i>Sparattosperma leucanthum</i>	Feuilles	125mg/Kg 250mg/kg 500mg/Kg	Inhibition de l'enzyme xanthine oxydase (activité anti-hyperuricémique).	Flavone pinocembrin	<b>Lima et al., 2015</b>
<i>Triphala sp.</i>	Fruit	1000mg/Kg	Inhibition de la libération des enzymes lysosomales et le médiateur TNF-α	Acide éllagique, acide gallique, flavonoides, Vitamin C,	<b>Sabina et Rasool, 2007</b>

Les populations méditerranéennes, particulièrement dans le Nord maghrébin utilisent le frêne dans le traitement traditionnel des accès aigus de la goutte (Arthrite goutteuse). En Algérie, *Fraxinus angustifolia* est la plus abondante des deux espèces représentatives du genre *Fraxinus* (Quezel et Santas, 1963).

**I.7.1. FRAXINUS ANGUSTIFOLIA**

Le genre *Fraxinus* appartient à la famille des Oléacées et comprend environ 70 espèces ligneuses, qui sont largement distribuées en Europe, Afrique du Nord, Asie de l'Est et du Nord et en Amérique centrale (Lee et al., 2012). Le genre a été décrit par Linnaeus en 1753 et dès lors, plus de 450 taxons ont été décrits (Wallander et al., 2008). Le frêne à feuilles étroites est un arbre qui atteint 20 à 25 m de haut et vivant de 150 à 200 ans. Cette espèce est tolérante des sols secs que les autres espèces du genre *Fraxinus*. C'est une espèce thermophile qui préfère les sols basique à neutre (Rameau et Dumé, 1989 ; Duflot, 2002 ; Prat et al., 2006).



Figure 08: Photographie de l'arbre de *Fraxinus angustifolia*.

**I.7.1.1. TAXONOMIE ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE**

Il y a plusieurs points de vue différents quant au statut taxonomique de cette espèce, mais en général, on considère que *Fraxinus angustifolia* a trois sous-espèces distribuées par région géographique, la sous-espèce (ssp.) *angustifolia* (dans l'Ouest de la Méditerranée), ssp. *Oxycarpa*, (dans l'Est et le Sud-Est de l'Europe), et ssp. *syrriaca* ou frêne syrien (en Turquie et en Iran vers l'Est) (Capuana, 2013).

En fait, *Fraxinus angustifolia* est l'espèce méditerranéenne par excellence vu qu'on la retrouve fréquemment dans les habitats biogéographiques méditerranéens. Elle est donc naturellement présente dans tout le Sud et l'Est de l'Europe, du Portugal à l'Ouest jusqu'à la mer Noire à l'Est (Tonon et al., 2001 ; Temunovic et al., 2012), tout le long du Nord africain, plus fréquemment au Maroc, Tunisie et Algérie (Quezel et Santas, 1963).

**I.7.1.2. CLASSIFICATION BOTANIQUE ET NOMS VERNACULAIRES**

Wallander a pu établir la nouvelle classification du genre *Fraxinus* en 2008 (Wallander, 2008), qui repose essentiellement sur une étude phylogénique moléculaire. Cette classification a placé l'espèce *Fraxinus angustifolia* dans la position systématique suivante :

**Règne :** Végétal

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Ordre :** Oléales

**Famille :** Oléacées

**Genre :** *Fraxinus*

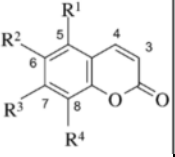
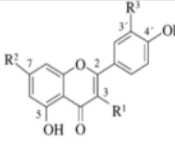
**Espèce :** *Fraxinus angustifolia*

Les noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* sont multiples, elle s'appelle en arabe (Derdar), en anglais (Narrow leaved ash, southern ash), en français (Frêne à feuilles étroites, oxyphylle), et le nom amazigh (Aslen, Thaslent) (Rameau et Dumé, 1989).

**I.7.1.3. COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DE *F. ANGUSTIFOLIA***

Le genre *Fraxinus* est une source riche en composés phénoliques biologiquement actifs, dont plusieurs ont été identifiés comprenant des coumarines, des flavonoïdes (la rutine, l'astragaline et la nicotiflorine), des lignanes (pinoresinol, pinoresinol-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, 8-Hydroxypinoresinol-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, Fraxiresinol-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside), et des des phényléthanoides, illustrés dans le tableau II.

Tableau II : Structures chimiques des principaux composés phénoliques de *Fraxinus angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007).

Les coumarines								
	<b>Esculetine</b>	<b>Esculine</b>	<b>Cichoriine</b>	<b>Scopoletine</b>	<b>Isoscooletine</b>	<b>Fraxetine</b>	<b>Fraxine</b>	<b>Fraxinol</b>
R1	H	H	H	H	H	H	H	OMe
R2	OH	OGLe	OH	OMe	OH	OMe	OMe	OH
R3	OH	OH	OGLE	OH	OMe	OH	OH	OMe
R4	H	H	H	H	H	OH	OGLe	H
Les flavonoïdes								
	<b>Rutine</b>	<b>Astragaline</b>		<b>Nicotiflorine</b>				
R1	O-Glc <sup>6</sup> -Rha	O-Glc		O-Glc <sup>6</sup> -Rha				
R2	OH	OH		OH				
R3	OH	H		H				
Les lignanes								
Pinoresinol			8-Hydroxypinoresinol-4-O-3-D-Glycopyranoside					
Pinoresinol-4-O-3-D-Glucopyranoside			Fraxiresinol-8-O-3-D-Glycopyranoside					
Phényléthanoides glycosylés								
Oleoside-7, 11-Dimethylester			Fraxicarboside A					
Oleuropein			Fraxicarboside B					
Ligstrosides			Fraxicarboside C					
10-Hydroxylligstroside			Methylated Secoiridoid Glucosides					
10-Hydroxyoleuropein			Secoiridoids GI-3					
Angustifolioside A			Secoiridoids GI-5					
Angustifolioside B			Oleobutyl					
Angustifolioside C			Ligstrobutyl					
Neuzhenide			Ligstral					

#### **I.7.1.4. INTERET PHARMACOLOGIQUE**

Quelques espèces du genre *Fraxinus* trouvent l'application dans la médecine, les feuilles sont principalement recommandées contre la fièvre et les rhumatismes (**Kostova et Iossifova, 2007**). Les extraits et les métabolites de *Fraxinus* se sont avérés à posséder des activités régénératrices de peau, anti-inflammatoire, modulatrice immunitaire, antimicrobiennes, antioxydants dans la prévention des dommages photodynamiques et antiallergiques. Ce sont aussi des diurétiques, purgatifs doux et laxatifs (**Calis et al., 1993**), et utilisés dans le traitement des ulcères et des plaies, la goutte, l'œdème et les calculs (**Gruenwald et al., 2007**) .

#### **I.7.2. MECANISMES D'ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE DES COMPOSES PHENOLIQUES**

Plusieurs études ont été faites sur la phytochimie des plantes médicinales, les activités biologiques de leurs principes actifs (métabolites secondaires), avec une ultime étape de détermination de leurs mécanismes d'action. Les hypothèses concernant les mécanismes d'action anti-inflammatoires des composés phénoliques des plantes sont diversifiées. Ils agiraient principalement par l'inhibition de l'expression des facteurs inflammatoires, inhiber leurs activités ou interrompre les cascades de transduction du signal.

L'acide *P*- coumarique est un principe actif, extrait à partir de certains végétaux, notamment les fruits, utilisé à une dose de 100mg/Kg et exerce son effet anti-inflammatoire via l'inhibition de la cyclooxygénase (COX-2) et la réduction de la production de la (PEG2) (**Pragasam et Rasool, 2013**).

Les flavonoïdes est une classe de composés phénoliques, rapportés pour leurs implications dans les pouvoirs anti-inflammatoires des plantes médicinales (**Sabina et Rasool, 2007 ; Lima et al., 2015**). Un modèle de mécanismes d'action anti-inflammatoire a été proposé pour expliquer comment les flavonoïdes exercent leurs activités anti-inflammatoires (Figure 08).

Les flavonoïdes peuvent moduler l'activité inflammatoire des cellules recrutées au cours de la réponse inflammatoire tels que les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles, inhiber l'activité des enzymes pro-inflammatoires telle que la phospholipase (PLA2) et la cyclooxygénase (COX) et la production d'autres enzymes pro-inflammatoires ainsi que l'expression des gènes pro-inflammatoires (**Bellik, 2012**).



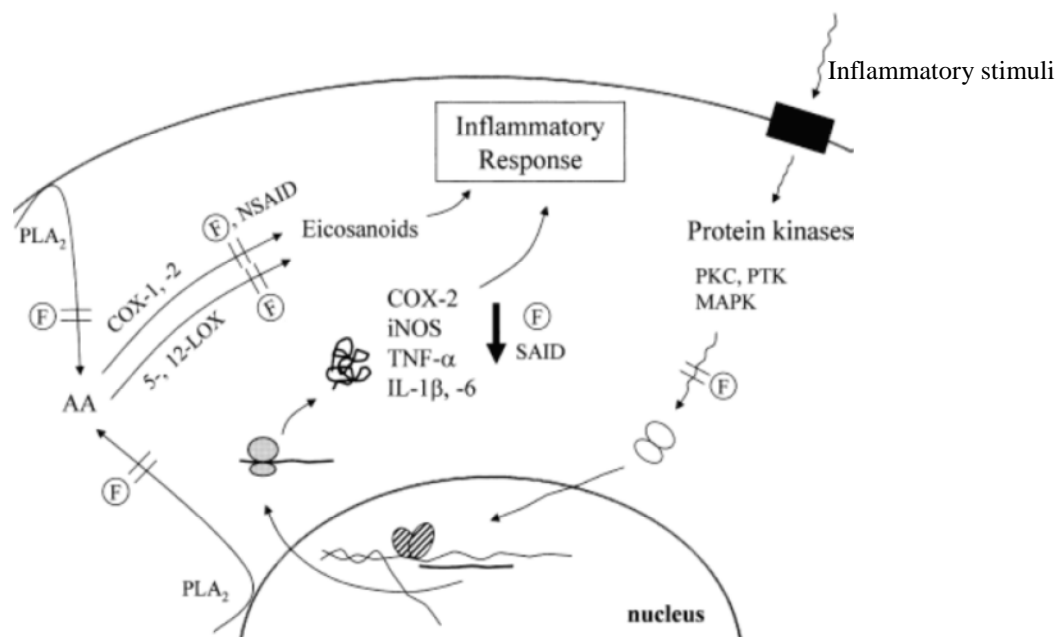


Figure 09 : Modèle de mécanisme d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes (Bellik, 2012).

## I.8. OBJECTIF DE TRAVAIL

Sur la base de son utilisation traditionnelle dans le traitement de l'inflammation associée à la maladie de la goutte, sa richesse et diversité en composés phénoliques font de *Fraxinus angustifolia* une plante intéressante pour des investigations pour des activités biologiques et phytochimiques.

Aucune investigation expérimentale antérieure sur l'effet de *Fraxinus angustifolia* sur un modèle de goutte induite *in vivo* n'a été effectué, d'où l'objectif de ce travail qui consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits ethanolique et aqueux de *Fraxinus angustifolia* sur l'évolution d'une l'inflammation induite par les UMS chez les souris (Modèle d'arthrite goutteuse).

**II.1.MATERIEL****II.1.1. APPAREILLAGES ET VERRERIE**

Un agitateur (VELP), une balance analytique (RADWAG), une balance de précision, une centrifugeuse (SIGMA), un rotavapeur (HEIDHOLF), un lyophilisateur (CHRIST), une étuve (BINDER), un pHmètre (HANNA), un microscope optique (ZEISS), un sonicateur (RAYPA), un thermomètre (CHICCO), un spectrophotomètre (SHIMADZU), des seringues intradermiques de 2,5 mL, pied à coulisse micromètre (IHM), une sonde de gavage, des micropipettes (EPPENDORF), verrerie (bêchers, éprouvette, erlenmeyers, cristallisoirs, ballons ...), tubes Eppendorf, équipement de dissection (lames bistouri, ciseaux, pinces...).

**II.1.2.PRODUITS CHIMIQUES**

Ethanol, chloroforme et acétate d'éthyle (BIOCHEM), carboxyméthyle cellulose (CMC), colchicine, indométacine et acide urique (SIGMA), HCl (ORGANICS), NaOH (RIEDEL-DEHAËN), NaCl, KCl (PANREACQUIMICA SA), Kit de dosage de phosphatase acide (LINEAR CHEMICALS), eau physiologique stérile (0,9%), alcool chirurgical, vaseline inerte.

**II.1.3. MATERIEL VEGETAL**

Les feuilles et les écorces de *Fraxinus angustifolia* (Figure 10) ont été récoltés en juillet 2014 de la forêt d'Akfadou, coté Chemini, Wilaya de Bejaia. Le matériel végétal a été séché, broyé et tamisé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre  $\leq 63\mu\text{m}$ .

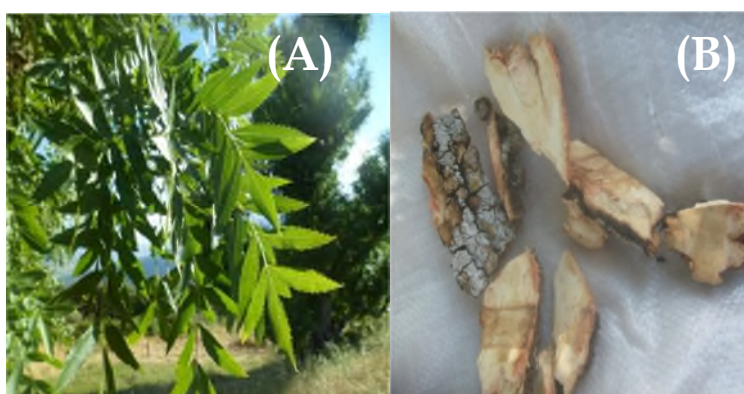


Figure 10: Photographies originales des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

**II.1.4. ANIMAUX D'EXPERIMENTATION**

Les souris albinos males (25-30 g), de souche NMRI (Naval Medical Research Institute), ont été fournies par l'Institut Pasteur de Kouba (Alger). L'élevage à partir de cette souche a été effectué au niveau de laboratoire d'expérimentation animal de l'université de Bejaia. Les souris sont placées dans des cages collectives et soumises à un régime alimentaire standard, qui consiste en une nourriture industrielle (ONAB) et accès libre à l'eau potable. Les conditions constantes de température (25°C) et de lumière/obscurité (12/12h) ont été respectés (Figure 11).



Figure 11 : Cage des souris.

**II.2.METHODES****II.2.1.PREPARATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUE ET AQUEUX**

Le procédé d'extraction employé au niveau de laboratoire Biochimie Appliquée est celui de **Chiang et ses collaborateurs (1994)**, avec les modifications apportées par **Berboucha et al. (2009)**, qui porte sur trois principales étapes, La première est la macération de la matière végétale fine dans l'éthanol (97%) à raison de 4,0 mL pour 1,0 g de la poudre végétale sous agitation pendant 24h. La suspension éthanolique est ensuite laissée se décanter (12h) pour donner deux phase bien distinctes; le surnageant qui est la solution éthanolique de l'extrait végétal a été récupéré soigneusement, centrifugé et soumis au séchage sous le rotavapeur. L'extrait sec obtenu est transféré dans un mélange acétate d'éthyle/eau (3/1 : v/v) en vue d'une partition liquide/liquide entre les deux phases non miscibles; celles-ci ont été séparées et laissées sécher. L'extrait sec acétate d'éthyle a été redissous pour une distribution entre deux autres phases chloroforme/eau (3 :1, v/v). Après une nuit de macération, les deux phases ont été séparées, séchées au rotavapeur et lyophilisateur, respectivement, jusqu'à stabilisation de leurs poids secs (Figure 12).

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

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

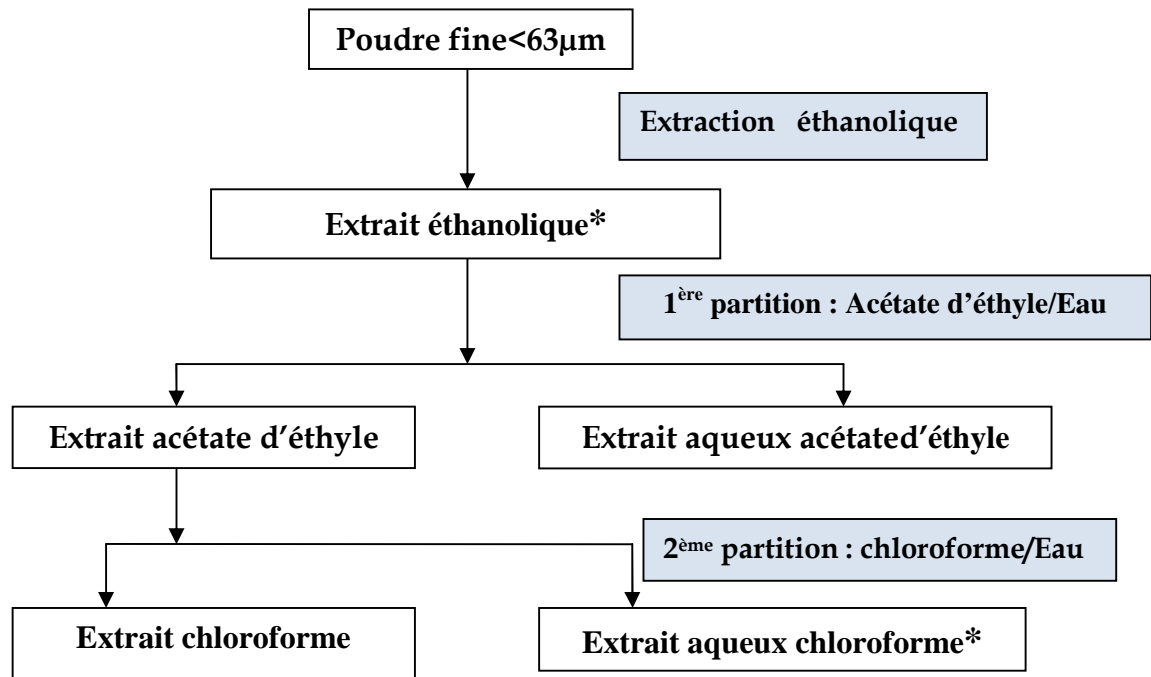


Figure 12: Schéma du protocole d'extraction.

\*Les extraits éthanologiques et la dernière phase aqueuse des feuilles et des écorces de *F.angustifolia* feront l'objet des tests anti-inflammatoires ultérieurs.

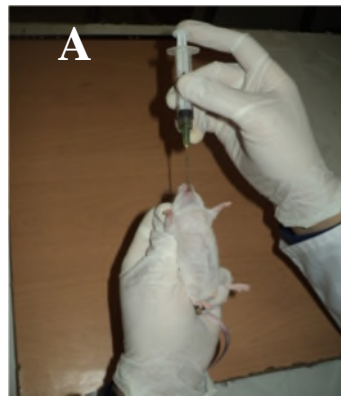
## II.2.2.PREPARATION DES CRISTAUX D'URATE DE MONOSODIUM (UMS)

Les cristaux d'urate monosodique ont été préparés selon la méthode de (Schorn *et al.*, 2012), avec de légères modifications. En bref, 1g d'acide urique a été dissous dans une solution alcaline et saline de 180 mL NaOH (0,03M). Ce mélange a été bouilli jusqu'à la dissolution totale de l'acide urique, puis refroidi, ajusté au pH 7,5 et ensuite filtré (0.2  $\mu\text{m}$ ) et 1 mL d'une solution NaCl (5M) a été ajouté. Le mélange a été soumis à une agitation très lente pendant 24H, le précipité obtenu a été lavé à l'eau puis à l'éthanol. Après centrifugation, le culot a été récupéré et séché à 40°C. Une stérilisation des UMS formés a été réalisée dans un four Pasteur (MEMMERT) à 180°C pendant 2h.

**II.2.3.EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE CHEZ DES SOURIS INDUITES PAR LES UMS****II.2.3.1. INDUCTION DE L'INFLAMMATION PAR LES UMS**

Un effectif de 128 souris males ont été réparties en 16 groupes (n=8) afin de tester l'effet anti-inflammatoire des extraits éthanolique et aqueux des feuilles et des écorces de *F. angustifolia* sur des souris induites par les cristaux UMS, selon la méthode de **Sabina et al. (2008)** décrite dans **De Souza et al. (2012)**, avec de légères modifications.

Les animaux ont été privés de nourriture et d'eau 2h avant le début de l'expérimentation. A l'exception de control négatif tous les animaux ont reçu une injection intradermique par 150µL (4mg) d'une solution des cristaux UMS fraîchement préparée au niveau de la patte droite, ceci une heure après l'administration intra-gastrique à l'aide d'une sonde gastro-oesophagienne de : CMC (0,8%) pour le lot control positif et les différentes solutions de traitement à savoir l'indométacine (3mg/Kg), la colchicine (1mg/Kg), les extraits éthanolique de feuilles et écorces (100, 200, 400mg/Kg) et aqueux (50, 100, 200mg/Kg) de *Fraxinus angustifolia* pour les lots tests, illustrés dans la (Figure 13) et le tableau III, respectivement.



Administration intra gastrique (A)



Injection intradermique (B)

Figure 13 : Photographies originales montrant les deux voies d'administration des traitements (A) et des UMS (B).

Tableau III : Répartition des groupes et leurs traitements respectifs.

Groupes	Gavage	Injection intradermique (1h après gavage)	
		Patte Droite	Patte Gauche
Contrôle négatif(C <sup>-</sup> )	CMC 0,8 %	Eau physiologique	Eau physiologique
Contrôle positif (C <sup>+</sup> )	CMC 0,8 %	Solution UMS (4mg/150µL)	Eau physiologique
<b>Traitements médicamenteux</b>	Indométacine(3mg/Kg)	Solution UMS (4mg/150µL)	Eau physiologique
	Colchicine (1mg/Kg)		
<b>Traitements par les extraits de feuilles</b>	EtOH (100mg/Kg)	Solution UMS (4mg/150µL)	Eau physiologique
	EtOH (200mg/Kg)		
	EtOH (400mg/Kg)		
	Aqueux (50mg/Kg)		
	Aqueux (100mg/Kg)		
	Aqueux (200mg/Kg)		
<b>Traitements par les extraits d'écorce</b>	EtOH (100mg/Kg)	Solution UMS (4mg/150µL)	Eau physiologique
	EtOH (200mg/Kg)		
	EtOH (400mg/Kg)		
	Aqueux (50mg/Kg)		
	Aqueux (100mg/Kg)		
	Aqueux (200mg/Kg)		

### II.2.3.2. CARACTERISATION DE L'INFLAMMATION ET LES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES DES TRAITEMENTS

#### II.2.3.2.1. MESURE DE L'ÉPAISSEUR DE LA PATTE

Le diamètre de la patte a été mesuré à l'aide d'un micromètre digital (IHM) (Figure 14 A) avant et après induction de l'œdème (Figure 14 B) à des intervalles de temps de 4h, 24h, 48h et 72h.

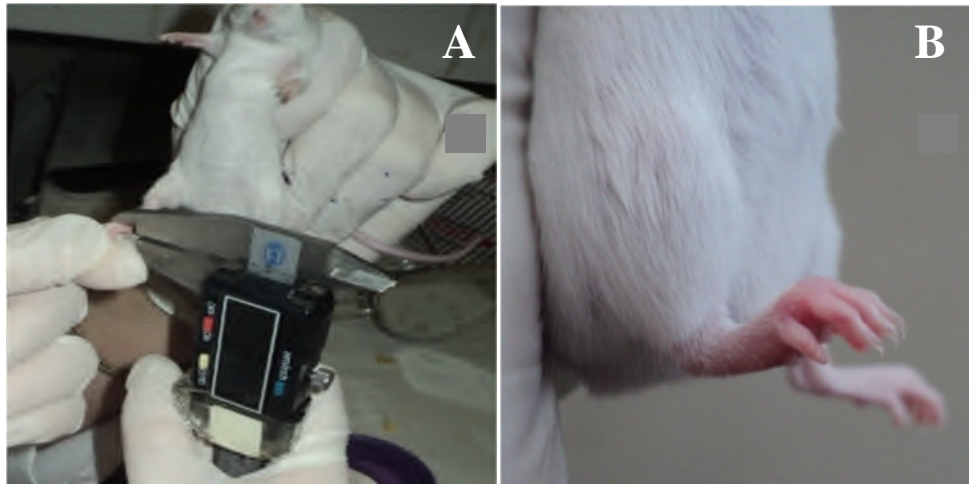


Figure 14 : Photographie de la mesure de l'épaisseur de l'œdème (A) induit au niveau de la patte droite de la souris (B).

Au quatrième jour du test (Après 72h) et 1 heure après la dernière mesure, les souris ont été sacrifiées sous une légère anesthésie à la vapeur du chloroforme. Le sang collecté à partir de la jugulaire a été centrifugé à 5000g pendant 10 min et le sérum est stocké à -80°C. Le foie et la rate rapidement prélevés ont été lavés au KCl (0,15M) et également stockés à -80°C.

#### **II.2.3.2.2. MESURE DE LA TEMPÉRATURE CORPORELLE**

Dans le but d'évaluer les effets des différents traitements sur la température corporelle des souris, des mesures de la température rectale (°C) ont été enregistrées en parallèle avec toutes les mesures des épaisseurs des pattes, c'est-à-dire juste avant le début et après 4h, 24h, 48h et 72h d'expérimentation, ceci à l'aide d'un thermomètre de marque CHICCO (Figure 15).

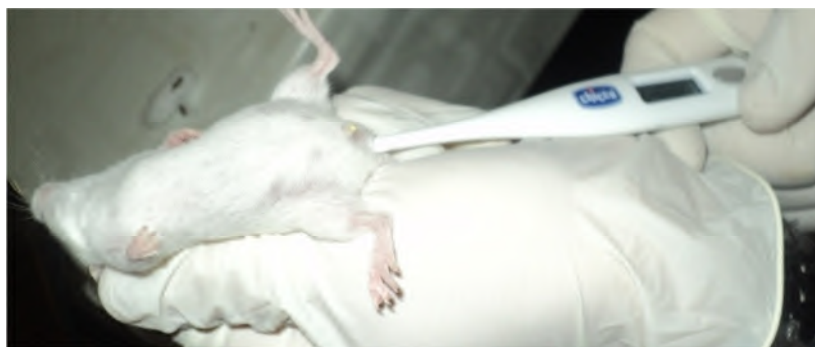


Figure 15 : Photographie de la mesure de la température rectale.

**II.2.3.2.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE ACIDE TOTALE (PAT) DANS LES SERUMS**

Les sérums sanguins obtenus des lots traités par les extraits aqueux de feuilles et d'écorce à 100 mg /Kg et ceux traités par la colchicine et l'indométacine ont été évalué pour leurs effets sur l'activité phosphatase acide, comparativement au lot induit par les UMS et le contrôle négatif. La phosphatase acide étant une enzyme lysosomiale excessivement libérée dans des états inflammatoires. Son dosage a été réalisé suivant la procédure dictée par la fiche technique du kit enzymatique Linear Chemicals pour le dosage de la phosphatase acide. Elle réagit avec le  $\alpha$ -naphtyl phosphate et produit le  $\alpha$ -naphtol qui à son tour réagit avec un indicateur coloré en milieu acide et à 30-37°C.

Les sérums des lots traités par les extraits, l'indométacine, la colchicine et les deux lots contrôle négatif et contrôle positif, préalablement stabilisés par 50 $\mu$ L/mL de tampon acétate (5M, pH 5,2), ainsi que la solution du substrat ( $\alpha$ -naphtyl phosphate 12,5 mmol/L) ont été pré-incubés à la température de réaction (37°C). 100 $\mu$ L de chaque sérum est ajouté à 1mL de réactif puis mélanger doucement. Après une incubation de 5min/37°C, les absorbances de la réaction ont été enregistrées à 405nm après la 1ère, 2ème et 3<sup>ème</sup> minute, après avoir étalonné le spectrophotomètre à zéro absorbance par l'eau distillée.

La différence entre les absorbances obtenues a été calculée et la moyenne des résultats obtenus exprime le changement d'absorbance par minute ( $\Delta A/\text{min}$ ). L'activité phosphatase acide totale est exprimée en U/L et calculée comme suit :

$$\text{PAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 853$$

**II.2.4. TEST DE TOXICITE AIGUE**

Les essais de la toxicité aigue permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent à court terme (1-14 jours), après l'administration d'une substance chimique. Les effets des extraits de feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia* ont été testés selon la méthode décrite dans (Freitas et al., 2011), suivant la directive 423 de l'OCDE (2001).



**II.2.4.1. PROCEDURE EXPERIMENTALE**

Lors de cette étude, les souris ont été laissées à jeun pendant une nuit, puis réparties selon l'homogénéité de leur poids sur (06) lots de (05) souris pour chaque sexe. Les lots 1 et 2 constituent les groupes contrôles négatifs, ils ont reçu uniquement de la CMC (0,8%).

Les lots 3 et 4 sont traités par une dose de 2000mg/Kg de l'extrait éthanolique des feuilles et les lots 5 et 6 ont reçu la même dose de l'extrait éthanolique d'écorce. L'administration des extraits et de la CMC sont effectués par voie orale.

**II.2.4.2. OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES ANIMAUX**

Lors de ce test, les animaux ont été observés individuellement, pendant les six premières heures suivant l'administration de l'échantillon, puis quotidiennement durant 30 minutes pour une période d'observation de 14 jours. Le comportement des souris, la létalité, les symptômes manifestés ainsi que le temps d'apparition de nouveaux symptômes ont été notés. Ce test a été confirmé dans les mêmes conditions que le précédent par des lots de trois souris male et trois femelles, suivant la directive 423 de l'OCDE.

**II.2.4.3. MESURE DU VOLUME D'EAU ET DE LA QUANTITE DE NOURRITURE CONSOMMES**

En plus des observations comportementales, le volume d'eau et la quantité de nourriture consommés ont été déduits des mesures quotidiennes, pendant les 14 jours, de poids de la nourriture restantes dans l'auge (couvercle des cages) et le volume d'eau restant dans les biberons. Les résultats sont exprimés en quantités de nourriture et volumes d'eau consommés par souris et par jour (g/souris/jour, mL/souris/jour).

**II.2.4.4. ÉTUDE DE L'EVOLUTION PONDERALE DES SOURIS**

Le poids corporel des souris utilisées dans cette étude a été mesuré avant l'administration orale des échantillons, et après le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jours du test. Les différences de poids ont été déduites par les soustractions suivantes : le poids au 7<sup>ème</sup> jour - le poids initial de la souris, le poids à la fin de l'expérimentation - le poids au 7<sup>ème</sup> jour. Les résultats sont exprimés en  $\Delta$  poids par 7 jours (g/7jours).

**II.2.4.5. SACRIFICE ET DISSECTION DES ANIMAUX**

A la fin de ce test (15<sup>ème</sup> jour), les animaux mis à jeun la veille ont été sacrifiés et le prélèvement des organes a été réalisé aussitôt que possible après la mort de l'animal, afin d'éviter les altérations cadavériques qui apparaissent rapidement. Le cadavre a été fixé dorsalement sur une plaque de dissection, en fixant solidement les quatre pattes à l'aide d'aiguilles, ensuite les organes ont été délicatement prélevés (Figure16).

Pour cette étude nous nous sommes contenté de l'observation macroscopique des viscères des souris, notamment le foie, la rate et les reins, qui sont immédiatement lavés dans du KCl (0,15M), séchés, pesés et conservés dans de la formaline pour une ultérieure investigation histologique.

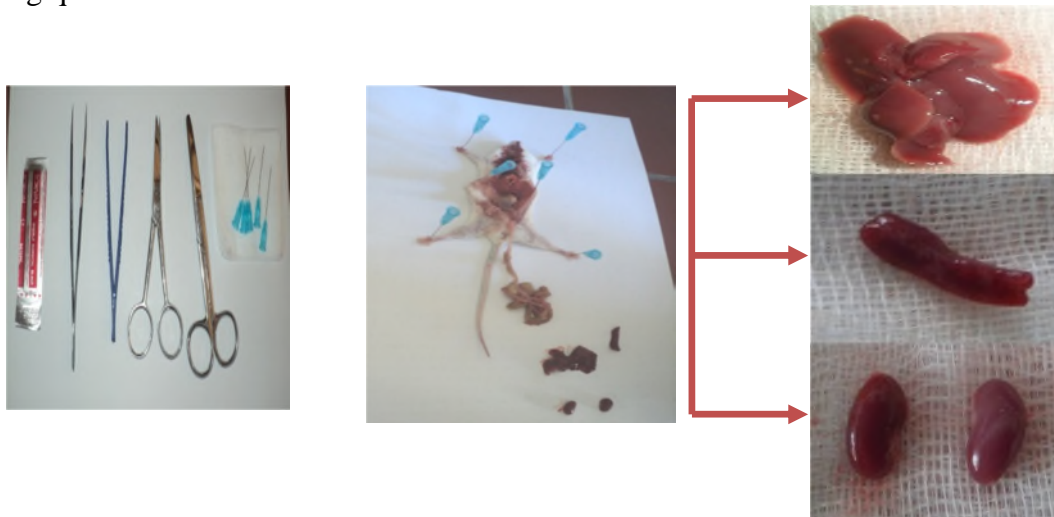


Figure16 : Dissection et prélèvement des organes des souris sacrifiées pour une observation macroscopique des viscères.

**II.2.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS**

Les résultats des tests *in vivo* ont été exprimés en moyennes  $\pm$  S.E.M. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les différents lots ont été comparés par l'analyse de la variance (ANOVA) via les tests de Dunnett's et Tukey's comme post-tests. Les résultats sont considérés significatifs à  $P < 0,05$ .

### III.1. RESULTATS DE L'EXTRACTION

Les rendements de la procédure d'extraction adoptée dans les différentes phases organiques et aqueuses obtenues sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau V : Rendements de l'extraction à partir des feuilles et des écorces de *F. angustifolia*.

Extrait	Rendement de l'extraction (g/100g de poudre sèche)	
	Feuilles	Ecorce
Ethanol	19,84	10,84
Acétate d'éthyle	8,56	4,07
Eau	9,28	2,19
Chloroforme	4,48	1,36
Eau	1,64	0,54

D'après le tableau ci-dessus, le taux d'extraction varie d'une phase à une autre selon les deux parties utilisées de la plante (feuille, écorce). Le taux le plus élevé a été obtenu par l'extraction à l'éthanol à partir de la poudre des feuilles (19,84%), ce qui indique une forte concentration en métabolites dans cette partie du végétal qui ont été solubilisés par l'éthanol, mais aussi l'efficacité de la technique d'épuisement appliquée. Cependant le taux d'extraction d'écorce par le même solvant est uniquement de 10,84%, malgré l'application de la même méthode d'extraction et dans les mêmes conditions, ceci indique une importante différence de composition entre les deux parties étudiées du végétal.

Les deux étapes de partition liquide/liquide dans les mélanges de solvants non miscibles et de polarités différentes, à savoir l'acétate d'éthyle/eau et le chloroforme/eau, ont permis la distribution des constituants de l'extrait brut à travers les phases organiques et aqueuses, ce qui prouve une éventuelle sélectivité de cette méthode d'extraction et indique que les extraits bruts est un mélange complexe de composés polaires et apolaires. Concernant les extraits de feuilles on observe un taux presque équitable entre l'acétate d'éthyle et l'eau, ce qui n'est pas le cas pour l'extrait de l'écorce. Toutefois, la répartition de l'extrait acétate d'éthyle entre le chloroforme et l'eau nous donne un faible rendement dans la phase aqueuse aussi bien pour les feuilles que les écorces, indiquant un faible taux de composés moyennement polaires.

### **III.2.EVALUATION DES EFFETS DES EXTRAITS DE *F.ANGUSTIFOLIA* SUR L'INFLAMMATION INDUITE PAR LES UMS CHEZ LA SOURIS.**

Plusieurs études récentes ont prouvé l'effet bénéfique des extraits de plantes à propriétés anti-inflammatoires dans le traitement de différentes pathologies, y compris la maladie de la goutte. L'activité anti-inflammatoire de *F.angustifolia* a été évaluée par l'administration des extraits ethanoliqes et aqueux, de ses feuilles et ses écorces, à différentes doses répétées pendant 3 jours successifs par la voie intra-gastrique à des souris, chez lesquelles une arthrite goutteuse a été induite par les UMS.

#### **III.2.1.EFFETS DES EXTRAITS DE FEUILLES DE *F .ANGUSTIFOLIA***

Les effets des extraits ethanoliqes (100, 200, 400 mg/Kg) et aqueux (50, 100, 200mg/Kg) des feuilles de *F. angustifolia* (FF) à différentes doses sur l'inflammation induite par les UMS chez les souris sont présentés dans les histogrammes de la figure 17.

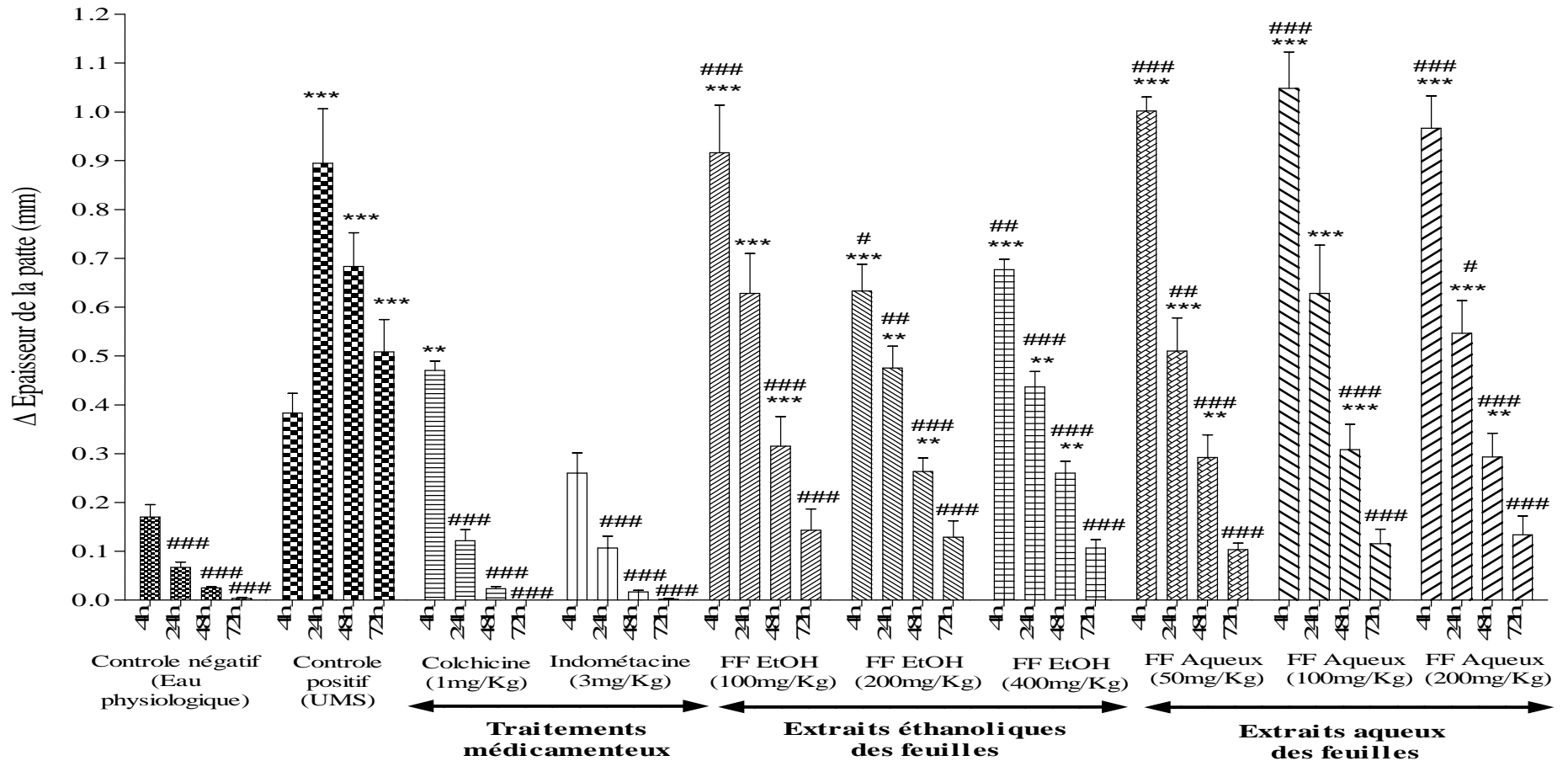


Figure 17 : Effets anti-inflammatoires des extraits éthanolique et aqueux des feuilles de *F.angustifolia*, la colchicine et l'indométacine sur l'inflammation induite chez les souris. Les résultats sont représentés en moyennes  $\pm$ S.E.M. \* $p < 0,05$  comparé au control négatif, # $p < 0,05$  comparé au control positif.(FF: *F. angustifolia* Feuilles).

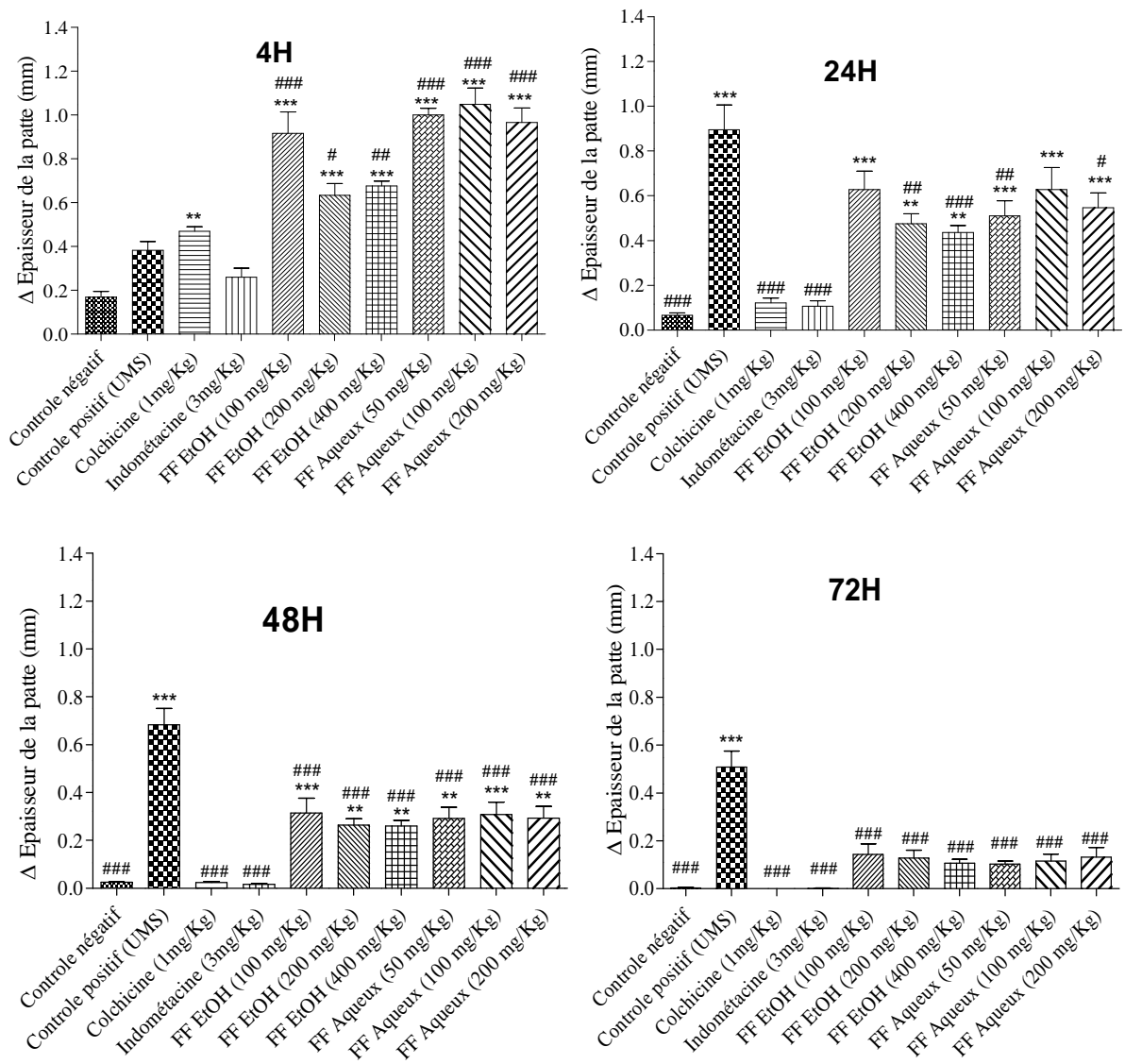


Figure 17 (Suite) : Effets anti-inflammatoires des extraits éthanolique et aqueux des feuilles de *F.angustifolia*, la colchicine et l'indométacine sur l'inflammation induite chez les souris. Les résultats sont représentés en moyennes  $\pm$ S.E.M. \* $p < 0,05$  comparé au control négatif, # $p < 0,05$  comparé au control positif. (FF:*F. angustifolia* Feuilles).

Le traitement des souris par les cristaux d'urate monosodique (UMS) a provoqué une inflammation qui s'est exprimée par une augmentation et variations de l'épaisseur de la patte dans différents intervalles de temps. Après 4h de l'injection des UMS, l'épaisseur de la patte a augmenté de 0.4mm, ensuite une augmentation hautement significative ( $P < 0.05$ ) a été observée à 24h d'expérimentation, pour atteindre 0,9 mm exprimant une inflammation aigue

comparativement au control négatif, qui représente qu'une légère inflammation induite par l'injection de l'eau physiologique.

Une diminution progressive a été observée à 48h et 72h, mais reste significativement élevée par rapport au lot contrôle négatif ( $P < 0.05$ ), indiquant que l'inflammation n'a pas été totalement résolue après 72h.

Le traitement par la colchicine administrée par voie orale (1mg/Kg), a montré une augmentation significative de l'inflammation ( $*p < 0,05$ ) à 4h (0,5mm), suivie d'une diminution significative ( $^{\#}P < 0.05$ ) au bout de 24h (0,1mm), puis une résolution totale après 48h et 72h, comparable au control négatif. Par ailleurs, le traitement par l'indométacine (3mg/Kg) par la même voie a diminué l'inflammation dès 4h, suivi d'une forte réduction à 24h ( $^{\#}P < 0.05$ ) et sa résolution complète a été obtenue après 48h et 72h. D'ailleurs les résultats exhibés par cet anti-inflammatoire est comparable au contrôle négatif.

Le traitement par les extraits éthanoliques (100,200, 400mg/Kg) et aqueux (50,100, 200mg/Kg) de feuilles de *F. angustifolia* à différentes doses ont montré une augmentation significative ( $*p < 0,05$ ) de l'inflammation jusqu' à atteindre une variation de l'épaisseur de la patte induite par les UMS de 1mm à 4h. Toutefois, après 24h une nette diminution significative ( $^{\#}p < 0,05$ ) de l'inflammation au bout de 24h, et progressive après 48h et 72h.

Des effets anti-inflammatoires ont été observés pour tous les extraits de feuilles de *F. angustifolia* comparativement au contrôle positif, avec un effet plus accentué pour l'extrait aqueux testé à des doses inférieures à celles de l'extrait éthanolique, néanmoins, la résolution de l'inflammation n'est pas totale après 72h de test, par comparaison au lot contrôle négatif.

### **III.2.2.EFFETS DES EXTRAITS D'ECORCE DE *F. ANGUSTIFOLIA***

Les effets des extraits éthanoliques et aqueux des écorces de *F.angustifolia* (FE) ont été testés à des doses de 100,200, 400 mg/ Kg et 50, 100, 200mg/Kg, respectivement, sur l'inflammation induite par les UMS chez les souris sont représentés dans les histogrammes de la figure 18.

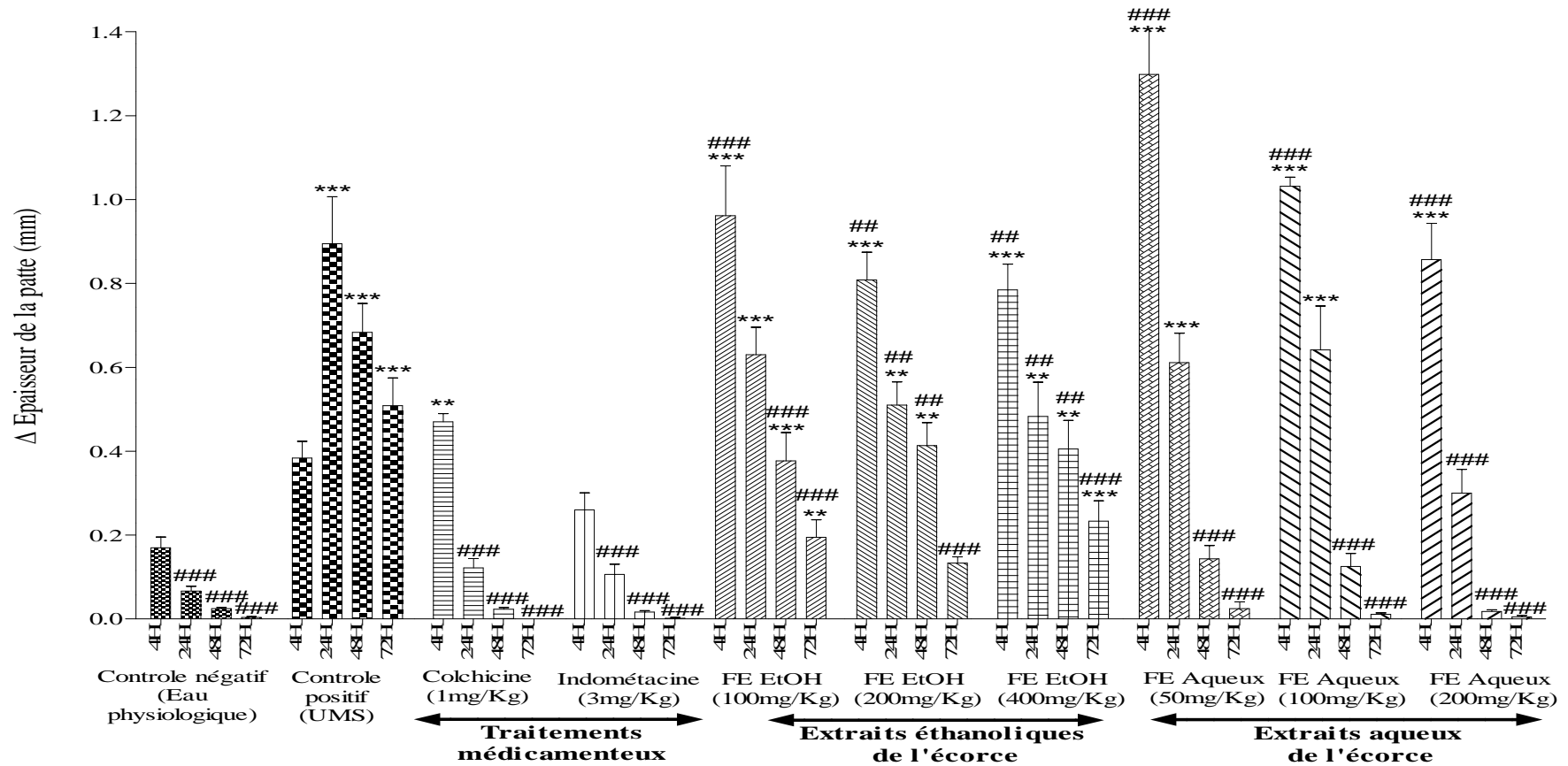


Figure 18: Représente l'effet anti-inflammatoire des extraits éthanolique et aqueux d'écorce de *F.angustifolia*, la colchicine et l'indométacine sur l'inflammation induite chez les souris par des UMS (contrôle positif). Les résultats sont représentés en moyennes  $\pm$ S.E.M. \* $p < 0,05$  comparé au control négatif, # $p < 0,05$  comparé au control positif. (FE: *F. angustifolia* Ecorce).



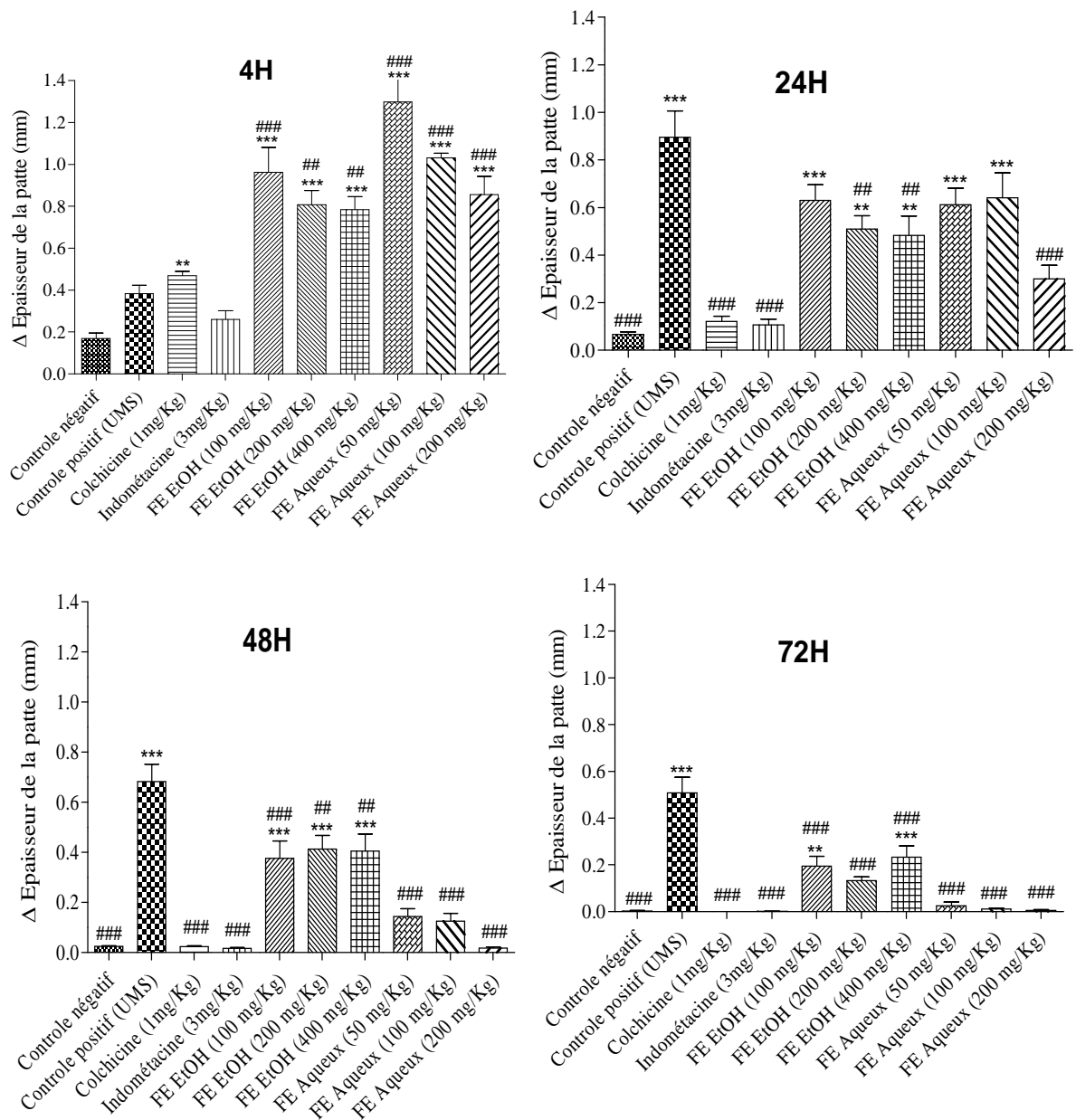


Figure 18 (Suite) :Représente l’effet anti-inflammatoire des extraits ethanologique et aqueux d’écorce de *F.angustifolia*, la colchicine et l’indométacine sur l’inflammation induite chez les souris par des UMS (contrôle positif). Les résultats sont représentés en moyennes ±S.E.M. \*p<0,05 comparé au control négatif, #p< 0,05comparé au control positif. (FE : *F. angustifolia* Ecorce).

A partir de ces histogrammes, il a été déduit également que le traitement avec l'extrait éthanolique (100, 200, 400mg/Kg) et l'extrait aqueux (50, 100, 200 mg/Kg) d'écorce à des doses différentes ont montré une augmentation significative de l'inflammation (\* $p < 0,05$ ) à 4h. Après 24h, des effets anti-inflammatoires ont été observés pour tous les extraits d'écorce, avec un effet accentué pour l'extrait aqueux à une dose de 200mg/Kg (<sup>#</sup> $p < 0,05$ ).

Au bout 48h, l'extrait aqueux aux trois doses testées se sont distingués par une meilleure résolution de l'inflammation comparativement à l'extrait éthanolique, puis sa disparition totale à 72h, des effets comparables aux deux molécules médicamenteuses testées dans les mêmes conditions.

### **III.2.3. MESURE DE LA TEMPERATURE CORPORELLE**

La température corporelle des souris a été mesurée avant et après l'administration des substances médicamenteuses à savoir la colchicine, l'indométacine et les extraits éthanoliques à des doses 100, 200, 400mg/Kg, et les extraits aqueux à des doses (50, 100, 200mg/Kg). Les résultats sont représentés dans la Figure 19.

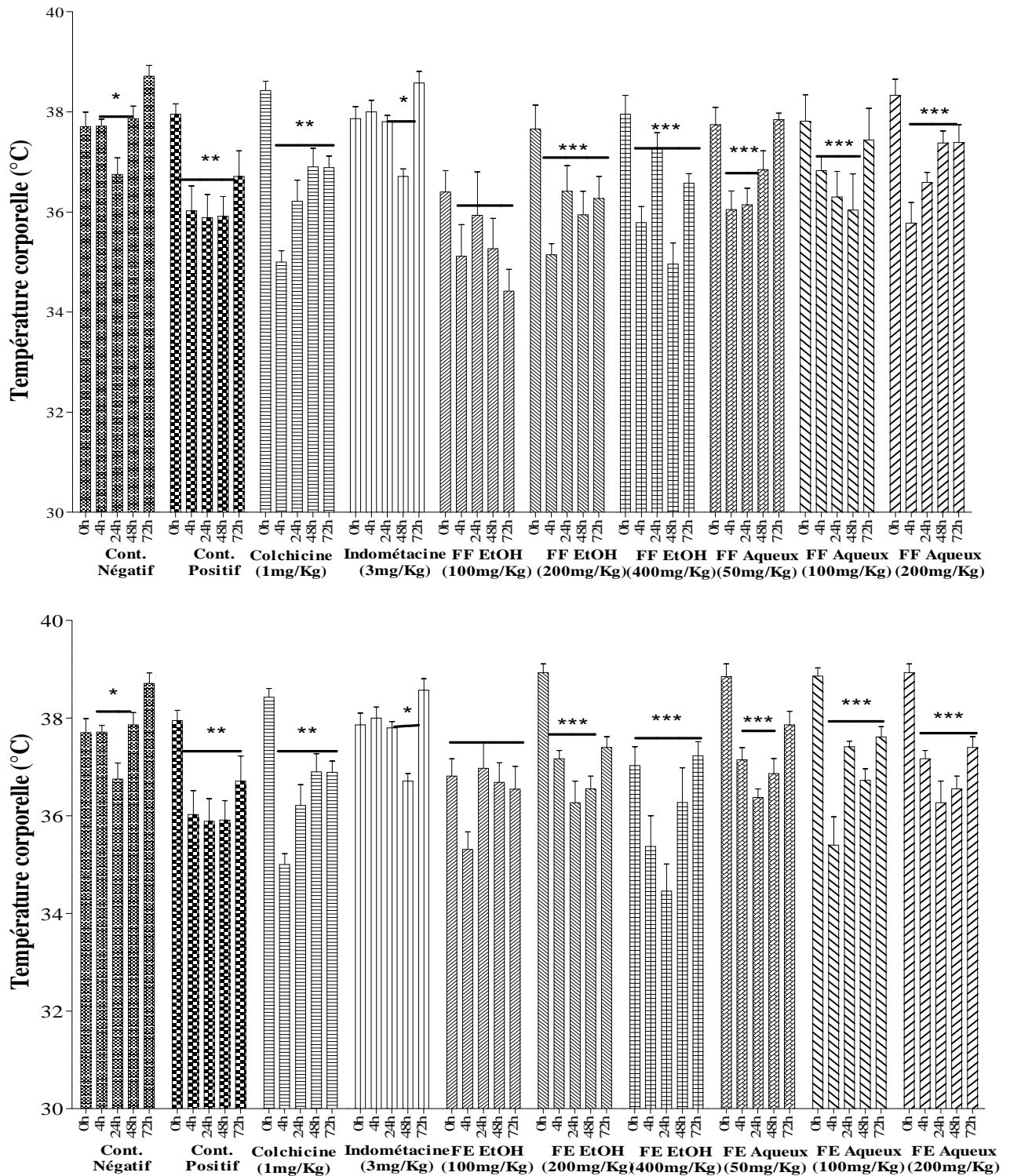


Figure 19: Représente les variations de la température corporelle des souris en parallèle avec l'inflammation induite par des UMS chez les souris et traitées par l'indométacine, la colchicine et les extraits éthanolique (100, 200, 400mg/Kg) et aqueux (50, 100, 200mg/Kg). Les résultats sont représentés en moyennes  $\pm$ S.E.M. et considérés significatifs à  $*p < 0,05$ . (FF : *F. angustifolia* Feuille, FE : *F. angustifolia* Ecorce).

Les résultats ont montré une diminution significative dans la température corporelle dans le lot traité par les UMS et celui traité par la colchicine après 4h comparativement aux mesures effectuées à 0h de l'expérimentation. L'indométacine, quant à elle, n'a montré aucun effet à 4h et une légère baisse de température à 24h.

Concernant les extraits, aussi bien ceux des feuilles que ceux de l'écorce de *F.angustifolia*, ils ont affecté la température corporelle des animaux en expérimentation avec une diminution significative (\*p<0,05) dès 4h. Il est à noter que, globalement, ce sont les extraits ethanoliques qui ont exhibé des effets plus prononcés. Ces observations laissent suggérer que ces extraits seraient dotés d'un effet antipyrétique.

### III.2.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA PHOSPHATASE ACIDE

Les résultats de dosage de l'activité de la phosphatase acide totale dans les sérums des animaux sacrifiés au terme du test anti-inflammatoire, sont représentés dans le tableau V. Le test a été réalisé sur les lots traités par les extraits aqueux de feuilles (FF) et des écorces (FE) de *F.angustifolia* à 100 mg/Kg, ceux traités par la colchicine (1mg/Kg) et l'indométacine (3mg/Kg), en comparaison avec les lots contrôles positif et négatif.

Tableau V : Résultats du dosage de l'activité phosphatase acide totale dans les sérums.

Traitements	Activité phosphatase acide (U/L)	Pourcentage d'inhibition
Contrôle Négatif	19,55 ± 3,54 <sup>#</sup>	---
Contrôle Positif	44,87 ± 7,17 <sup>**</sup>	---
Colchicine (1mg/Kg)	18,42 ± 3,49 <sup>#</sup>	100%
Indométacine (3mg/Kg)	21,07 ± 3,14 <sup>#</sup>	93,99%
FF Aqueux (100mg/Kg)	22,39 ± 5,74 <sup>#</sup>	88,78%
FE Aqueux (100mg/Kg)	25,18 ± 5,23 <sup>#</sup>	69,03%

Les résultats sont représentés en moyennes ± S.E.M \*p< 0,05 comparé au control négatif. <sup>#</sup>p< 0,05 comparé au control positif.

L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits aqueux de *F.angustifolia* et les effets des traitements par la colchicine, l'indométacine sur l'activité de phosphatase acide totale dosée dans le sérum sanguin ont montré des résultats intéressants, en accord avec les effets anti-inflammatoires exhibés par les deux extraits testés et les molécules de référence utilisés dans cette étude.

A 100 mg/Kg, les deux extraits aqueux ont significativement ( $^{\#}p<0,05$ ) réduit l'activité phosphatase acide dans le sérum par rapport au lot contrôle positif, avec des pourcentages d'inhibition de 88,78% pour l'extrait des feuilles et 69,03% pour celui des écorces. La colchicine et l'indométacine ont totalement réduit l'excès d'activité phosphatase acide induit par les UMS chez les souris goutteuses.

### **III.3. TEST DE TOXICITE AIGUE DE *F.ANGUSTIFOLIA***

#### **III.3.1. OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES ANIMAUX**

Durant la période d'observation qui a duré 14jours, les souris n'ont montré aucun changement dans l'apparence physique générale. Cependant, l'administration d'une dose de 2000mg/Kg des extraits ethanologiques de feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* par voie orale a provoqué des diarrhées modérées et des frissonnements dans les premières heures qui suivent les traitements comparativement au lot contrôle négatif. Ces observations suggèreraient des effets laxatif et fébrifuge pour les deux extraits de *Fraxinus angustifolia*, notamment à cette forte dose.

#### **III.3.2. MESURE DE LA QUANTITE DE NOURRITURE ET LE VOLUME D'EAU CONSOMMES**

La quantité de nourriture et le volume d'eau consommés chaque jour/souris traitée par 2000mg d'extrait ethanologique (FF) ou d'écorce (FE) sont représentés dans figure 20.

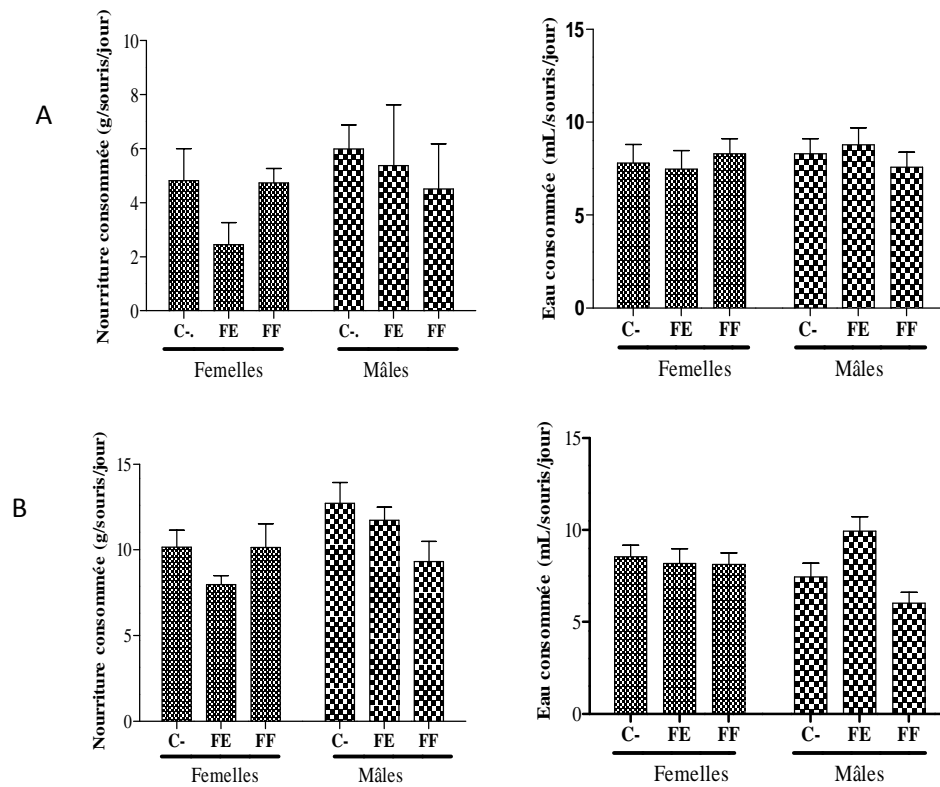


Figure 20 : Représente le suivi de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés par souris par jour pendant 14 jours (A : test de toxicité initial, B : test de confirmation). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$ S.E.M. et considérés significatifs à \*  $p < 0,05$ . (FF : *F. angustifolia* Feuille, FE : *F. angustifolia* Ecorce, C- : Contrôle négatif).

L'administration des extraits éthanoliques de feuilles et d'écorce par voie orale à la même dose pour des souris femelles et mâles n'ont montré aucune différence significative (\* $p < 0,05$ ) concernant la quantité de nourriture et le volume d'eau consommé, à l'exception du lot de femelles traitées par l'extrait d'écorce, où une baisse de la quantité de nourriture et du volume d'eau consommés a été remarqué, mais statistiquement non significative.

### III.3.3. ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION PONDERALE DES SOURIS

L'évolution pondérale des souris femelles et mâles, traités par 2000mg/Kg des extraits éthanoliques de feuilles (FF) et des écorces (FE), chaque semaine pendant 14 jours est illustrée dans les figures suivantes :

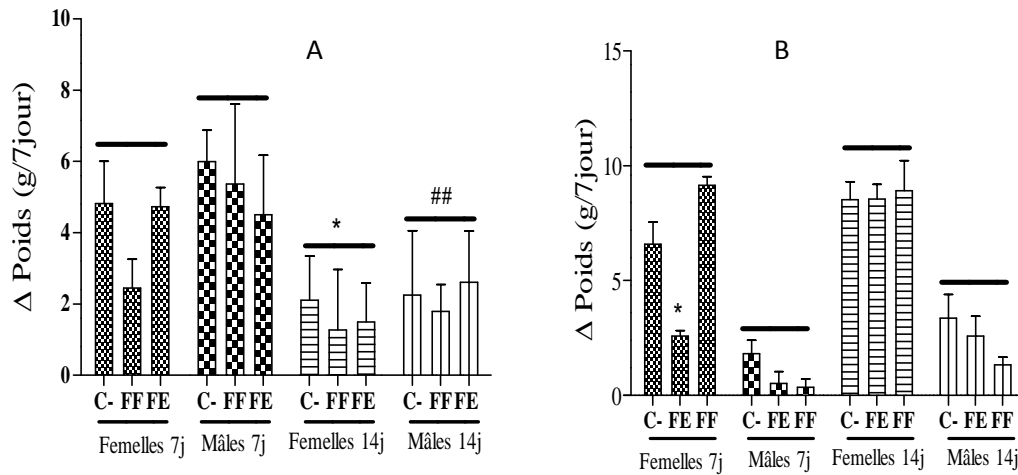


Figure 21 : Représente le suivi de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés par souris par jour pendant 14 jours (A : test de toxicité initial, B : test de confirmation). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  S.E.M. et considérés significatifs à  $*p < 0,05$ . (FF : *F. angustifolia* Feuille, FE : *F. angustifolia* Ecorce, C- : Contrôle négatif).

Pendant la première semaine de l'administration des extraits de feuilles et des écorces, aucun effet significatif ( $*p < 0,05$ ) n'a été enregistré comparativement au lot contrôle négatif. Cependant, durant la deuxième semaine et au bout du 14<sup>ème</sup> jour, la prise de poids a été moindre aussi bien, chez les mâles que chez les femelles, cela peut être liés au fait que les souris pendant la première semaine d'expérimentation ont été encore dans la phase de croissance. D'ailleurs, les souris en expérimentation n'ont montré de perte d'appétit durant cette dernière semaine.

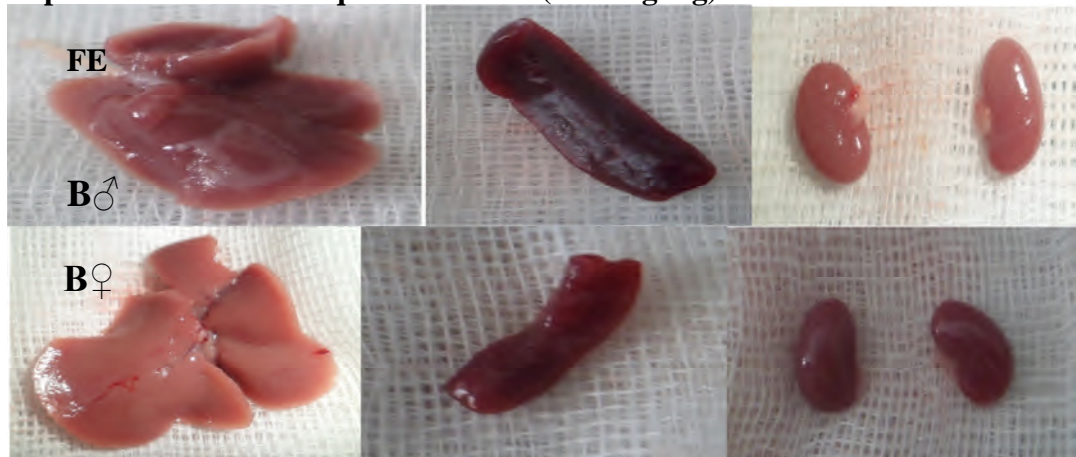
### III.3.4.OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES ORGANES

Les observations macroscopiques des organes des souris sacrifiées sont illustrées dans les photographies représentatives de chaque lot dans la figure 22.

Lots traités par la CMC (Contrôle négatif) :



Lots traités par l'extrait éthanolique de l'écorce (2000mg/Kg)



Lots traités par l'extrait éthanolique de feuilles (2000mg/Kg)

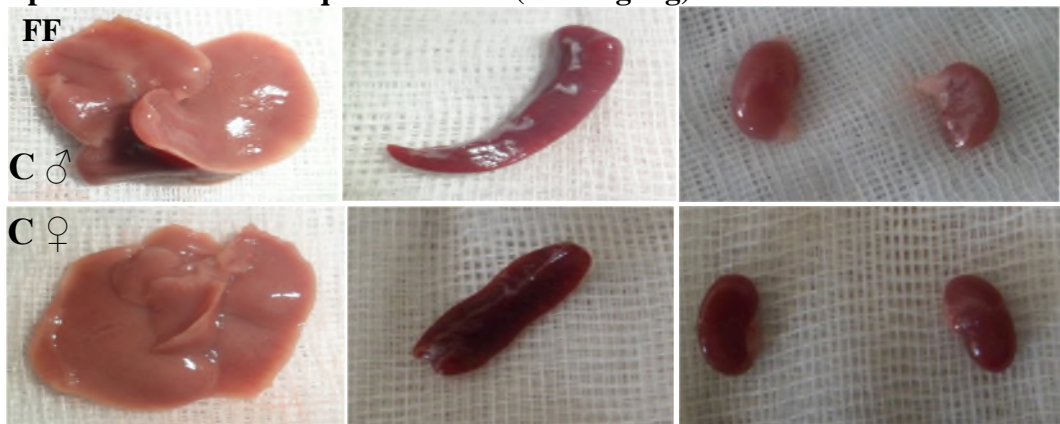


Figure 22: Photographies des foies, rates et reins (de gauche à droite) des souris mâles et femelles testés pour la toxicité des extraits éthanolique de feuilles (FF)(B) et d'écorces (FE)(C) de *F.angustifolia* comparées au lot control négatif (A).



L'observation macroscopique des organes des lots traités par les extraits de feuilles et des écorces de *F.angustifolia* à une dose de 2000mg/Kg n'ont pas montré d'anomalie morphologique visible à l'œil nu, comme montré dans les photographies illustratives des foies, rates et reins des lots de mâles et de femelles traités dans les mêmes conditions que le contrôle négatif.

Néanmoins, un foie anormal a été retrouvé chez une seule souris mâle traitée par l'extrait éthanolique de feuilles de *F.angustifolia* avec une couleur rouge foncée et des kystes (Figure 23A), ce qui n'a pas été observé chez les autres individus du même lot aussi bien mâles que femelles. Un autre cas d'anomalie de rein chez une souris femelle traitée par l'extrait éthanolique de l'écorce de *F.angustifolia* a été également rencontré (Figure 23 B), il est à noter que c'est aussi l'unique individu atteint parmi les deux lots mâles et femelles ayant reçu le même traitement. Ceci nous laisse suggérer que ces anomalies ne sont pas forcément liées aux traitements par ces extraits.

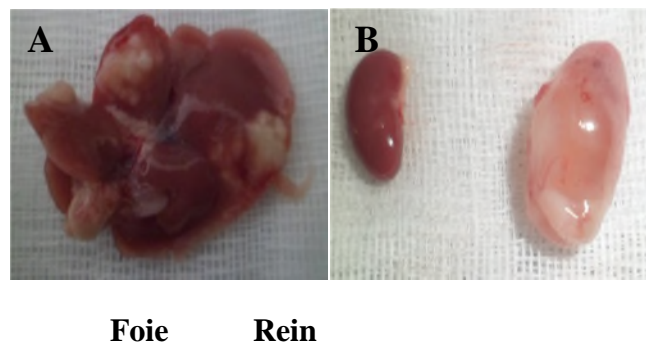
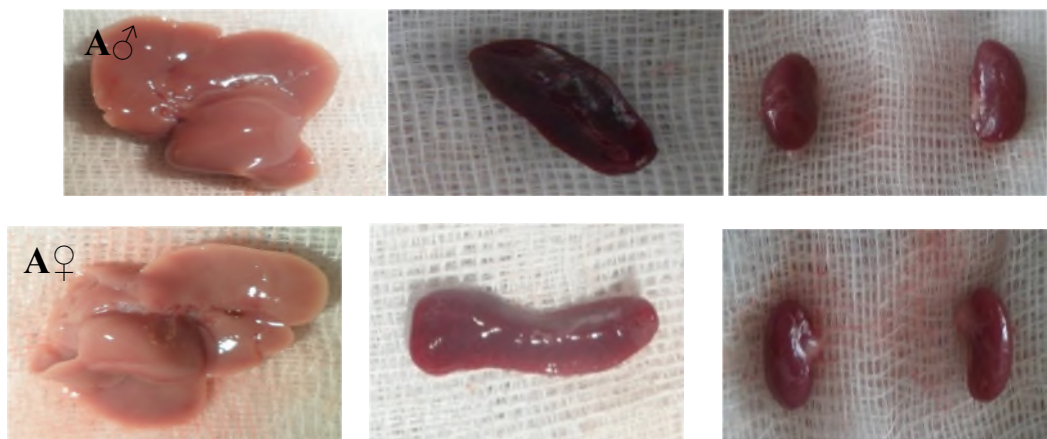


Figure 23 : Photographie d'un foie et d'un rein de souris altérés

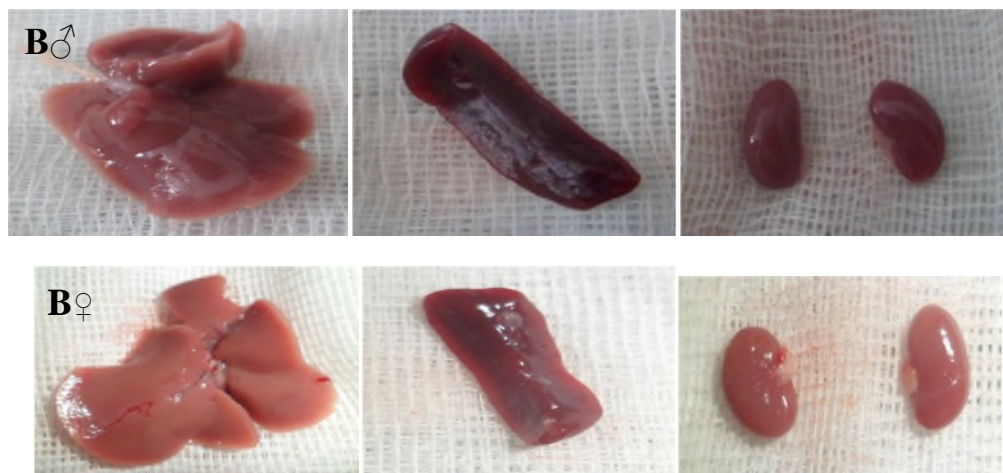
Ces résultats ont donc nécessité un test de confirmation de la toxicité aiguë sur d'autres lots de trois individus chacun, pour confirmer les différentes observations notées du premier test, suivant les directives et instructions de l'**OCDE, 2001**.

Les résultats du test de confirmation sont représentés par les photographies de la figure 24. Elles n'ont révélés aucune anomalie semblable à celles précédemment observées. Néanmoins des études plus approfondies sur ces organes doivent être menés, à savoir la réalisation des coupes histologiques pour détecter d'éventuels signaux de toxicité.

Lots traités par la CMC (Contrôle négatif) :



Lots traités par l'extrait éthanolique de l'écorce (2000mg/Kg)



Lots traités par l'extrait éthanolique de feuilles (2000mg/Kg)

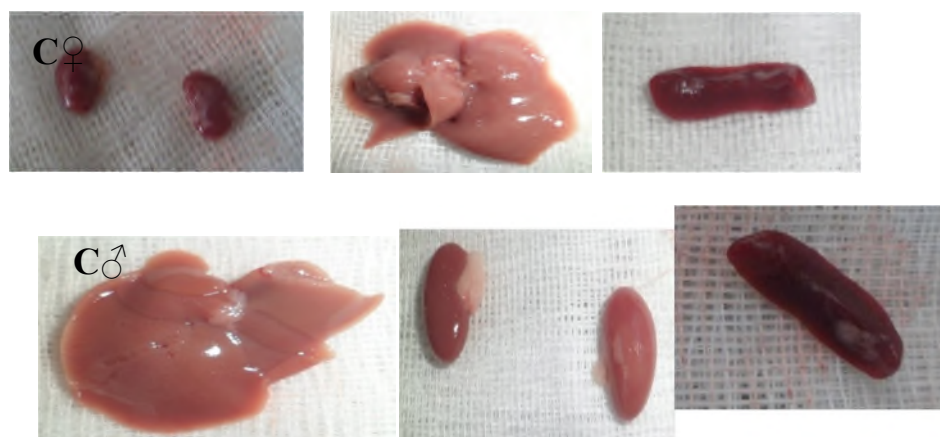


Figure 24 : Photographies des organes (Foies, Rates, Reins) des souris mâles et femelles issues du test de confirmation de la toxicité aiguë des extraits éthanoliques de feuilles (FF B) et d'écorces (FE C) de *F.angustifolia*.

### III.4. DISCUSSION

L'acide urique est l'ultime métabolite du métabolisme des purines chez l'Homme. Dans certaines conditions pathologiques, l'organisme perd sa capacité à éliminer l'acide urique et, par conséquent, une augmentation permanente de son taux peut mener à sa précipitation sous forme de cristaux d'urate monosodique dans les articulations, qui à son tour va causer une inflammation qui persiste dans le temps et se traduit par une crise de goutte aiguë (arthrite goutteuse) ou chronique (la goutte) (Ryu *et al.*, 2005 ; Peng *et al.*, 2012, Sabina *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2013 ; Lima *et al.*, 2015).

La présente étude est consacrée à l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* dans un modèle *in vivo* de l'arthrite goutteuse. Les résultats des investigations biologiques sont souvent variables en fonction de la procédure d'échantillonnage et d'extraction utilisée.

Le séchage des feuilles et d'écorce de *F.angustifolia* a été faite dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière pour mieux préserver ses constituants d'intérêt, les composés phénoliques. L'extraction de ce type de composés à partir des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est influencée par différents paramètres, à savoir les solvants de départ qui ont été choisis selon la polarité et le type de composés ciblés. Le procédé d'extraction est influencé également par la taille des particules de l'échantillon, en effet, le taux d'extraction obtenu peut être lié à la granulométrie de la poudre initiale utilisée, la durée de chaque étape de l'extraction (macération, décantation) (Marcheix *et al.*, 2006), le séchage et les conditions de stockage (température, lumière) qui préservent l'altération de ses composantes phénoliques, et peut être lié aussi à la région et la saison (Climat) de la récolte (Escribano *et al.*, 2003 ; Naczka, 2004 ; Atmani *et al.*, 2010). Il n'existe pas une méthode standard (uniforme) pour l'extraction des matériaux végétaux, néanmoins l'extraction adoptée dans cette étude s'avère sélective, d'après la répartition des composantes de l'extrait éthanolique brut à travers les différents solvants, qui se sont exprimés par de différentes activités anti-inflammatoires entre les extraits aqueux et éthanolique sur le modèle d'arthrite goutteuse *in vivo*.

Expérimentalement, cette inflammation est induite par l'injection des cristaux d'UMS dans la patte des souris et suivie par l'évolution de gonflement de l'œdème dans un intervalle du temps (4h, 24h, 48h et 72). Une réaction de l'organisme à l'action des UMS induisant l'inflammation et endommage les tissus (Landis *et al.*, 2001 ; Molloy *et al.*, 2004).

En effet, l'interaction de ses cristaux avec la membrane des cellules entraîne une physiopathologie d'une crise de goutte qui se déroule en trois phases ; à 4h c'est le déclenchement de l'inflammation, suivie d'une augmentation au bout de 24h, qui s'explique par l'amplification de l'inflammation par la libération de l'histamine et des cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , ce qui entraîne ainsi une activation des cellules endothéliales et favoriserait le recrutement des PNN. La légère diminution progressive de l'inflammation à 48h et 72h indique la résolution de la réaction inflammatoire sans pour autant atteindre l'état initial (**Landis et al., 2002 ; Sabina et al., 2010 ; Ea, 2011 ; Lioté, 2011 ; Peng et al., 2012**).

L'augmentation de l'inflammation après 4h chez les souris traitées par la colchicine peut être liée à l'effet tardif de la colchicine dû à un métabolisme lent, qui à son tour dépend de la voie d'administration. En effet, la voie orale permet au principe actif de se libérer lentement grâce au passage hépatique, contrairement à la voie intraveineuse qui permettra à la colchicine de se retrouver rapidement dans la circulation générale (**Chang et al., 1976**). La diminution de l'inflammation à 24h est certainement due à l'action de la colchicine, rapportée comme étant un bon inhibiteur de l'expression des molécules d'adhésion endothéliale et donc le recrutement des PNN. Ce mécanisme a été révélé par différentes études *in vitro* (**Chang et al., 1976 ; Nuki, 2008 ; Shi et al., 2013 ; Dalbeth et al., 2014**). La diminution de l'inflammation est liée aux facteurs intervenant dans l'amplification de l'inflammation. En effet, elle agit par l'inhibition de l'inflamasome NLRP3, la cas-1, la production d'IL-1 $\beta$  et le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation. De plus, elle réduit le taux d'histamine libéré par les mastocytes (**Chang et al., 1976 ; Nuki, 2008 ; Lioté, 2011 ; Dalbeth et al., 2014 ; Wei et al., 2014**) qui mène à la disparition totale de l'œdème.

Par ailleurs, la réduction de l'inflammation chez les souris traitées par l'indométacine revient à son effet préventif car elle a été administrée aux animaux 1heure avant l'injection par les UMS, un temps suffisant à l'indométacine pour se retrouver dans la circulation sanguine. Les paramètres pharmacocinétiques de l'indométacine, comme ceux des anti-inflammatoires non stéroïdiens, sont bien connus tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination rapides. De plus, son facteur de la biodisponibilité est supérieure, sa demi vie plasmatique détermine sa dose thérapeutique, le volume apparent de distribution est grand, son état d'équilibre est nécessaire à la saturation complète des récepteurs et le temps d'élimination totale (**Li et al., 2005**).

Les résultats exhibés par l'indométacine dans cette étude sont en accords avec ceux obtenus par plusieurs études ayant utilisé la même molécule comme référence thérapeutique (**De Souza et al., 2012 ; Sabina et al., 2012 ; Pragasam et rasool, 2013 ; Shi et al., 2013**). La réduction de l'œdème induit par les UMS au niveau de la patte après le traitement par l'indométacine est liée à son activité anti-inflammatoire dont le mécanisme d'action principal est l'inhibition de la COX2 (**Jacquz-aignain et Guillonnet, 1998**). D'autres parts, elle réduit les effets physiologiques des prostaglandines (**Burmester, 2000**). La disparition de l'œdème est obtenue par l'action de l'indométacine sur le taux de leucocytes au niveau du site de l'inflammation, ceci par l'empêchement de la migration des lymphocytes et monocytes-macrophage qui se retrouvent dans le sang vers la cavité synoviale (**Rasool et Varalakshmi, 2006**).

Cependant, des effets secondaires telle que l'insuffisance rénale, la toxicité gastro-intestinale sont liés à ces deux médicaments (colchicine et indométacine) (**Sabina et al., 2011; Shi et al., 2013**). Un argument qui ne cessent de solliciter l'intérêt des chercheurs pour leurs trouver des substituts à partir des plantes médicinales, tels que les composés phénoliques.

Les polyphénols représentent un très grand groupe de molécules présentes dans les plantes et caractérisées par des fonctions importantes sur l'inhibition de développement de certaines maladies, telle que l'arthrite goutteuse (**Scalbert et al., 2002**). De ce fait, les activités anti-inflammatoires exhibés par les extraits ethanologiques et aqueux de feuilles et des écorces de *F. angustifolia* seraient liés à leurs compositions phénoliques respectives.

L'augmentation de l'inflammation à 4h dans les lots traités par les extraits de *F.angustifolia* peut être expliquée par la présence de certains composés pro-inflammatoires dans ces extraits ou encore à leur biodisponibilité réduite. Ainsi, il a été rapporté que la partie glycosidique des polyphénols (certains flavonoïdes) jouent un rôle important dans leur absorption (**Hollman et al., 1999 ; Erlund et al., 2000 ; Kong et al., 2000 ; Morand et al., 2000 ; Crespy et al., 2002 ; Su et al., 2002**).

Le métabolisme de ses extraits a eu lieu tardivement, et leurs composés à propriétés anti-inflammatoires ont atteint leurs dose efficace sur le site de l'inflammation (cibles d'action) qu'au bout de 24h, d'où la réduction des œdèmes par les extraits étudiés progressivement à partir de 24h. Ce résultat est commun à plusieurs autres investigations anti-inflammatoires des extraits de plantes médicinales (**Yanik et al., 2004**), liés à des principes actifs de nature phénolique tels que les coumarines, les flavonoïdes et les lignanes (**Beta et al., 2005 ; Bellik**

et *al.*, 2012). Ces composés sont rapportés dans différentes espèces du genre *Fraxinus*, y compris *Fraxinus angustifolia* (Kostova et Iossifora, 2007).

Il serait donc possible que ces substances soient fortement impliquées dans cette activité anti-inflammatoire, notamment des phases aqueuses des feuilles et des écorces de *F. angustifolia*, qui auraient sélectionné des composés phénoliques moyennement polaires, donc glycosylés.

Li et ses collaborateurs (2011) ont suggéré que *F.angustifolia* aurait un effet uricosurique, et hypouricémique dans un modèle animal. Ces auteurs ont montré que l'esculetine et l'esculine ont exhibé leur effets sur l'élimination de l'acide urique par une activation de l'expression du transporteurs d'anion organique rénal 1(OAT1) et les transporteurs organiques cationique et de carnétine (OCT1-2 et OCTN1-2), alors que le fraxetine et la fraxine ont augmenté l'excrétion de l'urate mono-sodique par l'inhibition de l'URAT1, responsable de la réabsorption de ce dernier (Cos et *al.*, 1998 ; Chen et *al.*, 2011 ; Kuo et *al.*, 2012).

La lutéoline et la quercétine sont des flavonoïdes qui inhibent l'activité de NF-κB responsable de l'activation de l'expression des cytokines, des chimiokines et des enzymes pro-inflammatoires et peuvent moduler le métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la COX2 (Jain et *al.*, 2010 ; Petar et *al.*, 2012). On peut suggérer que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de *F.angustifolia* est lié à sa composition en flavonoïdes, rapportée dans des travaux antérieurs au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée (Atmani et *al.*, 2009 ; Berboucha et *al.*, 2010).

Par ailleurs, le dosage de l'activité phosphatase acide dans le sérum sanguin des lots de souris traitées par les extraits aqueux de feuilles et des écorces de *F.angustifolia* suggère que leur potentiel anti-inflammatoire est en partie exercé par l'inhibition de la libération des enzymes lysosomiales, incluant la phosphatase acide. En effet, les enzymes lysosomiales sont des macromolécules ubiquitaires biologiquement actives, qui peuvent dégrader des protéines, des glycosaminoglycanes, des acides nucléiques et des lipides. Il est probable que les leucocytes libèrent les enzymes lysosomiales comme une conséquence d'une intense endocytose. Donc, la libération extracellulaire des enzymes lysosomiales peut être cruciale dans la pathogenèse des dommages tissulaires et de l'inflammation. En effet, la réduction de la libération de ces enzymes peut être bénéfique (Sabina et *al.*, 2008). On suggère donc, que la réduction de l'œdème et l'activité phosphatase acide, après administration orale des deux extraits de *F.angustifolia* indique qu'ils ont pu inhiber la libération de ces enzymes lysosomiales par leur

action stabilisatrice. Cet effet peut être dû à la présence de quelques composés phénoliques dans ces extraits ayant la capacité de stabiliser les membranes biologiques.

Ce qui laisse suggérer également que l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* peut donc être liée à leurs pouvoirs antioxydants et anti-radicalaires, par conséquent protecteur des membranes cellulaires. En effet, certains flavonoïdes telle que la rutine présente dans le frêne est dotée d'un bon potentiel anti-radicalaire (**Jean et al., 2010**).

Ces effets anti-inflammatoires sont accompagnés par des baisses de températures corporelles des souris et des frissonnements qui sont observés dans le test de la toxicité, et peuvent être expliqués par l'effet antipyrétique des extraits de *F. angustifolia*, rapporté dans la littérature (**Kostova et Iossifova, 2007**).

Le test de toxicité aigue par voie orale (2g/Kg) n'a pas montré d'importants signaux de toxicité, mis à part de légères diarrhées le premier jour du traitement qui peuvent être expliqués par l'effet laxatif des extraits de *F. angustifolia*, précédemment rapporté dans la bibliographie (**Beloued, 2001 ; Kostova et Iossifova, 2007**).

La goutte, une maladie caractérisée par une réaction inflammatoire, est le résultat de l'évolution de l'acide urique sérique jusqu'à formation des cristaux d'urate et disposition de ce dernier dans les divers tissus et plus généralement les articulations.

*Fraxinus angustifolia* est utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies inflammatoires. De ce fait, cette étude a été menée pour démontrer le pouvoir anti-inflammatoire des extraits ethanologique et aqueux de feuilles et d'écorce de cette plante sur un modèle animal (Souris) induit par les cristaux mono-sodiques. Les souris ont été traitées avec différentes doses des extraits ethanologiques (100, 200,400 mg/Kg) et aqueux (50, 100,200 mg/Kg), ainsi que les molécules de références indométacine (3mg /Kg) et colchicine (1mg/Kg).

Tous les extraits ont montré un effet anti-inflammatoire, notamment après 24h d'expérimentation. Les extraits aqueux se sont avérés plus efficace que leurs extraits ethanologiques natifs. En effet, les extraits aqueux d'écorce ont montré une activité maximale à une dose de 200mg/Kg où la disparition totale de l'œdème a été observée après 48h.

De plus, un test de toxicité aigüe par voie orale a été effectué sur les deux extraits ethanologiques de feuilles et des écorces de *F.angustifolia* et n'ont pas montré de symptômes indésirables sur les souris à la dose de 2000 mg/Kg.

Les résultats obtenus montrent une efficacité de cesextraits comparable à celle du traitement par des médicaments anti-inflammatoires. Ce qui a permis de valider scientifiquement l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle pour le traitement des accès aigus de la goutte.

Des études complémentaires sont à envisager dans le but d'identifier les composés de ces extraits qui sont impliqués dans cette efficacité contre l'arthrite goutteuse. Il serait également intéressant de déterminer le mode d'action de ses substances dans le but d'envisager une application pharmaceutique.

Il serait également indispensable de reprendre les investigations toxicologiques par la réalisation des coupes histologiques pour donner de meilleures conclusions concernant les signaux de toxicité.



## Résumé

Dans cette étude nous avons évalué l'effet des extraits éthanoliques natifs (100, 200, 400 mg/Kg) et leurs extraits aqueux respectifs (50, 100, 200 mg/Kg) de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* sur l'inflammation au niveau des articulations (Arthrite goutteuse), induite par les cristaux d'urate monosodique chez les souris. Leurs effets ont été comparés à ceux des molécules utilisées comme références thérapeutiques, l'indométacine (3mg/Kg) et la colchicine (1mg/Kg).

Les résultats obtenus ont montré que l'administration orale de l'extrait éthanolique et aqueux à différentes doses ont induit une baisse significative (\* $P < 0.05$ ) du gonflement de la patte, aussi bien dans la phase d'amplification que celle de la résolution. Cependant, les anti-inflammatoires (indométacine et colchicine) ont été plus efficace avec une diminution comparable à celle de contrôle négatif.

De plus, les extraits aqueux de feuilles et de l'écorce de *F.angustifolia* ont inhibé significativement l'activité phosphatase acide dans les sérums sanguins respectifs à ces deux traitements, indiquant une inhibition de la libération des enzymes lysosomiales comme un probable mécanisme d'action.

D'autres parts, l'étude de la toxicité aiguë des extraits éthanoliques des deux parties de la plante sur des souris mâles et femelles n'a révélé aucun cas de létalité ni d'important signes de toxicité à lier directement aux traitements des souris par cette dose de 2000mg/Kg.

Ces résultats valident en partie l'usage traditionnel *Fraxinus angustifolia* dans le traitement des arthrites goutteuses et suggèrent qu'elle serait donc une source potentielle de substances anti-inflammatoires.

**Mots clés :** Arthrite goutteuse, Cristaux d'urate monosodique (UMS), *Fraxinus angustifolia* Indométacine, Colchicine, Phosphatase acide, Toxicité.

## Abstract

In this study we evaluated the effects of native ethanol extracts (100, 200, 400 mg/Kg) and their respective aqueous fractions (50, 100, 200 mg/Kg) of leaves and barks of *F.angustifolia* on MSU-induced inflammation mice, as a gouty arthritis model. Their effects were compared to those of indomethacin (3mg/Kg) and colchicine (1mg/Kg) used as a therapeutic reference molecules.

Obtained results showed that oral administration of ethanol and aqueous extracts of leaves and bark of *F.angustifolia*, induced a significant decrease (\* $P < 0.05$ ) in monosodium urate crystal induced inflammation (foot thickness) in mice, either in the amplification and resolution steps. However, indomethacin and colchicine showed higher effects (\* $P < 0.05$ ) with a resolution of inflammation similar to negative control.

In addition, *Fraxinus angustifolia* aqueous extracts of both leaves and bark inhibited significantly the phosphatase acid activity in induced mice sera, indicating a probable anti-inflammatory mechanism by inhibition of lysosomal enzymes liberation.

On the other hand, acute oral toxicity of ethanolic extracts of both leaves and barks of *Fraxinus angustifolia* (2000mg/Kg) was performed. This toxicity test did not show important toxicity signals, both in the first test and the confirmation test.

These results validate in part *Fraxinus angustifolia* traditional use in gouty arthritis treatment and can be suggested as a potential source of anti-inflammatory substances.

**Keywords:** Gouty arthritis, Crystal monosodium urate (MSU), *Fraxinus angustifolia*, Indomethacin, Colchicine, Phosphatase acid, Toxicity.

# *Introduction*

# *I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

## *II. MATÉRIEL ET MÉTHODES*

### *III. RESULTATS & DISCUSSION*

*Conclusion*

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

-A-

- **Agudelo, C. A., Wise, C. M. (2001).** Gout: Diagnosis, pathogenesis, and clinical manifestation. *Current Option in Rheumatology*. (13): 234-239.
- **Al-Nahaim, A., Jahan, R., Rahmatullah, M. (2014).** Zingiber officinale: A potential plant against rheumatoid arthritis. *Hindawi Publishing Corporation Arthritis*. Article ID 159089.p8.
- **Anthony, M. R., Mount, D. B., Yang, I., Choi, H. K. (2012).** The genetics of hyperuricaemia and gout. *Nature reviews rheumatology*.(8): 610-621.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009).**Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*.(112): 303-309.

-B-

- **Bang, J. S., Oh, D. H., Choi, H. M., Sur, B. J., Lim, S. J., Kim, J. Y., Y, H. I., Yoo, M.C.,Hahm, D. H., Kim, K. S. (2009).**Anti-inflammatory and anti-arthritis effects of piperine in human interleukin 1 $\beta$ -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models.
- **Bardin, T. (2004).** Comment traiter un goutteux résistant ou allergique à l'allopurinol en 2004 ? *Revue du Rhumatisme*. (71) : 860–864.
- **Bardin, T. (2007).** Epidémiologie de la goutte. *Revue du Rhumatisme*. (74) : 52-57.
- **Bardin, T., Richette, P. (2011).** Épidémiologie et génétique de la goutte. *Arthropathies microcristallines*. (40) :830-835.
- **Bellik, Y., Boukraa, L., Alzahrán, H. A., Bakhotmah, B. A., Abdellah, F., Hammoudi, S.M., Iguer-ouada, M. (2013).** Molecular mechanism underluing anti-inflammatory and anti-allergie activities of phytochemicals: An update. *Molecules*. (18): 322-353.
- **Bellik, Y., Hammoudi, S.M., Abdellah, F., Iguer-Ouada, M., Boukraa, L. (2012).**Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*. (6).
- **Benesser, H. A., Tazi, Z.M., Harmouche,H., Aouni, M., Maaouni, A. (2010).** La goutte : nouvelle recommandations. *Revue du Rhumatisme*. (17) :119-133.
- **Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D., Benboubetra, M. (2010).** Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *J. Med. Food*. 13 (4): 1-9.



- **Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., Sapirstein, H. D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry Journal*. (82): 390-393.
- **Bjarnason, I., Hayllar, J., Macpherson, A. J., Russell, A. S. (1993).** Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology*. 104 (6):1832-47/
- **Beloued, B. (2001).** Plantes médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires Algerie*. p368.
- **Burmester, G-R., et Rezzuto, A. (2000).** Atlas poche d'immunologie. *Med-scie (Flamm)*, p295.

-C-

- **Chiang, H. C., Lo, Y. J., Lu, F. J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* ( Hook ) Tryon. *J of Enz Inh.* (8): 61-67.
- **Capuana, M. (2013).** In Vitro Propagation of Ash (*Fraxinus excelsior* L.) by Somatic Embryogenesis. *Methods in Molecular Biology*. (994) :213-221.
- **Chalès, G. (2011).** De l'hyperuricémie à la goutte : épidémiologie de la goutte *Revue du Rhumatisme*.(78): 109-115.
- **Chang, Y., Malawista, S. (1975-1976).** Mechanism of action of colchicine. *Inflammation*. (1)2: 143-153.
- **Chen, C.J., Shi, Y., Hearn, A., Fitzgerald, K., Golenbock, D., Reed, G. (2006).** MyD88-dependent IL receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest.* (116): 262-271.
- **Chen, L., Yin, H., Lan, Z., Ma, S., Zhang, C., Yang, Z., Li, P., Lin, B. (2011).** Anti hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *Journal of Ethnopharmacology*. (135) : 399-405.
- **Choi, H.K., Mount, D.B., Reginato, A.M. (2005).** Pathogenesis of gout. *Ann InternMed* (143):499-516.
- **Chouhan, H. S., Sridevi, K., Singh, N. K., Singh, S. K. (2012).** Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Vitex glabrata* leaves. *Paka. J. Pharm. Sci.* (25): 131-134.
- **Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Bergh, D. (1998).** Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.* (61) : 71-76.

- **Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C., (2002).** Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (50): 618-621.

-D-

- **Davis, W. (1962).** Prove urate crystals cause gouty condition. *Science News Letter*. p30.
- **Dalbeth, N., Haskard, D.O. (2005).** Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology (Oxford)*. (44):1090-6.
- **Dalbeth, N., Lauterio, T. J., Wolfe, H.R. (2014).** Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clinical Therapeutics*. (36) 10.
- **Dallwing, R. (2010).** Allopurinol. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 19 (3): 255-257.
- **De Souza, M. R., Paula, C. A., Resende, M. L. P., Grabe-Guimaraes, A., Filho, J. D. S., Saude-Guimaraes, D. A. (2012).** Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. (142): 845-850.
- **De Souza, M. R., Paula, C. A., Resende, M. L. P., Grabe-Guimaraes, A., Filho, J. D. S., Saude-Guimaras, D. A. (2015).** Effects of extracts of *Sparattosperma leucanthum* on hyperuricemia and gouty arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*. (161): 194-199.
- **Doherty, M., Whicher, J. T., Dieppe, P. A. (1983).** Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate monohydrate crystals and other inflammatory particles. *Annals of the Rheumatic Diseases*.(42): 285-291.
- **Dubost, J., Mathieu, S., et Soubrier, M. (2011).** Traitement de la goutte : *La Revue de médecine interne*. (32):751-757.
- **Duflot, H. (2002).** Le frêne en liberté. 2ème édition. *Institut pour le développement forestier* .p 20-21.

-E-

- **Ea, H.K. (2011).** De l'hyperuricémie à la goutte: physiopathologie. *Revue du Rhumatisme*. (78):103-108.
- **Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Maenpaa, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., Aro, A., (2000).** Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*.(56): 545-553.
- **Escribano-Baillon, M.T. et Santos-Buetos-Buelga, C. (2003).** Polyphenols extract from food. *Methods in polyphenol analysis*. 31 (11): 2503-2518.

-F-

- **Freitas, P.C.M., Pucci, L.L., Vieira, M.S., Lino, R.S., Oliveira, C.M.A., Cunha, L.C., Paula, J.R., Valadares, M.C. (2011).** Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum, *Journal of Ethnopharmacology*. (134): 501–503.
- **Falcini, F., Trapani, S., Civini, R., Capone, A., Ermini, M., Bartolozzi. (1996).** The primary role of steroids on the osteoporosis in juvenile rheumatoid patients evaluated by dual energy X-ray absorptiometry. *J Endocrinol Invest*. 19(3): 165-9.
- **Fang, Y., Waizy, H.( 2013) .** Current Concepts in the Treatment of Gouty Arthritis. *Chinese Orthopaedic Association and Wiley Publishing Asia Pty Ltd*.
- **Faure, S. (2010).** Les antigoutteux. *Actualités pharmaceutiques*. 495.
- **Fleming, A. (1994).** Drug management of arthritis in the elderly. *Journal of the Royal Society of Medicine Supplement*. (87)23.
- **Foster, C. S., Barrett, F. (1993).** Cataract development and cataract surgery in patients with juvenile rheumatoid arthritis-associated iridocyclitis. *Ophthalmology*. 100(6): 809-17.

-G-

- **Garay, R., El-Gewely, R., Labaunec, J.P., Richette, P. (2012).** Perspectives des uricases dans la goutte. *Revue du rhumatisme*. (79) : 17–22.
- **Ghaemi-Oskouie, F., Shi, Y. (2011).** The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. (13): 160-166.
- **Ginsberg, M.H., Kozin, F., O'Malley, M., McCarty, D.J. (1977).** Release of platelet constituents by monosodium urate crystals. *J Clin Invest*. (60):999–1007.
- **Godeau, P., Herson, S., Piette, J.C. (2004).** Goutte. *Traité de Médecine. Quatrième édition, Médecine-sciences Flammarion*. 2261-2270.
- **Goetz, P., (2011).** Phytothérapie de l'inflammation (partie1). *Phytothérapie*. (9): 310-317.
- **Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2007).** Ash, *Fraxinus excelsior*. Editors. PDR for herbal medicines. 4 th edition. Thomson. p 53-54.
- **Gupta, M., Maghuvanshi, M., Jain, D. (2010).** Comparative studies on anti-inflammatory activity of *Coriandrum sativum*, *Datura stramonium* and *Azadirachta indica* . *Asian J. Biol. Sci*. 1(1): 151-154.

-H-

- **Hamilton, J. A., Carthy, G., Whitty, G. (2001).** Inflammatory microcrystals induce murine macrophage survival and DNA synthesis. *Arthritis Res.* 242-246.
- **Hitching, G. H. (1966).** Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis. *Annales of the Rheumatic Diseases.*(25) : 601-607.
- **Hollman, P. C. H. (2004).** Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology.* (42): 74-83.
- **Hurtes, X., Meria, P. (2011).** Atteintes uro-néphrologiques des hyperuricémies. *journal de médecine.* (40): 865–868.

-I-

- **Izzedine, H., Deray, G.(2011).** Acide urique et fonction rénale. *Revue du Rhumatisme.* (78) : 134-141.

-J-

- **Janus, N., Amet, S., Zimmer-Rapuch, S., Deray, G., Launay-Vacher, V. (2012).** Mise au point sur les Médicaments. *Séminaires Universitaires de Néphrologie.* p3.
- **Jackson, J. K., Higo, T., Hunter, W. L., Burt, H. M. (2006).** The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm. res.* (55): 168-175.
- **Jacqz-Aigrain, E., Guillonnet, M. (1998).** Anti-inflammatoire. *Encycl Médchir (Elsevier, Paris), Encyclopédie Pratique de Médecine.* 8(10) : p4.
- **Jain, P. K., Dkharya, M., Gajbhiye, A., Sara, U. V. S., Sharma, V. K. (2010).** Flavonoids as nutraceuticals. *A review. D. J. College of Pharmacy Modinagar, india.* 56 (2).
- **Joosten, L.A., Netea, M.G., Mylona, E. (2010).** Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1 $\beta$  production via the ASC/caspase pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheumatisme.*(62):3237-48

-K-

- **Kuntz, D. (1979).** La Goutte . *Encycl Méd Chir. Appareil locomoteur.* p1-20.
- **Khanna, D., Sethi, G., Ahn, K. S., Pandey, M. P., Kunnumkara, A. B., Sung, B., Aggarwal, A., Aggarwal, B. B. (2007).** Current Opinion in Pharmacology. (7): 344-351.
- **King, M.V., vriest, J.L.Pepinsky, R. (1952).** An X-ray diffraction determination of the chemical structure of colchicines. *Acta Cryst.*( 5):437-440.

- **Kingsbury, S. R., Conaghan, G. P., Dermott, M. F. (2011).** The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *Journal of Inflammation Research.* (4):39-49.
- **Klein, A. S., Joh, J. W., Rangan, Wang, D. Bulkley, G. B. (1996).** Allopurinol Discrimination of Antioxidant from Enzyme Inhibitory Activities. *Free Radical Biology and Medicine.* 21 (5): 713-717.
- **Kong, L. D., Cai, Y., Huang, W. W., Cheng, C. H. K., Tan, R. X. (2000).** Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology,* (73): 199-207.
- **Kostova, I., and Iossifova, T. (2007).** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia.* (78) : 85-106.
- **Kuntz, D., et Lioté, F. (2003.).Goutte .** *Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur.*14-270- A-(10) : p23.
- **Kuo, C.Y., Kao, E.S., Chan, K.C. Lee, H.J., Huang, T.F., Wang, C. J.(2012).** *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Fuctional Foods.* (4): 375-381.

-L-

- **Li, D.M., Lu, W.L., Wang X.Q., Wang, J.C., Zhang, H., Zhang, R.J., Wang, G.L., Zhang, X., Zhang, Q. (2005).** Pharmacokinetics of Indomethacin, a Metabolite of Acemetacin, Following a Single dose and Multiple doses Adm in istered as Acemetacin Sustained-Release Tablets in Healthy Male Volunteers. *Journal of health Science.* 51 (3): 308-316.
- **Lafforgue , P., Legré, V. (2005).** Maladies et Grands Syndromes–Arthropathies micro-cristallines. *Faculté de Médecine de Marseille .*p1-20
- **Lioté, F., Bardin, T. (1995).**Pourquoi la crise de goutte s’arrête-t-elle spontanément? *In: De Séze S, Ryekewaert A, MF, KuntzD, Dryll A, Meyer O. L’actualité rhumatologique. Expansion Scientifique Française.*260-268.
- **Landis, R.C., Haskard, D.O. (2001).** Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports.* (3): 36-41.
- **Landis, R., Yagnik, D. R., Florey, O., Philippidis, P., Emons, V., Mason, J. C., Haskard, D. O. (2002).** Safe Disposal of Inflammatory Monosodium Urate Monohydrate Crystals by Differentiated Macrophages. *Arthritis and Rheumatism.* Vol. 46, No. 11.p 3026-3033.
- **Le Bellec, M.L., Gastine, B., Mosquet, B., Godde,F., Ze Bekolo , R.,Gloro, R., Leterrier, C., Coquerel, A.(2009).** Risque d’intoxication à la colchicine chez les personnes âgées et

moyens de prévention : à propos de quatre observations : Colchicine intoxication in four elderly patients: How to prevent it?. *Revue de médecine interne.* ( 30 ) : 783–788.

- **Lederer, J. (1978).** Régime de la goutte. *Manuel de diététique.*p.2.
- **Lee, H.S., Park, S.H., Wallander , and Chang, C. S. (2012).** A flavonoid survey of *Fraxinus* (Oleaceae) in eastern Asia, and the overlooked species *Fraxinus hopeiensis* T . Tang in northern China. *Biochemical Systematics and Ecology.*(41): 150-156.
- **Lespine A.(2006).** La crise aiguë de goutte.
- **Li, J.M., Zhang, X., Chang, Y., Ling,X., Wang.,D. (2011).** Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *Eropean Journal of pharmacology.* (666): 96-204.
- **Lima, R. C. L., Ferrari, F. C., Souza, M. R., Pereira, B. M., Paula, C. A. S. (2015).**Effects of extracts of leaves *Sparattosperma leucanthum* on hyperuricemia and gouty arthritis. *Journal of Ethnopharmacology.* (161): 194-199.
- **Lioté, F. (2010).** Epidémiologie de la goutte. *Revue du Rhumatisme.* (14):11-14.
- **Lioté, F. (2011).** Physiopathologie et traitement de l'inflammation goutteuse. *Revue du Rhumatisme.* (78) : S122-S128.
- **Lioté, F. ( 1999).** Goutte. *Encyclopédie Pratique de Médecine.* 7-0610.
- **Lioté, F., Ea, H.K. (2006).**Gout: update on some pathogenic and clinical aspects. *Rheumatisme Dis Clin North Am.* (32):295-311.
- **Lioté, F., Bardin, T. ( 2007).** Traitement de la goutte. *Revue du Rhumatisme.*(74):160-167.
- **Lioté, F., Ea, H.K. (2007).** Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Revue du Rhumatisme.*( 74 ) : 131-137.
- **Liu, R., Lioté, F., Rose, D.M., Merz, D., Terkeltaub, R. (2004).** Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheumatisme.* (50):247–58.

-M-

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

- **Marié, E., Fournier, C., Butin, N., Doyen, V., Wallaert, B. (2005).** Accoutumance ultrarapide à l'allopurinol. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.* (45) : 498-500.
- **Marshall, J.S., Jawdat, D.M. (2004).** Mast cells in innate immunity. *Journal Allergy Clin Immunol.* (114).7-21.
- **Molloy, E. S., Carthy, G. M. (2004).** How crystals damage tissue. *Current Rheumatology Reports.* (6): 228-234.
- **Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C., (2000).** Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors.* (12) : 169-174.
- **Murakami, Y., Akahoshi, T., Hayashi, I., Endo, H., Kawai, S., Inoue, M. (2006).** Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murineresident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheumatisme.* (54): 455–62.

**-N-**

- **Naczk, M. et Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.* (1054): 95-11.
- **Negrao, R., Faria, A. (2009).** Natural polyphenols as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic agents in the metabolic syndrome. *Springer Science Business Media B V.* p 147-180.
- **Nuki, G. (2008).** Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports.* (10): 218-227.

**-O-**

- **Owen, P.L., Johns, T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology.* (64): 149-160.

**-P-**

- **Peng, Y.J., Lee, C.H., Wang, C.C., Salter, D. M., Lee, H.S. (2012).** Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. *Free Radical Biology and Medicine.* (52): 765-774.
- **Perez-Ruiz, F. (2007).** Les nouveaux traitements de la goutte. *Revue du Rhumatisme.* (74) : 624–626.

- **Pétrilli, V., Martinon, F. (2007).** The inflammasome, auto-inflammatory diseases, and gout. *Rhumatisme. (74)* : 1240–1246.
- **Pragasam, S. J., Rasool, M. (2013).** Dietary component *p*-coumaric acid suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Inflamm. Res. (62)*: 489-498.
- **Prat, D., Rampant, P.F., Prado, E. (2006).** Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières. *Institut nationale de la recherche agronomique. Paris.* p282.

-Q-

- **Quezel, P., et Santas, S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Ed. du centre national de la recherche scientifique, Paris 7<sup>e</sup>, France.* P 738-739.
- **Rameau, J. C., Dumé, G. (1989).** Flore forestière française : Tome 1. Plaines et collines. *Institut pour le développement forestier.* p 457-459.
- **Rasool, M., Varalakshmi, P. (2006).** Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on experimental gouty arthritis: An *in vivo* and *in vitro* study. *Chemico-Biological Interactions . (164)*: 174-180.
- **Reach, G. (2011).** L'observance dans la goutte. *Revue du rhumatisme.(78)* :319–323
- **Richette, P. (2010).** Goutte. Séminaires de Réflexions rhumatologie. **p40.**
- **Richette P.(2011)** .Goutte : mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant. *Revue du Rhumatisme. (78)* : 142-147.
- **Richette,P., Bardin, T .(2009)** . Gout. *Revue du Rhumatisme. (375)* :318-328.
- **Robert, M., Hood, L. (1994).** Colchicine poisoning. *Journal of Emergency Medicine. (12)*:171-177.
- **Roddy, E., Doherty, M. (2010).** Epidemiology of gout. *Roddy and Doherty Arthritis Research and Therapy. (12)*: 223.
- **Rose, D. M., Liu-Bryan, R. (2006).** Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty inflammation. *Current Rheumatology Reports. (8)*: 209-214.
- **RSC (2015).** Royal Society of Chemistry.
- **Rozenberg, S. (2007).** La goutte médicamenteuse. *Revue du Rhumatisme. (74)*:150–152.
- **Ryu, K., Takeshita, H., Takubo, Y., Hirata, M., Taniguchi, D., Masuzawa, N., Kishimoto, M., Kubo, T. (2005)** . Characteristic appearance of large subcutaneous gouty in magnetic resonance imaging. *Mod Rheumatol. (15)*: 290-293.



## -S-

- **Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., Herrmann, M. (2012).** Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* (3): 277.
- **Sabina, E. P., Rasool, M. (2008).** An in vivo and in vitro potential of Indian ayurvedic herbal formulation triphala on experimental gouty arthritis in mice. *Vascular Pharmacology.*(48): 14-20.
- **Sabina, E. P., Rasool, M., Mathew, L., Ezilrani, P., Indu, H. (2010).** 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation An *in vivo* and in vitro study. *Food and Chemical Toxicology.* (48): 229-235.
- **Sabina, E. P., Nagar, S., Rasool, M. (2011).** A role of piperine on monodium urate crystal-induced inflammation-An experimental model of gouty arthritis. *Inflammation,* (34) 3
- **Sabina, E. P., Indu, H., Rasool, M. (2012).**Efficacy of boswellic acid on lysosomal acid hydrolases, lipid peroxidation and anti-oxidant status in gouty arthritis mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 128-133.
- **Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C. (2002).** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* (56): 276-282.
- **Schumacher, H. R. (1996).** Crystal-induced arthritis: An overview. *The American Journal of Medicine.* (100): S46-S52.
- **Shi, L., Xu, L., Yang, Y., Song, H., Pan, H., Yin, L. (2013).** Suppressive effect of modified simiaowan on experimental gouty arthritis: An *in vivo* and *in vitro* study. *Journal of Ethnopharmacology.* (150): 1038-1044.
- **Shi, Y., Mucsi, A.D., Ng, G.(2010).** Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Revue.* (233):203-17.
- **So, A., Thorens, B. (2010).** Uric acid transport and disease. *The Journl of Clinical Investigation.* (6): 1791-1799.
- **Steinmeyer, J. (2000).** Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res.* (2): 379-385.
- **Su, J., Guo, C., Wei, J., Yang, J., (2002).**Study on the absorption of quercetin and rutin at different segments of intestine. *Wei Sheng Yan Jiu.* (31): 55-57.
- **Subhan, F., Nasiara, K.,Ibrar, M. (2007).** Anti-inflammatory activity of methanolic and aqueous extracts of *Valeriana wallichii* rhizome. *Pak. J. Pl. Sci.* 13(2): 103-108.

-T-

- **Temunovic, M., Franjic, J., Satovic, Z., Grgurev, M., Frascaria-Lacoste, N., and Fernández-Manjarres, J.F. (2012).** Environmental heterogeneity explains the genetic structure of continental and mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* vahl. *PLOS ONE*. (7).
- **Tonon, G., Capuana, M., and Di Marco, A. (2001).** Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae*. (87): 291-301.
- **Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Kohler, H.R., Schwaiger, J. (2004).** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofénac: Part II. Cytological effects in liver, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 68 (2): 151-166.

-U-

-V-

- **Valli, G., Vasanthi, A., Vijayalakshmi, R., Thanga, T. A. (2012).** Anti-pyretic and anti-inflammatory activity of the *Phorosiapurpura* root extract. *IJPRD*. 3(11): 146-152.

-W-

- **Wortmann, L. R., Fox, H. I., Lighfoot, W.R. Ridolfo, S.A.(1985).** Antihyperuricemic properties of anflutizole in gout. *Journal of rheumatology*.(12):540-543.
- **Wallander, E. (2008).** Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*. (273):25-49.
- **Wei, H., Hu, C., Xie, J., Yang, C., Zhao, Y., Guo, Y., Mei, Z., Chen, L., Lan, Zhou. (2014).** Doliroside A attenuates monosodium urate crystals-induced inflammation by targeting NLRP3 inflammasome. *European Journal of Pharmacology*. (740): 321-328.
- **Wilcox, W.R., Khalaf, A. (1972).** Solubility of uric acid and monosodium urate. *Med. Biol. Eng.* Vol.10. p 522-531.

-X-

-Y-

- **Yagnik, D.R., Evans, B.J., Florey, O., Mason, J.C., Landis, R.C., Haskard, D.O. (2004).** Macrophage release of transforming growth factor  $\beta$ 1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis and Rheumatism*. 5 (7) : 2273-2280.

-Z-