

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
Université Amar TELIDJI de Laghouat
كلية العلوم
Faculté des Sciences
قسم علوم المادة
Département des Sciences de la Matière



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master-LMD

Filière : Chimie
Option : Chimie inorganique

Présenté par : Zakaria LASSAKEUR

**Effet des extraits de quelques plantes locales sur l'inhibition de
la xanthine oxydase et la dissolution de l'acide urique :
une approche pour le traitement de la goutte**

Soutenu publiquement le 21/06/2023, devant le jury composé de :

M.	Mohamed YOUSFI	Professeur	Université de Laghouat	Président
M ^{me}	Chahrazed HAMIA	MCA	Université de Laghouat	Examinatrice
M ^{me}	Madjda BENGUECHOUA	MCA	Université de Laghouat	Examinatrice
M.	Amar DJERIDANE	Professeur	Université de Laghouat	Encadrant

Année universitaire 2022/2023

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs Assia et Hadjer pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, Hammou et Riad, pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi

Zakaria, TM

Remerciements

Je tiens d'abord Allah tout puissant qui nous a donné la force et patience pour accomplir ce modeste travail ;

Je remercie particulièrement mon promoteur ; le professeur **Amar DJERIDANE** pour l'honneur qu'il m'a fait en m'encadrant et pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté, pour ses remarques et conseils avisés qui m'a permis de mener à bien ce travail. J'adresse également, un grand merci à Monsieur **Hicham BOUAKAZ**, doctorant en troisième cycle au département des sciences de la matière à l'université de Laghouat pour son aide inestimable, sa contribution judicieuse, sa gentillesse et sa main tendue dans les bons et les moins bons moments.

Ce travail de mémoire s'est déroulé au laboratoire de recherches des sciences fondamentales à l'université **Amar Telidji –Laghouat** ; dont je remercie infiniment son directeur, le professeur **Mohamed YOUSFI** pour l'accueil et les conditions matérielles et scientifiques qui m'ont été offertes ;

Mes remerciements s'adressent à monsieur **Mohamed YOUSFI** d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance et à madame **Chahrazed HAMIA** et madame **Madjda BENGUECHOUA** pour avoir accepté d'examiner ce travail ;

Enfin, je remercie toute l'équipe administrative et pédagogique du département des sciences de la matière de l'université **Amar Telidji** et à tous ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragement durant la réalisation de ce travail

Liste des abréviations

Abs ₀	: Absorbance en absence d'inhibiteur
Abs _{Ech}	: Absorbance en présence d'inhibiteur
ACP	: Analyse en composantes principales
AEAXoC	: Allopurinol equivalent antixanthine oxidase capacity
ANOVA	: Analyse de la variance
C.C-Ac	: Extrait acétonique de <i>Cistus creticus</i>
C.C-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Cistus creticus</i>
C.C-ET	: Extrait aqueux de <i>Cistus creticus</i>
C.C-M	: Extrait méthanolique de <i>Cistus creticus</i>
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
EAG	: Équivalent en acide gallique
EAU	: Équivalent en acide urique
Eau-D	: Eau distillée
EC	: Équivalent en catéchine
EQ	: Équivalent en quercétine
ERO	: Espèce réactive de l'oxygène
GRh	: Globules rouges humain
H.E-Ac	: Extrait acétonique de <i>Hammada elegans</i>
H.E-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Hammada elegans</i>
H.E-ET	: Extrait aqueux de <i>Hammada elegans</i>
H.E-M	: Extrait méthanolique de <i>Hammada elegans</i>
P.C-Ac	: Extrait acétonique de <i>Plantago ciliata</i>
P.C-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Plantago ciliata</i>
P.C-ET	: Extrait aqueux de <i>Plantago ciliata</i>
P.C-M	: Extrait méthanolique de <i>Plantago ciliata</i>
P.S-Ac	: Extrait acétonique de <i>Pituranthos scoparius</i>
P.S-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Pituranthos scoparius</i>
P.S-ET	: Extrait aqueux de <i>Pituranthos scoparius</i>
P.S-M	: Extrait méthanolique de <i>Pituranthos scoparius</i>
PAXo	: Pourcentage d'inhibition de l'activité XO
PBS	: Solution saline tamponnée au phosphate
PH	: Pourcentage d'hémolyse
PTH	: Hormone parathyroïdienne
RS	: Résidu sec
XO	: Xanthine oxydase

Liste de tableaux

Tableau 1	: Les plantes investiguées et leur utilisation en médecine traditionnelle	04
Tableau 2	: Produits chimiques, appareillage et équipements utilisés dans ce travail	06
Tableau 3	: Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, tanins et acide urique dans les extraits étudiés	14
Tableau 4	: Travaux antérieurs sur la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins chez quelques espèces végétales	16
Tableau 5	: Teneurs en sodium, potassium et calcium dans les extraits étudiés	19
Tableau 6	: Travaux antérieurs sur la teneur en sodium, potassium et calcium chez quelques espèces végétales	20
Tableau 7	: Activité anti-goutte (mesurée par le test d'inhibition de la xanthine oxydase et la dissolution de l'acide urique) et l'activité cytotoxique des extraits étudiés	22
Tableau 8	: Matrice des coefficients de corrélation de Pearson (r) entre les valeurs provenant des 10 différentes méthodes de dosage et d'activité	26

Liste des figures

Figure 1	: Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase	01
Figure 2	: Résultats de la recherche Science Direct sur les termes « anti-gout et plant extracts » au cours des années	02
Figure 3	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	12
Figure 4	: Courbe d'étalonnage de la quercétine	13
Figure 5	: Courbe d'étalonnage de la catéchine	13
Figure 6	: Courbe d'étalonnage de l'acide urique	13
Figure 7	: Courbe d'étalonnage du sodium	17
Figure 8	: Courbe d'étalonnage du potassium	18
Figure 9	: Courbe d'étalonnage du calcium	18
Figure 10	: Courbe d'étalonnage de l'Allopurinol	21
Figure 11	: Projections des variables et des individus dans le plan factoriel F1-F2	28

Sommaire

Remerciements	I
Liste des abréviations	II
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
I. Introduction générale	01
II. Matériel et méthodes	04
II.1. Matériel	04
II.1.1. Matériel végétal	04
II.1.2. Matériel chimique	06
II.2. Méthodes	07
II.2.1 Préparation des extraits	07
II.2.2. Dosage des phénols totaux	07
II.2.3. Dosage des flavonoïdes	08
II.2.4. Dosage des tannins condensés	08
II.2.5. Dosage de l'acide urique	08
II.2.6. Dosage du sodium, du potassium et du calcium	09
II.2.7. Evaluation de l'activité anti-goutte <i>in vitro</i>	09
II.2.7.1. Evaluation de l'effet de dissolution de l'acide urique	09
II.2.7.2. Evaluation de l'activité anti-xanthine oxydase (XO)	10
II.2.8. Evaluation de la cytotoxicité des extraits par le test d'hémolyse des globules rouges humains	11
II.2.9. Analyse statistique	12
III. Résultats et Discussions	12
III.1. Dosage des phytoconstituants	12
III.2. Evaluation de l'activité anti-goutte et la toxicité des extraits <i>in vitro</i>	21
III.3. Corrélations entre tous les résultats obtenus	25
IV. Conclusion générale	31
V. Références Bibliographiques	33

Introduction générale

I. Introduction générale

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires, qui ont été considérés comme une source importante de composés bioactifs ayant des activités pharmacologiques spécifiques. De nombreux inhibiteurs d'enzymes ont été identifiés et isolés à partir d'extraits de légumes et d'herbes [1-3]. Divers composés bioactifs, notamment les polyphénols, les saponines, les terpénoïdes, les glycosides phénylétanoïdes et les alcaloïdes, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [4-6]. Parmi eux, les polyphénols qui ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leurs biodisponibilités importantes et de leurs diverses activités biologiques telles que les effets antioxydants, antitumoraux, anti-inflammatoires, antiviraux, antihypertenseurs, hypoglycémiques et inhibiteurs d'enzymes [7-9]. Ils ont été également, indiqués comme étant des inhibiteurs efficaces de la xanthine oxydase (XO) [10-13].

La xanthine oxydoréductase est l'une des principales sources de radicaux libres. C'est un complexe métallo-flavo-protéine qui catalyse les deux dernières réactions de formation d'acide urique dans le catabolisme des purines humain (**Figure 1**), accompagné par la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ces deux espèces oxygénées peuvent être des précurseurs des autres espèces réactives soit de l'oxygène ou de l'azote qui sont impliquées dans les grands dommages cellulaires et tissulaires [14 et 15]. Ainsi, l'accumulation de l'acide urique dans le sang engendre l'hyperuricémie, facteur principal de la maladie de la goutte [16-18].

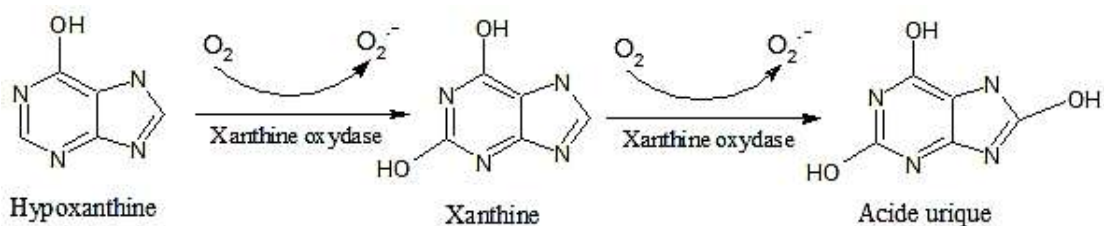


Figure 1 : Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase

La goutte est l'arthrite inflammatoire la plus courante chez l'adulte dans le monde, avec une proportion disproportionnée charge de morbidité chez les hommes, les personnes âgées et les minorités raciales/ethniques. Les comorbidités de la goutte sont très fréquentes et aggraver la morbidité de la maladie et rendre sa prise en charge difficile. D'ailleurs, la prévalence de la goutte variait de 1 à 4 % dans le monde et l'incidence variait de 0,1 à 0,3 %. De plus, l'incidence

et la prévalence de la goutte augmentent à chaque décennie de la vie, la prévalence passant à 11,13 % et incidence passant à 0,4 % chez les personnes de plus de 80 ans [19 et 20].

Une des approches thérapeutiques de cette maladie, est l'utilisation d'inhibiteur de la xanthine oxydoréductase. L'allopurinol, est un puissant inhibiteur chimique cliniquement très utilisé, cependant, son administration à long terme, s'accompagne d'un certain nombre d'effets secondaires [21]. L'implication de cette enzyme dans plusieurs cas pathologiques ainsi que la toxicité provoquée par son inhibiteur chimique, a incité les chercheurs à trouver des substituts qui ne retiennent que l'efficacité thérapeutique souhaitée. L'une de ces sources sont les plantes médicinales. Plusieurs études ont été entreprises dans le but d'évaluer l'activité hypouricémiant des extraits de plante dans un but préventif ou curatif de la maladie de la goutte et les pathologies qui lui sont associées [22-26]. C'est pour ces raisons que les recherches sur l'activité hypouricémiant des plantes médicinales se sont développées de façon exponentielle. Une recherche dans la base de données « ScienceDirect » en utilisant les termes « anti-gout et plant extracts » a révélé une pléthore littérature sur ce sujet de recherche. Alors qu'avant 1960, il n'y avait même pas une seule référence sur les termes « anti-gout et plant extracts ». Toutefois, environ 399 citations ont été obtenues pour la période 1961 à 2000. Cependant, le nombre de citations a été significativement augmenté à 2571, entre 2001 et 2022 (Figure 2). Ces résultats montrent clairement que ces dernières années, la recherche sur les composés naturels antigoutteux a reconnu une énorme popularité, indiquant qu'un grand nombre de plantes dans le monde ont été analysées pour leur activité hypouricémiant. Il est devenu donc nécessaire de se concentrer davantage sur les plantes médicinales algériennes.

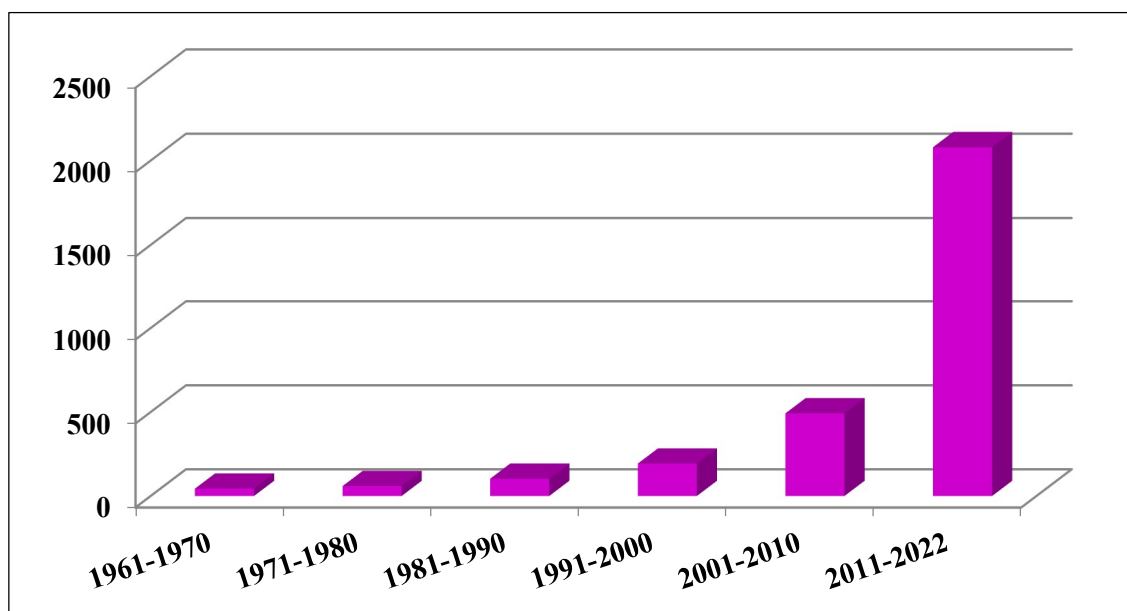


Figure 2 : Résultats de la recherche ScienceDirect sur les termes « anti-gout et plant extracts » au cours des années

L'Algérie est l'un des pays arabes les plus riches par sa diversité végétale ; sa flore comprend 4449 taxons dont 6,5% sont endémiques, avec un indice de rareté élevé. Plus des trois quarts (77,9%) des taxons strictement endémiques d'Algérie sont des plantes rares, représentant moins d'un quart du nombre total de plantes [27 et 28]. Cependant, peu d'études ont été réalisées dans ce pays sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique des espèces végétales locales. Dans ce contexte, dans ce screening scientifique, nous avons sélectionné quatre plantes locales à savoir : *Cistus certicus* L., *Hammada elegans*, *Plantago ciliata* Desf. et *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur). Le facteur le plus important dans le choix de ces plantes est qu'il n'y a pas des études préalables sur leurs effets antigoutteux. Ainsi, le programme de recherche dans ce mémoire est structuré en deux parties principales :

1. La première partie de ce travail a été consacrée à la préparation des extraits de plantes, puis à la quantification de leurs contenus en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, en tanins, en certains métaux et en acide urique,
2. La deuxième partie a été portée sur l'évaluation du pouvoir antigoutteux *in vitro* des extraits ainsi préparés, par la mesure de leurs pouvoirs de dissolution de l'acide urique, ainsi que leurs activités inhibitrices de la xanthine oxydase, puis à l'évaluation de la toxicité de ces extraits par la mesure *in vitro* de leurs effets hémolytiques des globules rouges humains.

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

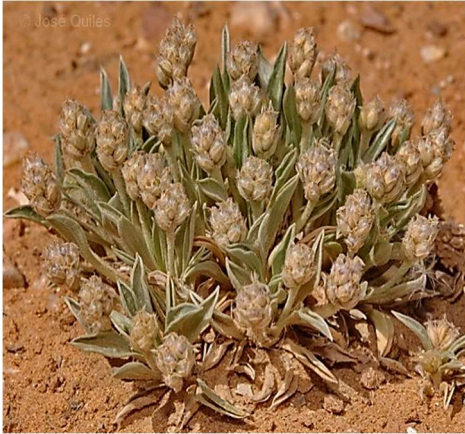
Notre travail de recherche a été réalisé au sein de laboratoire des sciences fondamentales et laboratoire pédagogique du département des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Les quatre plantes étudiées *Hammada elegans* et *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur), *Cistus creticus* L. et *Plantago ciliata* Desf (Tableau 1), ont été récoltées de trois régions (Bordj Senoussi, Aïn Chouhada et Dar Chioukh environ 5 km, 78 km et 134,5 km successivement du centre-ville de la willaya de Laghouat), au mois de novembre 2022. Les plantes investiguées sont séchées à l'abri du soleil pendant 2 mois. Après le séchage, le matériel végétal est finement broyé et conservé dans des sacs en papier jusqu'à leur extraction

Tableau 1 : Les plantes investiguées et leur utilisation en médecine traditionnelle

Plante	Photo
<p>Famille : <i>Plantaginaceae</i></p> <p>Nom latin : <i>Plantago ciliata</i> Desf</p> <p>Nom vernaculaire : Lelma</p> <p>Localisation de récolte : Aïn Chouhada-Djelfa</p> <p>Partie utilisée : Partie aérienne</p> <p>Description : Petite plante du sable désertique herbacée annuelle, grisâtre, peut passer inaperçue. Elle n'atteint pas plus de 10 à 15 cm de hauteur. Les feuilles lancéolées, velues et nombreuses, poussent en rosette à la base de la plante. Cependant, la variété angustifoliée se caractérise par ces feuilles étroites. Les fleurs petites et verdâtres, en épis globuleux ou courtement cylindriques très laineux portée par des hampes plus courtes que les feuilles. Cette plante a des appellations vernaculaires telles que : Lelma et Cadeau du nègre.</p> <p>Utilisation traditionnelle : <i>Plantago ciliata</i> est utilisée en médecine traditionnelle sous forme de pommade et cataplasme (pansmon) comme cicatrisante des blessures, ainsi que pour le traitement des inflammations. Elle est aussi prescrite pour traiter le diabète grâce à son pouvoir anti-hyperglycémiant [29].</p>	

Famille : *Cistaceae*

Nom latin : *Cistus creticus* L.

Nom vernaculaire : Gassa

Localisation de récolte : Dar Chioukh -Djelfa

Partie utilisée : Partie aérienne

Description : Arbrisseau aux fleurs roses chiffonnée, haut de 0,5 à 1,5 m. Les feuilles opposées ont des pétioles plus ou moins soudés entre eux. Le limbe réticulé-rugueux est hérissé de poils étoilés. Les fleurs sont rassemblées dans des cymes ombelliformes de 1 à 8 fleurs. Le fruit est une capsule velue, à 5 loges.

Utilisation traditionnelle : La décoction des feuilles de *Cistus creticus* L. agit contre les coliques. Elle est utilisée à grande échelle par les populations locales comme anti-acide, antidiarrhéique et antispasmodique. De plus, les infusions de ses feuilles et fleurs sont employées comme remède pour soulager les maux gastriques, l'inflammation et nettoyer les blessures [30].



Nom latin : *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur)

Famille : *Apiacée*

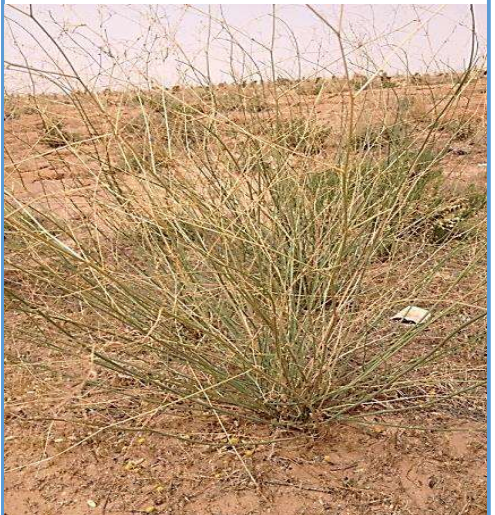
Nom vernaculaire : Guezah

Localisation de récolte : Bordj Senoussi-Laghouat

Partie utilisée : Racines

Description : C'est une plante herbacée, aphyllé, à tiges souvent très ramifiées. Ombelle à involucre, ovoïde à 6 bandelettes. C'est une plante herbacée, formant des touffes : tiges florifères érigées bien plus longues, à ombelles latérales, à pédoncule court (1-3 cm). Les fleurs sont de couleurs blanches.

Utilisation traditionnelle : Cette espèce semble être très peu utilisée dans le domaine médicinal traditionnel ; elle est utilisée pour le traitement des diarrhées et de l'eczéma. Elle est également utilisée comme purgatif digestible et contre les maladies des voies urinaires [31].



Famille : *Chenopodiaceae*

Nom latin : *Hammada elegans*

Nom vernaculaire : Ajram

Localisation de récolte : Bordj Senoussi-Laghouat

Partie utilisée : Partie aérienne

Description : Plante aux rameaux grêles et charnus, articulés, dressés, très nombreux. Les rameaux foncent et noircissent en séchant. Les rameaux âgés sont gris-brun et les rameaux nouveaux sont d'un vert légèrement blanchâtre. Feuilles opposées très petites en triangle des principales caractéristiques de *Hammada elegans* est sa très grande résistance à la sécheresse.

Utilisation traditionnelle : Elle est utilisée par les habitants de la région pour soigner les maladies abdominales [32].



II.1.2. Matériel chimique

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2: Produits chimiques, appareillage et équipements utilisés dans ce travail

Produit chimique	Firme et pays
Sulfate de sodium (Na ₂ SO ₄), Phénol (C ₆ H ₆ O), Acide gallique (C ₇ H ₆ O ₅), Méthanol absolu (CH ₄ O), Ethanol absolu (C ₂ H ₅ OH), Diméthylsulfoxyde (C ₂ H ₆ OS).	Riedel-de Haën (Allemagne)
Hydroxyde de sodium (NaOH), Chlorure de Potassium (KCl), iodure de potassium (KI), phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄), phosphate de potassium dibasique trihydraté (K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O), Quercétine hydraté (C ₁₅ H ₁₂ O ₈), Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃), Vanilline (4-(HO) C ₆ H ₃ -3-(OCH ₃) CHO), Xanthine (C ₅ H ₄ N ₄ O ₂), Folin-Ciocalteu (H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ -H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀), Acide Chlorhydrique (HCl), Acétone(C ₃ H ₆ O), Acide urique (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃), Hexane (C ₆ H ₁₄), Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃), Chlorure de calcium (CaCl ₂).	Sigma-Aldrich (France)
Réactif de l'acide urique	ELITech Groupe (France)
Appareillage et d'autres équipements	
Balance analytique (KERN, ABS 220-4), Spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800), Spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1601), pH-mètre (WTW:inoLab® pH 7310), Micropipette 20-200µL (ISOLAB), Micropipette 100-1000µL (SOCOREX), Micropipette 10-100µL (Accumax), Cuvette en quartz, Cuvette UV/visible à usage unique en plastique, Etuve (Mettler), Bain marie (Mettler), Bêchers, Fioles jaugées classe A et B (5, 10, 25, 100, 250, 500, 1000 mL), Tube à essai en verre, Pissettes, Ballon à fond rond, Tube à essai en plastique, Eprouvette graduée de classe A (5ml), Porte tube, Spatule, Verre de montre, Centrifugeuse (Nahita Modèle 2650), Flacons en verre, Entonneurs, Ultrasons (5L, Joident), Agitateur, Chauffe ballon (Nahita 1000mL), Rotavapeur (Laborota 4000), Papiers filtres.	

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits

Après avoir broyé finement chaque partie de la plante, une masse d'environ 50g a été extraite tout d'abord par Soxhlet en utilisant 3 systèmes de solvants de polarité croissante : Hexane (0,0) ; Acétone (5,4) ; Méthanol (6,6), jusqu'à l'épuisement de la matière solide. Ensuite, une extraction aqueuse assistée par ultrason a été conduite sur le marc épuisé et sur la matière végétale brute, en mettant 3 g de la matière végétale avec 50 mL d'eau distillée dans un bain à ultrasons (sonicateur), pendant 60 minutes et à température de 50°C. Après chaque extraction, le solvant utilisé est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un Rotavapeur. Ensuite, le résidu récupéré est pesé puis solubilisé dans des volumes différents du DMSO. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière pour être utilisés pour les différentes analyses. Nous avons obtenu alors, 16 extraits : 4 extraits acétoniques, 4 extraits méthanoliques et 8 extraits aqueux. Par conséquent, dans un souci de simplicité nous avons proposé des codifications pour les extraits des plantes ainsi préparés :

C.C-Ac	: Extrait acétonique de <i>Cistus creticus</i>	H.E-Ac	: Extrait acétonique de <i>Hammada elegans</i>
C.C-M	: Extrait méthanolique de <i>Cistus creticus</i>	H.E-M	: Extrait méthanolique de <i>Hammada elegans</i>
C.C-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Cistus creticus</i>	H.E-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Hammada elegans</i>
C.C-ET	: Extrait aqueux de <i>Cistus creticus</i>	H.E-ET	: Extrait aqueux de <i>Hammada elegans</i>
P.S-Ac	: Extrait acétonique de <i>Pituranthos scoparius</i>	P.C-Ac	: Extrait acétonique de <i>Plantago ciliata</i>
P.S-M	: Extrait méthanolique de <i>Pituranthos scoparius</i>	P.C-M	: Extrait méthanolique de <i>Plantago ciliata</i>
P.S-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Pituranthos scoparius</i>	P.C-ES	: Extrait aqueux-Soxhlet de <i>Plantago ciliata</i>
P.S-ET	: Extrait aqueux de <i>Pituranthos scoparius</i>	P.C-ET	: Extrait aqueux de <i>Plantago ciliata</i>

II.2.2. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique décrite par Singleton et Rossi en y apportant quelques modifications en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [33]. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. 100 µL de chaque extrait ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 µL du réactif de Folin-Ciocalteu (10 %). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na₂CO₃ à 2% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme du résidu sec (mg EAG /g RS).

II.2.3. Dosage des flavonoïdes

Une version légèrement modifiée de la méthode de Lamaison et Carnat [34] a été employée pour déterminer les teneurs en flavonoïdes des échantillons en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif. Cette méthode est basée sur la complexation entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium, ce qui entraîne une coloration jaune détectable dans le visible. Les teneurs en flavonoïdes des extraits ainsi préparées ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine choisie comme étalon et exprimée en milligrammes équivalent en quercétine par gramme du résidu sec (mg EQ /g RS). Pour ce faire, dans des tubes à essais, nous avons mélangé 1 mL de chaque échantillon dilué avec 1 mL de 2% d'AlCl₃. Le mélange a été bien homogénéisé, puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min, l'absorbance du mélange de la réaction a été mesurée à 420 nm contre un blanc en employant le même spectrophotomètre pour le dosage précédent.

II.2.4. Dosage des tannins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par Julkunen-Titto [35]. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des tanins condensés et la formation de complexes rouges, cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline. Un volume de 200 µL de chaque extrait a été ajouté à 1000 µL de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 µL de l'acide chlorhydrique concentré (37%) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 494 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. La teneur en tanins de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de la catéchine et exprimée en milligrammes équivalent en catéchine par gramme du résidu sec (mg EC /g RS).

II.2.5. Dosage de l'acide urique

Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. Dans la première réaction enzymatique l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne avec formation du peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase, un mélange de sulfonates de dichlorophénol et de 4-aminoantipyrine est oxydé par le peroxyde d'hydrogène ainsi formé pour former une teinture du quinonéimine proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon qui peut être dosé spectrophotométriquement à 550 nm [36]. Pour ce faire, 100 µL de chaque extrait dilué ont été mélangés avec 1 mL du réactif de l'acide urique. Le mélange a

été agité puis maintenu à l'obscurité pendant 20 minutes à 37 C°. La densité optique de chaque solution est enregistrée à 550 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). La teneur en acide urique de chaque extrait a été calculée à partir une courbe d'étalonnage de l'acide urique et exprimée en milligrammes équivalent en acide urique par gramme du résidu sec (mg EC /g RS).

II.2.6. Dosage du sodium, du potassium et du calcium dans les extraits

Le dosage du sodium, du potassium et du calcium a été effectué par la photométrie de flamme [37]. Cette technique est basée sur excitation par énergie calorifique des électrons des atomes qui vont passer d'une orbite à une autre avec une variation d'énergie qui s'accompagne de radiations lumineuses. La production d'une raie est fonction de la source d'excitation, et l'élément excité produit un nombre de raies qui lui est propre, l'intensité d'une raie étant fonction du nombre d'atomes excités, c'est à dire de la concentration en l'élément de la solution à doser. Dans la photométrie de flamme, on compare l'intensité d'émission d'une solution contenant l'élément à déterminer à celle d'une solution étalon. L'énergie lumineuse, transformée en énergie électrique par une cellule photoélectrique, est mesurée par un galvanomètre fonctionnant en ampèremètre. L'appareil utilisé est un photomètre de flamme m410, Sherwood®, dont air-butane a été utilisé comme source de flamme. Pour ce faire, les intensités d'émission de Na, K et Ca des différents extraits dilués dans l'eau distillée puis centrifugés (3000 tr/min pendant 10 minutes) ont été mesurées aux longueurs d'ondes convenables. La teneur en Na, K et Ca de chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage de de sodium de potassium et de calcium en utilisant le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de potassium (KCl) et le chlorure de calcium (CaCl₂) comme solutions étalons, respectivement. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent en sodium, en potassium et en calcium par gramme du résidu sec (mg Na /g RS), (mg K /g RS) et (mg Ca /g RS), respectivement.

II.2.7. Evaluation de l'activité *anti-goutte in vitro*

II.2.7.1. Evaluation de l'effet de dissolution de l'acide urique

L'évaluation de l'activité anti-goutte des extraits ainsi préparés par la méthode de dissolution de l'acide urique a été entreprise par la mesure de la masse dissoute de l'acide urique par les différentes solutions d'extraits. L'étude de ce modèle a été proposée et effectué pour la première fois.

La première étape consiste à mettre en contact -dans des tubes à essai, 10 mg d'acide urique avec 10 mL de chaque extrait (ou référence : eau distillée), les solutions sont centrifugées à

2000 tr/min pendant 10 minutes en utilisant une centrifugeuse, L'acide urique dissout dans chaque extrait a été ensuite dosé en faisant mélanger 100 μ L de chaque surnageant avec 1 mL du réactif de l'acide urique. Le mélange a été agité puis maintenu à l'obscurité pendant 20 minutes à 37 C°. La densité optique de chaque solution est enregistrée à 550 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). La teneur en acide urique dissoute dans chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide urique et exprimée en milligrammes d'acide urique soluble dans 1 litre d'extrait de concentration égale à 1mg/mL.

II.2.7.2. Evaluation de l'activité anti-xanthine oxydase (XO)

L'activité totale de la XO a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 550 nm, en présence de xanthine comme substrat de l'enzyme. L'effet inhibiteur des extraits sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de l'acide urique produit par oxydation de la xanthine [38].

Les mesures d'inhibition par les extraits ont été réalisées comme suit : 1000 μ L d'un tampon phosphaté de sodium saturé on air (0,2M, pH 7,8) ont été mélangés avec 100 μ L d'extrait et 100 μ L de solution XO (0,1 unité / mL dans un tampon phosphate, pH 7,5). Ce mélange a été pré-incubé à 37 ° C pendant 10 minutes. Ensuite, 100 μ L de la solution de xanthine (0,2 g / L, pH ajusté avec du HCl à 37%) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique a été ensuite stoppée par l'ajout de 100 μ L d'HCl (1 M), puis 100 μ L de NaOH (1 M) a été ajoutés pour ajuster le pH à 7,8. L'acide urique produit dans chaque essai a été ensuite dosé en faisant mélanger avec 1 mL du réactif de l'acide urique. Le mélange a été agité puis maintenu à l'obscurité pendant 20 minutes à 37 C°. Les mesures de densité optique ont été effectuées immédiatement à 550 nm dans un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu 1800). L'activité antixanthine oxydase des extraits a été exprimée tout d'abord par le pourcentage d'inhibition de l'activité XO (PAXo) selon l'équation :

$$PAXo (\%) = \frac{(A_0 - A_{Ech})}{A_0} \times 100$$

Où ; Abs₀ : Absorbance en absence d'inhibiteur. Abs_{Ech} : Absorbance en présence d'inhibiteur.

L'activité antixanthine oxydase (AEAXoC) a été calculé ensuite à partir de la courbe d'étalonnage de l'allopurinol et exprimée en microgrammes équivalent en allopurinol par 1 milligramme du résidu sec (μ g Allopurinol/ 1mg RS).

II.2.8. Evaluation de la cytotoxicité des extraits par le test d'hémolyse des globules rouges humains

L'étude de la cytotoxicité des extraits ont été évalué par la mesure de leurs activités hémolytique *in vitro* vis-à-vis des globules rouges humaines. Le test d'effet hémolytique des extraits a été réalisé selon la méthode de Li et Liu [39], avec quelques modifications. Tout d'abord, nous avons préparé la suspension érythrocytaire comme suit : du sang fraîchement prélevé d'un donneur sain unique dans un tube héparine est centrifugé à 2000 tours/minutes pendant 10 minutes. Après élimination du plasma, le culot est lavé 5 fois avec une solution de PBS, le culot ainsi obtenu est resolubilisé est diluée à nouveau 20 fois par PBS. Dans un tube à hémolyse, 2 mL de la suspension érythrocytaire préparée avec 500 µL de l'extrait à concentration égale 2 g/L ont été ensuite incubés à 37°C durant 60 min dans l'incubateur agitateur. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 2000tr/min pendant 10 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible contre le blanc contenant du PBS. Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 1 mL de la suspension érythrocytaire 1 mL d'eau distillée avec absence d'extrait. Le taux d'hémolyse (PH) des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 min d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{PH}\% = \frac{A_{\text{Extrait à 60 min}}}{A_{\text{hémolyse total à 60 min}}} \times 100$$

II.2.9. Analyse statistique :

Tous les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois à cinq essais en utilisant le logiciel Excel 2018. Une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2018.5.03, avec une tolérance de 0,0001 et un intervalle de confiance de 95%, afin de déterminer le coefficient de corrélation (coefficient de Pearson) et de faire l'analyse en composantes principales (ACP). L'analyse de la variance à un facteur contrôlé (ANOVA) et le test de la différence significative de Tukey ont été utilisés pour comparer les moyennes des groupes.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Dosage des phytoconstituants

L'extraction des composés actifs à partir du matériel végétal constitue la première étape pour étudier les propriétés biologiques des plantes. Cette étape est primordiale et doit permettre l'extraction des différents constituant actifs et assurer un meilleur rendement. Plusieurs méthodes d'extraction ont été rapportées dans la littérature. Actuellement, l'utilisation des méthodes innovantes permettent d'augmenter le rendement d'extraction. Parmi les méthodes récentes, l'extraction au Soxhlet et l'extraction à l'aide des ondes ultrasons ont été largement utilisées pour récupérer divers composés à partir de différentes matrices [40]. Les végétaux présentent une grande diversité des composés phénoliques à activités anti-goutte. En effet, chez les plantes les teneurs en composés phénoliques et leur nature sont fortement modifiées sous l'action, d'une part, des facteurs externes ou exogènes qu'ils soient de natures biotiques ou abiotiques et d'autre part, des facteurs internes ou endogènes tels que les facteurs génétiques conduisant à des différences importantes entre les espèces du même genre [41].

Les quantifications des phytoconstituants obtenus après épuisement par Soxhlet à l'hexane, à l'acétone et au méthanol, puis extraction à l'eau assistée par ultrason sur le marc épuisé et sur la matière végétale brute, ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage (Figures 3, 4, 5 et 6) et exprimée en milligrammes équivalent en chaque standard par gramme du résidu sec obtenu.

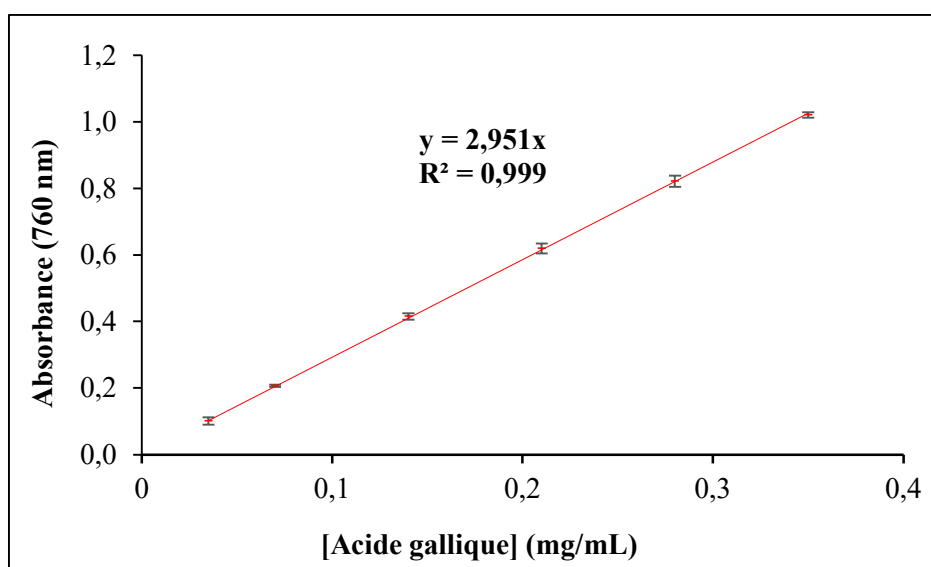


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

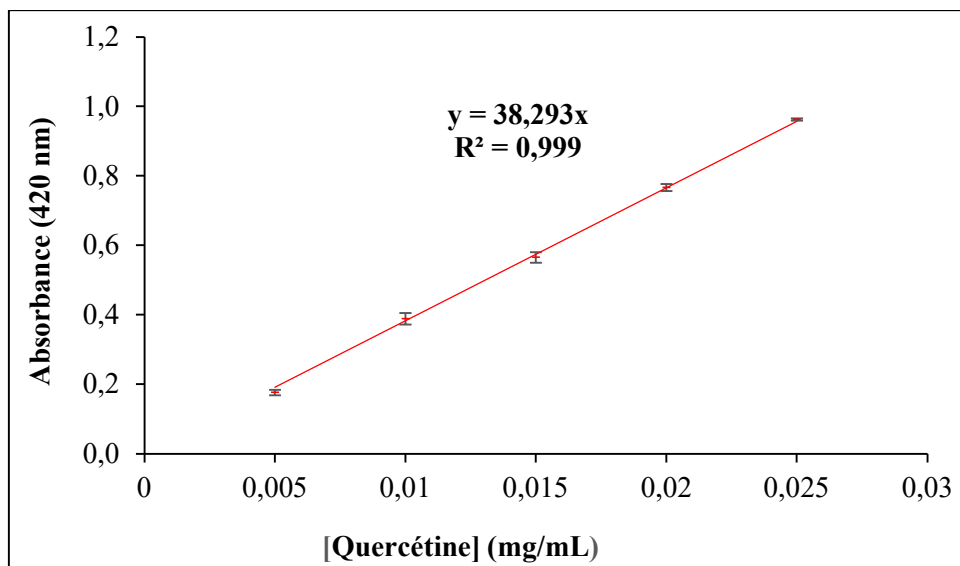


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

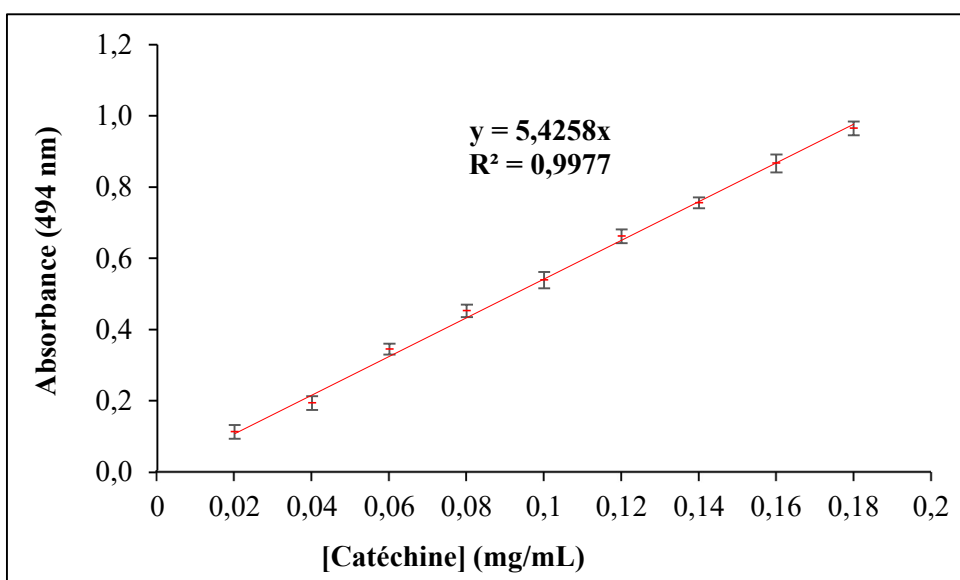


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la catéchine

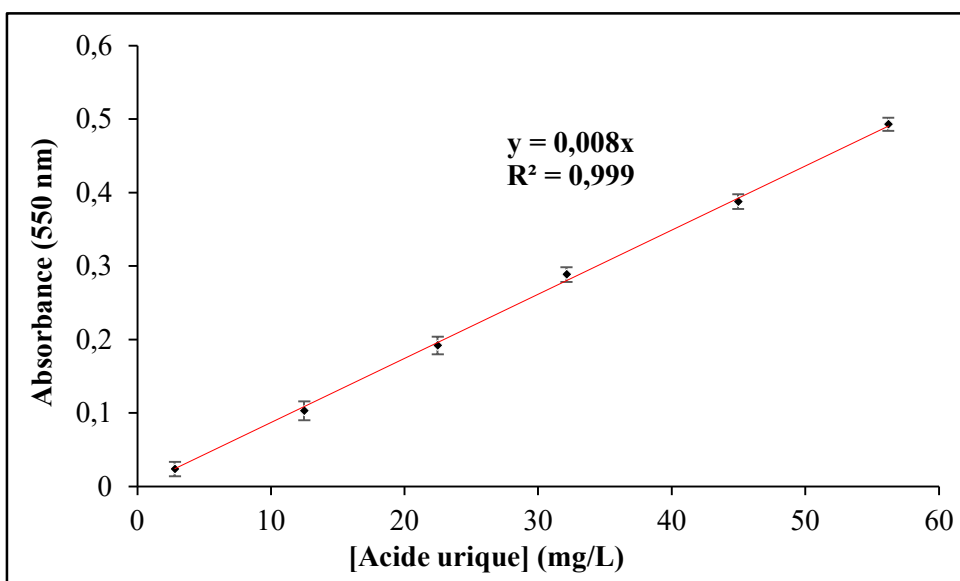


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide urique

Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en tanins et en acide urique de chaque extrait sont regroupées dans le **Tableau 3**. Les effets séparés de la nature du solvant utilisé et du type de l'espèce étudiée, sur les teneurs en ces phytoconstituants ont été analysés grâce à l'ANOVA.

Tableau 3 : Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, tanins et acide urique dans les extraits étudiés.

Extraits	Phénols totaux (mg EAG / g RS)	Flavonoïdes (mg EQ / g RS)	Tanins (mg EC / g RS)	Acide urique (mg EAU / g RS)
<i>C.C</i> -Ac	258,054 ±21,522 ^g	61,129 ±0,289 ^j	20,716 ±0,117 ^g	73,653 ±0,007 ^d
<i>C.C</i> -ES	217,491 ±2,131 ^f	18,556 ±0,209 ^g	53,251 ±0,532 ^h	4,942 ±0,001 ^{ab}
<i>C.C</i> -ET	189,648 ±0,992 ^e	18,297 ±0,910 ^g	78,334 ±0,432 ^j	154,845 ±0,002 ^f
<i>C.C</i> -M	346,212 ±2,813 ^h	37,197 ±0,292 ^h	55,284 ±0,850 ⁱ	4,304 ±0,006 ^{ab}
<i>H.E</i> -Ac	88,724 ±3,044 ^c	47,703 ±0,255 ⁱ	2,070 ±0,155 ^{cd}	26,828 ±0,006 ^c
<i>H.E</i> -ES	40,653 ±0,187 ^b	1,790 ±0,054 ^b	1,302 ±0,050 ^{abc}	4,137 ±0,016 ^{ab}
<i>H.E</i> -ET	29,587 ±0,374 ^{ab}	0,000 ±0,000 ^a	1,045 ±0,024 ^{ab}	0,170 ±0,006 ^a
<i>H.E</i> -M	16,311 ±0,356 ^a	2,369 ±0,015 ^{bc}	1,767 ±0,017 ^{bcd}	4,208 ±0,003 ^{ab}
<i>P.C</i> -Ac	369,289 ±3,186 ⁱ	18,242 ±0,272 ^g	5,316 ±0,248 ^e	72,981 ±0,006 ^d
<i>P.C</i> -ES	40,368 ±1,389 ^b	7,330 ±0,143 ^d	1,163 ±0,031 ^{ab}	70,550 ±0,002 ^d
<i>P.C</i> -ET	36,584 ±0,642 ^b	0,000 ±0,000 ^a	0,982 ±0,026 ^{ab}	141,599 ±0,002 ^e
<i>P.C</i> -M	122,839 ±4,483 ^d	7,094 ±0,090 ^d	6,415 ±0,017 ^f	16,251 ±0,006 ^{bc}
<i>P.S</i> -Ac	77,602 ±0,675 ^c	9,126 ±0,690 ^e	2,379 ±0,094 ^d	26,210 ±0,006 ^c
<i>P.S</i> -ES	81,699 ±4,803 ^c	12,747 ±0,177 ^f	1,854 ±0,237 ^{bcd}	8,819 ±0,002 ^{ab}
<i>P.S</i> -ET	25,157 ±1,095 ^{ab}	2,813 ±0,005 ^c	0,630 ±0,052 ^a	2,509 ±0,004 ^a
<i>P.S</i> -M	40,087 ±0,145 ^b	0,733 ±0,026 ^a	0,737 ±0,003 ^a	3,612 ±0,006 ^{ab}

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ±écart-type, n=5. Les valeurs moyennes suivies d'une lettre minuscule différente sont significativement différentes ($p < 0,00001$).

D'une manière générale, l'estimation de la teneur en polyphénols totaux en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu indique que les parties aériennes de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* sont riches en ces molécules. Cependant une variabilité intra-spécifique et inter-spécifique liée à l'organe et au solvant d'extraction a été notée pour tous les extraits. Par contre, les teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux sont intra-spécifiquement les plus faibles. L'analyse statistique a révélé que la différence dans les teneurs en polyphénols totaux dans la totalité des différents extraits est significative au seuil 0,00001%. En revanche, les résultats indiquent une

variabilité très importante intra-spécifique en fonction du solvant d'extraction pour chaque espèce. Ainsi, la partie aérienne de *Cistus creticus* exhibe significativement les valeurs les plus importantes en polyphénols totaux supérieures à $217,491 \pm 2,131$ EAG/g RS. Cependant, les extraits des racines de *Pituranthos scoparius* sont placés en dernière position en matière de concentration en polyphénols totaux, où nous avons enregistré des valeurs inférieures à $81,699 \pm 4,803$ mg EAG/g RS. Malgré cette différence en termes de teneurs en composés phénoliques entre les différents extraits de quatre plantes étudiées, ces résultats restent importants en comparaison avec ceux obtenus sur d'autres espèces connues pour leurs activités biologiques importantes (**Tableau 4**) [42-45].

D'autre part, la teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine comme il est indiqué dans le **Tableau 3**. Comme pour les polyphénols, les extraits aqueux exhibent les teneurs les plus faibles en flavonoïdes. Par contre les extraits acétoniques renferment significativement et inter-spécifiquement les valeurs les plus importantes en flavonoïdes. Ainsi, la partie aérienne de *Cistus creticus* exhibe significativement les valeurs les plus importantes en termes de flavonoïdes avec des valeurs supérieures à $18,297 \pm 0,910$ mg EQ/g RS. L'analyse statistique n'a révélé aucune variabilité significative entre les deux extraits aqueux pour cette plante. Par ailleurs, l'analyse de la variance a révélé que la variabilité intra-spécifique liée au type du solvant d'extraction et inter-spécifique liée à l'espèce est significative au seuil 0,001%. De même, d'un point de vue comparatif, certains extraits étudiés représentent une source prometteuse de flavonoïdes, comme certainement d'autres plantes présentent relativement qu'une faible teneur de ces composés (**Tableau 4**). Ces teneurs sont également similaires à celle trouvées dans d'autres études. Par contre, ces valeurs sont moins importantes par rapport à celles trouvées dans d'autres plantes [42-45].

La quantité en tanins condensés de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de catéchine (**Tableau 3**). Les résultats des teneurs en tanins condensés ne suivent pas les mêmes tendances enregistrées pour les polyphénols totaux et les flavonoïdes. Nous constatons que les teneurs les plus élevées en tanins condensés sont enregistrées pour les extraits aqueux de la partie aérienne de *Cistus creticus* avec des concentrations de $53,251 \pm 0,532$ mg EC/g RS et $78,334 \pm 0,432$ mg EC/g RS. L'extrait méthanolique de cette plante renferme aussi une quantité importante en tanins qui est de l'ordre de $55,284 \pm 0,850$ mg EC/g RS, cette teneur est statistiquement différente de celle enregistrée pour les autres fractions de la même plante. Cependant, les extraits des autres plantes sont significativement pauvres en matière de concentration en tanins condensés, où nous avons enregistré des valeurs inférieures à $6,415 \pm 0,017$ mg EC/g RS. Bien que ces valeurs soient faibles mais restent nettement comparable avec

ceux rapportés dans d'autres plantes (**Tableau 4**). Par contre, tous les extraits de *Cistus creticus* représentent une source prometteuse de tanins condensés, comme certainement d'autres plantes présentent relativement qu'une faible teneur de ces composés [45-47].

Tableau 4 : Travaux antérieurs sur la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins chez quelques espèces végétales.

Plante	Phénols totaux (mg EAG/g RS)	Flavonoïdes (mg EQ/g RS)	Tanins (mg EC/g RS)	Reference
<i>Vernonia cinerea</i>	53,96 ±1,45	30,09 ±0,44	/	[42]
<i>Digera muricata</i>	83,69 ±0,46	18,00 ±0,68	/	[43]
<i>Ipomoea aquatica</i>	77,06 ±0,70	6,61 ±0,42	/	[43]
<i>Basella alba</i>	72,66 ±0,46	6,97 ±0,62	/	[43]
<i>Alternanthera sessilis</i>	292,65 ±0,42	21,51 ±0,46	/	[43]
<i>Cassia tora</i>	287,73 ±0,16	37,86 ±0,53	/	[43]
<i>Thymus vulgaris</i>	16,0 ±2,2	13,6 ±4,0	/	[44]
<i>Thymus daenensis</i>	14,6 ±2,0	21,3 ±3,4	/	[44]
<i>Marrubium vulgare</i>	24,77 ±1,36	10,59 ±0,11	1,08 ±0,02	[45]
<i>Moringa oleifera</i>	/	/	0,36 ±0,01	[46]
<i>Aloe vera</i>	2,23 ±20,83	0,76 ±10,54	0,96 ±0,17	[47]
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	8,05 ±3,34	0,31 ±13,89	0,05 ±0,00	[47]
<i>Cymbopogon citratus</i>	2,18 ±5,50	1,91 ±27,47	0,80 ±0,02	[47]
<i>Centella asiatica</i>	1,04 ±2,20	0,66 ±7,46	0,14 ± 0,00	[47]

D'autre part, les résultats obtenus pour le dosage de l'acide urique sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide urique par gramme d'extrait, en utilisant l'équation linéaire de la courbe d'étalonnage tracée avec des solutions d'étalon de l'acide urique à différentes concentrations. Le **Tableau 3** montre que les valeurs varient de 0,170 ±0,006 mg EAU/mg RS à 154,845 ±0,002 mg EAU/mg RS dans les extraits étudiés. Ainsi, l'analyse statistique ne montre pas de différence significative entre les extraits méthanoliques et aqueux-Soxhlet de *Cistus creticus*, *Hammada elegans* et *Pituranthos scoparius*. Par contre, il existe une différence significative ($p < 0,00001$) entre les extraits acétoniques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata*, d'une part et les extraits acétoniques de *Hammada elegans* et *Pituranthos scoparius*, d'autre

part. L'hyperuricémie est fortement affectée par l'apport alimentaire élevé d'aliments riches en purine, tels que la viande, les graines d'haricots, les champignons et certains types de fruits de mer [48]. De plus, il existe un intérêt croissant pour les fruits, les légumes et les herbes riches en composés phytochimiques qui ont été impliqués comme médicaments alternatifs ou additifs contre la goutte. Les purines sont naturellement présentes dans tous les aliments végétaux. Il a été constaté que la purine à 10-15 mg/100 g de nourriture est présente dans tous les aliments végétaux. Cependant, certains aliments végétaux peuvent contenir 100 à 500 mg d'acide urique/100 g d'aliments [49]. Certaines plantes, en revanche, aident à réduire le niveau d'acide urique, tels que l'ananas, le citron, les aliments fibreux, l'huile d'olive, le persil, le chou rouge, le maïs et le riz [50].

Par ailleurs, les ions les plus naturellement importants présents dans les tissus végétaux sont le sodium, le potassium et le calcium. De ce fait, les concentrations de Na, K et Ca pour tous les extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction ont été déterminées à l'aide d'un photomètre à flamme. Les teneurs de ces éléments ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage du Na, du K et du Ca (Figures 7, 8 et 9).

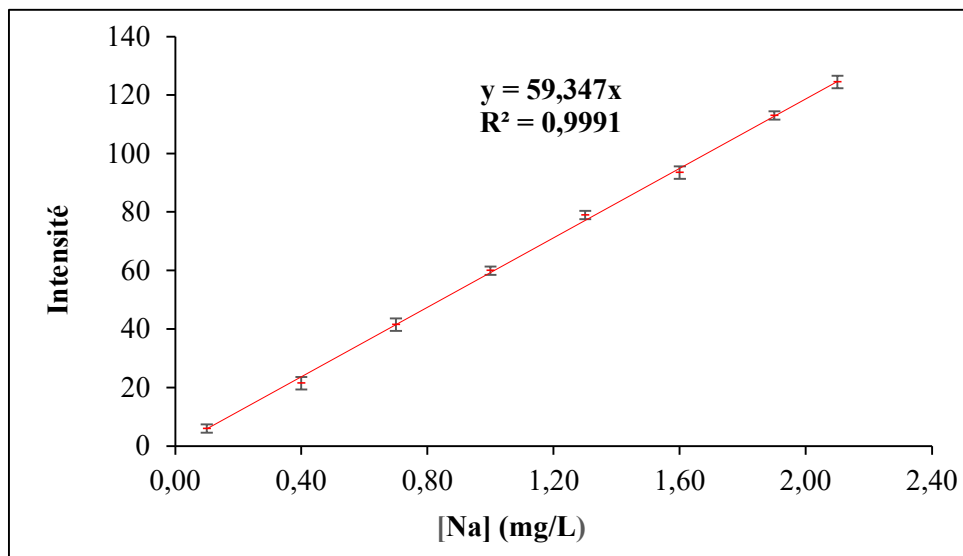


Figure 7 : Courbe d'étalonnage du sodium

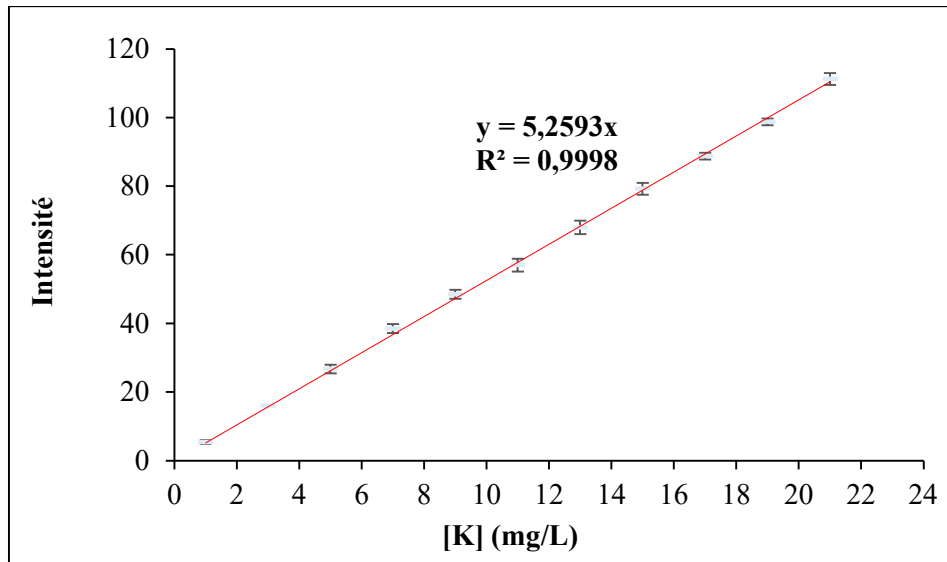


Figure 8 : Courbe d'étalonnage du potassium

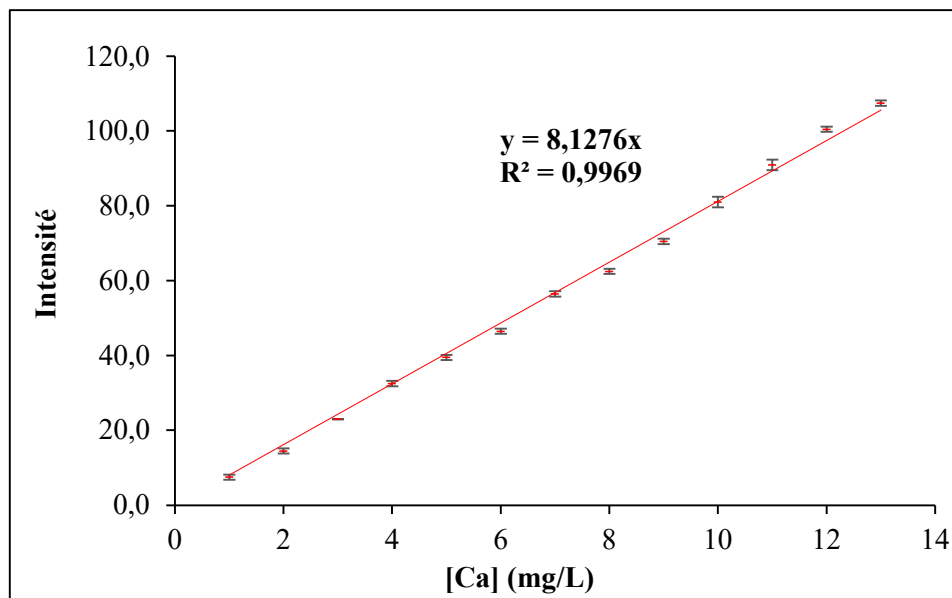


Figure 9 : Courbe d'étalonnage du calcium

Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en tanins et en acide urique de chaque extrait sont regroupées dans le **Tableau 4**. Les effets séparés de la nature du solvant utilisé et du type de l'espèce étudiée, sur les teneurs en ces phytoconstituants ont été analysés grâce à l'ANOVA.

Tableau 5 : Teneurs en sodium, potassium et calcium dans les extraits étudiés.

Extraits	Sodium (mg de Na / g RS)	Potassium (mg de K / g RS)	Calcium (mg de Ca / g RS)
<i>C.C-Ac</i>	0,182 ±0,074 ^a	0,705 ±0,027 ^a	0,543 ±0,017 ^{ab}
<i>C.C-ES</i>	8,262 ±0,165 ^h	44,795 ±1,411 ^d	39,081 ±0,454 ^h
<i>C.C-ET</i>	25,815 ±0,456 ^j	43,166 ±0,814 ^d	34,272 ±0,303 ^g
<i>C.C-M</i>	0,082 ±0,001 ^a	20,276 ±0,548 ^b	0,664 ±0,007 ^b
<i>H.E-Ac</i>	0,828 ±0,074 ^c	4,335 ±0,056 ^a	0,546 ±0,036 ^{ab}
<i>H.E-ES</i>	2,922 ±0,102 ^d	27,815 ±0,876 ^c	3,998 ±0,044 ^d
<i>H.E-ET</i>	3,789 ±0,058 ^e	57,488 ±0,661 ^f	2,618 ±0,022 ^c
<i>H.E-M</i>	0,654 ±0,019 ^{bc}	27,568 ±0,890 ^c	0,547 ±0,004 ^{ab}
<i>P.C-Ac</i>	0,245 ±0,004 ^{ab}	2,053 ±0,025 ^a	0,708 ±0,016 ^b
<i>P.C-ES</i>	3,213 ±0,086 ^d	71,163 ±0,485 ^g	73,232 ±0,000 ^j
<i>P.C-ET</i>	4,595 ±0,095 ^f	51,859 ±0,408 ^e	65,464 ±0,000 ⁱ
<i>P.C-M</i>	0,091 ±0,001 ^a	21,222 ±0,531 ^b	4,422 ±0,074 ^d
<i>P.S-Ac</i>	0,304 ±0,005 ^{ab}	1,154 ±0,027 ^a	0,774 ±0,018 ^b
<i>P.S-ES</i>	21,830 ±0,178 ⁱ	279,004 ±5,350 ^h	18,456 ±0,205 ^f
<i>P.S-ET</i>	6,284 ±0,061 ^g	70,839 ±0,689 ^g	6,478 ±0,040 ^e
<i>P.S-M</i>	0,032 ±0,001 ^a	25,940 ±0,590 ^c	0,191 ±0,004 ^a

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ±écart-type, n=5. Les valeurs moyennes suivies d'une lettre minuscule différente sont significativement différentes ($p < 0,00001$).

Le **Tableau 5** compare les concentrations de sodium, potassium et calcium déterminées à partir des différents extraits. En général, les concentrations de sodium de 0,032±0,001 à 25,815±0,456 mg de Na/g RS étaient significativement ($p < 0,0001$) différentes entre les extraits aqueux et les extraits organiques. Ainsi, l'extraction avec l'acétone a entraîné une légère surestimation des concentrations de sodium, tandis que l'extraction avec de l'eau a emporté une grande estimation des concentrations de Na. Les concentrations de K déterminées à partir des mêmes extraits n'ont pas montré la même tendance pour les teneurs en sodium. Les concentrations déterminées de potassium varient de 0,705±0,027 à 279,004±5,350 mg de K/g RS. Cependant, l'extraction avec l'eau distillée a conduit à des concentrations de K plus élevées par rapport aux extraits organiques, tandis que l'extraction par l'acétone a entraîné une sous-estimation mineure des

concentrations de K. Ainsi, aucune différence significative n'a été trouvée entre tous les extraits acétoniques. Par contre, les concentrations de potassium sont significativement ($p < 0,00001$) différentes entre les extraits aqueux. Également, de bonnes différences significatives ($p < 0,00001$) et intra-spécifiquement lié au type du solvant d'extraction, ont été trouvées entre les différents extraits ainsi préparés. Aussi, l'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,00001$) entre les extraits méthanoliques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata*, d'une part et les extraits méthanoliques de *Hammada elegans* et *Pituranthos scoparius*, d'autre part. En ce qui concerne les teneurs de calcium, les valeurs sont comprises entre $0,191 \pm 0,004$ et $73,232 \pm 0,000$ mg de Ca/g RS. L'accord linéaire le plus élevé a été trouvé entre les concentrations de K dans les extraits à l'eau-Soxhlet, les extraits à l'eau-Total et celles extraites par le méthanol. L'extraction par l'acétone n'a donné aucune différence liée au type d'espèce étudiée. Ainsi, l'extraction avec l'eau distillée sur la plante totale ou après épuisement par solvants organiques a donné des concentrations de K les plus significativement élevées ($p < 0,00001$). De même, d'un point de vue comparatif, certains extraits étudiés représentent une source prometteuse de Na, K et Ca, comme certainement d'autres plantes présentent relativement qu'une faible teneur de ces composés (**Tableau 6**) [44, 51-54].

Tableau 6 : Travaux antérieurs sur la teneur en sodium, potassium et calcium chez quelques espèces végétales.

Plante	Sodium (mg de Na/g RS)	Potassium (mg de K/g RS)	Calcium (mg de Ca/g RS)	Référence
<i>Thymus vulgaris</i>	2,6 ±0,1	4,0 ±0,1	0,7 ±0,0	[44]
<i>Thymus daenensis</i>	2,9 ±0,0	3,8 ±0,0	0,5 ±0,0	[44]
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	2,36 ±0,04	14,8 ±0,3	/	[51]
<i>Achyranthes aspera</i>	4,97 ±3,66	48,66 ±5,78	14,93 ±3,73	[52]
<i>Eclipta alba</i>	0,45 ±1,25	51,74 ±5,74	22,21 ±6,83	[52]
<i>Vitex negundo</i>	5,77 ±2,23	33,45 ±4,65	17,86 ±7,88	[52]
<i>Vigna angularis</i>	5,25 ±0,27	14,2 ±1,1	4,2 ±0,0	[53]
<i>Moringa oleifera</i>	6,60 ±0,15	11,34 ±0,46	19,4 ±11,2	[54]

III.2. Evaluation de l'activité anti-goutte et la toxicité des extraits *in vitro*

Il a été démontré que les inhibiteurs de la xanthine oxydase sont des agents thérapeutiques potentiels pour l'hyperuricémie qui provoque la goutte, les lithiases rénales, l'ischémie myocardique et les maladies induites par les ERO. En outre, les extraits possédant l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase font baisser les taux d'acide urique dans le sérum. Les inhibiteurs de la xanthine oxydase ont été mis en évidence dans beaucoup de plantes utilisées en médecine traditionnelle, reconnue par la population qui les utilise par leurs effets bénéfiques sur la goutte et le rhumatisme [55 et 56]. D'ailleurs, L'allopurinol est un inhibiteur de la xanthine oxydase allostérique qui peut diminuer l'effet néfaste de la xanthine oxydase dans les maladies à médiation radicale. L'utilisation de l'allopurinol est limitée par la formation d'oxypurinol, ce qui est connu d'engendrer des effets secondaires [57]. Toutefois, les extraits de plantes pourraient constituer une alternative intéressante pour le traitement des maladies à médiation radicale [58 et 59]. Alors, pour mesurer la capacité anti-goutte *in vitro* des extraits, nous avons utilisé le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase ainsi que le test de solubilisation de l'acide urique comme cible thérapeutique. Cependant, l'effet inhibiteur des extraits sur l'activité de la xanthine oxydase a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage de l'Allopurinol (Figure 10).

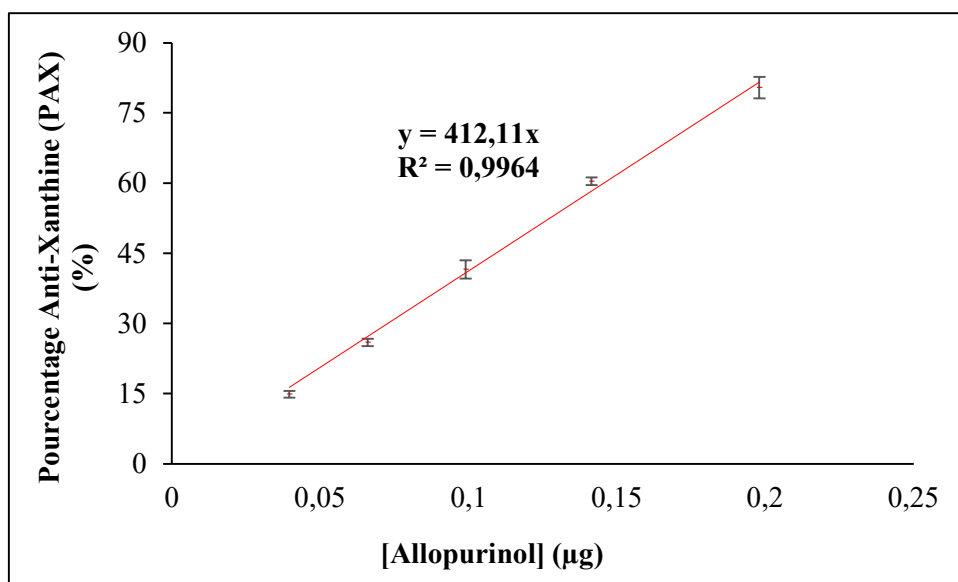


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'Allopurinol

L'efficacité anti-xanthine oxydase des extraits a été ensuite exprimée en AEAXoC (Capacité Anti-Xanthine oxydase Equivalente en Allopurinol) définit comme le nombre de microgrammes en Allopurinol donnant le même pouvoir inhibiteur d'un (1) milligramme du résidu sec de la plante étudiée (μg Allopurinol/ 1mg RS). L'évaluation du pouvoir antigoutteux

in vitro des extraits ainsi préparés a été déterminée également, par la mesure de leurs pouvoirs de dissolution de l'acide urique. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Activité anti-goutte (mesurée par le test d'inhibition de la xanthine oxydase et la dissolution de l'acide urique) et l'activité cytotoxique des extraits étudiés.

Extraits	Dissolution d'acide urique (mg d'acide urique/L (1mg/mL d'extrait))	AEAXoC (μ g Allopurinol/ 1mg RS)	PH (%)
C.C-Ac	509,585 \pm 0,005 ^e	13,480 \pm 0,596 ⁱ	63,416 \pm 0,100 ^g
C.C-ES	979,724 \pm 0,005 ^h	10,886 \pm 0,193 ^h	0,000 \pm 0,000 ^a
C.C-ET	590,552 \pm 0,009 ^f	6,715 \pm 0,478 ^f	4,787 \pm 0,504 ^c
C.C-M	18,335 \pm 0,005 ^a	4,156 \pm 0,084 ^{cd}	14,266 \pm 0,383 ^e
H.E-Ac	179,965 \pm 0,009 ^c	4,147 \pm 1,309 ^{cd}	89,523 \pm 1,726 ⁱ
H.E-ES	24,895 \pm 0,005 ^a	0,085 \pm 0,005 ^a	79,773 \pm 0,276 ^h
H.E-ET	30,816 \pm 0,009 ^a	0,740 \pm 0,024 ^b	95,124 \pm 1,120 ^j
H.E-M	28,429 \pm 0,014 ^a	3,670 \pm 0,0986 ^c	1,245 \pm 0,144 ^{ab}
P.C-Ac	179,411 \pm 0,003 ^c	13,020 \pm 0,627 ⁱ	17,665 \pm 0,392 ^f
P.C-ES	930,750 \pm 0,012 ^g	9,954 \pm 0,092 ^g	0,000 \pm 0,000 ^a
P.C-ET	450,042 \pm 0,006 ^d	0,679 \pm 0,061 ^{ab}	5,410 \pm 0,083 ^c
P.C-M	20,418 \pm 0,004 ^a	4,864 \pm 0,108 ^e	0,718 \pm 0,127 ^{ab}
P.S-Ac	122,408 \pm 0,011 ^b	3,904 \pm 0,192 ^c	100,000 \pm 0,073 ^k
P.S-ES	9,000 \pm 0,005 ^a	0,095 \pm 0,005 ^a	2,378 \pm 0,193 ^b
P.S-ET	36,482 \pm 0,021 ^a	0,560 \pm 0,026 ^{ab}	10,213 \pm 1,812 ^d
P.S-M	21,901 \pm 0,005 ^a	4,665 \pm 0,171 ^{de}	1,245 \pm 0,144 ^{ab}
Eau-D	58,36 \pm 0,024	/	100,000 \pm 0,073 ^k

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type, n =5. Les valeurs moyennes suivies d'une lettre minuscule différente sont significativement différentes ($p < 0,00001$).

Les résultats démontrent que tous les extraits ont exercé une inhibition de l'activité de la XO très significative ($p < 0.00001$) et d'une manière concentration-dépendante. Les valeurs d'AEAXoC des différents extraits testés montrent une grande variation allant de 0,085 \pm 0,005 à 13,480 \pm 0,596 μ g Allopurinol/ 1mg RS (**Tableau 7**). Mais, en comparaison avec l'Allopurinol, tous les extraits s'avèrent moins actifs. Il ressort des valeurs d'AEAXoC des différents extraits

que les extraits acétoniques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* semblent avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, parmi les autres extraits, avec des valeurs de $13,480 \pm 0,596$ et $13,020 \pm 0,627$ μg Allopurinol/ 1mg RS respectivement. Ainsi, ces extraits peuvent être explorés en tant qu'inhibiteur prometteur de la xanthine oxydase. D'ailleurs, il existe des substances qui inhibent la XO en bloquant la fixation du substrat aux sites actifs de l'enzyme, donc l'inhibition de l'activité de la XO par les extraits est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant sur les sites actifs, de l'enzyme. Or, selon les résultats du criblage phytochimique de ces extraits, leur effet semble être lié à leur richesse en phénols totaux. Cependant, de nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité de la XO [60-63], cette activité inhibitrice est peut-être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols [64 et 65], les tannins [66 et 67] et les flavonoïdes [68 et 69]. Donc, l'effet inhibiteur le plus élevé des extraits acétoniques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* par rapport à celui des autres extraits bruts est dû à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes. Comme la XO joue un rôle critique dans l'hyperuricémie et la goutte, ainsi que dans les maladies cardiovasculaires, les inhibiteurs de la XO sont considérés comme des médicaments efficaces pour contrôler ces problèmes de santé liés à l'acide urique. Bien que l'allopurinol est le médicament le plus couramment utilisé comme un inhibiteur de la XO, on estime qu'environ 5% des patients sont incapables de tolérer ses effets indésirables, ceux-ci comprennent l'irritation gastro-intestinale, la suppression de la moelle osseuse, la fièvre, la détérioration de la fonction rénale et les syndromes d'hypersensibilité allant de la simple éruption cutanée à des conditions menaçant la vie dans lesquelles les patients développent une nécrolyse épidermique toxique [70]. Donc, en raison des limitations des médicaments disponibles inhibiteurs de la XO, le développement de nouveaux médicaments avec une activité thérapeutique accrue et moins d'effets secondaires est un domaine de recherche très actif. Par conséquent, les extraits de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* qui sont de puissants inhibiteurs de la XO, peuvent être utilisés comme traitement des maladies liées à cette enzyme.

D'autre part, l'activité anti-goutte des extraits a été évaluée en calculant le taux de dissolution de l'acide urique pur après contact avec différentes concentrations en extraits. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 7**. Tout d'abord, il est clair que tous les extraits acétoniques de quatre plantes exercent un effet de dissolution d'acide urique d'une manière efficace et significative ($p < 0,00001$), qui est supérieur à celui du contrôle positif (Eau distillée $58,36 \pm 0,024$ mg/mL). Cependant, les extraits aqueux de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* possèdent les pouvoirs de dissolution les plus élevés et présentent des solubilités supérieures à 450 mg d'acide urique/L. De plus, selon le criblage phytochimique des extraits, le bon effet de dissolution d'acide urique est probablement dû à la contribution

significative des ions du calcium. Une hypothèse qui a été confirmée par plusieurs travaux montrant que le calcium pourrait également avoir un rôle indirect dans la diminution de l'uricémie par la régulation négative de l'hormone parathyroïdienne (PTH), avec ou sans l'influence de la vitamine D [71 et 72]. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier ultérieurement si les effets protecteurs de la goutte sont affectés par l'effet hypouricémiant du calcium.

L'évaluation de l'effet hémolytique d'une plante médicinale est nécessaire même si cette dernière possède une activité anti-goutte importante, afin de déterminer la dose ; au-delà de laquelle cette plante est toxique. L'hémolyse représente donc un indicateur de cytotoxicité. Cependant, le test *in vitro* de cytotoxicité représentée par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges humain (GRh) a été effectué en utilisant des GRh d'un donneur sain en bonne santé. Une concentration de 2g/L pour chaque extrait a été testée. Le pourcentage de l'hémolyse a été évalué, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, en comparaison à l'eau distillée (Eau-D). Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau 7**. Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'hémolyse varient significativement et intra-spécifiquement entre $00,000 \pm 0,000$ % et $100,000 \pm 0,073$ %. Ainsi, les extraits acétoniques ont présenté les pourcentages d'hémolyse significativement les plus élevés ($p < 0,00001$). Cependant, on constate que l'effet hémolytique des extraits aqueux et acétonique de *Hammada elegans* est significativement élevé par rapport aux autres extraits. Par ailleurs, on note que l'effet hémolytique de l'extrait acétonique des racines de *Pituranthos scoparius* est atteint 100 %, ce qui est pratiquement similaire à celui du contrôle négatif. Par ailleurs, on note qu'à la concentration de 2 g/L, l'effet hémolytique des extraits aqueux-Soxhlet de *Cistus creticus*, *Plantago ciliata* et *Pituranthos scoparius* n'a pas excédé 3 %. On remarque aussi, que les extraits méthanoliques des différentes plantes provoquent un taux d'hémolyse relativement faible qui ne dépasse pas 15%. De la même façon, on constate que les extraits aqueux-Soxhlet de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* n'ont présenté aucun effet toxique face aux érythrocytes isolés, ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité. Cependant, très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude de l'activité hémolytique des plantes choisies. Toutefois, nos résultats sont en accord avec les travaux de HADDOUCHI et al. [73] sur *Pituranthos scoparius*. Ainsi la toxicité des extraits dépend de la concentration et aussi des constituants des extraits. A forte concentration, les composés phénoliques sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et l'augmentation de la conductimétrie et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets prooxydants qu'ils peuvent exercer [74]. Par exemple, l'acide gallique à forte concentration, est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou Cu^{2+} en Cu^{+} , et ainsi de déclencher la réaction de Fenton avec formation du

radical hydroxyle [75]. Mais, il ressort clairement de cette étude que l'effet hémolytiques des extraits est faiblement corrélés avec les teneurs en différentes classes de composés phénoliques, cela suggère que ces phytoconstituants n'ont pas directement lié aux activités hémolytiques, mais il existe d'autres composés susceptibles d'être plus actif tels que les saponines.

III.3. Corrélations entre tous les résultats obtenus

Le screening biologique d'un grand nombre d'échantillons par différentes méthodes produit une large matrice de données dont il devient difficile d'en extraire toute l'information. À cette fin, l'utilisation de la méthode d'analyse en composantes principales (ACP) devient nécessaire pour faciliter l'interprétation des facteurs fondamentaux qui expliquent la variation des valeurs du dosage des échantillons et les méthodes utilisées. La distribution de variables dans une ACP est sous forme de nuage de points. Elle permet de différencier les groupes dans l'ensemble des variables en regardant celles qui se ressemblent et celles qui se distinguent des autres. C'est-à-dire, lorsque deux variables sont proches les unes par rapport aux autres, elles sont alors positivement corrélées. Si elles sont orthogonales les unes par rapport aux autres, alors elles sont non-corrélées. Si elles sont symétriquement opposées par rapport au centre, elles sont alors négativement corrélées.

De ce fait, pour montrer l'existence ou pas de corrélation entre les teneurs en phytoconstituants avec les tests d'activité anti-goutte et le test d'hémolyse des différents extraits étudiés, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) sur la matrice des 16 échantillons x 10 méthodes de dosage et d'activité. Tout d'abord, la réalisation d'une matrice des corrélations permet une analyse deux à deux des corrélations entre variables explicatives. Pour cela, le coefficient de corrélation de Pearson entre toutes les variables étudiées a été calculé. L'analyse a été effectuée en utilisant les valeurs moyennes de chaque variable. Il est d'usage de considérer que l'obtention de coefficients de corrélations supérieurs à 0,5 est révélatrice d'un problème de multi colinéarité entre les variables concernées. Les coefficients de corrélation sont établis par le test de Pearson à matrice non carrée avec la probabilité $p < 0,05$. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Matrice des coefficients de corrélation de Pearson (*r*) entre les valeurs provenant des 10 différentes méthodes de dosage et d'activité.(Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$)

Variables	Phénols totaux	Flavonoïdes	Tanins	Acide urique	Sodium	Potassium	Calcium	Hémolyse	Dissolution AU	XO
Phénols totaux	1									
Flavonoïdes	0,621	1								
Tanins	0,591	0,365	1							
Acide urique	0,196	0,129	0,325	1						
Sodium	-0,025	-0,093	0,478	0,366	1					
Potassium	-0,260	-0,234	-0,122	-0,116	0,658	1				
Calcium	-0,180	-0,237	0,153	0,582	0,340	0,251	1			
Hémolyse	-0,128	0,255	-0,264	-0,192	-0,307	-0,312	-0,437	1		
Dissolution AU	0,180	0,195	0,432	0,504	0,229	-0,070	0,765	-0,258	1	
XO	0,661	0,528	0,310	0,282	-0,183	-0,397	0,102	-0,145	0,602	1

Tout d'abord, compte tenu de la distribution quantitative des différents phytoconstituants étudiés dans les 16 extraits, les résultats montrent clairement l'existence des corrélations positivement significatives ($r = 0,621$; $p = 0,01$) et ($r = 0,591$; $p = 0,016$) entre les phénols totaux versus les flavonoïdes et les tanins, respectivement. Ce résultat indique que la contribution quantitative des flavonoïdes et des tanins dans la composition phénolique totale dans tous les extraits est de 62,1 % et 59,1 %, respectivement. Cependant, il n'y avait pas de corrélations significatives ($r < 0,26$) de la distribution des autres phytoconstituants dans le contenu phénolique. En revanche, une forte corrélation significative ($r = 0,658$; $p = 0,006$) a été constatée entre les teneurs en potassium *versus* sodium. Même observation a été remarquée entre le contenu en acide urique et la teneur en calcium dont le coefficient de corrélation estimé est de $r = 0,582$; $p = 0,012$.

D'autre part, il ressort clairement de cette étude que la capacité anti-goutte mesurée par le test d'inhibition de la xanthine oxydase des 16 extraits et le contenu en composés phénoliques totaux en en flavonoïdes sont positivement corrélés avec des coefficients de corrélation $r=0,662$; $p = 0,005$ et $r = 0,528$; $p = 0,036$, respectivement. Ce résultat suggère que presque 66 % des capacités inhibitrices des extraits sont dues aux polyphénols et quasiment 53 % sont liées aux flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres études antérieures, qui ont également trouvé de bonnes corrélations positives entre les teneurs en phénols totaux et l'activité anti-goutte mesurée par le test d'inhibition de la xanthine oxydase [76et 77]. De plus, d'autres recherches précédentes ont rapporté que les teneurs en flavonoïdes sont responsables de l'effet anti-xanthine oxydase avec une grande proportion [78-80]. Par contre, les teneurs des autres phytoconstituants des extraits sont très faiblement corrélées avec l'activité anti-xanthine oxydase avec des coefficients de corrélation ne dépasse pas 0,397.

Par ailleurs, la capacité des extraits à dissoudre l'acide urique a été fortement corrélée avec la teneur en calcium avec un coefficient de corrélation de $r = 0,765$; $p = 0,001$. Ce résultat suggère que le calcium est le plus important contributeur de l'activité de dissolution de l'acide urique. Par ailleurs, les résultats obtenus indiquent l'existence d'une bonne corrélation ($r = 0,602$; $p = 0,014$) entre les activités anti-goutte mesurées par les eux test. Ce résultat suggère que 60% des agents anti-xanthine oxydase de ces extraits sont également de bons agents contribuant à dissoudre l'acide urique.

En outre, pour tenter de mieux identifier les principaux facteurs contribuant à la variation des teneurs en amidon, en maltose et glucose selon les échantillons et les méthodes utilisées, nous avons effectué dans notre deuxième partie expérimentale une analyse en composantes

principales (ACP) à partir de la matrice de données des 16 extraits x 10 méthodes. Les résultats du plan factoriel de l'ACP sont représentés dans la **Figure 11**.

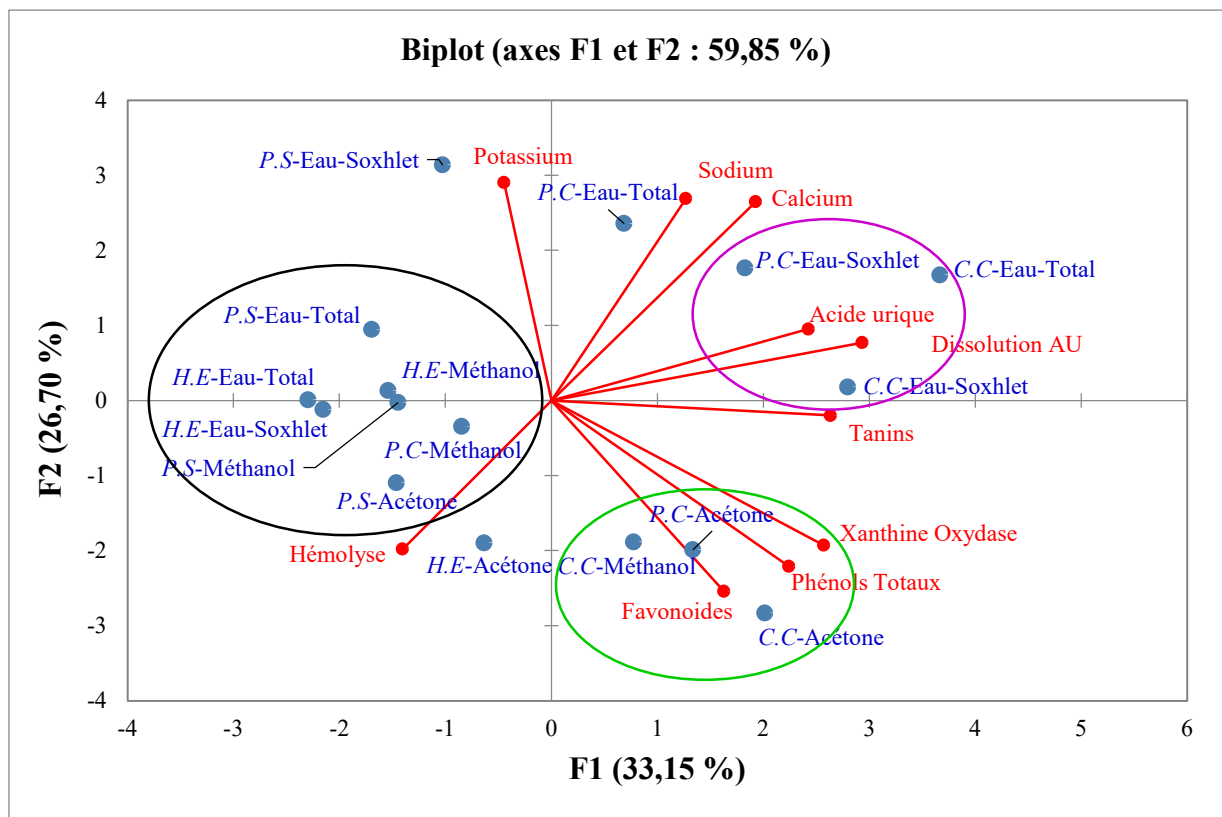


Figure 11 : Projections des variables et des individus dans le plan factoriel F1-F2 (ACP).

Selon la **Figure 11**, les deux composantes principales expriment une variance totale de 59,85%. La première composante principale (F1), a une influence dominante, avec une expression de 33,15% de la variation totale. Tandis que, le deuxième axe représente une variabilité de 26,70 % de la variance totale. La contribution de chaque variable dans l'expression de la composante principale est donnée par la valeur du rapport de corrélation entre la variable et l'axe factoriel considéré, autant que ce rapport est important, autant que la variable contribue à l'expression de l'axe. La combinaison linéaire des variables initiales définit le gradient de chaque composante. Le **Tableau 8** regroupe la corrélation des variables aux principaux axes factoriels.

Tableau 8 : Rapport de corrélation entre les variables et les facteurs (composantes principales)

Variable	F1	F2
Phénols totaux	0,621	-0,549
Flavonoïdes	0,451	-0,633
Tanins	0,730	-0,050
Acide urique	0,672	0,237
Sodium	0,351	0,669
Potassium	-0,124	0,721
Calcium	0,534	0,658
Hémolyse	-0,389	-0,492
Dissolution AU	0,813	0,192
Xanthine oxydase	0,712	-0,479

Il ressort de ce tableau que le premier axe est corrélé positivement avec phénols totaux (62,1 %), tanins (73,0 %), acide urique (67,2 %), dissolution d'acide urique (81,3 %) et le test de la xanthine oxydase (71,2 %). Par contre, il est moyennement ou faiblement corrélé avec les autres variables (<53,4%). En revanche, l'axe F2 est positivement corrélé avec sodium (66,9 %), potassium (72,1 %) et calcium (65,8 %), et également négativement corrélé avec flavonoïdes (63,3 %). Mais, il est moyennement ou faiblement corrélé avec les autres variables (<54,9 %).

Par ailleurs, le plan représentant la projection des variétés sur les deux axes F1 et F2 révèle une distinction claire entre les différents extraits étudiés. Les nuages de points des individus dans les plans factoriels (1, 2) (**Figure 11**) ne permettent pas d'apprécier de façon claire les effets des variables sur les grandeurs mesurées. Peu d'individus se distinguent véritablement des autres. En effet, tous les individus sont globalement distribués dans une zone proche de l'origine des axes, ce qui signifie que les différents essais réalisés ne présentent pas d'écarts importants laissant apparaître des familles distinctes des extraits.

En examinant de plus près les projections des individus, on constate que les échantillons *C.C*-Eau-Soxhlet, *C.C*-Eau-Total et *P.C*-Eau-Soxhlet (**Cercle violet**) sont caractérisées par des teneurs élevées en acide urique et en tanins, et d'un pouvoir à dissoudre l'acide urique très remarquable. La totalité de ces échantillons se sont des extraits aqueux et présentent également un effet hémolytique faible. Le nuage de points (**Cercle vert**) est caractérisé par les échantillons ayant la même réponse en termes de teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes, et en activité

anti-xanthine oxydase. En revanche, la situation est moins nette pour les autres échantillons, ce qui confirme l'hétérogénéité en phytoconstituants analysés de l'espèce constatée. Pour ce nuage de points (**Cercle noir**), on remarque que les échantillons sont caractérisés par des teneurs faibles en phytoconstituants à caractère polaire avec une toxicité remarquable (Taux d'hémolyse élevé). D'autre part, l'axe F1 qui est fortement corrélé avec les variables dissolution d'acide urique (81,3 %) et xanthine oxydase (71,2 %), présente également une corrélation significativement positive avec les individus C.C-Eau-Soxhlet (2,8) et C.C-Eau-Total (3,7).

En conclusion, l'ACP nous a permis de visualiser graphiquement les informations contenues dans un tableau de résultats de dimensions importantes. En raison d'une mauvaise distribution des individus dans l'espace de projection, il n'est pas possible d'établir de relations liant les différents paramètres du dosage et d'activité avec la nature ou l'origine des extraits investigués. Il a permis également, de démontrer que le dosage des différents phytoconstituants dans les extraits étudiés dépend de plusieurs facteurs, dont bien entendu la source des extraits, qu'à leur nature diversifiée, avec des propriétés hydrophile ou hydrophobe, et de leur mécanisme d'action avec la xanthine oxydase. Toutefois, il faut prendre en compte que cette ACP représente la distribution du dosage 16 extraits seulement. Ainsi, ce petit nombre d'échantillons pourrait modifier les conclusions de l'ACP, en mettant en évidence un facteur potentiel non révélé par ces extraits. Par ailleurs, il ressort de cette étude que les extraits aqueux de *Cistus creticus* qui se mettent dans la même région des deux variables xanthine oxydase et dissolution d'acide urique, nous amène à conclure que ces deux extraits représentent la capacité anti-goutte les plus importantes par rapport aux autres extraits.

Conclusion générale

IV. Conclusion générale

Actuellement, l'industrie pharmaceutique a pris conscience des limites et du coût de la chimie de synthèse. Beaucoup de molécules synthétiques ainsi obtenues ont un faible taux d'efficacité et présentent de plus en plus d'effets secondaires. C'est pour cela qu'elle se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude sur le terrain pour répertorier les plantes les plus prometteuses. De ce fait, cette importance phytothérapeutique a suscité notre attention de démontrer le pouvoir anti-goutte *in vitro* de 16 extraits de quatre plantes médicinales locales et d'illustrer la contribution de certains phytoconstituants vis-à-vis de cette activité. En effet, les résultats obtenus lors de la réalisation de cette thèse nous amènent à tirer les conclusions suivantes :

- Le screening quantitatif phytochimique a révélé la présence de polyphénols, flavonoïdes, tannins, acide urique, sodium, potassium et calcium, avec une variabilité significative intra- et inter-spécifique selon l'espèce étudiée et la nature du solvant d'extraction utilisé ;
- Tous les extraits étudiés ont révélé des propriétés inhibitrices de la xanthine oxydase et de dissoudre l'acide urique à différents niveaux. Ainsi, les extraits acétoniques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* semblent avoir l'effet inhibiteur de la xanthine oxydase le plus puissant, par contre, les extraits aqueux de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* possèdent les pouvoirs de dissolution de l'acide urique les plus élevés ;
- Les extraits aqueux de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* n'ont présenté aucun effet toxique face aux érythrocytes isolés, ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité ;
- L'analyse par ACP a montré que l'activité anti-goutte la plus importante a été enregistrée par les extraits aqueux de *Cistus creticus*. Ainsi, leur puissant effet anti-goutte semble être lié à leur richesse en tanins condensés.

Cette étude ne reste que préliminaire et peut servir de référence de base pour d'autres recherches et plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- ❖ Détermination des principaux composés des extraits actifs pour une meilleure compréhension de l'inhibition de la XO ;
- ❖ L'étude des activités anti-goutte des extraits actifs *in vivo* afin de démontrer leur potentialité et de déterminer leurs doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

V. Références bibliographiques

- [1] : Siyong You, Guiqing Wang, Fang Zhou, Haixia Wu d, Yanqing Han, Wenshuang Xue, Yuchen Ma, Chunxue Zhang, Lehao Zhou, Fen Yan, Caili Fu, Alideertu Dong. Chapter 8 - Antihyperuricemic peptides: A review focused on xanthine oxidase inhibitory activities. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2022 (74), 279-294.
- [2]: Samina Naz, Paul Holloway, Athar Ata, Bilge Sener. Chapter 29 - Exploring medicinal plants for the development of natural enzyme inhibitors. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine (Second Edition). *Translational Research on Botanicals*. 2022, 671-690.
- [3]: Daniel Załuski, Łukasz Cieśla, Zbigniew Janeczko. Chapter 7- The Structure–Activity Relationships of Plant Secondary Metabolites with Antimicrobial. Free Radical Scavenging and Inhibitory. Activity toward Selected Enzymes. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2015, (45), 217-249.
- [4]: Dinesh Chaudhary, Gopal Lamichhane. Chapter 1 - Overview of natural products in nutraceutical industries. Herbs. *Spices and Their Roles in Nutraceuticals and Functional Foods*. 2023, 1-13.
- [5]: Roberto de Paula do Nascimento, Mario Roberto Maróstica Junior. Chapter 1 - Introduction: History of inflammatory bowel diseases and relevance of natural plant products. Natural Plant Products in Inflammatory Bowel Diseases. *Preventive and Therapeutic Potential*. 2023, 1-7.
- [6]: Chalermpong Saenjum, Thanawat Pattananandecha, Sutasinee Apichai. Chapter 22 - Plant bioactives, aging research, and drug industry: procedures and challenges. Plant Bioactives as Natural Panacea Against Age-Induced Diseases: Nutraceuticals and Functional Lead Compounds for Drug Development. *Drug Discovery Update*. 2023, 447-468.
- [7]: Upasana Bhuyan, Jyotirekha G. Handique. Chapter 6 - Plant polyphenols as potent antioxidants: Highlighting the mechanism of antioxidant activity and synthesis/development of some polyphenol conjugates. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2022, (75), 243-266.
- [8]: Marina AlDaccache, Mohamed Kouba, Nicolas Louka, Richard G. Maroun, Eugène Vorobiev, Hiba N. Rajha. Chapter 11 - Separation, purification, analyses, and preservation of polyphenols. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes*. 2022, 247-270.
- [9]: Alfredo Aires. Chapter 14 - Polyphenols applications in pharmaceutical and cosmetic industries. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes*. 2022,337-357
- [10]: Prathapan Ayyappan, Suresh V. Nampoothiri. Chapter 13 - Bioactive natural products as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Studies in Natural Products Chemistry*.2020, (64), 391-416.
- [11]: Jun Li, Yuhong Gong, Jinwei Li, Liuping Fan. *In vitro* inhibitory effects of polyphenols from Tartary buckwheat on xanthine oxidase: Identification, inhibitory activity, and action mechanism. *Food Chemistry*.2022, (379), 132100.
- [12]: Jun Li, Yuhong Gong, Jinwei Li, Liuping Fan. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory properties of *Flos Sophorae Immaturus* and potential mechanisms. *Food Bioscience*. 2022, (47), 101711.
- [13]: Xin Li, Weili Jin, Wenkai Zhang, Guodong Zheng. The inhibitory kinetics and mechanism of quercetin-3-O-rhamnoside and chlorogenic acid derived from *Smilax China* L. EtOAc fraction on xanthine oxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, (213),447-455.

- [14]: Roger White C., Jonathan E. Shelto, Douglas Moellering, Hanjoong Jo, Rakesh P. Patel, Victor Darley-USmar. Part II • Chapter 3- Exercise and xanthine oxidase in the vasculature: superoxide and nitric oxide interactions. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. 2000, 69-86.
- [15]: Y. Hellsten. Part III • Chapter 7 -The role of xanthine oxidase in exercise. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. 2000, 153-176.
- [16]: Nicola Dalbeth, Lisa K. Stamp. Chapter 13 -Xanthine Oxidase Inhibitor Treatment of Hyperuricemia. *Gout & Other Crystal Arthropathies*. 2012,154-173.
- [17]: Author links open overlay panelBradley E. Britigan, Sovitj Pou, Gerald M. Rosen, Diane M. Lillig b, Garry R. Buettner. Production of hydroxyl radical during the oxidation of xanthine by xanthine oxidase is dependent on the presence of adventitious iron. *Oxidative Damage & Repair. Chemical, Biological and Medical Aspects*. 1991,837-841.
- [18]: Ali Rashidinejad, John Birch. Xanthine Oxidase in Dairy Foods. *Encyclopedia of Food Chemistry*. 2019, 374-380.
- [19]: Field Tristan Pascart, Tony R. Merriman, Hyon K. Choi and Robert Terkeltau. Gout, Urate, and Crystal Deposition Disease: Launch of the First Journal Dedicated to a Rapidly Growing. *Gout Urate and Crystal Deposition Disease*. 2023, 1(2), 83-88.
- [20]: Jasvinder Singha A., Angelo Gaffo. Gout epidemiology and comorbidities. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2020, (50), 11-16.
- [21]: Šmelcerović, Katarina Tomović, Žaklina Šmelcerović, Živomir Petronijević, Gordana Kocić, Tihomir Tomašić f, Žiga Jakopin, Marko Anderluh. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, (135),491-516.
- [22]: Kheng Leong Ooi, Rahimah Zakaria, Mei Lan Tan, Shaida Fariza Sulaiman. The influence of chemical composition of potent inhibitors in the hydrolyzed extracts of anti-hyperuricemic plants to their xanthine oxidase activities. *Journal of Ethnopharmacology* .2021, (278) 114294.
- [23]: Lianzhu Lin, Xuemei Liu, Mouming Zhao. Screening of xanthine oxidase inhibitor from selected edible plants and hyperuricemic effect of *Rhizoma Alpiniae* Officinarum extract on hyperuricemic rats. *Journal of Functional Foods*. 2018, (50),26-36.
- [24]: Yalda Pirmohammadi, Solmaz Asnaashari, Hossein Nazemiyeh, Sanaz Hamadryade. Bioactivity assays and phytochemical analysis upon *Alcea glabrata*; focusing on xanthine oxidase inhibitory and antimalarial properties. *Toxicon*. 2023, (229),107140.
- [25]: Susi Endrini, Fazleen Izzany Abu Bakar, Mohd Fadzelly Abu Bakar, Norazlin Abdullah, Himmi Marsiati. Phytochemical profiling, and *in vivo* xanthine oxidase inhibition and antihyperuricemic activity of *Christia vespertilionis* leaf. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.2023. (48),102645.
- [26]: Rahma SR., Mahrous, Hoda M. Fathy, Reham S. Ibrahim. Metabolic bioprofiling for discovering xanthine oxidase inhibitors from *Glycyrrhiza glabra* root solvent fractions using orthogonal separation modalities coupled with chemometry. *South African Journal of Botany*. (154),2023,251-259.
- [27] : Dobignard, A., Chatelain, C., Index synonymique de la Flore d’Afrique du Nord. *Ville de Genève Éditions des conservatoires et jardin botaniques Genève*. 2010-2013.1-5.

- [28]: Benhouhou, S., Yahi, N. and Véla, E., Algeria (chapter 3 "Key Biodiversity Areas (KBAs) for plants in the Mediterranean region. *Journal of Threatened Taxa*. 2023, (15), 53-60.
- [29]: Noura Addoun, Zakaria Boual, Cédric Delattre, Alina Ursu, Jacques Desbrières, Didier Le Cerf, Christine Gardarin, Faiez Hentati, Mohamed Didi Ould El-Hadj, Philippe Michaud, Guillaume Pierre. Structural features and rheological behavior of a water-soluble polysaccharide extracted from the seeds of *Plantago ciliata* Desf. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, (155),1333-1341.
- [30] : Zerrougui Leila et Bekrar Manel. Etude phytochimique et potentiel antioxydant d'une plante Algérienne du genre *Cistus* (Cistaceae). Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantin. *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*. 2019, 8-9.
- [31]: Hammiche V., Maiza Traditional Medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, (105), 358-367,
- [32]: Labioth S., Mahfoudi R., Djeridane A., Benlhorma S., and Yousfi M., Phytochemical Characterization and High *in Vitro* Antioxidant Properties of *Hammada elegans* Algerian Extracts: A Potent Medicinal Plant. *Phytothérapie*.2021, (19),3 – 15.
- [33]: Singleton V.L., Rossi J.R., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphothungstic acid. *American Journal of Enology and Viticulture*.1965, (16), 144
- [34]: Lamaison, J.L. and Carnat A., The Amount of Main Flavonoids in Flowers and Leaves of *Crataegus Monogyna* Jacq. and *Crataegus Laevigata* (Poiret) DC. (Rosacea). *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 1990, (65), 315-320.
- [35]: Julkunen-Titto. Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.1985, (33) ,213–217.
- [36]: Artiss JD, Entwistle WM. The application of a sensitive uricase-peroxidase couple reaction to a centrifugal fast analyser for the determination of uric acid. *Clinica Chimica Acta*. 1981 ,(116), 301-309.
- [37]: Samuel Knight, W Mathis, and J. Graham. Mineral Analysis with Flame Photometer. *Analytical Chemistry*. 1951, (23),1704–1706.
- [38]: Fridovich I., Handler P., Xanthine oxidase. V. Differential inhibition of the reduction of various electron acceptors. *Journal of Biological Chemistry*. 1962, (237),916-21.
- [39]: Li, G.X. and Liu, Z.Q., The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and chemical toxicology*. 2008, (46),886-892.
- [40]: Adithya Sridhar, Muthamilselvi Ponnuchamy, Ponnusamy Senthil Kumar, Ashish Kapoor, Dai-Viet N. Vo, and Sivaraman Prabhakar. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2021, (19), 3409–3443.
- [41]: Eva Brglez Mojzer, Maša Knez Hrnčič, Mojca Škerget, Željko Knez, and Urban Bren. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action. Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016, (21), 901.
- [42]: Oluwaseun R Alara, Nour H, Abderrahmane, Chinonso I. Ukaegbu, Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018, (11), 12–17.

- [43]: Sushant Aryal, Manoj Kumar Baniya, Krisha Danekhu, Puspa Kunwar, Roshani Gurung and Nirajan Koirala. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants*. 2019, (8), 96.
- [44]: Zohreh Emami Bistgania, Masoud Hashemib, Michelle DaCostab, Lyle Crakerb, Filippo Maggic, Mohammad Reza Morshedlood. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris L* and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops & Products* .2019, (135), 311–320.
- [45]: Jaadan Hayat, Mustapha Akodad, Abdelmajid Moumen, Mourad Baghour, Ali Skalli, Said Ezrari, Saadia Belmalha. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare L*. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon*. 2020, (6),05609.
- [46]: El-Sayed M., Desokya, Abdelaleim. ElSayedb, Abdel-Rahman M.A., Merwadc, Mostafa M., Radyd. stimulating antioxidant defenses, antioxidant gene expression, and salt tolerance in *Pisum sativum* seedling by pretreatment using *licorice root* extract (LRE) as an organic biostimulant. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019, (142), 292–302.
- [47]: Ziaul Hasan Rana, Mohammad Khairul Alam and Mohammad Akhtaruzzaman. Nutritional Composition. Total Phenolic Content, Antioxidant and Amylase Inhibitory Activities of Different Fractions of Selected Wild Edible Plants. *Antioxidants*. 2019, (8), 203.
- [48]: Boštjan Jakše, Barbara Jakše, Maja Pajek and Jernej Pajek. Uric Acid and Plant-Based Nutrition Nutrients. *Biomolecules*.2019, (11), 1736.
- [49]: Tina H.T., Chiu, Chin-Hsiu Liu, Chia-Chen Chang, Ming-Nan Lin, Chin-Lon Lin. Vegetarian diet and risk of gout in two separate prospective cohort Studies. *Clinical Nutrition*. (2020), (39),837844.
- [50]: Meiqi Zhou, Xin Huang, Ruiqiang Li, Zechen Zhang, Limin Zhang, Xian Gao, Hui Yang and Yuxia Ma. Association of dietary patterns with blood uric acid concentration and hyperuricemia in northern Chinese adults. *Nutrition Journal*. 2022, (10) ,21-42.
- [51]: Mohammad Abass Ahanger, Usman Aziz, Abdulaziz Abdullah Alsahli, Mohammed Nasser Alyemeni and Parvaiz Ahmad. Influence of Exogenous Salicylic Acid and Nitric Oxide on Growth, Photosynthesis, and Ascorbate-Glutathione Cycle in Salt Stressed *Vigna angularis*. *Biomolecules* .2020, (10), 42.
- [52]: Lamia Mabrouki, Ilhem Rjeibi, Jihen Taleb, and Lazhar Zourgui. Cardiac Ameliorative Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract in High-Fat Diet-Induced Obesity in Rat Model. *Biomedicine Research International*. 2020, (28),2.
- [53]: Elsa S., du Toit, Joseph Sithole, Juan Vorster. pruning intensity influences growth, flower and fruit development of *Moringa oleifera Lam*. under sub-optimal growing conditions in Gauteng. *South African Journal of Botany*.2020, (129),448-456.
- [54]: Zhi Xiang Nga, Phaik Har Yongb, Sin Yee Lima. Customized drying treatments increased the extraction of phytochemicals and antioxidant activity from economically viable medicinal plants. *Industrial Crops & Products*.2020, (155),112815.
- [55]: Roleira F.M.F., Varela C.L., Costa S.C., Tavares-da-Silva E.J. Phenolic Derivatives from Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2018, (57), 115-156.

- [56]: Li M. J., Liu L., Fu Y., and Guo Q. Accurate bond dissociation enthalpies of popular antioxidants predicted by the ONIOM-G3B3 method. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. 2007, (815), 1-9.
- [57]: Safna Hussan K. P., Shahin Thayyil M., Rajan V. K., and Muraleedharan K., DFT studies on global parameters, antioxidant mechanism and molecular docking of amlodipine besylate. *Computational Biology and Chemistry*. 2019 (80), 46–53.
- [58]: Olugbodi J. O., Tincho M. B., Oguntibeju O., Olaleye M. T., and Akinmoladun A. C., Glyphaea brevis – *In vitro* antioxidant and in silico biological activity of major constituents and molecular docking analyses. *Toxicology in Vitro*. 2019, (59), 187–196.
- [59]: Miranda C. G. Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: *In vitro* determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. *Food Chemistry*. 2019, (19), 125523.
- [60]: Lin L., Liu X., and Zhao M. Screening of xanthine oxidase inhibitor from selected edible plants and hypouricemic effect of Rhizoma Alpiniae Officinarum extract on hyperuricemic rats. *Journal Functional Foods*. 2018, (50), 26–36.
- [61]: Shi B. B., Chen J., Bao M. F., Zeng Y., and Cai X. H. Alkaloids isolated from Tabernaemontana bufalina display xanthine oxidase inhibitory activity. *Phytochemistry*. 2019, (12), 166.
- [62]: Duong N. T., *et al.*, Xanthine oxidase inhibitors from Archidendron clypearia (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants. *Asian Pac. Journal of Tropical Medicine*. 2017, (10), 549–556.
- [63]: Liu F., Deng C., Cao W., Zeng G., Deng X., and Zhou Y. Phytochemicals of Pogostemon Cablin (Blanco) Benth, aqueous extract: Their xanthine oxidase inhibitory activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, (89), 544–548.
- [64]: Ouyang H., Hou K., Peng W., Liu Z., and Deng H. Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of total polyphenols from onion. *Saudi Journal of Biology*. 2018, (25), 1509–1513.
- [65]: Chen G., Tan M. L., Li K. K., Leung P. C., and Ko C. H. Green tea polyphenols decreases uric acid level through xanthine oxidase and renal urate transporters in hyperuricemic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, (175), 14–20.
- [66]: Masuoka N., and Kubo I. Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds. *Phytochemistry*. 2018, (155), 100–106.
- [67]: Honda S., Fukuyama Y., Nishiwaki H. i, Masuda A., and Masuda T. Conversion to purpurogallin, a key step in the mechanism of the potent xanthine oxidase inhibitory activity of pyrogallol. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017, (106), 228–235 .
- [68]: Jayaraj P., Mathew B., Parimaladevi B., . Ramani V. A, and Govindarajan R. Isolation of a bioactive flavonoid from Spilanthes calva D.C. in vitro xanthine oxidase assay and in silico study. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2014, (4), 481–484. .
- [69]: Santi M. D. *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from Gardenia oudiepe (Rubiaceae) *in vitro* and molecular docking studies. *European Journal of Internal Medicine Chemistry*. 2018, (143), 577–582.
- [70]: Shih-Wei Lai , Kuan-Fu Liao , Yu-Hung Kuo , Bing-Fang Hwang , Chiu-Shong Liu . Comparison of benzbromarone and allopurinol on the risk of chronic kidney disease in people with asymptomatic hyperuricemia. *European Journal of Internal Medicine*. 2023, (10), 109–35.

- [71]: Leskovar P., Hartung R., et Kratzer M. Correlation between the Uric Acid and Calcium Concentration in Urine. Results of a Long Term Study on Recurrent Stone-Formers and Healthy Controls. *Advances in Experimental Medicine and Biology book series*.1980,(122), 93-98.
- [72]: Fang Gu, Xiaoming Luo, Xiaoli Jin, Changshou Cai, and Wenyan Zhao. Association of Total Calcium With Serum Uric Acid Levels Among United States Adolescents Aged 12–19 Years: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Medicine*. 2022, (9), 915371.
- [73]: Haddouchi F., Chaouche T.M., Halla N. Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria. screening phytochimique, activates antioxydants et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*. 2016, (10),1007.
- [74]: Bozena Bukowska, Sylwia Kowalska. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Frontiers in Medicine*. 2004, (152), 73–84.
- [75]: Panghal, Kshirod Bihari Sathua, Flora Archana S.J.S. Gallic acid and MiADMSA reversed arsenic induced oxidative nitrosative damage in rat red blood cells. *Heliyon*.2020, (6),03431.
- [76]: Nirmala Phuyal, Pramod Kumar Jha, Pankaj Prasad Raturi, and Sangeeta Rajbhandary. Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *Hindawi Scientific World Journal*. 2020, (7),87.
- [77]: Said I., Behiry, Mohmmad Okla Saud. Alamri, Mervat EL-Hefny, Mohamed. Salem, Ibrahim Alaraidh, Hayssam M. Ali, Salem. Al-Ghtani, José C. Monroy and Abdelfattah M. Salem. Antifungal and Antibacterial Activities of *Musa paradisiaca* L. Peel Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Contents. *Processes*. 2019, (7), 215.
- [78]: AOUACHRIA Sana, BOUMERFEG Sabah, BENSLAMA Abderrahmane, BOUSSOUALIM Naouel, TRABSA Hayat, BAGHIANI Abderrahmane, Phenolics Contents, Xanthine Oxidoreductase Inhibitory Potential, Antibacterial and Antioxidant Activities of *Cachrys libanotis* L. Root Extracts. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2020, (10),71-79.
- [79]: Urszula Szymanowska, Monika Kara and Justyna Bochnak-Nied'zwiecka. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential and Consumer Acceptance of Wafers Enriched with Freeze-Dried Raspberry Pomace. *European Journal of Internal Medicine*. 2021, (11), 6807.
- [80]: Dadang Juanda, Irda Fidrianny, Komar Ruslan Wirasutisna, Muhamad Insanu, Evaluation of Xanthine Oxidase Inhibitory and Antioxidant Activities of Three Organs of Idat (*Cratoxylum glaucum* Korth and Correlation with Phytochemical Content. *Pharmacognosy Journal*. 2021, (13),971-976.

ملخص:

أجريت هذه الدراسة مخبرياً لتقييم فعالية 16 مستخلصاً مختلفاً من أربعة نباتات محلية في تثبيط زانثين أوكسيداز وانحلال حمض البوليك، بالإضافة إلى التحليل الكمي لبعض المكونات الكيميائية النباتية وتأثيرها على انحلالية خلايا الدم الحمراء البشرية. أظهرت نتائج التحليل الكمي الفيتوكيميائي تباين معنوي تحت و بين نوعي في الفينولات الكلية والفلافونويدات والعفصيات وحمض البوليك والصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم اعتماداً على أنواع النباتات المدروسة ونوع المذيب المستخدم في الاستخلاص. أشارت نتائج النشاط المضاد للنقرس مخبرياً أن جميع المستخلصات لديها القدرة على تثبيط نشاط أكسيداز الزانثين وإذابة حمض البوليك عند مستويات مختلفة، حيث أظهرت مستخلصات الأسيثون ل *Cistus creticus* و *Plantago ciliata* أقوى فعل تثبيطي لأكسيداز الزانثين، كما أظهرت مستخلصاتهما المائية أعلى قدرة على إذابة حمض اليوريك. من جهة أخرى، بين تحليل المكون الرئيسي (PCA) أن المستخلصات المائية ل *Cistus creticus* تمتلك أهم نشاط مضاد للنقرس، وبالتالي يمكن استخدام هذه المستخلصات التي لم تظهر أي تأثير سام ضد خلايا الدم الحمراء كعلاج للأمراض المرتبطة بهذا الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات ، النقرس ، أوكسيداز الزانثين ، حمض البوليك ، السمية.

Résumé :

Ce travail a étudié *in vitro* l'efficacité de 16 différents extraits de quatre plantes locales sur l'inhibition de la xanthine oxydase et la dissolution de l'acide urique ; ainsi que la quantification de certains phytoconstituants et leurs effets hémolytiques des globules rouges humains. Les résultats de l'analyse quantitative phytochimique obtenus ont révélé une variabilité significative intra- et inter-spécifique des phénols totaux, flavonoïdes, tanins, acide urique, sodium, potassium et calcium selon l'espèce étudiée et la nature du solvant d'extraction utilisé. Les résultats de l'activité anti-goutte *in vitro* a démontré que tous les extraits étudiés montrent des propriétés inhibitrices de la xanthine oxydase et de dissoudre l'acide urique à différents niveaux. Ainsi, les extraits acétoniques de *Cistus creticus* et *Plantago ciliata* semblent avoir l'effet inhibiteur de la xanthine oxydase le plus puissant, par contre, leurs extraits aqueux possèdent les pouvoirs de dissolution de l'acide urique les plus élevés. D'autre part, l'analyse par ACP a montré que l'activité anti-goutte la plus importante a été enregistrée par les extraits aqueux de *Cistus creticus*. Ainsi, ces extraits qui n'ont présenté également aucun effet toxique face aux érythrocytes humains isolés, peuvent être utilisés comme traitement des maladies liées à cette enzyme.

Mots-clés : Extraits, goutte, xanthine oxydase, acide urique, toxicité.

Abstract:

This study has been conducted to evaluate *in vitro* the efficacy of 16 different extracts from four local plants on the inhibition of xanthine oxidase and the dissolution of uric acid; as well as the quantification of certain phytoconstituants and their haemolytic effects on human red blood cells. Results from quantitative phytochemical analysis revealed a significant intra- and inter-specific variability in total phenols, flavonoids, tannins, uric acid, sodium, potassium and calcium depending on the studied species and the type solvent used in extraction. The *in vitro* anti-gout activity results indicated that all extracts had the ability to express inhibitory activity of xanthine oxidase and to dissolve uric acid at different levels. Therefore, the acetonic extracts of *Cistus creticus* and *Plantago ciliata* had the strongest xanthine oxidase inhibiting effect, moreover, their aqueous extracts showed the highest uric acid dissolving power. Furthermore, PCA analysis suggested that the most significant anti-gout activity was found in the aqueous extracts of *Cistus creticus*. Consequently, these extracts which also showed no toxic effect against isolated human erythrocytes, can be used as a treatment for this enzyme-linked disorders.

Keywords: Extracts, gout, xanthine oxidase, uric acid, toxicity.