

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique.
Filière : Science de la nature et de la vie
Option : Biochimie Appliquée.



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité anti NADH
oxydase de la XOR des extraits de deux
plantes médicinales *Clématis flammula*
et *Galium mollugo***

Présenté par :

TERKI Athmane

Soutenu le : **10 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mme: **D.ATMANI.**

MCA

President

Melle: **N.CHAHER**

MAA

Encadreur

Mr.: **M.HAMOUM**

MAB

Examineur

REMERCIEMENTS

Louange a dieu, le miséricordieux, sans lui rien de tout cela n'aurait pu être.

Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont octroyé main vigoureuse pour sa

Réalisation à:

M^{lle} N. CHAHER

Pour le temps et l'intention qu'elle a bien voulu consacrer au bon déroulement de ce travail.

Madame D. Atmani

Pour avoir accepté de nous accueillir pour mener à terme nos travaux.

De nous avoir fait l'honneur de juger le travail et présider le jury.

Monsieur M. Hamoum

Pour avoir accepté de donner de son temps pour évaluer ce travail.

M^{lle} N. Ahmane

Pour sa présence et son aide précieuse.

A toute l'équipe du laboratoire génétique

Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenu, et à l'intérêt

Qu'ils m'ont toujours portés pour mes études, je ne les remercierai jamais assez,

Pour tout ce qu'ils m'ont fait.

Que dieu nous les protèges.

*A mes frères et sœurs Abderrahim, Amina et Kenza qui n'ont jamais cessés de m'encourager dans la
poursuite*

De mes études en m'apportant soutien moral, et financer

A ma très chère fiancée Chafiaa

*A toutes personnes qui m'ont soutenu durant mes études et à tous mes amis : et sur tout Hichem, Bilal,
Yacine, Makhlouf, Abdelhak, Sidali, Lyes.*

A tous mes oncles en particulier Khireddine et tentes et à toute ma famille

A toute la promotion biochimie appliquée 2015.

En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.

Liste des abréviations

- NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- ERN : Reactive Nitrogen Species (espèce radicalaire de l'azote)
- ERO : Reactive Oxygen Species (espèce radicalaire de l'oxygène)
- XDH : Xanthine Déshydrogénase
- XO : Xanthine Oxydase
- XOR : Xanthine Oxydoréductase
- NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit).
- NADH oxydase : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydase.
- TNF: Tumoral Necrosis Factor.
- IL: Interleukine.
- FAD: Flavine Adénine Dinucléotide.
- Mo-Pt: Molibdo Pterine
- Mo: Molybdène.
- Fe-S: fer-soufre.
- KDa: Kilo Dalton.
- Cys: Cystéine
- O₂[·] : Superoxyde.
- H₂O₂ : Peroxide d'hydrogène.
- NO[·] : Monoxyde d'azote.
- ADN: Acide DésoxyriboNucleique.
- ATP: Adénosine TriPhosphate
- OH[·]: Radical hydroxyle.
- Arg: Argénine

-Phe: Phenylalanine

-K₂HPO₄: Di-potassium Hydrogen Phosphate.

-DTT: Dithiothreitol.

-DMSO: Diméthylsulfoxyde.

-HCl: Acide chlorhydrique.

-EDTA: Acide éthylène Diamine Tétra acétique.

-Phe : Phénilalanine.

-Trp : Tryptophane.

-PEP : Phosphoénolpyruvate.

-Kb : kilo bits.

-SH : Groupements Sulphydryle.

Liste des Figures

Figure1 : Structure moléculaire du dimère de la XDH.....	3
Figure2 : Model structural de la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase.....	4
Figure3 : Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo, et du NADH au niveau du site FAD. Et la réduction du NAD ⁺ ou de l'O ₂ au niveau du site FAD.....	7
Figure4 : Mécanisme de génération des ERO par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion	10
Figure 5 : A: Structures des substrats puriniques de la XOR. B: Structures des inhibiteurs de la XOR analogues de substrats.....	11
Figure 6 : La structure des monomères destannins.....	16
Figure 7 : Photos de <i>Clématis Flammula</i>	18
Figure 8 : <i>Galium mollugo</i> (a) et ses sommités fleuris (b).....	22
Figure 9 :Pourcentage d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits des feuilles de <i>Clématis flammula</i>	26
Figure10 :Pourcentage d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits des sommités fleuries de <i>Galium mollugo</i>	28
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'activité anti NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase par les extraits de <i>clématis flammula</i> et <i>Galium mollugo</i>	29
Figure12 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'extrait aqueux chloroforme de <i>Galium mollugo</i>	30
Figure13 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'extrait acétate d'éthyle de <i>Clématis flammula</i>	31

Liste des Figures

Figure14 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'extrait éthanolique de *Clématis flammula*.....32

Figure 15 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la rutine.....33

Liste des Tableaux

Tableaux I: Localisation de l'activité de la XOR dans les différents tissus de certaines espèces.....6

Tableaux II : Les flavonoïdes et les dérivés des polyphénols.....14

Tableaux III : corrélation entre le pourcentage d'inhibition et la teneur en phénols.....27

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I

I- La xanthine oxydoréductase2

I-1- La structure de la XOR3

I-2- Le gène de la XOR4

I-3- Conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase.....4

I-4- Localisation et distribution de la XOR5

I-5- Rôles de la XOR6

I-5-1- Rôle physiologique6

I-5-2- Rôles pathologique8

I-6-Inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase.....10

I-6-1-Inhibiteurs synthétiques.....10

I-6-2-Inhibiteurs naturels de la XOR.....11

I-7-Les composés phénoliques.....12

I-7-1-Définition.....12

I-7-2-Biosynthèse12

I-7-3-Classification13

I-7-4-Les phénols simples	13
I-8-Les flavonoïdes	13
I-9-Les tanins	15

Chapitre II

II-1- Matériels et méthodes.....	17
II-1-1-Matériels végétales	17
II-2-Méthodes.....	24
II-2-1- Préparation de matériel végétale.....	24
II-2-2-Récolte	24
II-2-3-Séchage.....	24
II-2-2-4-Broyage.....	24
II-2-2-5-Tamisage.....	24
II-3- Méthodes.....	24
II-3-1-Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase.....	24
II-3-2- Préparation des solutions tests.....	24
II-3-3-Préparation de la solution tampon.....	25
II-3-4-Préparation de la solution de substrat (NADH).....	25
II-3-5- Etude de l'activité inhibitrice de la XOR par les extraits.....	25
II-4-Etude statistique.....	25
II-5-Résultats et discussion.....	26
II-5-1-Testes d'activité anti-NADH oxydase des extraits de <i>Clématis flammula</i>	26
II-5-2-Testes d'activité anti-NADH oxydase des extraits de <i>Galium mollugo</i>	27

II-5-3-L'inhibition de NADH oxydase en fonction des concentrations.....	29
II-5-4-Détermination de type d'inhibition.....	30
Conclusion et perspective.....	35
Références bibliographique.....	36

Introduction

Depuis longtemps, des remèdes traditionnels à base des plantes ont été employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Il est évident que l'effet thérapeutique est la conséquence de leur composition aussi bien organique que minérale. Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicament. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base des plantes. Récemment de nombreux travaux ont montré que les plantes issues de la médecine traditionnelles et qui ont été testées sont efficaces dans les modèles pharmacologiques et quasiment dépourvues de toxicité.

Les composés phénoliques (flavonoïdes et tannins) qui sont présents chez toutes les plantes sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antitumoraux et antioxydants. A partir des années quatre vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules.

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une enzyme qui catalyse l'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et cette dernière en acide urique. La capacité du NADH d'agir comme un substrat réduisant la XOR a été élucidé depuis longtemps (Hunt et Massey, 1994). L'activité NADH oxydase a récemment généré un intérêt considérable dans le terme de son rôle postulé dans les lésions post-ischémiques par production de radicaux libres.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de deux plantes médicinales locales *Galium mollugo* et *Clématis flammula* sur l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase. Ces plantes sont utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs pathologies comme l'inflammation, l'ulcère et celles qui sont dues apparemment à la XDH tels que la goutte.

I-La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase(XOR) est un complexe molybdoflavoprotéine, qui catalyse l'hydroxylation oxydative des pyrimidines, ptérines et aldéhyde (Truglio et *al.*, 2002). La xanthineoxydoréductase(XOR) est une enzyme impliquée dans la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique qui est le produit final du catabolisme des purines chez l'Homme. En outre, cette réaction est accompagnée de la production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, d'où le rôle attribué à la XOR dans le stress oxydatif (Parks et *al.*, 2005). **(Figure 1).**

La XOR intervient aussi sur un autre aspect en utilisant le NADH comme substrat. En effet, la XOR catalyse la transformation du NADH en NAD^+ tout en produisant des radicaux libres tel que le superoxyde (Atmani et *al.*, 2005).

La xanthine déshydrogénase a été considérée pendant longtemps comme étant une aldéhyde oxydase, jusqu'à ce que Scardinger découvre en 1902 qu'elle était codée par un gène différent de celui de l'aldéhyde oxydase (Enroth et *al.*, 2000).

En effet, la XDH est un complexe métallobiflavoprotéique constitué de quatre centres redox actifs qui sont : une molybdénoptérine, deux centres fer-soufre et une flavine adénine dinucléotide (FAD).

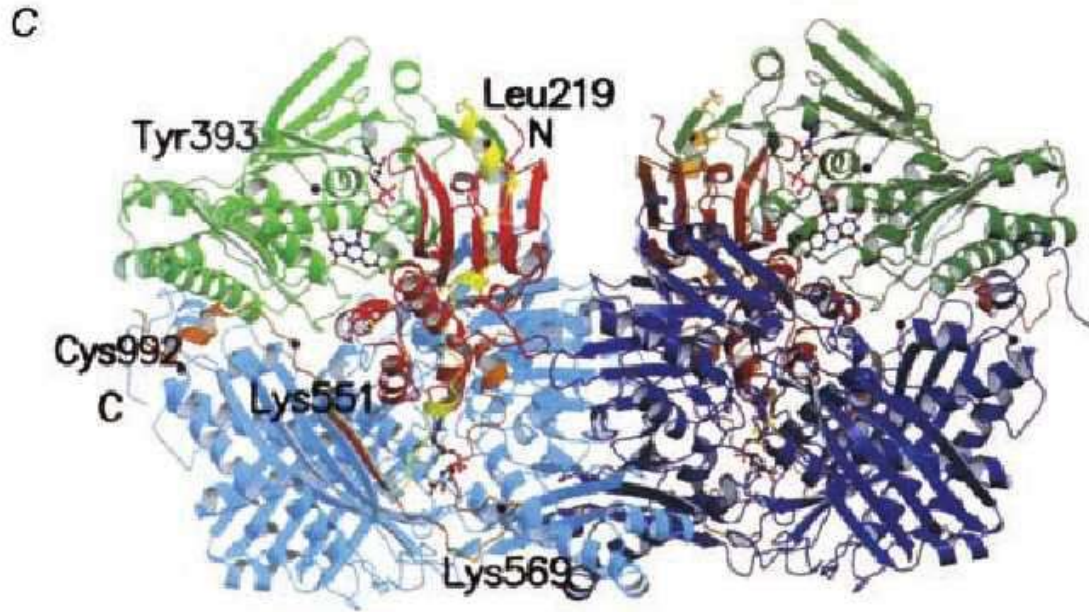


Figure 1 : structure moléculaire du dimère de la XDH. (Truglio et *al.*, 2002).

Rouge : centre Fer-soufre ; Vert : domaine FAD ; Bleu : domaine Mo-pt ; Marron : domaine de liaison du co-facteur FAD au co-facteur Mo-pt ; Jaune : domaine de liaison du centre Fe-S au co-facteur FAD

I-1-La structure de la XOR

Toutes les XOR isolées à partir d'animaux différents ont des poids moléculaires et une composition en centre d'oxydoréduction similaires (Hille, 1996). Elles sont constituées d'environ 1330 acides aminés et sont très homologues (Hille et Nishino, 1995).

La XOR est un homodimère (α_2) de 300 kDa. Composée de deux sous-unités identiques et catalytiquement indépendantes, chaque sous-unité contient : un centre FAD, un centre Mo-Pt et deux centres Fe-S non identiques (Nishino, 1994). La protéolyse par la trypsine de l'une de ses sous-unités, la clive en trois fragments qui restent fortement liés et ne sont pas dissociés sous des conditions de dénaturation telles que les fortes concentrations de guanidine hydrochloride (Yamasaki et *al.*, 1990).

Par la détermination de la séquence d'acides aminés N-terminal de chaque fragment :

-Le fragment N-terminal de 20 kDa correspond aux deux centres Fe-S, contient 8 résidus de cystéine localisés dans un environnement hydrophobe.

-Le fragment intermédiaire de 40 KDa, correspond au domaine FAD.

-Le fragment C-terminal de 85KDa, correspond au domaine Mo-Pt

I-2-Le gène de la XOR

Le gène de la XOR est trouvé chez l'Homme au niveau du chromosome 2. Il est situé sur le locus 2p22, environ 60 Kb et il est constitué de 36 exons (partie codante) (Xu et *al.*, 1994).

Dans divers type de cellules les niveaux de la XOR sont régulés par différents stimulateurs comme les cytokines (TNF, INF gamma, IL-6 et IL-1) (Page et *al.*, 2000), et certaines hormones comme les glucocorticoïdes et la prolactine (Kurosaki et *al.*, 1995).

I-3-Conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase

La XOR existe sous deux formes: type D et type O. La forme dominante de la XOR quise trouve *in-vivo* est le type D (Della Corte et *al.*, 1969; Stirpe et Della Corte, 1969; Waud et Rajagopalan, 1976a). Chacune des deux formes préfère un accepteur d'électrons différent de celui de l'autre forme. Le type D préfère la réduction du NAD⁺ et le type O préfère la réduction de l'O₂ (Harrison, 2002).(Figure 2).

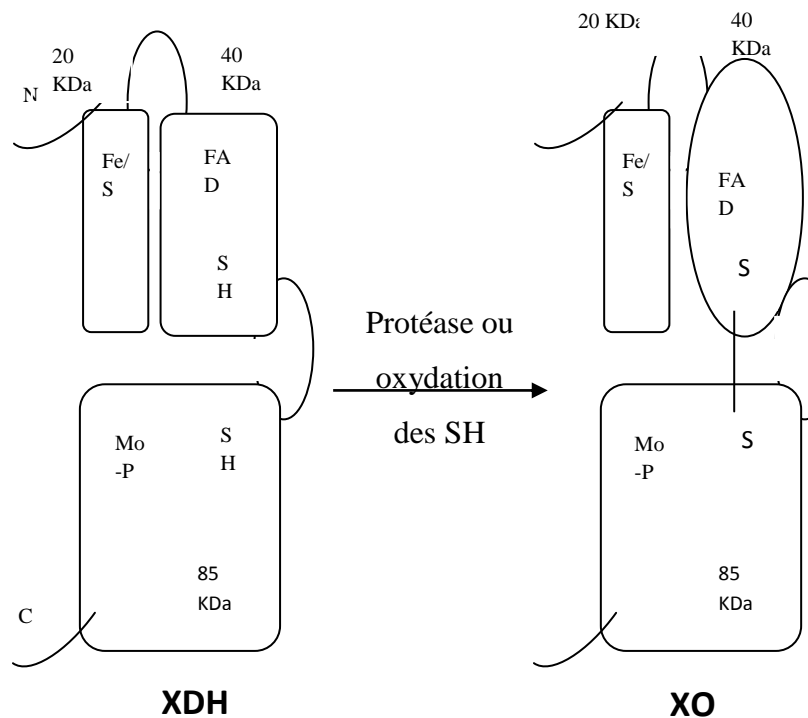


Figure 2 : Model structural de la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase (Nishino, 1994).

La conversion de la XDH en XO se fait via différentes voies; la première est dû à u traitement de la XDH par les protéases, comme la trypsine, la chymotrypsine ou laponcréatine, elle est donc irréversiblement transformée en XO (Della Corte *et al.*, 1969; Stirpe et Della Corte, 1969; Nishino et Tamura, 1991). Ces enzymes provoquent unemodification dans le groupe d'acides aminés (Phe 549, Arg 335, Trp 336, Arg 427) et doncl'interaction entre Phe 549 et Trp 336 est rompue, ce qui change la structure du site actif FADet celui-ci devient inaccessible au NAD⁺. Ce changement structurale forme un canal facilitantle rapprochement de l'O₂ au site FAD (Kuwabara *et al.*, 2003).

La deuxième conversion de la XDH est réversible, elle est dû à l'oxydation desgroupements thiols de la Cys 535 et la Cys 992 (Nishino and Nishino, 1997) dans des conditions d'incubation à 37 °C (Della Corte et Stirpe, 1972), exposition aux agentssulphydryls (Waud et Rajagopalan, 1976b) et l'exposition aux conditions anaérobiques(Della Corte *et al.*, 1969). Quelques composés, tel s que l'oxygène, le 4,4-dithiodipyridine et le phydroxymercuribenzoate, provoquent l'oxydation de 14 groupements sulphydryls libres (SH) dans le type D de l'enzyme XOR en formant des ponts disulfures (Waud et Rajagopalan, 1976a). Ce changement de conformation du site catalytique de l'enzyme type D le rend de type O. Ensuite les ponts disulfures sont réduits par des composés réducteurs des groupements sulphydryls tel que le dithiothreitol (DTT) (Parks *et al.*, 1988).

I-4-Localisation et distribution de la XOR

Elle se fait au moyen de plusieurs méthodes : biochimiques, enzymatiques, histochimiques et immunohistochimiques ; il a été démontré que la XOR est largement distribuées entre différentes espèces allant de bactéries aux plantes à l'être humain (Parks *et al.*,1986). La localisation cellulaire chez certaines espèces est résumée dans le tableau suivant :

Tableau I : Localisation de l'activité de la XOR dans les différents tissus de certaines espèces (Moriwaki *et al.*, 1999).

Espèces	Localisation cellulaire
Homme	Cerveau, thymus, foie, glandes mammaires, placenta, pancréas, cœur, vessie, rate, ovaire, prostate, muscle squelettique, œsophage, estomac et jéjunum.
Rat	Foie, peau, utérus, œsophage, estomac, rate, intestin, duodénum, reins et muscle squelettique.
Bovin	Cœur, foie, muscle squelettique, glande mammaires et poumon.
Cheval	Muscle.
Sourie	Intestin et foie.
poulet	Foie, pancréas et intestin grêle.

I-5-Rôles de la XOR

I-5-1-Rôle physiologique

Enzyme clé du catabolisme des purines, elle catalyse ainsi les deux dernière réaction (**figure 3**) en convertissant l'hypo xanthine en acide urique via la xanthine (Enroth *et al.*, 2000).

L'oxydation de la xanthine se fait au niveau du centre molybdoptérine (Mo-Pt) et les électrons introduits sont rapidement distribués aux autres centres par transfert d'électrons intramoléculaire (Kooij *et al.*, 1994). Pendant ce temps, le substrat naturel NAD oxydant est réduit à travers le FAD. (**Figure3**)

Le rôle de la XDH est connues, le catabolisme des purines, ses autres fonctions restent obscures et font l'objet de nombreuses hypothèses. L'une des implications de la XDH serait la lutte bactéricide favorisée par la production des radicaux superoxydes (Bgorck *et al.*, 1979). En effet, la localisation de l'enzyme autour des bactéries laisserait penser qu'elle participerait

dans la protection antibactérienne en coopération avec les cellules immunitaires dont elle induirait la prolifération et la différenciation. (Kawakami et *al.*, 1997). En aérobiose, la XDH utilise la nicotamide adénine dinucléotide (NAD) comme accepteur d'électron, et non une molécule d'oxygène, évitant ainsi la formation d'oxygène superoxyde. En anaérobiose, la XDH est convertie en XO (Nielsen et *al.*, 1996). La transformation de la XDH en XO se fait soit par un mécanisme réversible d'oxydation, soit par un mécanisme irréversible de protéolyse.

La production d'urate, qui est un puissant antioxydant, préférerait de ce fait ce rôle à la XDH (Peden et *al.*, 1990). L'enzyme jouerait aussi un rôle important dans l'absorption du fer dans l'intestin grêle et sa mobilisation dans le foie (Pasquier et *al.*, 1992). La distribution de la XDH dans les tissus constitue la bases sur laquelle les suggestions de ses rôles possibles sont émises. Sa localisation est limitée chez l'homme au foie et l'intestin sauf cas pathologique, mais s'étend chez l'animal à d'autres organes comme le pancréas, rein, rate, ovaires, testicules, poumon...etc. (Rytkonen et *al.*, 1994).

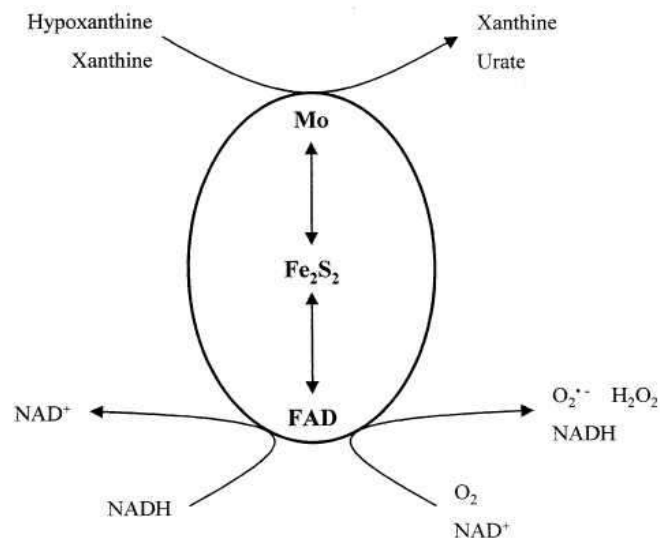


Figure3: Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo, et du NADH au niveau du site FAD. Et la réduction du NAD⁺ ou de l'O₂ au niveau du site FAD (Harrison, 2002).

La XOR catalyse aussi la réduction du nitrate avec une production de l'acide nitrique (NO) et ce sous des conditions d'anaérobiose (Millar *et al.*, 1998).

I-5-2-Rôles pathologique

En plus du rôle bénéfique dans le catabolisme des purines, la XO est supposée être impliqué dans de nombreuses pathologies telle que : la goutte, l'athérosclérose, le cancer, le vieillissement, l'inflammation (Cos *et al.*, 1998., Chiang *et al.*, 1994) l'arthrite, la xanthinurie (Ichida *et al.*, 1997), l'ischémie réperfusion, le rhumatisme, l'Alzheimer et la parkinson (Squadrito *et al.*, 2000., Hooper *et al.*, 2008, Granger *et al.*, 1981) et également dans l'induction de la prolifération et la différenciation cellulaire (Kooij *et al.*, 1992).

Il a été établi que la XDH est impliquée dans différents états pathologiques comme la goutte, elle est la source biologique des radicaux libres. En outre, l'intérêt de la XO a augmenté à la dernière décennie à cause du rôle important de cette enzyme dans les lésions de tissus [l'intestin (Granger *et al.*, 1981), le foie (Harisson *et al.*, 2002), le cœur (Heahse *et al.*, 1985), le muscle (Rythkonen *et al.*, 1994) durant la réperfusion après une ischémie.

La déficience de l'activité de la XDH due à une mutation du gène de la XDH est associée à la xanthinurie qui est une maladie autosomale récessive bénigne (Ichida *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2001). Cette déficience est caractérisé par un syndrome lié à la disposition des caillots de la xanthine dans l'appareil urinaire (Kusick., 1993 dans ; Rytkonen *et al.*, 1994).

I-5-2-1-Génération des radicaux libres par la xanthine oxydoréductase

La XOR est également une source importante de radicaux libres (superoxyde) ; elle produit l' O_2^- et le H_2O_2 . Ces deux espèces oxygénées peuvent être par la suite des précurseurs des autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou d'azote (ERN) qui sont impliquées dans les grands dommages cellulaires. Ces espèces réactives peuvent induire un changement structural des molécules biologiques ; les lipides, les protéines et l'ADN. La XOR joue un rôle important dans différentes formes de pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires, les lésions post-ischémiques, les dommages tissulaires et vasculaires et les maladies cardiaques chroniques (Pacher *et al.*, 2006).

Le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique. La production

d'espèces réactives de l'oxygène par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouera un rôle important lors de l'ischémie-réperfusion (Ling, 2001).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande en ATP et déficit en oxygène, notamment lors d'ischémie-réperfusion ou d'hypoxie. Pendant cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' O_2^- (Garait, 2006).

I-5-2-2-La goutte

C'est une affection très douloureuse, provoquée par un trouble du métabolisme de l'acide urique entraînant l'augmentation de son taux dans le sang (hyperuricémie). La goutte touche l'Homme vers 40 ans. L'hérédité, les habitudes alimentaires jouent un rôle important puisque 50 % des goutteux présentent un excès de poids. Néanmoins, certains cas sont secondaires à une intoxication par le plomb (saturnisme) ou à une hémopathie maligne.

La goutte se manifeste, d'une part, par des accès aigus inflammatoires touchant les articulations, d'autre part par des affections chroniques dues à la surcharge dans les tissus de dépôts uratiques. (Philippe et al., 1989).

I-5-2-3-Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion

Granger et ses collaborateurs (1981), ont lancé leur hypothèse qui dit que les ERO produits par la XOR provoquent les lésions ischémiques dû au catabolisme de l'ATP pendant l'hypoxie, ce qui conduit à l'augmentation de concentration de l'hypoxanthine (**Figure 4**). Lorsque la concentration intracellulaire de l'ATP est diminuée, il se produit un déséquilibre dans le gradient ionique de part et d'autre de la membrane plasmique conduisant ainsi à l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} provoque l'activation des protéases Ca^{2+} dépendantes (Granger et al., 1981; Mc Cord, 1985) qui catalysent la conversion irréversible de la XDH, prédominante *in vivo*, en XO (**Figure 4**) (Della Corte et Stirpe, 1968; Granger et al., 1981; Kooij et al., 1992).

Dans la réperfusion, la Xanthine oxydase oxyde l'hypoxanthine accumulée en xanthine, et la xanthine en acide urique, et réduit l' O_2 en O_2^- et H_2O_2 (**Figure 4**) (Hille and Massey, 1981a). L'interaction entre ces deux espèces par la réaction de Haber-Weiss produit le radical hydroxyle, provoquant ainsi des lésions tissulaires (Huang et al., 2001).

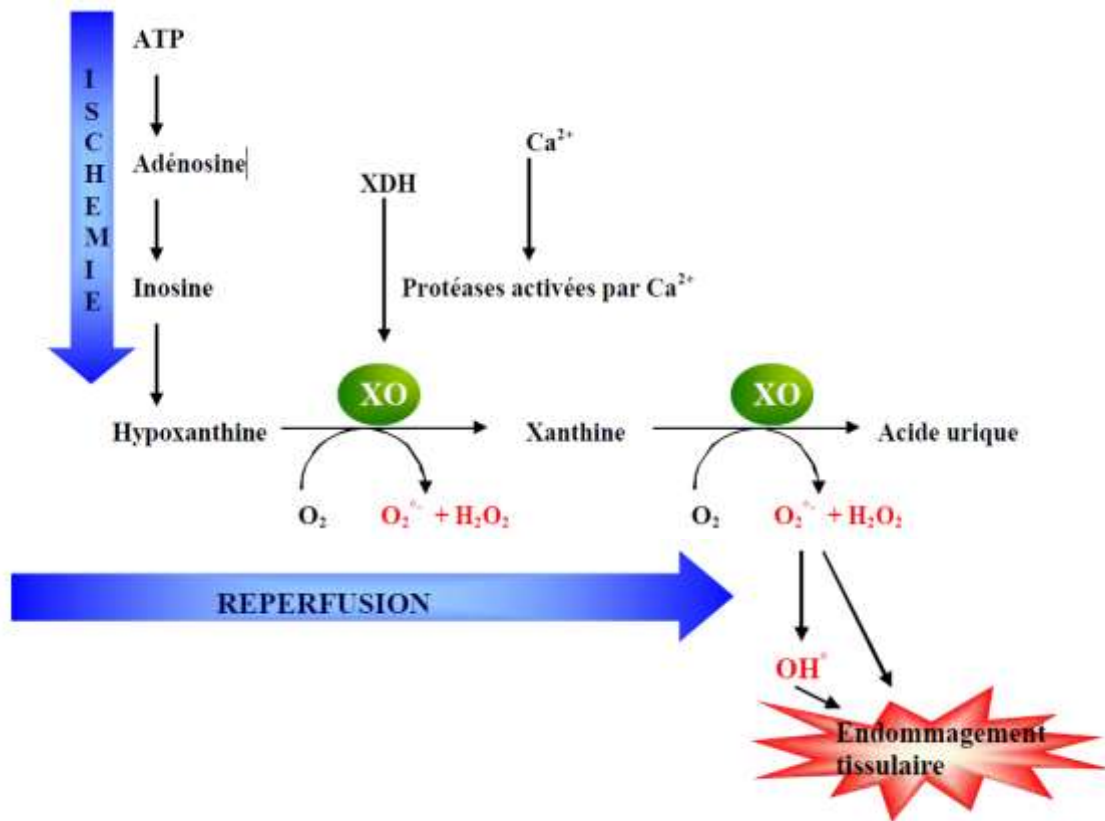


Figure 4: Mécanisme de génération des ERO par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion (Granger et al., 1981).

I-6-Inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase

I-6-1-Inhibiteurs synthétiques

I-6-1-1-L'allopurinol

L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine, dans lequel les atomes N et C en position 7 et 8 sont interchangeés (Iwata et al., 1998), considéré comme inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase (Chang et al., 1994). (**Figure 5 : B**)

I-6-1-2-Salicylate

Le salicylate est un inhibiteur compétitif de la XO, et interagit avec plusieurs acides aminés du site actif (Arg 880, Phe 914, Thr 1010 et Glu 1261) (Danny et al., 2002).

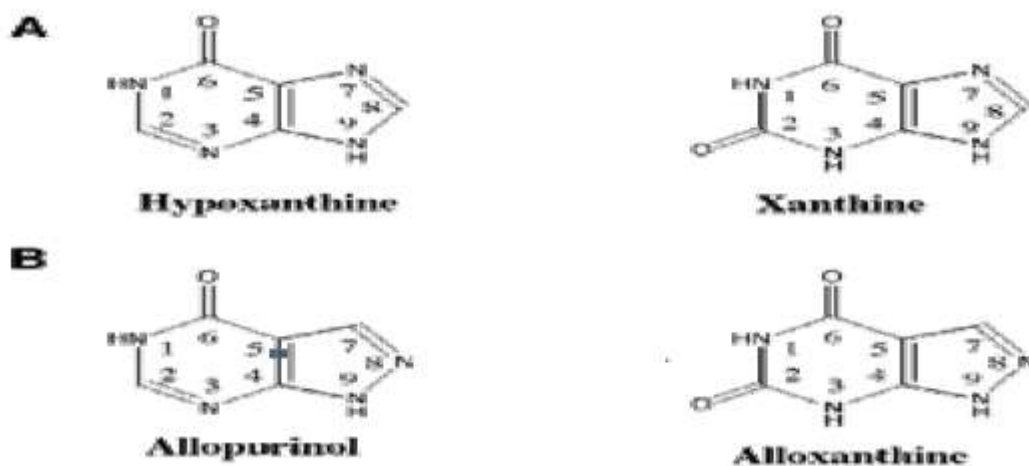


Figure 5: **A:** Structures des substrats puriniques de la XOR. **B:** Structures des inhibiteurs de la XOR analogues de substrats (Truglio et *al.*, 2002).

I-6-2-Inhibiteurs naturels de la XOR

I-6-2-1-L'acide urique

L'acide urique est un inhibiteur compétitif de la XOR grâce à son analogie au substrat. Il favorise la réoxydation de la XOR (Radi et *al.*, 1992).

I-6-2-2-Les composés phénoliques

Acide Gallique, et l'acide ellagique (Rebereau, 1992).

Flavonoïdes : les Flavonols (le kaempferols, la la quarcétine). (Aucomp et *al.*, 1997).

Coumarines : Esculetine. (chang et *al.*, 1994).

Quinones : L'alizarine (Sheu et *al.*, 1997).

I-7-Les composés phénoliques

I-7-1-Définition

Les polyphénols, groupe de molécules de structures variées, utiliser en phytothérapie (Hennebelle et *al.*, 2004). Ce sont des métabolites secondaires qui se trouvent dans toutes les plantes et dont les vertus thérapeutiques de ces dernières sont attribuées (Balasundram et *al.*, 2006). Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libre ou engagées dans une autre fonction chimique (ester, osidique).

Leurs poids moléculaires varient de 500 à 3000 Dalton (Macheix et *al.*, 2005). Les différentes propriétés, notamment antioxydantes des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés phénoliques. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003).

I-7-2-Biosynthèse

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux voies de biosynthèses : la voie la plus courante est la voie shikimate (l'acide shikimique). La première réaction est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former un composé en C_7 , qui conduit aux acides aminés aromatiques et à leurs très nombreux dérivés (acide benzoïque, acétophénone, lignines et lignanes, coumarines...etc.) (Bruneton, 1999).

L'autre voie commence de l'acétate et conduit à des poly β -cétoesters (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation de différentes formes de composés phénoliques (Bruneton, 1999).

Les différences structurales des composés phénoliques due à cette double origine (figure de la voie de synthèse des composés phénoliques) est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origines mixtes des deux voies (Bruneton, 1999).

I-7-3-Classification

Selon leur structure de base, les composés phénoliques peuvent être groupés en différentes classes, les plus importantes sont :les phénols simples, les flavonoïdes et les tanins (Bennick, 2002).

I-7-4-Les phénols simples

Ce sont les formes phénoliques les plus simples qui présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C_6 aux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) et à des molécules proches (Macheix et *al.*,2005).

Les dérivés hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de l'acide cinnamique, l'ensemble de ce groupe est souvent rapporté sous la dénomination commune de phénylpropanoïde. Ils sont les plus abondants des composés phénoliques simple, et leur présence dans le règne végétal est, généralement à l'état d'ester avec d'autres molécules organiques tels que les glucides (Macheix et *al.*, 2005).

Les coumarines sont des composés qui dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leur chaîne latérale. Ils sont les moins répons des deux premiers et leur répartition dans la nature est assez limitée. Le composé le plus fréquent est l'ombelliférone (Bruneton,1999).

I-8-Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 8 000 composés naturels, qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

Ils sont formés à partir de la phénylalanine et de, la tyrosine. La structure de base du flavonoïde est le noyau flavan, qui est composé de 15 atomes de carbone arrangé dans trois noyaux (C6-C3-C6) (figure), qui se présentent par A, B, et C (Pietta, 2000).

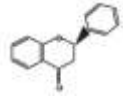
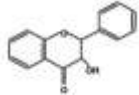
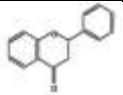
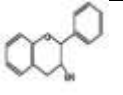
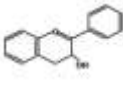
A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions sont alors glycosylés (Havsteen,2002).

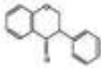
La structure de l'hétérocycle central<<C >> et son degré d'oxydation, ainsi que les positions des groupements hydroxyles sur les noyaux <<A>> et <>, permettent de

distinguer les différentes classes de flavonoïdes (Pietta, 2000 ;Macheix et *al.*, 2005). On distingue :

Flavonols, flavones, flavan-3-ols, isoflavines, flavanones, chalcones et les aurones.

TABLEAU II : Les flavonoïdes et les dérivés des polyphénols. (Hooper et *al.*, 2008).

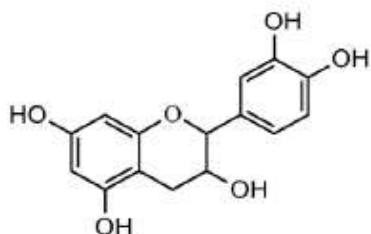
Les principaux classes des flavonoïdes	Structure	Membres de la famille	Les sources alimentaires
Flavanones		Naringénine, hesperétine, eriodictyole	agrumes, tomates
Flavonols		Quercétine, myricétine, isorhamnétine, kaempferole, pachypodole, rhamnazine	Oignons, pommes, brocoli, canneberges, baies, raisins, le persil, épinards
Flavones		Apigénine, nobiletine, tangeritine, luteoline	Céleri, la laitue, le persil, agrumes, betteraves, cloche poivrons, les épinards, Choux de Bruxelles, le thym
Flavan-3-ols		Catechine, epigallocatechine gallate, epicatechine, epicatechine gallate	Thé, le vin rouge, le cacao, raisins, prunes, fruits, légumineuses
Anthocyanidines		Cyanidine, delphinidine,	Vin rouge, canneberges,

		peonidine, malvidine, pelargonidine	prunes, les oignons, les pommes de terre rouges
Isoflavones (iso flavonoïdes)		Daidzeine, genisteine, glyciteine	Les produits de soja, trèfle rouge

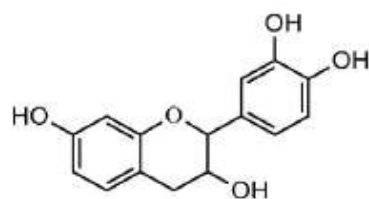
I-9-Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000. Classiquement on distingue deux groupes de tannins : les tannins hydrosolubles comme l'acide gallique et les tannins condensés comme la catéchine, qui diffèrent par leur structure et leur origine biogénétique. Ils sont d'une extrême diversité dont les propriétés tannantes sont basées sur le fait qu'ils précipitent de leurs solutions aqueuses certaines protéines de la peau, en particulier la gélatine. Leurs solutions aqueuses ont un caractère acide (Cuir et peaux, 1947). La durabilité tient avant tout à la présence dans le bois de matières antiseptiques, soit naturelles telles que les tanins (châtaignier, chêne), les résines (pin maritime, cèdre), les oléorésines (essences coloniales); soit artificielles telles que les sels antiseptiques (Salunkhe et *al.*, 199).

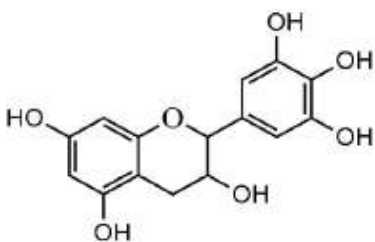
J.H. Low et al. / *Industrial Crops and Products* 69 (2015) 456–461



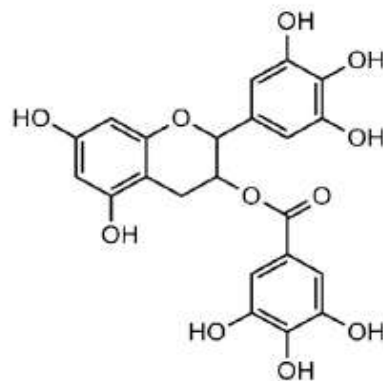
A.) Catechin, $[M+Na]^+ = 313.25$ Da



B.) Fisetinidin, $[M+Na]^+ = 297.25$ Da



C.) Galocatechin, $[M+Na]^+ = 329.25$ Da



D.) Galocatechin-3-O-gallate, $[M+Na]^+ = 481.35$ Da

Figure6: la structure des monomères des tanins.(Low et al., 2015).

II-1- Matériels et méthodes

II-1-1-Matériels végétales

Clématis flammula

Description botanique

Tige sarmenteuse, grimpante, grete, presque glabre, feuilles bipennées, à 3-7 folioles assez petites, ovales ou lancéolées, entières ou rarement trilobées, à saveur brûlante.

Fleurs blanches, en pénicule lache. La plante se trouve en générale dans des régions méditerranéennes, Jusque dans la Drome et l'Aveyron. Sa floraison est entre le mois de Juin et Aout.

Classification Phylogénétique

Règne : Plantae

Embranchement :Spermatophyta (Angiospremae)

Classe : Dicotyledones

Ordre : Ranales

Famille : Ranunculaceae

Genre : Clématis

Espèce : *Clématis flammula*

APPELATIONS INTERNATIONALES :

Nom Français : Clématite flamme

English Name : Virgin's-bower



Figure 7 : Photographie des feuilles de la clématite

Utilisation en phytothérapie

Les parties aériennes de diverses espèces de Clématis sont en particulier employées en Europe et l'Asie orientale comme diurétiques, anti malariques, l'antidote dans des morsures de serpent, anti dysenterie, et dans le traitement de la blennorragie, des maladies d'os, des désordres chroniques de la peau, de la goutte et la douleur rhumatismale, de la fièvre, des infections d'œil, des symptômes varicosité (Gruenwald *et al.*, 2000b). Dans la médecine folklorique, elle est employé pour traiter des cloques, et comme cataplasme pour les blessures, et les ulcères (Gruenwald *et al.*, 2000b). Les espèces de Clématis sont employées couramment par le peuple chinois dans le traitement du rhumatisme.

En Chine, il existe quelques 155 espèces de plantes appartenant au genre Clématis, parmi lesquelles 70 sont largement utilisées en médecine chinoise traditionnelle (Jiang *et al.*, 2006). En effet, *Clématis chinensi*, *Clématis mandshurica* et *Clématis hexapetalla* sont communément utilisées comme analgésique, antibactérien, antidiurétique et anticancéreux. La pharmacopée chinoise indique que les populations préparent les clématites en infusion des tiges et des feuilles fraîches ou séchées dans l'eau bouillante. Cette solution est ingérée après refroidissement pour servir de remède anti-inflammatoire et anticancéreux (Song *et al.*, 2010).

Clématis flammula appelée Clématite odorante ou flammette est utilisée pour le traitement des rhumatismes articulaires, des blessures superficielles et les brûlures, mais lorsqu'elle est utilisée en doses excessives ou pendant une longue durée, elle provoque des lésions d'où elle tient son nom de « Clématite brulante » (Marc *et al.*, 2008). Plusieurs études ont rapporté que les espèces appartenant au genre Clématis sont très utilisées dans le traitement de maladies inflammatoires, dans les affections respiratoires et le cancer. *Revue bibliographique 42 Dina Atmani-Kilani UAMB, 2011*

Galium mollugo

La plante sélectionnée pour cette étude est *Galium mollugo* (**Figure N° a**), il s'agit d'une plante médicinale algérienne, retrouvée dans la région de Jijel et communément appelée caille-lait blanc ou fouaoua. La partie de la plante utilisée pour cette étude est la sommité fleurie (**Figure N° b**).

Classification :

Règne : Planta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Rubiales

Famille : Rubiaceae

Genre : *Galium*

Espèce : *Galium mollugo*

Nom commun : Gaille-lait, Caille-lait blanc, Gaillet mollugine, Mollugine

Nom vernaculaire Arabe : Mokhatiralhalib

Nom targui ou berbère : Fouaoua

Description botanique

Plante vivace et rampante de 20-80 cm à feuilles étroites d'un vert foncé en verticilles et à minuscules fleurs blanches disposées en touffes (80 cm de haut). La tige anguleuses et plusieurs petites feuilles disposées en verticilles autour de cette tige. Elles sont cinq fois plus longue que large, les fruits sont assez gros, glabres (Rohfritsch., 1967).

Habitat

Espèce euro-asiatique, commune dans toute l'Algérie septentrionale, se rencontrant dans les lisières, les haies, les broussailles, chemins, prairies et pentes jusqu'à 2100 mètre. Aime les sols secs à mi-secs, alcalins et riches (**Baba Aissa, 2000**).

Elle est réponde en Europe et en Amérique du Nord, le gratteron pousse dans de nombreuses autres régions tempérées, notamment en Australie, on la cueille à la fin du printemps, juste avant la floraison (Rohfritsch, 1967).

Principe actif

Parmi les principes actifs de la plante on a l'Acides poly phénolique, les tanins, les glucosides, l'Acides oxalique, les alcaloïdes, les flavonoïdes, l'aspéruloside (**Baba Aissa, 2000; Said et al., 2002**).

Effets et usages médicaux

Plante autrefois utilisée pour cailler le lait et comme teinture par l'extraction d'un colorant naturel rouge de ses racines (**Lonchamp, 2000**). Dans la médecine traditionnelle, la plante est indiquée contre l'obésité (tisane) et l'épilepsie (**Cazin, 1868 ; Cheref, 1999**).

Diurétique efficace, le gaillet blanc est souvent prescrit en cas d'affection cutanée comme la séborrhée, l'eczéma et le psoriasis, mais aussi contre les œdèmes des glandes lymphatiques. Sudorifique et antalgique et est utiliser pour soigner les calculs rénaux et d'autres troubles urinaires. Autrefois, on la disait même efficace contre le cancer. En homéopathie, contre les gonflements des glandes et les enflures (John et Ogle, 1862). La plante est antispasmodique, contre l'épilepsie et l'hystérie (Perroti et al, 1999).



Figure 8 : *Galium mollugo*(a) et ses sommités fleuries (b)

Composition chimique

La plante est riche en Iridoides (notamment de l'aspéruloside, légèrement laxatif), anthraquinones (uniquement dans la racine), acides poly phénoliques, tanins et flavonoïdes.

Parmi les poly phénols et flavonoïdes, on trouve l'acide chlorogénique, acide caféique, acide ferulique, acide coumarique, Rutine, acide Rosmarinique, Luteoline et quercetole (Danila et *al.*, 2011).

Matériel

*Micro pipete

*Bain marie

*Vortex

*Plaque agitatrice

*Balance électronique de marque RADWAG.

*Colonne Séphadex G₂₅

*Spectrophotomètre

*PH mètre de marque

*Cuve en quartz

*Barreau magnétique

Réactifs :

*NADH

*K₂HPO₄

*DDT

*DMSO

*Polyéthylène glycol

*Hcl

* EDTA

*Eau distillée

*XDH

*Ethanol

II-2-Méthodes :

II-2-1- Préparation de matériel végétale :

II-2-2-Récolte

Les échantillons de sommités fleuries de *galium mollugo* ont été récoltés au niveau de la région d'Azru n Bechar à Amizour wilaya de Bejaia entre Juin-Juillet 2014 et les feuilles de *Clématis flammula* à Jijel juin 2014

II-2-3-Séchage

Les feuilles de *Clématis flammula* et les sommités fleuris de *Gallium mollugo* ont été séchées à l'air libre et à température ambiante.

II-2-2-4-Broyage

Le broyage des feuilles et des fleurs a été réalisé avec un Broyeur électrique, pour obtenir une poudre fine.

II-2-2-5-Tamisage

La poudre obtenue a été tamisée dans un premier tamiseur de 125 µm de diamètre puis par un deuxième tamiseur de 63 µm de diamètre afin d'obtenir une poudre très fine.

II-3-1-Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase

La XOR a été incubée avec le dithiothreitol (DTT) (10mM), pendant 2H à 37⁰C avant chaque expérience, puis passée à travers une colonne de sephadex G-25.

II-3-2- Préparation des solutions tests

10mg d'extrait brut dissous dans 1 ml de DMSO. Les extraits ont été préparés de la même façon pour les deux plantes.

II-3-3-Préparation de la solution tampon

Tampon phosphate (20 mM, pH : 7).

II-3-4-Préparation de la solution de substrat (NADH)

NADH a été dissous dans un volume de la solution tampon phosphate.

II-3-5- Etude de l'activité inhibitrice de la XOR par les extraits

L'activité de la XOR est mesurée par spectrophotométrie par la détermination de l'absorbance à 340nm, L'effet inhibiteur sur l'activité XDH est déterminé par la diminution de l'absorbance comparée au contrôle.

L'activité inhibitrice (%) de la XOR est déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance à 340nm:

% d'inhibition = $(1 - \Delta A \text{ test} / \Delta A \text{ contrôle})$, où :

ΔA contrôle : est le changement d'absorbance par seconde pour le test contrôle (sans Inhibiteur)

ΔA test : est le changement d'absorbance par seconde pour l'échantillon test (avec Inhibiteur).

II-4-Etude statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD, analysés par le logiciel Graph Pad Prism 5.3. L'analyse des variations a été effectuée par le test one-way ANOVA, $P < 0.05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

II-5-Résultats et discussion

II-5-1-Testes d'activité anti-NADH oxydase des extraits de *Clématis flammula*

Depuis plusieurs années, de nombreuses études cinétiques ont essayé d'élucider le mécanisme réactionnel et d'inhibition de la XOR car cette enzyme est la cible de plusieurs médicaments (Silva et al, 1999).

Cette étude est réalisée sur cinq extraits de *Clématis flammula* sur l'activité anti NADH oxydase. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 9**.

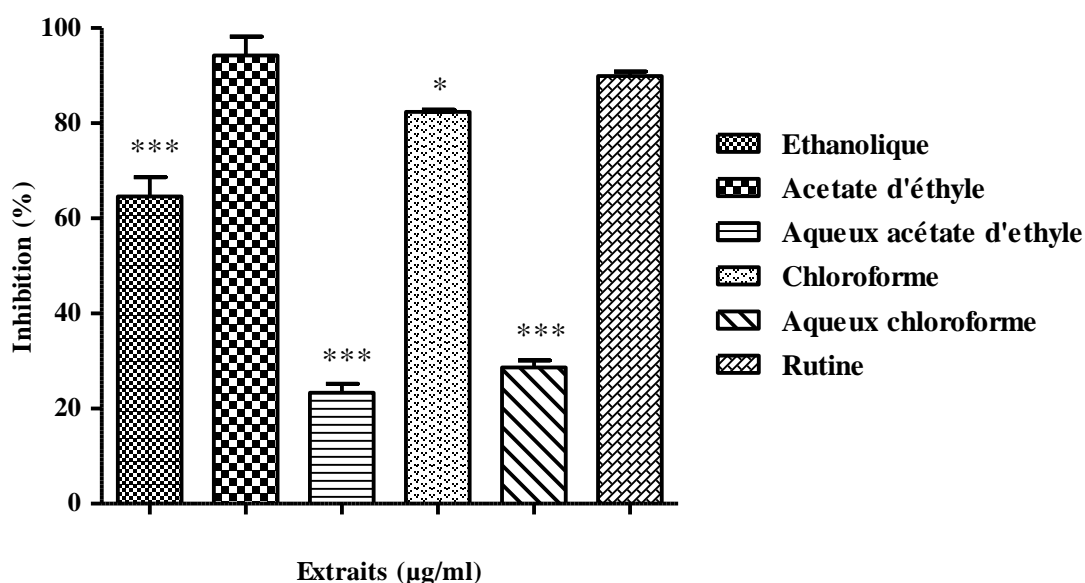


Figure 9 : Pourcentage d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits des feuilles de *Clématis flammula*.

D'après la figure 9, on remarque que tous les extraits exhibent une activité inhibitrice de NADH oxydase dont l'activité la plus élevée est celle enregistrée par l'extrait de la phase organique d'acétate d'éthyle avec 94.22±4.0% à une concentration de 100µg/ml, qui est légèrement supérieure à celle exhibée par la molécule de référence la rutine (89,93 ± 0,96%), suivi par l'extrait chloroforme (82.37 ± 0.28%) et l'extraits ethanolique (64.60 ± 4.08%). quand au extraits aqueux ils ont exhibé une activité significativement (p <0.001) faible en comparaison à la rutine avec des pourcentage d'inhibition de 23.3 ± 1.91% pour l'aqueux d'acétate d'éthyle et 28.65 ± 1.46% pour l'aqueux du chloroforme. ceci peut être expliqué par la solubilité totale du composé inhibiteur dans les phases organiques.

On observe que les meilleures inhibitions sont exhibées par les extraits organiques. Ceci peut être expliqué par la solubilité des composés inhibiteurs tels que les polyphénols (flavonoïdes, tanins et acides phénoliques) dans les phases organiques. Ce résultat est peut être en accord avec l'étude de atmani et *al.*, 2011, qui a montré la richesse des fractions organiques en composés phénolique par rapport au fraction aqueuse (**Tableau III**). On peut alors suggérer que cette activité est due à la richesse de *Clématis flammula* en phénols et il existe une corrélation entre la teneur en phénols et le pourcentage d'inhibition.

Tableaux III : corrélation entre le pourcentage d'inhibition et la teneur en phénols. (Atmani et *al.*, 2011).

Extrait	% d'inhibition	Teneur en Phénols mg eq catéchine/g d'extrait.
Ethanolique	64.6%±4.08	80.14±20
Acétate d'éthyle	94.22%±4.01	232±6
Aqueux acétate d'éthyle	23.32%±1.91	50.8±2.5
Chloroforme	82.37%±0.28	210.36±13
Aqueux chloroforme	28.65%±1.46	64±2.5

II-5-2-Testes d'activité anti-NADH oxydase des extraits de *Galium mollugo*

Une étude cinétique sur La disparition de NADH à 340 nm est réalisée aussi sur les extraits aqueux des sommités fleuries de *Galium mollugo* (**figure 10**).

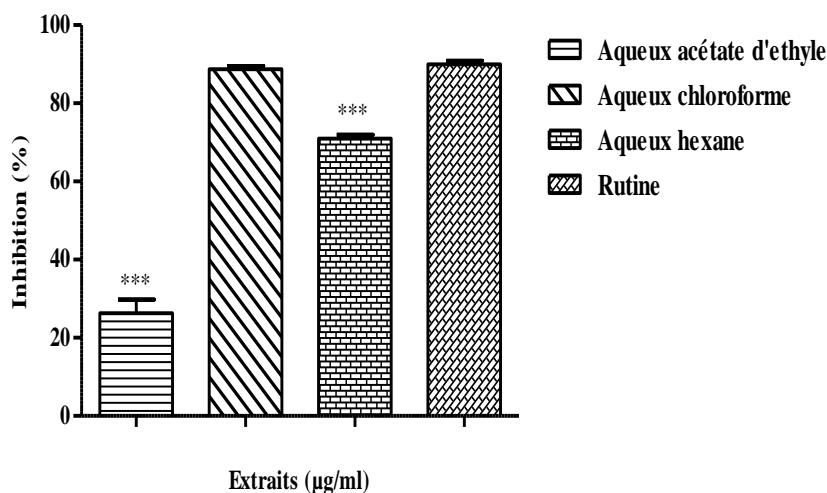


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits des sommités fleuries de *Galium mollugo*.

D'après les résultats obtenue dans la figure 10, on remarque une activité très élevé par l'extrait aqueux chloroforme avec $88.72 \pm 0,8\%$ qui est presque la même exhibé par la molécule de référence la rutine ($89,93 \pm 0,96\%$), suivie par l'extrait hexane avec $70.93 \pm 1.01\%$ et une faible activité a été exhibé par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle avec $26.25\% \pm 3.52$, ils ont exhibé une activité significativement ($p < 0.001$) faible en comparaison a la rutine. On peut suggérer que la solubilité des composés phénoliques de cette plante est dépendante du type de solvant utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. En comparaison avec une autre étude réalisée par Berboucha et *al.*, 2010 ; Debbache et *al.*, 2014 sur la XO a montré que l'extrait aqueux chloroforme exhibe une bonne activité.

Mersereau et Ditommaso , 2002 ont révélé la présence de flavonoïdes, coumarines et acides phénoliques dans les extraits de *Galium mollugo*. D'après Tamas et ces collaborateurs en 2006, cette plante possède deux flavonoïdes hétérosides. Une autre étude menée par Milic et ses collaborateurs en 2012 a montré que les extraits de *Galium mollugo* ont une teneur élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ces composés se concentrent au niveau des phases aqueuses. Ainsi on peut suggérer que l'activité anti NADH-oxydase de ces extraits est due à la présence des flavonoïdes et acides phénoliques.

En 1994, Hanasaki et ces collaborateurs, ont montré que les flavonoïdes dont la rutine fait partie agissent sur l'activité de la xanthine oxydoréductase en inhibant à la fois la production de l'acide urique et celle du radical superoxyde. En 1998, Cos et coll. ont confirmé ce résultat, et ils ont établi une relation entre la structure chimique de ces composés et leur pouvoir inhibiteur.

II-5-3-L'inhibition de NADH oxydase en fonction des concentrations

Nous avons étudié l'inhibition de l'extraits ethanologique et l'extraits acétate d'éthyle de *Clématis flammula* et l'extrait aqueux de chloroforme de *Galium mollugo*, ainsi que la rutine à différentes concentrations d'extrait (25, 50, 75, 125). (figure11).

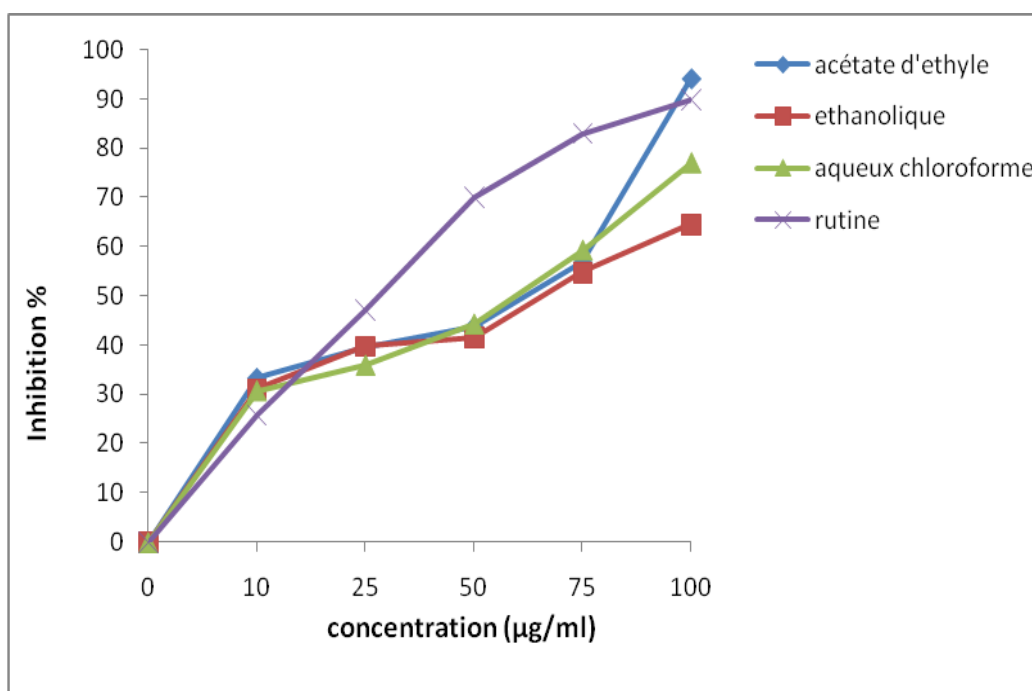


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'activité anti NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase par les extraits de *Clématis flammula* et *Galium mollugo*.

La **figure 11** montre que l'inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase est dépendante de la concentration, dont les extraits aqueux chloroforme de *Galium mollugo*, acétate d'éthyle et éthanologique de feuilles de *Clématis flammula* ainsi que la rutine exhibent une bonne activité inhibitrice de NADH oxydase exprimant des valeurs IC_{50} de l'ordre de 57.08, 50.56, 65.33, 40.20, respectivement.

Cette inhibition est remarqué même à faible concentration 10 μ g/ml avec 30.80% \pm 0.89 33.40% \pm 0.97 ; 31.13% \pm 1.88 et 25.88% \pm 2.

Après comparaison entre les résultats obtenue pour les extraits des deux plantes, on observe que l'extraits acétate d'éthyle de *Clématis flammula* exhibe une meilleur activité.

II-5-4-Détermination du type d'inhibition

La cinétique de l'enzyme en présence des l'extrait de *Galium mollugo* et *Clématis flammula* a été étudiée en utilisant les parcelles doubles réciproques de Lineweaver-Burk (**figure : 15**).

Le type d'inhibition a été déterminé en testant l'extrait de *Clématis flammula* et *Galium mollugo* en présence de différentes concentrations de NADH oxydase (25, 50, 75, 100, 125 μ M). (**Figure 15**)

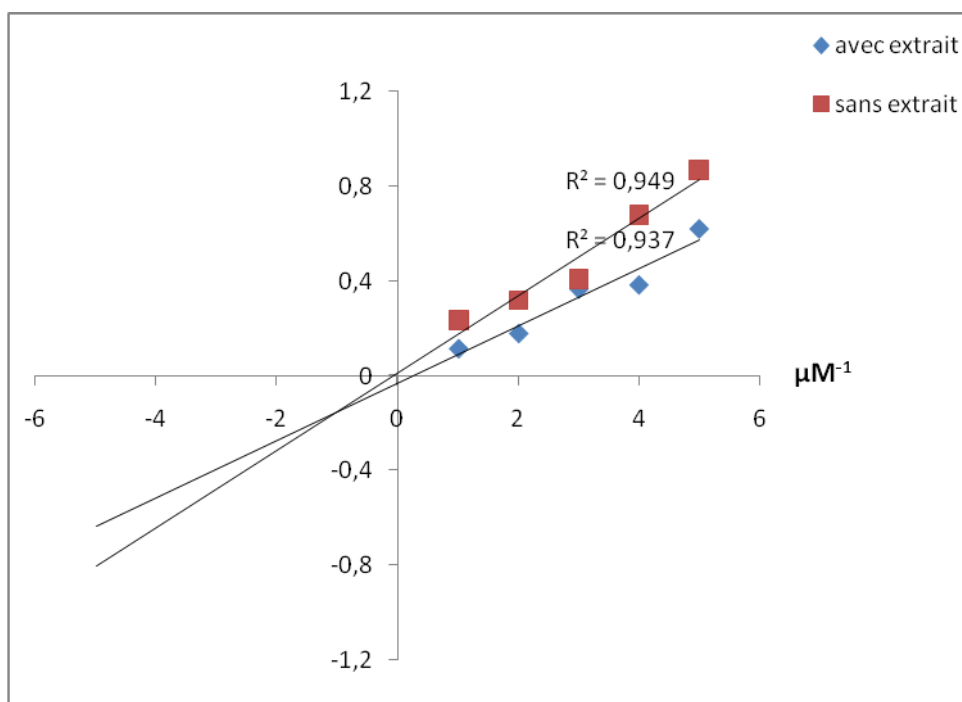


Figure 15 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité anti NADH oxydase par l'extrait aqueux chloroforme de *Galium mollugo*.

Une inhibition de type mixte a été enregistrée par l'extrait aqueux chloroforme, caractérisé par la liaison à la fois avec l'enzyme libre et avec l'enzyme liée au substrat, avec des affinités différentes : $K_i \neq K_I$. On distingue deux types d'inhibitions mixtes : l'inhibition compétitive - non compétitive ($K_I > K_i$) et l'inhibition non compétitive - incompetitive ($K_I < K_i$). Dans notre cas on peut suggérer que c'est l'inhibition compétitive - non compétitive car selon Lin et son équipe (2002), les flavonoïdes tels que la quercétine, myricétine et apigénine, présentent des modes d'inhibitions de type compétitif, donc nos résultats peut être due à la présence de l'une de ces molécules, ce qui est en accord avec une étude menée par Milic et ses collaborateurs (2013) qui a montré la richesse du *Galium mollugo* en cette classe de composés notamment la rutine.

D'après la **figure 15**, on peut suggérer que l'inhibition compétitive exercée par les flavonoïdes peut être modifiée par d'autres composés présents en extraits de plantes par des interactions non spécifiques, ainsi aboutissant à une inhibition de type mixte.

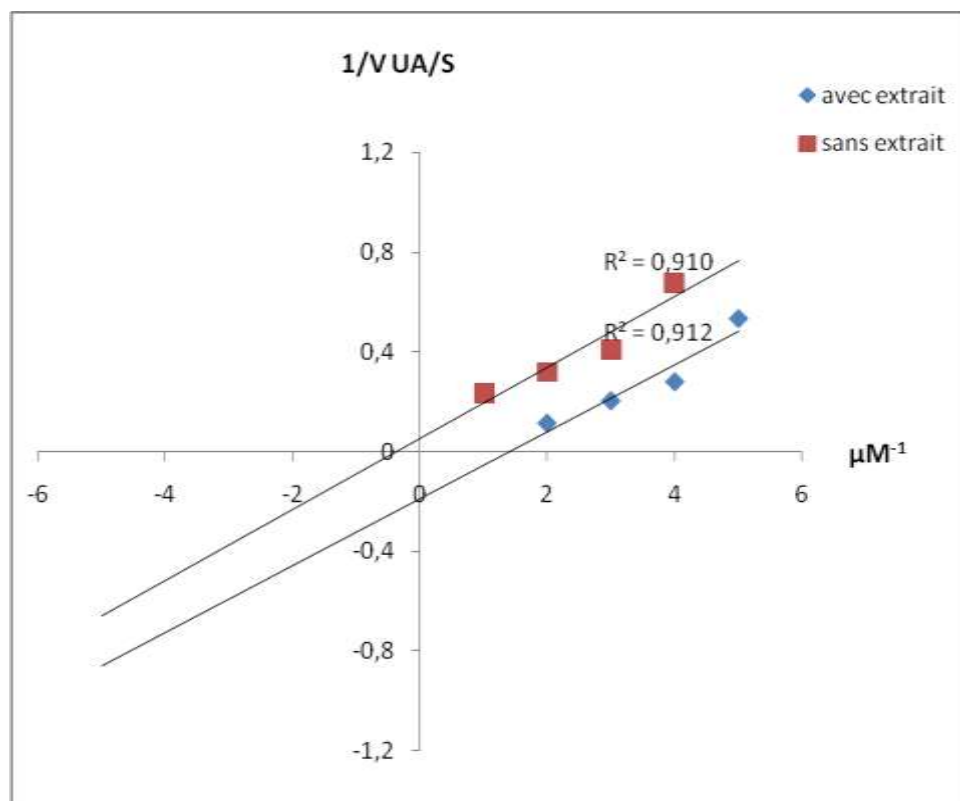


Figure 16 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'extrait acétate d'éthyle de *Clematis flammula*.

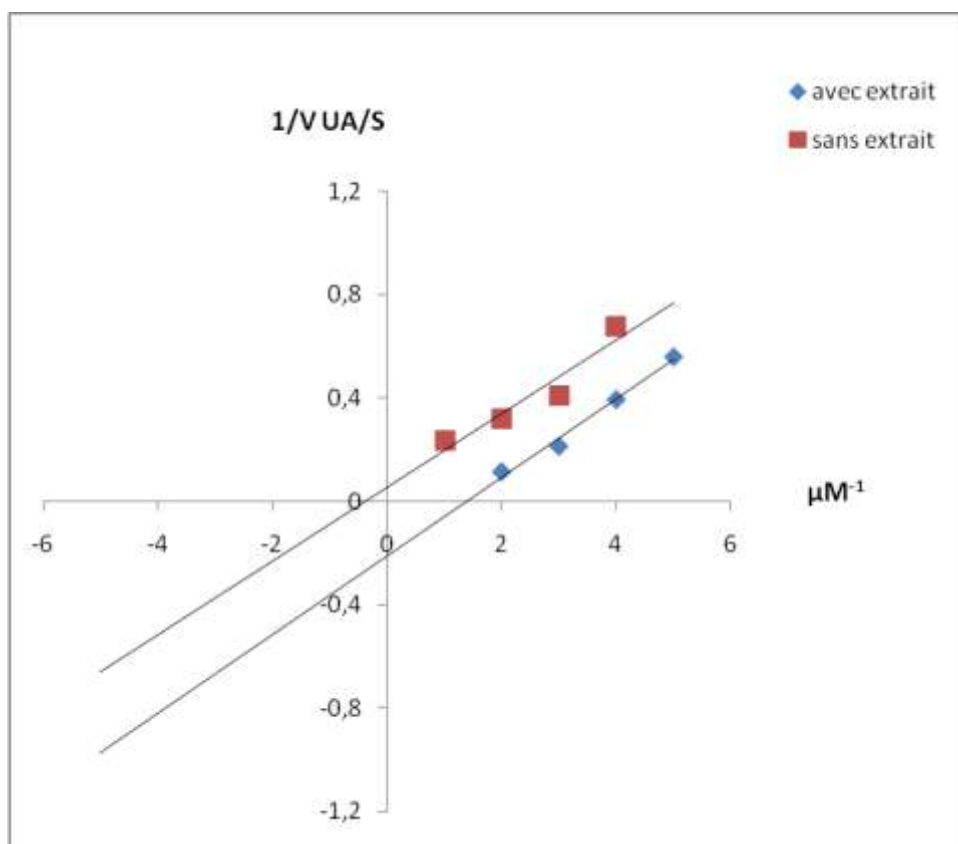


Figure 17 : Représentation de lineweaver et Burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'extrait éthanolique de *Clématis flammula*.

L'extrait acétate d'éthyle (**figure16**) et l'extrait éthanolique (**figure 17**) de *Clématis flammula* enregistrent une inhibition de type incompetitive dites aussi anti-compétitif ou l'inhibiteur ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat ES et empêche la formation des produits (complexe non productif). Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme par ajustement induit, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.

Les substances phénoliques sont connues pour leur affinité aux protéines, notamment aux résidus prolines ; ceci peut être à la base de l'inhibition de l'enzyme, car de telles interactions peuvent modifier la conformation de l'enzyme, affectant ainsi son activité (Moini et al., 2000).

La richesse de nos extraits d'acétate d'éthyle et d'éthanolique en phénols totaux avec des teneurs de 232 ± 6 mg eq catéchine/g et 80.14 ± 20 mg eq catéchine/g d'extrait, respectivement (Atmani et al., 2011). ce qui confirme nos résultats.

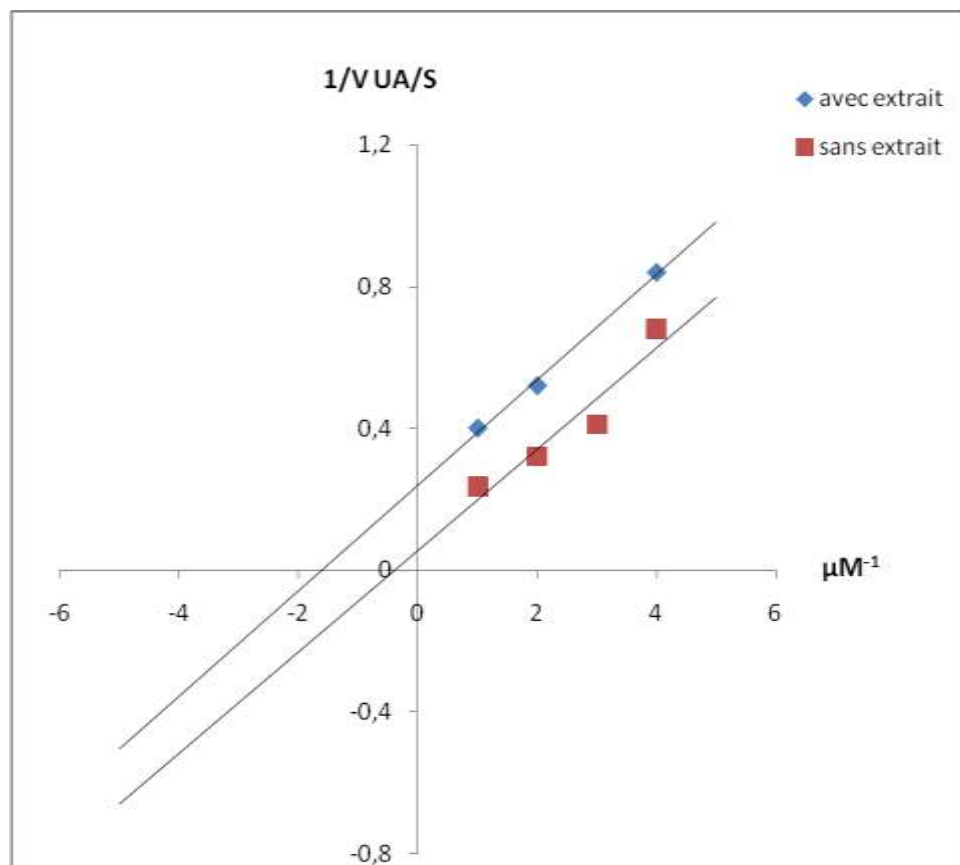


Figure 18 : Représentation de lineweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la rutine.

La rutine qui est un inhibiteur puissant de la xanthine oxydoréductase. Le mode d'inhibition exhibé par ce flavonoïde est de type incompetitive dit aussi anti-compétitif, ce qui indique que la rutine réagit avec l'enzyme après fixation du substrat (au complexe enzyme substrat) pour donner naissance à un complexe non productif. Ce résultat est différent avec les résultats obtenus par Lin et son équipe (2002), qui ont montrés que les flavonoïdes tels que la quercétine, rutine, myricetine et apigenine, présentent des modes d'inhibitions de type compétitif.

Des études menées par Aucamp et al. (1997) ainsi que ceux de Nagao et al. (1999) sur le mode d'inhibition de la quercétine sur la XOR, ont apporté un type d'inhibition mixte.

Ces résultats nous laissent suggérer que les flavonoïdes agissent d'une manière différente sur la XOR et la XDH.

Conclusion

L'utilisation d'un protocole d'extraction sélectif, basé sur différents solvants, à polarité variables, a permis d'obtenir cinq extraits de *Clématis flammula* et trois extraits *Galium mollugo* qui ont exhibé des pourcentages d'inhibition différent sur l'activité de la XDH. L'extrait aqueux chloroforme des sommités fleuries de *Galium mollugo* et d'acétate d'éthyle des feuilles de *Clématis flammula* se sont révélés les plus actifs avec des pourcentages d'inhibition de $88.72\% \pm 0,8$ et $94,22\% \pm 4,0$, respectivement.

L'effet inhibiteur de L'extrait aqueux de chloroforme des sommités fleurie de *Galium mollugo* est dépendant de sa concentration $IC_{50}=57,08$. Le tracé de Lineweaver et Burk a montré une inhibition de type compétitive, suggérant que les composés actifs présent dans l'extrait aqueux de chloroforme des sommités fleuries de *Galium mollugo* qui se lie avec des affinités différentes à l'enzyme libre et l'enzyme liée au substrat.

Les résultats obtenus par notre étude nous ont permis de suggérer que les extraits de *Clématis flammula* et *Galium mollugo* sont riches en composés phénoliques qui ont la capacité d'inhiber l'activité de la XDH. Ce qui justifie l'utilisation des deux plantes dans la médecine traditionnelle comme traitement de la goutte.

Des études complémentaires pourront être réalisées dans le but de :

- séparer, caractériser et identifier des composés actifs présents dans les extraits qui sont responsables de l'activité anti NADH oxydase,
- d'étudier la toxicité et la pharmacologie des deux plantes et la possibilité de les utiliser comme médicament pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XOR.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

-Amaya, Y; Yamazaki, K; Sato, M; Nishino,T. (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type of the O₂ –dependent type. Amino acid sequences of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage site of the enzym protein during irreversible conversion by trypsin. *J. Bio. Chem.* Vol.265: pp 14170-14175.

-Atmani, D., Baghiani, A., Harrison, R. and Benboubetra, M. (2005). NADH oxidation and superoxide production by milk xanthine oxidoreductase. *I. D. J.* **15**: pp 1113-1121.

-Atmani. D, M. Begoña Ruiz-Larrea, José Ignacio Ruiz-Sanz, Leandro J. Lizcano, Fadil Bakkali and Djebbar Atmani. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts Vol. 5(4), pp. 589-598.

-Aucomp, J. Gaspar, A. Hara, Y. and Apostolides, Z. (1997). Inhibition of xanthine oxydase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Research* **17**: pp 4381-4386.

B

-Berboucha, M; Ayouni, K; Atmani, D; Atmani D; and Benboubetra, (2010). M. Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the traitement of inflammatory diseases. *J. M. F.* **13**, No.4: pp.1-9.

-Bgork. L et Cleasson O., 1979. Xanthine oxidoreductase as a source of hydrogen peroxyd for the lactoperoxydase system in milk. *diary J .sci.* 62: 1211-1215.

-Bnnick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13 (2) : pp 184-196.

-Bruneton J. 1999. *Photochimie plante medicinal pharmacognosie* Edition Lavoisier. Paris. pp 310-343.

-Bruneton J. (2008). *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales.* Edition. *Tec et Doc*, pp 199-339.

C

- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *J. E. In.* **8**: pp 61-71.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-Cos p., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. et Berghe D.V.(1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of Xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J.Nat.Prod.*, **61**: pp 71-76.

D

-Danila, A. O., Gatea, F., et Radu, G. L. (2011). Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chem of N C.* **47(1)**: pp 22-25.

-Della Corte E. and Stirpe F. (1968). The regulation of rat liver xanthine oxidase: activation by proteolytic enzymes. *European Journal of Biochemistry Letters.* **2**: pp 83-84.

- Della Corte E., Gozzetti G., Novello F. and Stirpe F. (1969). Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochem. Biophys. A.* **191**: pp 164-166.

- Della Corte E. and Stirpe F. (1972). The regulation of rat liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.* **126**: pp 739-745.

E

-Enroth C., Eger B.T., Okamoto K., Nishini T. et Pai E.F.(2000). Crystal structure of bovine milk Xanthine dehydrogenase and Xanthine oxidase : structure-based mechanism of conversion .*PNAS.***97(20)**: pp 10723-10728.

G

- Gan R., Kuang L., Xu X., Zhang Y., Xia E., Song F. and Li H. (2010). Screening of natural antioxidants from traditional chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules* **15**: pp 5988-5997.

-Garait B. (2006). Le stress oxidant induit par voie métabolique (régime alimentaire) ou par voie gazeuse (hypoxie) et effet de la glisodin. *Laboratoire bioénergétique fondamentale et Appliqué.* EMI 0221. Vol. 192, pp 8-10.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-Ghedira K. 2005. Les flavonoids: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapie Laboratoire de pharmacognosie, Faculté de Pharmacie Phytothérapie Numéro **4** : pp 162-169.

-Granger D.N., Rutili G., McCord J.M. (1981). Role of superoxide in feline intestinal ischemia. *Gastroenterol.*, **81** : 22-29. In Harrison R.(2002). Structure and function of Xanthine oxidoreductase : where are we now?. *Free radical biology and medicine.*, **33(6)**: pp 774-797.

- Gruenwald J., Brendler T. and Jaenicke C. (2000). *PDR for herbal medicines* (2nd edition) Montrale, New Jersey p. 769.

-Guignard J.L. (2000). Les composés phénoliques. *Biochimie végétale*. 2^{ème} Edition *Dunod*, Paris, pp 160-164.

H

-Hanasaki. Y, Ogawa. S, Fukui. S, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free. Radic. Biol. Med*, 1994; **16**: pp 45- 850.

-Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96: 97-202.

- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase where are we now?. *Free radical biology and medicine*, Vol.33, No.6, pp 774-797.

-Hille, R. and Nishino, T. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB Journal* **9**: pp 995-1003.

-Hooper L, Kroon PA, Rimm EB. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials; pp 38-50.

- Huang Y.T., Ghio A.J., Nozik-Grayck E. and Piantadosi C.A. (2001). Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *American Journal of Physiology*. **280** : pp 474-481.

I

-Ichida K., Amaya Y., Kamatani N., Nishino T., Hosaya T. et Sakai O. (1997). Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J.Clin.Invest.*, **99** : pp 2391-2397.

J

- Jiang D., Shi S., Dong C. and Pengfei T. (2006). Triterpene saponins from *Clematis mandshurica*. *Journal of Natural Products*, **69**: pp 1591-1595.
- John, W., & Ogle, M. D. (1862). On a proposed, remedy (A Species of Galium) for epilepsy and other spasmodic affections, pp 510-513.

K

- Kawakami. M and Okabe. E. (1997). Superoxide anion raadaal-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum throught ryanodine receptor Ca^{2+} channel.J.pharmaco. **538**: pp 356-359.
- Kooij A. , Bosh K.S. , frederiks W . M . et Van Noorden C.T.F. (1992). Hight level of xanthin oxidoreductase in rat endothelial , epithelial and connective tissues cells. *Virchow Arch. B cell. Pathol. , 62*: pp 143-150.
- Kooij A., Schiller H.G., Scheijns M., Frederiks W.M et Van Noorden C.J.F.(1994). Conversion of Xanthine dehydrogenase into Xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia. *Hepathol.*, **19**: pp 1488-1495.
- Kurosaki M., Licalzi M., Scanziani E. et Terao M. (1995). Tissue and cells specific expression of mousse xanthine oxidoreductase gene in vivo: Regulation by bacterial lipopolysaccharide. *J.Biochem.*, **306**: pp 225-234.
- Kuwabara Y., Nishino T., Okamoto K., Matsumara T., Eger B.T., Pai E.F. and Nishino T. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: pp 8170-8175.

L

- Lin, C-M ; Chen, C-S ; Chen, C-T ; Liang, Y-C ; and Lin, J-K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**: pp 167-172.
- Ling L. (2001). Xanthine oxidase. B180 medical Laboratories free radical and Radiation Biology Program.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Lova J, Wan A, Abdul R, Jamarosliza J. (2015). Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS ¹³C NMR and MALDI-TOF MS. *Industrial Crops and Products* **(69)** pp 456–461.

M

- Marc E., Nelly A., Annick D.D. and Frederic D. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, 120**(3)**: pp 315-334.

- Mc Cord J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. **312**: pp 159-163.

-Macheix, J. J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.192 p.

- Mercereau, D; and Dictommaso, A. (2002). The biology of canadian weeds-121. *Galium mollugo*. *Department of crop and soil sciences Cornell University, USA* : pp.453-464.

-Millar T.M., Steven C.R., Benjamin N., Eisenthal R., Harisson R. et Blake D.R.(1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrit to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.*, **427**: 225-228. In benboubetra M., Baghiani A., Arrar L. et Almuhtasseb N. (2000). Xanthine oxidoreductase a source of nitrogen species : physiological and pathological roles. *Proc. First. Afr. Boil. Health.*, pp 136-165.

-Milic, P.S ; Stranojevic, P.L ; Rajkovic, K.M ; Milic,S.M ; Nikolic, L.B ; and Veljokovic, S.M. (2012). Antioxidant activity of galium mollugo L, extracts obtained by different recovery techniques. *High chemical and Technological School for Professional Studies* ,Serbia : pp.5-11.

- Milic, P ; Ljiljana, P ; Stanojevic ; Katarina, M ; Rajkovic ; Slavica, M ; Milić ; Vesna, D ; Nikolic ; Ljubisa, B ; Nikolic ; Vlada, B ; and Veljkovic. (2013). Antioxidant activity of Galium mollugo L. extracts obtained by different recovery techniques. *SCIENTIFIC PAPER, Hem. Ind*, **67 (1)**: pp 89–94.

-Moini, H.;Guo, Q. and Packer, L. (2000). Enzyme inhibition and protein binding action of the procianidin-richFrench maritime pine bark extract, pynogenol: effect on Xanthine oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **48**: pp 5630-5639.

-Moriwaki Y., Yamamoto T. et Higashino K.(1999). Enzymes involved in purine metabolism

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A reviews., of histochemical localization and fonctional implications. *Histol.Histopathol.*, **14**: pp 1321-1340.

N

- Nadjat Debbache, Dina Atmani, Djebbar Atmani. (2014). Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial Crops and Products* **53**: pp 85– 92

-Nielsen VG, Tan S, Weinbroum A, McCammon AT, Samuelson PN, Gelman S, et al. Lung injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **154**: pp 1364–1369.

-Nagao, A. Ski, M. and Kobayashi, H. (1999). Inhibition of Xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **63(10)**:1787-1790.

- Nishino T. and Tamura I. (1991). The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Advances in Experimental Biology and Medicine*. **309**: pp 327-333.

-Nishino T., Nishino T., Sato A., Page T. et Amaya Y.(1994). Xanthine dehydrogenase :Structure and properties in flavins and flavoproteins.*J.Biochem.*, **22** : pp 5270-5279.

- Nishino T. and Nishino T. (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **272**: pp 29859-29864.

P

-Pacher T., Nivorozhkin A., Szabo C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors : Renaissance Half a century after Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.***58**: pp 87-114.

-Page S., Powell D., Benboubetra M., Stevens C.R., Blacke D.R., Selase F., Wolstenholme A.J., Harrison R. (1998). Xanthine oxydoreductase in human mammary epithelial cells: activation in reponse to inflammatory cytokine. *Biochem. Bioph. Acta.*, **1381**: 191-202. In Benboubetra M, Baghiani A. Arrar L. et Almuhtasseb N. (2000). Xanthine oxydoreductase a

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

source of nitrogen species : physiological and pathological roles. Proc. First. Afr. Biol. Health., pp 136-165.

- Parks D.A. and Granger D.N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and pathology. *Acta. Physiol. Scand. [Suppl]*. **548**: pp 87-99.

- Parks D.A., Williams T.K. and Beckman J.S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.* **254**, G768-G744.

-PASQUIER C. (1992): Biochimie, Distribution et fonction de la Xanthine Oxydase.cah.Natr.Diét., XXVII, 6

-Peden. DB, Hohman. R, Borowre. Me, Masson. RT, Berkebile. S, Sales. Hm, Kaliner. MA., 1990. Uric acid is major antioxydant in human nasal air way sechon.proc.natl. Acad. Sci. Usa. 87: **76**: pp 7838-7642.

- Perrotti, C ; Caraffa, N ; and Aili, S. (1999). Se soigner par les plantes. Edition Berti : p.25.

-Philippe C, Pierre D, Galard D, Alexandra G, Patte D, Robert S. (1989). PETIT LAROUSSE DE LA MEDECINE. Imprimerie NEW INTERLITHO Dépôt légal Septembre 1976. Numéro de série Editeur 15838. Imprimerie en Italie. (*Printed in Italy*). pp 366-367.

-Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: pp 1035-1042.

R

-Radi R., Tan S., Prodanov E., Evan RA., Parks DA. (1992). Inhibition of Xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochemical and biophysical Acta*. Vol.1122, pp. 178-182.

- Rohfritsch, O. (1967). Analyse morphogénétique de la formation d'une galle (*Perrisia galu* sur *Galium mollugo*) par la méthode des ablations échelonnées du cécidozoaile. pp.20-25.

-Rythkonen. E.M.K, Halila. R, Lann. M, Kalliomimi. O.P, Palotie. A and Rauvio. K.O. (1994). The human gene for Xanthine dehydrogenase (XDH) is localized on chromosome nband 2p22. *Cytogenet. Cell. Genet.* **68**: pp 61-63.

S

- Said, O ; Khalil, K ; Fulder, S ; and Azaizels, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in israil, the golen height and the west bank region; Journal of ethnopharmacological, **83**: pp 251-263.

-Squadrito G.L., Cueto R., Splenser A., Evalavanidis A., Zhang H., Uppu R.M., Pryor W.A. (2000). Reaction of uric acide with peroxyxynitrite and implication for the mechanism of neuroprotection by uric acid. Arch. Biochem. Bioph., **376** : 333-337. In Harrison R. (2002). Structure and function of Xanthine oxidoreductase: where are we now?. Free radical biology and medicine., **33(6)**: pp 774-797.

- Sheu, S.Y. and Chiang, H.C. (1997). Inhibitory effects of plant growth regulators on xanthine oxidase. *Anticancer Research* **16**: 311-316.

-Silva, M.P ; Mira, L ; and Lima, J.V. (1999). Kenitic of the inhibition of xanthine dehydrogenase and the reversible and irreversible forms of Xanthine oxidase by Silibinin and bendazac. Environmental toxicology and pharmacology, Vol.1, pp.279-284.

T

-Tamas, M; Stana, D; and Timis,S. (2006). Comparative phytochemical research of *Galium verum L* and *Galium mollugo L*. *Not. Bot. Hort. Agrobot.*

-Truglio J., Theis K., Leimkuhler S., Rappa R., Rajagopalan KV., Kister, C. (2002). Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of Xanthine dehydrogenase from *Rhodobavter capsulatus*. Departement of pharmacological Sciences and biochemistry, New York. Vol. **10**: pp 115-125.

X

-Xu P., Zhu X L., Huecksteadt T. P., Brothman A.R. et Hoidal J.R.(1994). Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics.*, **34**: pp 173-180.

Y

-Yamamoto. T, moriwaki. Y, Shibutani. Y, Mastsui. K, Heo. T, Takahashi. S, Tsutsumi. Z and Hada. T. (2001). Human Xanthine dehydrogenase cDNA sequence and protein in an

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

typical case of type I xanthinuria in comparison with normal subjects. *Chemical. Acta.* **304**: pp 153-158.

-Yamazaki K., Amay Y., Sato M., Nada K. et Nishino T.(1990). Assignment of human Xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics.* **34**: pp 173-180.

W

-Waud W.R. and Rajagopalan K.V. (1976a). Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**: pp 354-364.

-Waud W.R. and Rajagopalan K.V. (1976b). The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.* **172** : pp 365-379.

-N.B:

-Granger et al., 1981, Harisson et al., 1983 et Heahse et al., 1985 sont tirés de : Cazzaniga et al., 1994.

-Rytkonen et al., 1995 et Sambrook et al., 1989 dans Saksela et al., 1996.

RESUME

Clématis flammula et *Galium mollugo*, deux plantes largement utilisée en médecine traditionnelle méditerranéenne dans le traitement de plusieurs états inflammatoires (*C. flammula*) et dans l'obésité (*G. mollugo*). Cinq extraits de feuilles de *Clématis flammula* et trois extraits des sommités fleuris de *Galium mollugo*, ont été isolées par une méthode d'extraction sélective et leur mode et capacité d'inhiber la XDH a été testé à différentes concentrations. Les résultats des extraits de feuilles de *C. flammula* ont présenté une meilleure inhibition pour l'extrait acétate d'éthyle avec 94.22±4.0% à une concentration de 100µg/ml, quant aux extraits aqueux ils ont exhibé une activité significativement faible ($p < 0.001$) en comparaison à la molécule de référence utilisé la rutine. Les résultats des extraits de sommités fleuries de *G. mollugo* ont montré une meilleure inhibition pour l'extrait aqueux du chloroforme avec 88.72 ± 0,8% qui est presque la même exhibée par la molécule de référence la rutine (89,93 ± 0,96%). L'inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase est dépendente de la concentration, les extraits aqueux chloroforme de *Gallium mollugo*, acétate d'éthyle et éthanolique des feuilles de *C. flammula* ainsi que la rutine exhibent une bonne activité inhibitrice de NADH oxydase exprimant des valeurs IC (50) de l'ordre de 57,08µg/ml, 50,56µg/ml, 65,33µg/ml et 40,20µg/ml, respectivement. Une inhibition de type mixte a été enregistrée par les extraits aqueux chloroforme et acétate d'éthyle des feuilles de *C. flammula*, alors que la rutine a présenté une inhibition de type incompétitive.

Mots clés : *Clématis flammula*, *Galium mollugo*, Xanthine déhydrogénase, NADH oxydase.

ABSTRACT

Clematis flammula and *Gallium mollugo* are two plants largely used in Mediterranean traditional medicine in the treatment of several inflammatory diseases (*C. flammula*) and obesity (*G. mollugo*). Five extracts of *C. flammula* leaves and three extracts of the flowering tops of *Gallium mollugo* were isolated using a selective method of extraction. Their mode and capacity to inhibit the NADH oxidase activity of the xanthine oxydoreductase (XDH) were tested using different extract concentrations. The results obtained with *Clematis flammula* leaves showed a better inhibition for the ethyl acetate extract with 94.22±4.0% at 100µg/ml, whereas the aqueous extracts showed a significantly weaker activity ($p < 0.001$) in comparison to the reference molecule rutin. On the other hand, results concerning the flowering top extracts of *Gallium mollugo* showed a better inhibition for the aqueous chloroform extract with 88.72 ± 0.8% which is comparable to that of the reference molecule, rutin (89.93 ± 0.96%). The inhibition of all extracts as well as rutin were dose-dependent with IC (50) values about 57.08 µg/ml, 50.56µg/ml, 65.33µg/ml and 40.20µg/ml for aqueous chloroform of *G. mollugo*, ethyl acetate and ethanol of *C. flammula* and rutin, respectively. Inhibition of a mixed type was recorded in the aqueous chloroform and ethyl acetate extracts of *Clematis flammula* leaves whereas rutin showed inhibition of an incompétitive type.

Keywords: *Clematis flammula*, *Galium mollugo*, Xanthine dehydrogenase, NADH oxidase