



HAL
open science

Mise au point d'un modèle *in vitro*, sur hépatocytes isolés, adapté à l'étude des propriétés antihépatotoxiques d'extraits végétaux : application à la recherche des principes antiradicalaires de *Rosmarinus officinalis* L.

Michel Joyeux

► To cite this version:

Michel Joyeux. Mise au point d'un modèle *in vitro*, sur hépatocytes isolés, adapté à l'étude des propriétés antihépatotoxiques d'extraits végétaux : application à la recherche des principes antiradicalaires de *Rosmarinus officinalis* L.. Sciences pharmaceutiques. Université Paul Verlaine - Metz, 1993. Français. NNT : 1993METZ024S . tel-01775464

HAL Id: tel-01775464

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775464>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ub 81621.

UNIVERSITE DE METZ

Centre des Sciences de l'Environnement

**Mise au point d'un modèle in vitro, sur hépatocytes isolés,
adapté à l'étude des propriétés antihépatotoxiques d'extraits
végétaux : application à la recherche des principes
antiradicalaires de Rosmarinus officinalis L.**

Thèse de Doctorat de l'Université de Metz

Mention Pharmacognosie

soutenue publiquement le 1^{er} juillet 1993

par

Michel JOYEUX

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930765
Cote	SM3 93/24
Loc	Magasin

Membres du jury :

M. J.M. PELT, Professeur (président)
M. L. ANGENOT, Professeur (rapporteur)
M. F. MORTIER, Professeur (rapporteur)
M. J. FLEURENTIN, Maître de Conférences (directeur de thèse)
M. B. LE BUANEC, Directeur de Recherche de LIMAGRAN
M. P. DORFMAN, Directeur de Recherche des Laboratoires DOLISOS

A Messieurs les membres du jury :

Je tiens à remercier, tout particulièrement, Monsieur le Professeur Jean-Marie PELT qui m'a accueilli au sein de son équipe et s'est tenu régulièrement informé de l'évolution de ce travail. Je voudrais lui exprimer mon profond respect pour les idées qu'il défend et ma sincère gratitude pour la qualité de l'écoute qu'il m'a toujours accordée.

Je voudrais adresser ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur François MORTIER, pour l'aide considérable qu'il a apportée à la réalisation de ce travail. Je souhaite à tous un guide aussi patient, compétent et disponible. Qu'il soit assuré de toute mon estime.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Docteur Jacques FLEURENTIN, pour les conseils avisés et les encouragements enthousiastes qu'il m'a toujours prodigués. Sa grande érudition dans le domaine de la pharmacologie des extraits végétaux m'a toujours été d'une grande aide. Au-delà des formules, que ce travail soit le gage de mon amitié et l'espoir d'une collaboration toujours plus fructueuse.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur Luc ANGENOT, d'avoir accepté de participer à ce jury et d'en être l'un des rapporteurs. Les travaux qu'il mène, avec son équipe, dans le domaine de l'ethnopharmacologie sont un remarquable exemple des potentialités thérapeutiques offertes par le monde végétal et ses remarques seront écoutées avec une grande attention.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur LE BUANEC, Directeur de recherche de LIMAGRAIN, de m'avoir fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury malgré un emploi du temps que j'imagine plus que chargé.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Docteur Pierre DORFMAN de m'avoir fait participer aussi souvent que possible, aux diverses activités des Laboratoires DOLISOS, ce qui fut très instructif. Suivant pas à pas ce travail, il m'a maintes fois communiqué des avis ou des idées de très hautes valeurs, je lui exprime toute ma gratitude pour cette enrichissante et très cordiale collaboration qui, je l'espère, ne fera que se développer.

Je voudrais également adresser mes remerciements à :

M. le Docteur DIALLO, de l'Université de LOUVAIN

M. le Docteur DIERCKXSEN des Laboratoires DOLISOS

M. le Docteur SIEGLER du CEIMED de NANCY

Pour leur collaboration active au cours de ce travail

et exprimer ma gratitude à :

M. le Docteur BERGANZA de l'Université d'ASUNCION (Paraguay)

M. le Docteur ESTEBAN de l'Université de SAN LORENZO (Paraguay)

M. le Professeur HAYASHI de la faculté de Pharmacie de TOYAMA (Japon)

M. le Professeur GUTIERREZ de l'Université de TENERIFE (Espagne)

qui tous les quatre ont conjugué leurs efforts pour me fournir

5 mg de rosmanol

<u>A. Introduction et but du travail</u>	1
<u>B. Lésions histologiques hépatiques d'origine toxique.</u>	
<u>I Rappel sur l'hétérogénéité cellulaire : lobule et acinus.</u>	5
<u>II Manifestations Aigues</u>	
<u>II-1 Atteintes cytotoxiques ou cytolytiques</u>	7
II-1-1 Dégénérescence cellulaire	7
II-1-2 Nécrose cellulaire	7
II-1-3 Granulomatose hépatique	9
II-1-4 Stéatose	9
II-1-4-1 Stéatose macrovacuolaire	
II-1-4-2 Stéatose microvacuolaire	
II-1-5 Phospholipidoses	10
<u>II-2 Atteintes cholestatiques</u>	11
II-2-1 Cholestase aigue hépatocellulaire	11
II-2-1-1 Cholestase pure	
II-2-1-2 Hépatite cholestatique	
II-2-2 Cholestase par atteinte des petits canaux biliaires	12
II-2-3 Cholestase par atteinte des gros canaux biliaires	12
<u>III-Manifestations Chroniques</u>	
<u>III-1 Stéatoses et Phospholipidoses</u>	12
<u>III-2 Hépatites chroniques</u>	12
III-2-1 Hépatite chronique persistante	13
III-2-2 Hépatite chronique active	13
<u>III-3 Cirrhose</u>	14
<u>III-4 Atteintes cholestatiques</u>	14
Cholestase chronique et cirrhose biliaire	
<u>IV- Les atteintes hépatiques vasculaires</u>	
<u>IV-1 Lésions du système veineux hépatique efférent</u>	15
IV-1-1 Syndrome de Budd-Chiari	15
IV-1-2 Maladie veino-occlusive	15
<u>IV-2 Lésions des sinusoides</u>	16
IV-2-1 La péliose	16
IV-2-2 La fibrose périsinusoïdale	16
IV-2-3 La dilatation périsinusoïdale	16
<u>IV-3 Lésions des artères hépatiques</u>	17

<u>V Tumeurs hépatiques</u>	
<u>V-1 Tumeurs bénignes</u>	17
Adénome et hyperplasie nodulaire focale	
<u>V-2 Tumeurs malignes</u>	17
V-2-1 Carcinome hépatocellulaire	17
V-2-2 Angiosarcome	18
<u>VI Classifications et Conclusions</u>	18
<u>C. MECANISMES TOXIQUES</u>	
<u>I Considérations générales</u>	22
<u>II Formation d'époxydes</u>	23
<u>III N-hydroxylation</u>	24
<u>III-1 Amines et amides</u>	24
<u>III-2 Hydrazynes</u>	25
- l'iproniazide	
- l'isoniazide	
- Les autres hydrazines thérapeutiques	
<u>III-3 Dérivés N nitrosés</u>	27
<u>IV Formes toxiques de l'oxygène</u>	27
<u>V Composés soufrés</u>	31
<u>V-1 Alkyl et aryl thiols</u>	31
<u>V-2 Thioamides</u>	32
<u>V-3 Thiocarbamides</u>	32
<u>V-4 Thiocarbamates</u>	33
<u>VI Les composés halogénés : production de radicaux libres</u>	34
<u>VI-1 Tétrachlorure de carbone</u>	34
<u>VI-2 Halothane</u>	35
<u>VII Conséquences biochimiques à l'échelon cellulaire</u>	36
<u>VII-1 Conséquence de l'apparition d'entités radicalaires:</u>	
<u>la Peroxydation Lipidique.</u>	36
Phase d'initiation	
Phase de propagation	
Phase de terminaison	
Hydroperoxydes	

<u>VII-2 Conséquences cellulaires de l'apparition d'entités électrophiles</u>	40
Action sur les protéines	
Action sur les nucléotides	
<u>D. LES HEPATOTROPES D'ORIGINE VEGETALE</u>	
<u>I.Flavonoïdes</u>	42
<u>II. Lignanes</u>	43
<u>III.Coumarines</u>	44
<u>VI. Caroténoïdes</u>	45
<u>V. Glycosides</u>	45
<u>V-1 Irido-glycosides</u>	
<u>V-2 Saponines</u>	
<u>VI. Terpénoïdes</u>	45
<u>E. Modèles pharmacologiques</u>	
<u>I. Evolution des modèles pharmacologiques</u>	47
<u>I-1 Drainage et sécrétions biliaires</u>	47
<u>I-2 Modèles in vivo</u>	47
<u>I-3 Modèles in vitro</u>	49
<u>II. Stratégie pharmacologique et choix des modèles</u>	51
<u>II-1 Test du DPPH</u>	52
<u>II-2 Test sur hépatocytes isolés</u>	52
II-2-1 Choix du toxique	53
II-2-2 tert-butylhydroperoxyde et hépatocytes	54
<u>F. Méthodologie expérimentale</u>	
<u>I Préparation des extraits végétaux</u>	58
<u>II Identifications chimiques</u>	58
<u>II-1 Recherche des alcaloïdes</u>	58
<u>II-2 Recherche de composés flavoniques</u>	59
<u>II-3 Recherche des saponosides</u>	59
<u>II-4 Recherche de dérivés stéroïdiques ou terpéniques</u>	59

<u>II-5 Recherche des tannins</u>	59
<u>II-6 Recherche des quinones</u>	60
<u>III Identifications par chromatographie en couche mince</u>	60
<u>III-1 Recherche des flavonoïdes</u>	60
<u>III-2 Recherche de composés réducteurs</u>	60
<u>IV Test d'inhibition du radical diphenyl picryl hydrazyl</u>	61
<u>V Hépatocytes en suspension</u>	62
<u>V-1 Isolement des hépatocytes</u>	62
V-1-1 Animaux	
V-1-2 Matériels	
V-1-3 Technique d'isolement des hépatocytes	
<u>V-2 Protocole expérimental</u>	63
<u>V-3 Déterminations biochimiques</u>	63
<u>V-4 Traitements statistiques</u>	63
<u>VI Choix du toxique</u>	65
<u>VI-1 Modèle ascorbate-fer</u>	65
VI-1-1 Méthodologie	65
VI-1-2 Résultats et discussion	65
Actions de substances flavoniques et apparentées	
Actions d'extraits végétaux	
VI-1-3 Conclusion	69
<u>VI-2 Modèle au diéthyl maléate</u>	72
<u>VI-3 Modèle au tert-butyl hydroperoxide</u>	72
VI-3-1 Effets à court terme	72
VI-3-2 Etude cinétique sur trois heures	75
VI-3-3 Action de la prométhazine	75
VI-3-4 Répercussion métabolique	76
VI-3-5 Conclusions	78
<u>G. Screening primaire d'extraits végétaux</u>	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	82
<i>Cuscuta americana</i>	86
<i>Momordica charantia</i>	90
<i>Curcuma domestica</i> :	94
<i>Justicia pectoralis</i>	98
<i>Terminalia catappa</i>	102
<i>Tamarindus indica</i>	106
<i>Annona muricata</i>	110
<i>Eupatorium odoratum</i>	113
<i>Xanthoxylum xanthoxylodes</i>	117

<i>Kalanchoe crenata</i>	121
<i>Staudia gabonensis</i>	125
<i>Cochlospermum tinctorium</i>	129
<i>Cochlospermum planchonii</i>	133
<i>Eupatorium cannabinum</i>	137
<i>Euphorbia hirta</i>	141
<i>Juniperus communis</i>	145
<i>Eschscholzia californica</i>	149
<i>Crepis rueppellii</i>	153
<i>Pulicaria orientalis</i>	157
<i>Vaccinium myrtillus</i>	160
<i>Bidens pilosa</i>	164
<i>Annona reticulata</i>	168
<i>Carthamus tinctorium</i>	172
<i>Peumus boldus</i>	176
<i>Capparis spinosa</i>	180
<u>II Remarques et conclusion sur la phase de screening</u>	182
<u>II-1 Relation DDPH / lipoperoxydation</u>	182
<u>II-2 Confrontation de la tradition et de l'expérimentation in vitro</u>	183
<u>II-3 Comparaison des extraits végétaux les plus actifs</u>	184
<u>H Etude de Cochlospermum tinctorium</u>	187
<u>I Etude d'Euphorbia hirta</u>	190
<u>I Effet d'un ajout retardé d'Euphorbia hirta</u>	190
<u>II Influence du solvant d'extraction</u>	190
<u>II-1 Mode opératoire</u>	190
<u>II-2 Contrôle pharmacologique</u>	191
<u>III Tentative de fractionnement d'Euphorbia hirta</u>	192
<u>J Etude de Rosmarinus officinalis</u>	194
<u>I Effet d'un ajout retardé de Rosmarinus officinalis</u>	194
<u>II Influence du solvant d'extraction</u>	194
<u>II-1 Soxhlet I</u>	194
II-1 1 Mode opératoire	
II-1 2 Contrôle pharmacologiques	
<u>II-2 Soxhlet II</u>	196
II-2 1 Mode opératoire	
II-2 2 Contrôle pharmacologiques	
<u>II-3 Caractérisations chromatographiques</u>	199
II-3 1 Recherche des composés réducteurs (Soxhlet I et II)	

II-3 2 Recherche des flavonoïdes (Soxhlet I et II)	
II-3 3 Recherche des triterpènes (Soxhlet I et II)	
<u>II-4 Soxhlet III</u>	202
II-4 1 Mode opératoire	
II-4 2 Contrôle pharmacologiques	
<u>II-5 Caractérisations chromatographiques</u>	205
II-5 1 Recherche des flavonoïdes (Soxhlet III)	
II-5 2 Recherche des triterpènes (Soxhlet III)	
<u>II-6 Conclusions et vérifications</u>	205
** recherche de triterpènes dans les extraits aqueux et hydroalcooliques	
** comparaison de l'activité d'extraits aqueux selon le type d'extraction	
<u>III Fractionnement de l'extrait chloroformique de R officinalis par chromatographie préparative</u>	
<u>III-1 Fractionnement primaire</u>	214
III-1 1 Mode opératoire	
III-1 2 Caractérisation chromatographique	
III-1 3 Contrôle pharmacologique	
<u>III-2 Fractionnement de la zone dépôt</u>	219
III-2 1 Mode opératoire	
III-2 2 Contrôle pharmacologique	
<u>III-3 Fractionnement de la zone 1</u>	219
III-3 1 Mode opératoire	
III-3 2 Contrôle pharmacologique	
<u>III-4 Fractionnement de la zone 1.3</u>	223
III-4 1 Mode opératoire	
III-4 2 Contrôle pharmacologique	
<u>III-5 Fractionnement de la zone 1.4</u>	223
III-5 1 Mode opératoire	
III-5 2 Contrôle pharmacologique	
<u>IV Tentative d'identification de la fraction 1.4.2.</u>	227
<u>IV-1 Chromatographie en couche mince</u>	227
IV-1 1 Identification par le trichlorure d'antimoine	
IV-1 2 Identification par le sulfate de cérium	
IV-1 3 Identification par l'aldéhyde anisique	
<u>IV-2 Chromatographie en phase gazeuse</u>	
<u>couplée à la spectrométrie de masse</u>	233
<u>IV-3 Purification de la fraction 1.4.2 après méthylation</u>	238

A. Introduction et but du travail

Ce travail réalisé au laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Metz en collaboration avec les Laboratoires Dolisos a été effectué dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche, prise en charge en partie par l'Association Nationale de la Recherche Technique. Il est consacré à la sélection, à l'aide de modèles in vitro, d'espèces végétales à effets hépatoprotecteurs, antioxydants et anti-radicaux libres; ainsi qu'au fractionnement et à la purification des extraits les plus actifs. Il complète des travaux précédemment entrepris sur des substances d'origine végétale traditionnellement utilisées dans les affections de la sphère hépatobiliaire. A n'en pas douter, le sujet supporte et mérite des regards différents, ne serait ce qu'en raison de l'extraordinaire richesse des remèdes proposés par la tradition et des énormes possibilités liées à l'exploration ethnopharmacologique de ces connaissances.

Ainsi l'étude de la pharmacopée de moins d'une dizaine de pays africains permet de révéler plus d'une centaine d'espèces végétales traditionnellement utilisées dans ce type d'indications. D'autres pharmacopées, sud-américaine, jamaïcaine, asiatique ou européenne sont également très riches en remèdes hépatotropes. Il conviendrait naturellement de pondérer chacune de ces données en fonction du mode d'utilisation, en monothérapie ou en association; du nombre de tradipraticiens les utilisant ou encore, si la répartition géographique de la plante le permet, des utilisations inter-éthniques. D'une manière générale, toutes les cultures reconnaissent un rôle de première importance au foie. Son activité peut être clairement individualisée ou perçue de manière plus globale, à côté de celle d'autres organes, dans une action "dépurative" ou de "drainage". Il n'est donc pas surprenant que la médecine traditionnelle, et même la médecine populaire, s'appuient dans ce domaine sur un très large arsenal thérapeutique.

Dans nos régions, les affections hépatiques sont dominées par deux grands groupes étiologiques:

- les pathologies hépatiques de nature infectieuse.
- les pathologies hépatiques de nature toxique.

Leurs expressions cliniques, biologiques ou encore histologiques sont d'ailleurs souvent proches voire identiques, ce qui n'est pas sans poser des problèmes de diagnostic différentiel. Si, devant un tableau d'hépatite, l'origine infectieuse, dont l'agent peut être très varié, doit encore être recherchée en première intention, il est, de plus en plus souvent, indispensable d'évoquer la possibilité d'une atteinte toxique et notamment médicamenteuse. Ces dernières, en effet, sont une cause d'atteinte hépatique en progression, eu égard à

l'accroissement constant de la consommation médicamenteuse dans nos pays développés. La prévalence de ces deux groupes a d'ailleurs tendance à s'inverser avec l'âge. Une étude sur les causes d'hépatite aiguë, réalisée à l'hôpital Beaujon de 1974 à 1984, est particulièrement significative à cet égard (Benhamou, 1986). Elle montre que, si l'origine toxique n'est retrouvée que dans 13% des cas sur l'ensemble des adultes, loin derrière l'origine infectieuse; chez les patients de plus de 50 ans la nature toxique prédomine puisqu'elle représente 51,5% des causes d'hépatite aiguë. Cette différence peut s'expliquer par un niveau de médication plus élevé dans ce groupe et probablement par une plus grande sensibilité à l'action toxique du fait de la diminution physiologique de certains mécanismes de protection cellulaire.

Bien évidemment, les atteintes chroniques peuvent, elles aussi, être de nature toxique; la cirrhose éthylique en est probablement l'exemple le plus accompli.

Ces distinctions étiologiques ne se retrouvent pas dans la plupart des pharmacopées traditionnelles à visée hépatique où les usages des extraits végétaux sont justifiés en termes peu précis comme "indiqué dans les affections hépatiques", ce qui peut recouvrir des pathologies extrêmement variées, ou encore par les termes "indiqué en cas d'ictère", ce qui, sous un couvert plus scientifique, reste peu précis. En effet, l'ictère est un signe clinique et non une maladie et, si certains ictères accompagnent une lésion parenchymateuse, d'autres comme ceux traduisant une atteinte primitive des voies biliaires ne sont pas forcément synonymes d'atteinte cellulaire. Enfin, certains états ictériques peuvent apparaître alors que la sphère hépatobiliaire est indemne (ictères hémolytiques par exemple).

Il existe un autre point de discordance entre les Médecines dites traditionnelles et la Médecine dite moderne. Les premières, malgré leur manque de rigueur sémiologique, proposent une pléthore de remèdes. De très nombreux extraits végétaux sont utilisés de manière empirique en monothérapie ou en association par les tradipraticiens. Plusieurs centaines de plantes sont ainsi "indiquées dans les affections hépatiques". La seconde, malgré des connaissances souvent très précises des mécanismes morbides et l'existence de classifications étiologiques parfois très subtiles, ne propose qu'une gamme thérapeutique modeste, se résumant généralement à de savantes associations entre vitaminothérapie et traitements substitutifs à base d'acides aminés et d'extraits de foie lyophilisé. Certains médicaments sont utilisés avec bénéfice sur des troubles extrahépatiques des atteintes cellulaires (prurit, trouble de la coagulation, encéphalopathie), mais des thérapeutiques non substitutives, agissant directement sur la cellule hépatique, sont peu nombreuses.

Le fait que les populations pour lesquelles les Médecines traditionnelles demeurent la forme prépondérante de soins sont probablement moins exposées

au risque d'hépatite toxique que celles des pays plus industrialisés, associé au fait que la plupart des hépatites aiguës, celles d'origine virale, sont généralement spontanément résolutive, laisse à penser que la réputation de certains extraits végétaux pourrait être usurpée, leur utilisation ne faisant qu'accompagner une guérison acquise d'emblée.

Malgré ces restrictions, les pharmacopées traditionnelles représentent un réservoir d'investigations particulièrement intéressant, qu'il s'agisse de valider scientifiquement un savoir empiriquement acquis, et par là valoriser un patrimoine culturel souvent négligé, ou de rechercher de nouvelles voies thérapeutiques.

Ce travail tente de répondre à un triple objectif :

- La mise au point de modèles pharmacologiques, in vitro, représentatifs des mécanismes toxiques présents au niveau hépatocytaire et adaptés à l'étude d'extraits végétaux bruts. Ce travail s'intéresse donc exclusivement aux hépatopathies d'origine toxique dont les mécanismes sont différents de celles d'origine infectieuse. Ces dernières en effet, malgré un tropisme hépatique particulier, répondent aux caractères généraux des agents viraux et bactériens et de ce fait nécessitent des modèles d'étude d'une autre nature.

- Le screening d'extraits végétaux, utilisés traditionnellement en raison de leur vertu hépatotrope, par ces modèles in vitro . Un certain nombre d'espèces végétales dont les indications traditionnelles échappent à la sphère hépatobiliaire sont également testées et permettent d'apprécier la sensibilité des tests proposés.

- La sélection au terme de ce screening des espèces les plus intéressantes, afin de poursuivre les investigations tant au point de vue analytique que pharmacologique.

Ces trois parties sont précédées de la présentation au cours de l'étude bibliographique de deux points qui, bien qu'ils puissent paraître en marge du sujet nous semblent tout à fait essentiels.

Le premier point concerne le survol rapide de la pathologie hépatique d'origine toxique. Il n'a d'autre but que de rappeler que celle-ci, malgré une réponse à l'agression souvent stéréotypée au niveau cellulaire, ne se limite pas aux seules hépatites, mais est extraordinairement variable dans ses traductions morbides, chacune possédant des formes cliniques encore plus nombreuses. Devant le polymorphisme de la réponse à l'agression toxique, le terme générique d'hépatoprotecteur longtemps utilisé semble impropre car il suggère un mécanisme de protection pouvant recouvrir tous les aspects de la maladie.

Le terme d'hépatotrope souvent employé actuellement présente surtout l'avantage d'être d'une précision minimale. Aussi au cours de ce travail les termes d'hépatotrope, d'hépatoprotecteur ou encore d'antihépatotoxique seront utilisés indifféremment.

Le second point est un rappel, volontairement limité, des voies d'activation toxique les plus souvent rencontrées. Il est clair que les agents responsables de l'hépatotoxicité sont extrêmement variés rendant à peu près vaine l'utilisation de tests hautement spécifiques de tel ou tel mécanisme d'activation particulier. Il est cependant possible, comme nous le verrons, de construire, en se basant sur les exemples cités, un modèle adapté à cette étude.

B. Lésions histologiques hépatiques d'origine toxique.

I- Rappel sur l'hétérogénéité cellulaire : lobule et acinus.

L'unité de base classique au niveau du foie est le lobule hépatique, cette entité introduite par Kiernan en 1833 correspondant à une systématisation morphologique évidente au vue de coupes histologiques, le parenchyme se divisant en zones grossièrement hexagonales ayant pour centre une veine hépatique terminale (ou veine centrale) et étant limitées en périphérie par les espaces portes au niveau desquels on individualise aisément une artériole hépatique, une veine porte et un canal biliaire. Cette systématisation aboutit à la division du lobule hépatique en trois zones :

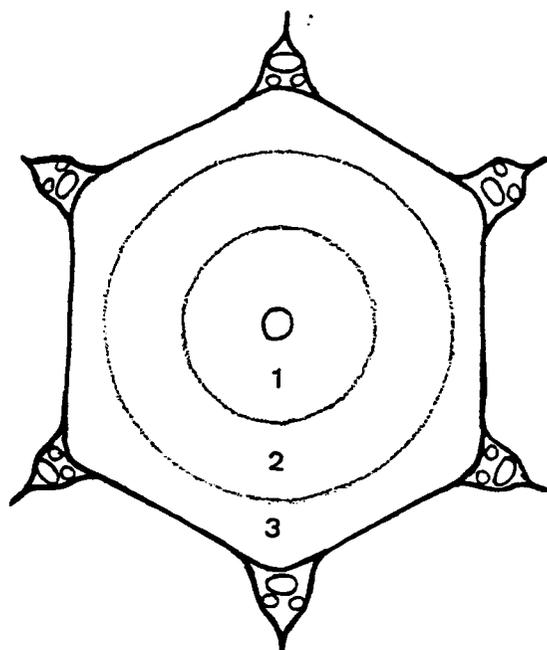
- une zone centrale ou centrolobulaire
- une zone périphérique ou périportale
- une zone intermédiaire

Ces divisions se retrouvent au niveau des descriptions anatomo-pathologiques des lésions focales (hépatite centrolobulaire par exemple.). Cependant, le lobule de Kiernan ne représente pas une unité vasculaire homogène puisque dépendant d'artérioles hépatiques et de veinules portes originaires de différentes branches parentes. Rappaport propose une systématisation fonctionnelle où l'unité de base est représentée par l'acinus hépatique, irrégulier en taille et en forme, axé sur une veine porte terminale de moins de 40 μ de diamètre, une artériole hépatique terminale de 15 à 50 μ et un canal biliaire (Rappaport, 1969). L'acinus hépatique représente la plus petite unité vasculaire et fonctionnelle du parenchyme hépatique puisque tous les hépatocytes d'un même acinus dépendent de la même source vasculaire. Cette structure peut également se diviser en trois régions :

- une région axiale ou zone I, de part et d'autre de l'axe vasculaire afférent
- une région périphérique ou zone III se terminant au niveau des veines hépatiques terminales
- une région intermédiaire ou zone II située entre les deux précédentes

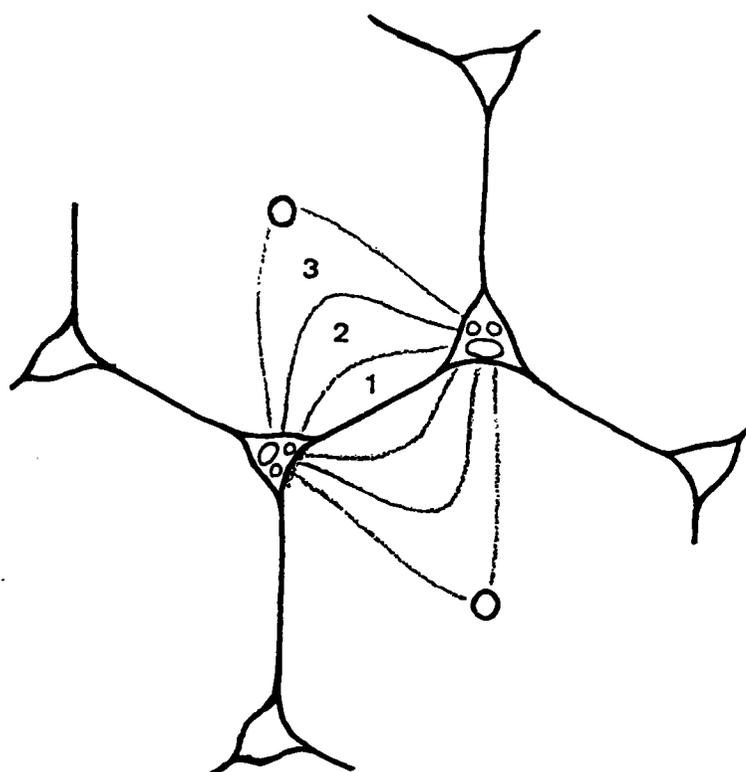
Cette systématisation rend compte de manière plus précise du cheminement d'un toxique apporté par voie sanguine au niveau du parenchyme hépatique. Il est possible d'établir des corrélations entre les zones définies par Rappaport et celles utilisées pour la description des lésions hépatiques et dérivant d'une division lobulaire. La zone centrolobulaire

correspond à la zone III de l'acinus hépatique puisque toutes deux représentent la région voisine de la veine hépatique terminale. Par contre la situation est plus complexe au niveau périportal puisque cette région correspond à trois acini hépatiques. Ces distinctions au sein même du parenchyme hépatique peuvent paraître subtiles mais elles permettent de mieux comprendre la topographie de certaines lésions de nature toxicologique, les populations cellulaires des différentes zones n'étant pas équivalentes de par la concentration de toxique apporté par voie sanguine dans les différentes régions mais également de part les potentialités biochimiques de ces zones. Ainsi les enzymes respiratoires sont plus nombreuses dans la zone I proche de l'axe vasculaire afférent alors que les enzymes microsomiales sont prédominantes dans la région centrolobulaire.



lobule hépatique

- 1 zone centrale ou centrolobulaire
- 2 zone intermédiaire
- 3 zone périphérique ou périportale



acinus hépatique

- 1 région axiale ou zone I
- 2 région intermédiaire ou zone II
- 3 région périphérique ou zone III

II Manifestations aiguës

L'atteinte hépatique d'origine toxique peut revêtir des aspects anatomopathologiques et symptomatologiques variés. Les lésions parenchymateuses sont les plus fréquentes et les plus abondamment décrites mais les substances exogènes sont également incriminées dans la survenue de diverses lésions vasculaires. Elles peuvent enfin induire ou favoriser le développement de tumeurs hépatiques bénignes ou malignes. Ces distinctions, utiles d'un point de vue diagnostique et pronostique, concernent les lésions primaires ; une atteinte vasculaire primitive pouvant avoir des conséquences parenchymateuses au cours de son évolution ou réciproquement.

II-1 Atteintes cytotoxiques ou cytolytiques

II-1-1 Dégénérescence cellulaire

Elle représente souvent le signe d'atteinte hépatique le plus précoce pour de très nombreux toxiques et est, le plus souvent, uniquement limitée à des modifications histologiques. Celles-ci peuvent se résumer à une simple augmentation de la taille cellulaire (ballonnisation), diffuse ou au contraire zonale dans le lobule, avec accumulation de glycogène et d'eau ou prolifération du réticulum endoplasmique. Parfois des anomalies hépatocytaires peuvent se voir sous forme de trinuécléarisation, d'anomalies mitotiques, de corps acidophiles ou d'infiltrat mononucléaire à minima.

La symptomatologie clinique est généralement absente et, du point de vue biologique, des élévations enzymatiques (ALAT, ASAT, phosphatases alcalines) toujours modérées peuvent se rencontrer. L'aflatoxine B1, la diéthylnitrosamine, l'acétylaminofluorène, de nombreux hépatotoxiques à doses faibles mais également certains inducteurs enzymatiques comme le phénobarbital peuvent déterminer de telles modifications qui, si elles se perpétuent, s'accompagnent de nécrose cellulaire.

II-1-2 Nécrose cellulaire

La nécrose cellulaire induite par des hépatotoxiques chimiques (α méthylidopa, isoniazide) peut éventuellement être diffuse, touchant quelques îlots cellulaires par lobule (Rodmann et coll.,1976; Mitchell et coll.,1976); mais elle

revêt le plus souvent l'aspect d'une atteinte focalisée dont la sévérité dépend à la fois du toxique incriminé et de la susceptibilité de l'intoxiqué (idiosyncrasie). Ainsi l'aflatoxine B1, l'allyl formate, le sulfate de fer donnent une nécrose périportale (Rees et Tarlow,1967), le furosémide une nécrose de la zone intermédiaire chez le rat (Walker et coll.,1981), alors que la diéthylnitrosamine, le tétrachlorure de carbone (Slater,1966), l'halothane, l'acétaminophène (Mitchell et Jollow,1975), le bromobenzène (Reid et coll.,1971) et d'une manière générale tous les composés dont la toxicité s'exprime après métabolisation touchent préférentiellement les zones centrolobulaires.

Dans la majorité des cas les hépatites médicamenteuses ou chimiques ne peuvent se différencier sur des critères purement histologiques des autres causes d'hépatite. Cependant, sans être pathognomoniques, certains aspects histologiques sont plus évocateurs, comme l'existence d'hépatocytes géants multinucléés lors d'hépatites à la clométacine (Goldfarb et coll.,1979) ou l'infiltrat inflammatoire semblable à celui de la mononucléose infectieuse dans les hépatites de la diphényl-hydantoïne (Mullick et Ishak,1980). De même, mais de manière moins spécifique, un infiltrat inflammatoire de polynucléaires éosinophiles ou des granulomes épithélioïdes et géantocellulaires suggèrent un mécanisme immunoallergique.

Les symptômes cliniques sont variables selon la sévérité des lésions. Ils peuvent être totalement absents ou au contraire se présenter d'emblée sous la forme d'hépatite fulminante avec encéphalopathie hépatique. Entre ces formes extrêmes tous les degrés sont naturellement observables. Si l'on retrouve généralement une anorexie, une asthénie, des nausées et un ictère (ce dernier signe évoquant d'emblée une pathologie hépatique), il faut être particulièrement vigilant pour démasquer les éventuelles formes anictériques ou encore les cas où les manifestations extrahépatiques sont prédominantes. Ainsi un rash cutané, une hyperthermie, des arthralgies, présents au cours de phénomènes immunoallergiques, peuvent dominer le tableau et égarer pour un temps le diagnostic. Ces derniers signes peuvent également constituer les prodromes d'une hépatite virale qu'il convient naturellement de rechercher.

Biologiquement le signe essentiel est une forte augmentation des transaminases dont le taux plasmatique évolue souvent parallèlement à l'étendue de la nécrose. D'autres indices biologiques peuvent être touchés: augmentation modérée des phosphatases alcalines, allongement du temps de prothrombine, hypotherminémie, augmentation variable des γ GT et des 5' nucléotidases. La mortalité par nécrose hépatique aiguë reste élevée, plus de 50 % pour certaines drogues.

II-1-3 Granulomatose hépatique

Elle est caractérisée par la présence de granulomes au niveau du lobule et de l'espace porte, qui apparaissent généralement dans les quatre premiers mois de l'intoxication et s'accompagnent d'une infiltration portale avec lymphocytes, histiocytes et surtout éosinophiles. Le diagnostic repose essentiellement sur l'examen histologique.

La granulomatose est le plus souvent asymptomatique mais peut, après un certain temps d'évolution, entraîner une hépatomégalie ou un ictère. Habituellement les anomalies hépatiques cèdent à l'arrêt du traitement responsable : allopurinol, carbamazépine, phénylbutazone, quinidine, sulfamides (Zimmerman,1978; Stricker et Spoelstra,1975).

II-1-4 Stéatose

Elle se définit par l'accumulation de lipides, notamment de triglycérides, dans les hépatocytes. On en distingue deux formes dont la clinique, l'histologie et l'évolution diffèrent.

II-1-4-1 Stéatose macrovacuolaire

La cellule hépatique est occupée par une volumineuse vacuole lipidique, unique refoulant le noyau en périphérie, due à une probable perturbation des mécanismes d'excrétion hépatique des triglycérides.

Le plus souvent asymptomatique, elle peut parfois entraîner une hépatomégalie et des douleurs abdominales. Les médicaments les plus souvent incriminés dans sa survenue sont le méthotrexate, l'asparaginase et les corticoïdes (Zimmerman,1978; Stricker et Spoelstra,1975).

II-1-4-2 Stéatose microvacuolaire

Elle est caractérisée par la présence de petites vacuoles lipidiques sans déplacement du noyau et semble être en relation avec une perturbation des phénomènes d'oxydation mitochondriale des acides gras lors d'administrations à

fortes doses de cyclines, d'acide valproïque, de salicylates (Stricker et Spoelstra, 1975; Zafrani et coll., 1982; Zimmerman et Ishak, 1982).

Les symptômes montrent le même spectre de sévérité que lors des phénomènes nécrotiques. Souvent les signes sont bénins à type de nausées, vomissements, élévation modérée des transaminases mais dans certains cas la stéatose peut s'accompagner de désordres hépatiques aigus, notamment d'une insuffisance hépatocellulaire sévère, voire mortelle (tétracyclines).

II-1-5 Phospholipidose

La phospholipidose hépatique correspond à une accumulation de phospholipides dans les lysosomes hépatocytaires. Elle se présente histologiquement sous la forme d'inclusions lamellaires intralysosomiales apparaissant après un traitement prolongé par le maléate de perhexiline (Pessayre et coll., 1979) ou par l'amiodarone (Amstrong et coll., 1984), semblables à celles observables dans les phospholipidoses primaires comme les maladies de Fabry, de Niemann-Pick ou de Tay-Sachs.

Généralement asymptomatique, elle peut cependant dans certains cas revêtir l'aspect d'une hépatopathie pseudoalcoolique avec corps de Mallory, infiltrat inflammatoire à polynucléaires neutrophiles et fibrose de degré variable. Si l'évolution est généralement lentement régressive à l'arrêt du traitement, parfois l'atteinte hépatique peut continuer à s'aggraver évoluant vers la cirrhose et la mort des patients.

Dans le cas du maléate de perhexiline, l'hépatotoxicité semble être en relation avec le déficit génétique d'un isoenzyme du cytochrome P-450, déficit qui aboutit à une diminution de l'hydroxylation du produit et à une accumulation du médicament au niveau des lysosomes hépatiques (Lüllmann et coll., 1975).

L'amiodarone, connue pour être un inhibiteur des phospholipases A1 lysosomiales, pourrait également être concernée par un mécanisme semblable.

Cependant les relations entre phospholipidoses et hépatopathies sont loin d'être entièrement élucidées.

II-2 Atteintes cholestatiques

L'apparition d'une cholestase peut dépendre de trois mécanismes différents :

- l'altération de la sécrétion biliaire par la cellule hépatique.
- l'obstruction des canaux biliaires intrahépatiques par atteinte des petits canaux biliaires portaux.
- l'obstruction de canaux biliaires de grande taille.

II-2-1 Cholestase aiguë hépatocellulaire

II-2-1-1 Cholestase pure

Elle se caractérise au point de vue histologique par la présence préférentiellement centrolobulaire de dépôts de bilirubine sans lésions cellulaires associées. Les médicaments responsables sont principalement les contraceptifs oraux, les androgènes anabolisants et les oestrogènes (Zimmerman et Lewis, 1987). La troléandomycine, connue pour inhiber l'oxydation des oestrogènes, augmente d'ailleurs considérablement la fréquence de l'ictère des contraceptifs oraux.

Cliniquement on retrouve généralement un ictère, un prurit, des urines foncées et au niveau biologique, une hyperbilirubinémie conjuguée et une augmentation des phosphatases alcalines et des γ GT. La régression est constante à l'arrêt du traitement.

II-2-1-2 Hépatite cholestatique

A la cholestase, s'associent un infiltrat inflammatoire et une nécrose hépatocytaire généralement modérée. Les médicaments incriminés sont très nombreux. Dans certains cas le mécanisme toxique pourrait être immunoallergique, l'atteinte hépatique évolue d'ailleurs fréquemment dans un tableau de rash cutané, d'hyperthermie, d'arthralgies; signes d'hypersensibilité très habituellement absents dans les cas de cholestase pure. Les hépatites cholestatiques régressent généralement à l'arrêt du traitement, parfois une cholestase chronique peut persister. Lors d'intoxication médicamenteuse la mortalité est faible, moins de 1 % des cas.

II-2-2 Cholestase aiguë par atteinte des petits canaux biliaires

La cholangite aiguë se caractérise par des lésions inflammatoires au niveau des canaux biliaires portaux. Souvent associée à une cholangiolite, elle se manifeste cliniquement comme une hépatite cholestatique et peut simuler une obstruction aiguë des voies biliaires. Elle a été retrouvée lors de prise d'ajmaline, d'allopurinol, de carbamazépine, de chlorpromazine ou de phénytoïne (Larrey et Erlinger, 1988; Larrey et coll., 1987).

II-2-3 Cholestase aiguë par atteinte des gros canaux biliaires

Elle peut survenir dans des circonstances tout à fait particulières comme l'administration hépatique directe de floxuridine au cours du traitement des métastases hépatiques de certains cancers coliques (Kemeny et coll., 1987).

III-Manifestations Chroniques

III-1 Stéatoses et Phospholipidoses

Les signes histologiques et cliniques restent généralement identiques à ceux décrits précédemment. Le risque d'intoxication chronique, dû à la poursuite des traitements impliqués devant un tableau asymptomatique ou à un relargage progressif à partir d'un site de stockage tissulaire après arrêt du traitement, est lié à l'apparition d'une fibrose voire d'une cirrhose en relation avec une atteinte nécrotique secondaire.

III-2 Hépatites chroniques

Un toxique responsable d'une nécrose hépatocytaire aiguë peut entraîner une hépatite chronique lorsque :

- l'hépatite aiguë initiale, asymptomatique, passe inaperçue
- le toxique responsable n'a pu être identifié et continue à être administré

- le toxique, bien qu'identifié, a été réadministré
- la maladie hépatique continue à évoluer malgré l'arrêt de l'exposition toxique, en raison d'un phénomène de relargage ou d'un mécanisme autoimmunitaire.

III-2-1 Hépatite chronique persistante

L'hépatite chronique persistante qui se prolonge de nombreux mois (plus de 6 mois) évolue, en règle générale, favorablement. Elle se caractérise du point de vue histologique par une portite, l'infiltrat inflammatoire étant limité à l'espace porte; une fibrose limitée peut également s'observer, le mur portal n'est pas franchi et les lésions hépatocytaires sont donc minimes.

Les symptômes cliniques peuvent être absents ou se résumer à un ictère et des signes non spécifiques.

Les manifestations biologiques sont modérées souvent à la limite de la normale.

III-2-2 Hépatite chronique active

L'hépatite chronique active est caractérisée par un infiltrat inflammatoire portal et lobulaire, une fibrose plus ou moins extensive, une nécrose hépatocytaire franche. En France, les médicaments les plus souvent impliqués ont été : l'oxyphénisatine (retirée), l'acide tiénilique, la clométacine, l'alpha méthyl dopa, le méthotrexate, la papavérine, le suloctidil.

Le tableau clinique est variable, on retrouve souvent une asthénie, une hépatomégalie, un ictère.

Du point de vue biologique, les transaminases sériques sont élevées, les phosphatases alcalines normales ou modérément augmentées, des signes d'insuffisance hépatocellulaire peuvent apparaître en cours d'évolution. Les gamma globulines sériques, notamment les IgG, sont augmentées et l'on observe fréquemment la présence d'anticorps anti-tissus dans le sérum, habituellement sous la forme d'anticorps anti-muscle lisse ou d'anticorps anti-noyau; mais parfois, dans des cas plus spécifiques, d'anticorps anti-microsomes et d'anticorps anti-mitochondriaux. Contrairement à ce qui se passe dans les hépatites autoimmunes, le titre de ces auto-anticorps tend à diminuer après l'interruption du toxique (Homberg et coll., 1985).

III-3 Cirrhose

La cirrhose hépatique, manifestation terminale commune à de très nombreux toxiques, est caractérisée par une destruction de l'architecture lobulaire, une fibrose extensive, une nécrose hépatocytaire majeure et l'apparition de nodules de régénération. L'ensemble de ces perturbations aboutit à trois types de conséquences qui sous-tendent la symptomatologie clinique :

- la réalisation d'une anastomose porto-cave intrahépatique permettant le passage dans la circulation générale de substances non épurées, pouvant aboutir dans certaines circonstances pathologiques à une encéphalopathie hépatique par ammoniémie.

- la modification des régimes circulatoires au niveau du réseau veineux hépatique avec installation d'une hypertension portale pouvant être responsable d'un syndrome oedémato-ascitique ou d'une hémorragie viscérale.

- une déchéance hépatocytaire marquée en fin d'évolution aboutissant à une insuffisance hépatocellulaire avec perturbations métaboliques et troubles de la coagulation.

III-4 Atteintes cholestatiques

Cholestase chronique et cirrhose biliaire

Les hépatites cholestatiques aiguës peuvent être suivies d'une cholestase qui peut se prolonger plusieurs années après l'arrêt du traitement (chlorpromazine, ajmaline, antidépresseurs tricycliques). Dans la majorité des cas l'ictère finit par disparaître; parfois celui-ci persiste et une cirrhose biliaire se constitue. Le tableau clinique simule alors une cirrhose biliaire primitive avec à la biopsie un infiltrat inflammatoire et une destruction partielle des canaux biliaires interlobulaires et septaux dont le mécanisme, incomplètement élucidé, pourrait être de nature autoimmune (Zimmerman, 1978).

IV- Les atteintes hépatiques vasculaires

Les lésions, d'origine toxique, du système veineux efférent et des sinusoides sont les plus courantes bien que tous les vaisseaux du foie puissent être touchés.

IV-1 Lésions du système veineux hépatique efférent

IV-1-1 Syndrome de Budd-Chiari

Les contraceptifs oraux peuvent conduire à une complication rare mais très grave, le syndrome de Budd-Chiari, qui représente l'ensemble des manifestations liées à l'oblitération totale ou partielle de tout ou partie des troncs des veines sus-hépatiques. De telles manifestations sont trois fois plus fréquentes chez les femmes utilisant des contraceptifs oraux que chez celles n'en utilisant pas (Valla et Benhamou, 1988). La latence clinique varie entre quelques semaines et plusieurs années et les relations entre doses d'oestrogènes et délais d'apparition ne sont pas clairement établies (Zafrani, 1983).

IV-1-2 Maladie veino-occlusive

La maladie veino-occlusive se définit par l'existence d'une oblitération fibreuse non thrombotique des petites branches des veines sus-hépatiques et résulte généralement d'une cause exogène (Zafrani, 1983): irradiation, alcaloïdes pyrrolizidiniques contenus dans des plantes genre *Crotalaria*, *Hélotropium* ou *Senecio* et surtout de médicaments antinéoplasiques et immunosuppresseurs : 6-thioguanine, cytosine-arabinoside, mitomycine, uréthane, azathioprine, 6-mercaptopurine (Zafrani et coll., 1983). L'évolution peut se faire sur un mode fulminant ou de manière chronique vers la cirrhose hépatique.

IV-2 Lésions des sinusoides

Elles sont essentiellement représentées par la péliose et la fibrose péricapillaire.

IV-2-1 La péliose

La péliose est due à une altération de la barrière sinusoidale se traduisant par l'existence de larges zones de communication laissant passer les globules rouges de la lumière du sinusoides vers l'espace périnusoidal de Diss qui devient dilaté (Zafrani,1983; Zafrani et coll.,1984).

Elle consiste en la présence de cavités de taille variée, disséminées dans tout le parenchyme hépatique sans prédominance topographique intralobulaire particulière et peut s'exprimer par une insuffisance hépatocellulaire, une hypertension portale ou un tableau d'hémopéritoine mais reste de manière générale asymptomatique. Elle semble le plus souvent de nature toxique et peut apparaître à la suite d'une prise de stéroïdes anabolisants (Nadell et Kosek,1977), de contraceptifs, de dérivés arsenicaux ou d'une exposition prolongée au chlorure de vinyle (Valla et Benhamou,1988; Zafrani et coll.,1983). Elle a pu être reproduite expérimentalement chez l'animal par administration de lasiocarpine, de monocrotaline ou de phalloïdine (Allen et Carstens,1971; Tuchweber et coll.,1973).

IV-2-2 La fibrose périnusoidale

La fibrose périnusoidale est elle aussi responsable d'hypertension portale. Son apparition a été notée au cours d'expositions à l'arsenic, au sulfate de cuivre, au chlorure de vinyle ou lors de prises de méthotrexate, d'azathioprine, de 6-mercaptopurine, de thorotrast ainsi qu'au cours d'hypervitaminoses A (Zafrani et coll.,1983). Certains de ces agents peuvent également déterminer l'apparition de péliose et une filiation entre les deux états morbides peut être envisagée.

IV-2-3 La dilatation périnusoidale

Sa cause principale est la prise de contraceptifs oraux et plus rarement d'azathioprine. Cette atteinte localisée dans la région périportale du lobule hépatique est souvent asymptomatique mais peut entraîner dans certains cas une hépatomégalie et des douleurs abdominales. Sa prévalence est difficile à apprécier en raison de sa latence clinique.

IV-3 Lésions des artères hépatiques

Les traitements par oestroprogestatifs peuvent induire un épaissement de la paroi de différentes artères, notamment des artères hépatiques. Habituellement asymptomatiques, ces lésions peuvent parfois conduire à une nécrose hémorragique multilobulaire.

V Tumeurs hépatiques

V-1 Tumeurs bénignes

Adénome et hyperplasie nodulaire focale

L'adénome est une tumeur hépatique bénigne constituée d'hépatocytes normaux disposés en travées plus ou moins régulières de deux ou trois cellules d'épaisseur. La fréquence de cette tumeur paraît fortement accrue lors de prise de contraceptifs oraux, de stéroïdes anabolisants et androgéniques.

L'hyperplasie nodulaire focale unique ou multiple, à la différence de l'adénome, est constituée d'un nodule central duquel partent des éléments fibreux formant un tractus stellaire. L'implication des oestroprogestatifs dans leur genèse est moins évidente mais leur prise aggrave les anomalies vasculaires observées dans ces deux types anatomopathologiques très vascularisés et favorise leurs complications à type d'hémorragies intratumorales ou sous capsulaires et d'hémopéritoïnes qui peuvent être mortels.

V-2 Tumeurs malignes

V-2-1 Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire est une tumeur maligne développée à partir des hépatocytes. Il peut faire suite à une exposition à des stéroïdes androgéniques et, dans ce cas, se distingue de celui compliquant une cirrhose car il touche des adultes plus jeunes, donne moins de métastases et s'accompagne d'une élévation en α foetoprotéine moins importante.

De nombreux xénobiotiques à usage non thérapeutique sont également impliqués dans la survenue de tels carcinomes. Leur structure chimique est variée, dérivés aromatiques (benzène...), dérivés halogénés (chlorure de vinyle), dérivés nitrés (nitroamines, nitroamides), aflatoxines. La pathogénie semble être

en relation avec la formation au cours de leur métabolisation d'un carcinogène ultime de fort pouvoir électrophile.

V-2-2 Angiosarcome

L'angiosarcome hépatique est une tumeur maligne de la cellule endothéliale sinusoidale. Sa relation avec une exposition au thorostrat, au chlorure de vinyle, à l'arsenic, au sulfate de cuivre semble bien établie. Ces toxiques sont également responsables de péliose et de fibrose périsinusoïdale de sorte qu'une filiation entre les lésions bénignes de la barrière sinusoidale et l'angiosarcome est possible et a d'ailleurs été retrouvée expérimentalement dans le cas du chlorure de vinyle chez les rongeurs.

VI Classifications des lésions chimiquement induites et conclusion

Plusieurs essais de classification des lésions chimiquement induites ont été réalisés. Ces tentatives de relier modifications histologiques et mécanismes biochimiques sont cependant délicates, notamment en raison de l'évolution constante des connaissances sur les processus d'actions toxiques.

Dans les années cinquante (Drill, 1952), les investigations ont surtout porté sur les toxiques industriels, CCl_4 , CHCl_3 , C_6H_6 , BrC_6H_5 , arsenic, phosphore, et de ce fait les classifications comportent très peu de substances utilisées en thérapeutique.

En 1959, Popper et Schaffner proposent une classification basée sur les modifications morphologiques et différencient ainsi cinq groupes de réactions :

- un premier groupe correspond à des altérations hépatocellulaires zonales sans réaction inflammatoire, se traduisant soit par une nécrose, soit par une stéatose, mais toujours limitées à une région particulière du foie. Le tétrachlorure de carbone, un des chefs de file de ce groupe, est largement utilisé expérimentalement à cette époque; on lui reconnaît un certain nombre d'avantages, son métabolisme est bien connu mais se situe très loin de la clinique médicale.

- un deuxième groupe correspond aux cholestases intrahépatiques; il comporte des substances sans analogie structurale (chlorpromazine, chlorothiazide, stéroïdes, hypoglycémiantes oraux), produisant chez un faible

pourcentage de la population un ictère semblable à celui de l'obstruction biliaire extrahépatique, sans relation dose-effet et de confirmation expérimentale difficile chez l'animal.

- un troisième groupe correspond aux nécroses hépatiques avec réactions inflammatoires, l'élément prépondérant étant l'évolution vers une nécrose massive et diffuse (iproniazide, zoxazolamide, cinchophen).

- un quatrième groupe dénommé inclassable ("unclassified group") regroupe les modifications morphologiques qui n'entrent dans aucun schéma particulier.

- un cinquième groupe, enfin, rassemble les cancers hépatiques

Zimmerman en 1968 propose une classification plus complexe, prenant en compte non seulement les altérations morphologiques mais également les mécanismes d'actions supposés et les circonstances d'exposition. Cette approche est intéressante car elle permet d'introduire une notion nouvelle, celle d'idiosyncrasie. En effet toute manifestation toxique y est considérée comme étant la conséquence soit de l'action d'un hépatotoxique intrinsèque, soit d'une manifestation d'idiosyncrasie. Dans le premier cas, l'incidence est élevée, il existe un effet-dose et la confirmation expérimentale est facile chez l'animal. Le second cas s'oppose point par point au premier et permet d'introduire une notion importante, concernant l'hépatotoxicité humaine, qui est celle de la réactivité de l'hôte, notion qui prend toute sa dimension en pharmacovigilance. Les altérations morphologiques décrites sont de trois types, cytotoxique, cholestatique ou mixte, recoupant celles de la classification de Popper et Schaffner.

Zimmerman dégage également une différence liée aux circonstances d'expositions toxiques en distinguant un aspect toxicologique de surdosage chimique et un aspect iatrogénique pour lequel les lésions apparaissent lors d'une utilisation thérapeutique aux doses habituelles.

Enfin, il divise les hépatotoxiques intrinsèques en deux groupes, les hépatotoxiques directs dont les lésions primaires sont de nature structurale, leur chef de file étant le tétrachlorure de carbone et les hépatotoxiques indirects dont les désordres primaires sont de nature métabolique, le chef de file expérimental étant la D galactosamine.

Les tentatives de relier dans une même classification les altérations anatomoclinique et les mécanismes d'actions toxiques ont, depuis, été quelque peu abandonnées. Leur intérêt reste surtout intellectuel dans la mesure où cliniciens et toxicologues ont des préoccupations différentes, ce qui permet l'existence de classifications distinctes, à visée diagnostique et pronostique pour les médecins et plus mécanistique pour les toxicologues.

Si, dans l'ensemble, les travaux de Zimmerman sont toujours de mise, il faudrait aujourd'hui y adjoindre un chapitre, probablement promis à un essor particulier dans les années à venir, qui est celui des hépatopathies de nature immunologique. Ces dernières peuvent apparaître suite à une modification de certaines molécules exprimées à la surface de l'hépatocyte du fait de l'action d'un métabolite réactif, conduisant ainsi à l'apparition d'un néoantigène membranaire ou être en relation avec l'apparition d'anticorps anti-tissus (antinoyau, antimuscle lisse, antimitochondrie ou antimicrosome) que l'on retrouve également dans les cas d'hépatites chroniques actives autoimmunes ou de cirrhoses biliaires primitives. Les processus induisant de tels mécanismes immunologiques restent incomplètement expliqués, mais demeurent cependant tributaires de la formation princeps d'un métabolite réactif, les désordres immunitaires n'étant qu'une expression physiopathologique particulière.

Nous venons de voir que les expressions morbides liées à une atteinte hépatique peuvent être extrêmement variées, et encore n'avons nous évoqué que les seules étiologies toxiques. En aucun cas elles ne sauraient être réduites, du point de vue clinique, aux seules "hépatites", même si celles-ci sont probablement les atteintes les plus fréquentes et sans aucun doute celles dont l'abord expérimental reste le plus aisé. Par conséquent, l'utilisation du terme d'hépatoprotecteur, très largement utilisé en phytothérapie, est d'un intérêt tout relatif s'il ne s'accompagne pas d'une référence précise à la pathologie qu'il est censé soulager. Aussi les indications très vagues retrouvées dans les pharmacopées traditionnelles, ou du moins la pauvreté sémiologique de leurs transcriptions écrites, affaiblissent quelque peu la démarche ethnopharmacologique dans la mesure où d'éventuels effets sur le parenchyme hépatique, sur la sécrétion biliaire voire sur de simples désordres digestifs sont décrits par un terme unique, l'hépatoprotection.

La précision sémiologique est d'ailleurs parfois faussement rassurante et d'une manière générale la description des effets d'une drogue est toujours utile. Le cas de Ziziphus mauritiana en est une parfaite illustration. Cette espèce retrouvée dans la pharmacopée du Niger sous la rubrique "hépatotropes", bénéficie d'une indication clinique plus complète. On précise que cette espèce est utilisée en cas "d'ictère avec oedème et ascite (cirrhose)". Cette précision, rare, est d'autant plus intéressante que la situation ainsi décrite peut correspondre à une cirrhose décompensée, état pour lequel la thérapeutique actuelle demeure, malheureusement, purement symptomatique. La description de l'effet d'une décoction de racines de cette plante est ainsi rédigée : "l'effet diurétique est franc et rapide"; il est donc fort probable que le bénéfice tiré par le patient de l'utilisation de Ziziphus mauritiana soit, là encore, de nature

purement symptomatique. Cette espèce devrait donc en toute logique être classée dans la catégorie des diurétiques et non dans celle des hépatotropes.

Si les pharmacopées traditionnelles permettent d'établir une première sélection parmi les espèces végétales potentiellement actives sur les désordres hépatiques au sens large, seul le développement de techniques *in vitro*, capables d'un screening rapide et économiquement acceptable, permettra de cibler plus précisément l'action de ces drogues et notamment d'évaluer leur potentiel anti-toxique au niveau de la cellule hépatique. Encore faudra-t-il que le modèle expérimental utilisé corresponde à un mécanisme toxique suffisamment général pour être représentatif des nombreuses voies d'activation toxique pouvant être rencontrées dans l'organisme.

C. MECANISMES TOXIQUES

I Considérations générales

La toxicité d'une substance chimique dépend d'un certain nombre de mécanismes séquentiels qui conditionnent son devenir et l'intensité de ses effets biologiques. Certains, comme l'absorption, la distribution tissulaire, l'excrétion, ne seront pas évoqués ici malgré leur importance concernant la disponibilité du toxique au niveau de son site d'action. Seuls seront envisagés les mécanismes cellulaires de biotransformations pouvant aboutir à un effet préjudiciable à l'économie cellulaire et en particulier à la cellule hépatique ; le foie représente, en effet, l'organe cible de choix en raison de son rôle prépondérant au cours de ces transformations. Cette évocation ne se veut, ni ne pourrait, être exhaustive tant les mécanismes sont divers et les variations individuelles nombreuses. Elle n'a d'autre but que de montrer, devant la diversité des mécanismes mis en jeu, que le concept même de substance ou d'extrait végétal hépatoprotecteur ne peut s'appliquer que dans un cadre restrictif, limité à un mécanisme biochimique ou à une voie toxique bien déterminés.

D'une manière générale, les transformations métaboliques d'un xénobiotique consistent en la transformation enzymatique d'un composé lipophile en un composé plus polaire, l'augmentation de l'hydrosolubilité se traduisant par une diminution des capacités de passage transmembranaire et de l'affinité envers les protéines tissulaires ou plasmatiques, par une augmentation du degré d'ionisation, par une excrétion plus aisée et donc au total par une toxicité moindre.

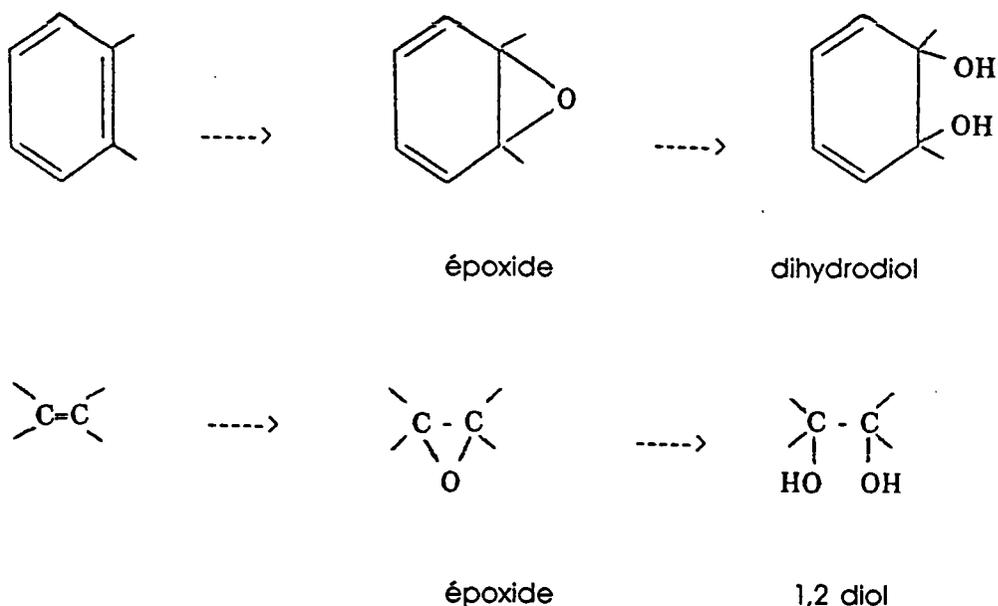
L'accroissement de la taille et de la polarité d'une substance xénobiotique se réalise par des réactions de couplage entre cette dernière et des composés endogènes : hydrocarbones (ac. glucuronique), acides aminés (glycine), oligopeptides (glutathion) ou encore par des réactions d'acétylation, de méthylation ou de sulfonation. Ces réactions dites de conjugaison ou réactions de phase II, extrêmement communes, ne peuvent se réaliser que si le toxique possède certains groupements fonctionnels (OH, NH₂, COOH, SH) sur lesquels le conjuguant vient se fixer par addition.

Si quelquefois des conjugaisons directes sont possibles, en règle générale, les toxiques nécessitent une transformation préalable, réaction de phase I ou de fonctionnalisation, qui permet de créer ou de rendre accessibles les groupements précédemment cités et dont l'existence conditionne les possibilités de conjugaison. Si les réactions de phase II se traduisent presque invariablement par une diminution de la toxicité, celles de la phase I peuvent faire apparaître,

dans certains cas, des métabolites dont la toxicité est supérieure à celle des composés parents . Bien que de nombreux tissus soient à même d'abriter ces réactions, le foie, par sa situation et surtout par sa richesse enzymatique est le principal organe de la biotransformation des xénobiotiques et il est de ce fait particulièrement affecté par les réactions de toxification liées à ces métabolisations. Ces réactions ont lieu dans la grande majorité des cas au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques où le système des monooxygénases à fonction mixte joue un rôle tout à fait prépondérant. Cependant, ces transformations sont parfois réalisées par des éléments non microsomaux comme les mitochondries ou le cytosol. Enfin, d'autres organes participent également à ces métabolisations de manière habituelle (poumon, rein, tractus gastrointestinal) ou occasionnelle (rate, cerveau, coeur, testicule, muscle, surrénale, rétine).

II Formation d'époxides

L'oxydation microsomiale peut entraîner la formation de composés intermédiaires à type d'époxides par ouverture de la double liaison tant pour des composés aromatiques qu'oléofiniques.



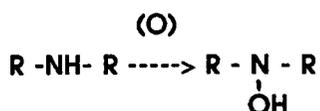
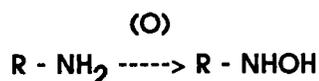
L'existence de métabolites dérivant d'un époxide a été mise en évidence pour de très nombreux composés aromatiques comme le benzène, le naphthalène, l'antracène, le phénanthrène, le pyrène, le benzantracène. D'autres carcinogènes potentiels comme l'aflatoxine B₁ forment également un époxide, tout comme des haloalcanes (1-bromoalcane) ou des alcènes halogénés (chlorure de vinyle). Ces époxides sont responsables d'alkylation ou d'arylation

par liaisons covalentes sur des sites nucléophiles des macromolécules cellulaires, notamment au niveau de leurs groupements thiols et sont impliqués dans les mécanismes d'initiation de la cancérogénèse des hydrocarbures polycycliques et de l'hépatotoxicité des halobenzènes.

III N-hydroxylation

III-1 Amines et amides

Il existe de nombreux arguments concernant l'importance de la N-hydroxylation dans les mécanismes toxiques. Cette hydroxylation peut probablement se réaliser par deux mécanismes différents selon qu'elle est catalysée par une monooxygénase à flavine (mécanisme ionique) (Ziegler, 1980) ou une monooxygénase à cytochrome P-450 (mécanisme radicalaire) (White et Coon, 1980). Dans ce dernier cas, la N-oxygénation ne concernerait que les arylamines, les N-arylamines, les carbamates et d'une manière générale les composés ne possédant pas d'hydrogène sur le carbone; en effet, les alkylamines aboutissent au niveau du cytochrome P-450 à une C-hydroxylation après réarrangement radicalaire, ce qui permet secondairement une N-déalkylation. Les hydroxylamines sont les premiers produits de l'oxygénation des alkyls ou des aryls amines primaires ou secondaires.



La stabilité de ces hydroxylamines est limitée en présence d'air ou d'autres oxydants, notamment pour les arylhydroxylamines et la toxicité de cette classe peut être en relation avec la formation d'un cation radical très réactif lors de leur décomposition (Kadlubar et coll., 1976). D'autre part, les hydroxylamines sont facilement oxydées en de nombreux produits dont la nature dépend du nombre et du type de substituants portés par l'azote:

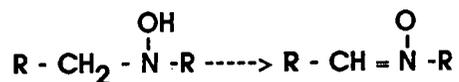
Les arylhydroxylamines sont oxydées en dérivés nitroso qui peuvent secondairement réagir avec des amines ou des hydroxylamines pour donner des composés azo ou azoxy.



Les hydroxylamines aliphatiques primaires sont oxydées en oximes relativement stables.



Les hydroxylamines issues d'amines secondaires portant au moins une chaîne aliphatique peuvent former des nitrones, plus réactives et susceptibles d'attaques nucléophiles.



La N-oxygénation d'amines tertiaires, aromatiques ou aliphatiques, donne des amines oxides stables qui, dans leur grande majorité, sont moins toxiques et moins actives que les amines parentes (Chasseaud, 1973).

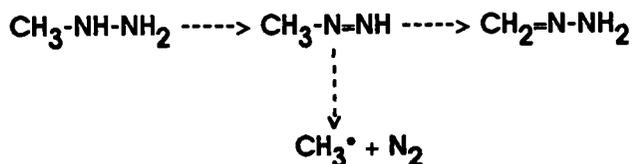
Les acides hydroxamiques sont les produits initiaux de l'oxydation des amides. Les acylhydroxylamines sont extrêmement diverses; les acides arylhydroxamiques sont généralement beaucoup plus stables que les hydroxylamines, dont ils possèdent certaines propriétés, mais peuvent donner des dérivés N-O acyls réactifs.

III-2 Hydrazynes

Les hydrazynes sont parmi les dérivés azotés les plus toxiques; ceci est particulièrement vrai pour les composés industriels mais a également entraîné le retrait du marché de certains médicaments en raison de lésions hépatocellulaires. Ces hydrazynes sont oxydées en diazènes qui forment secondairement des hydrazones (Lemal et coll., 1973).



Les mécanismes exacts de la toxicité sont peu connus; ils pourraient consister en une inhibition des monoamines oxydases et, pour certaines hydrazynes méthyliées, particulièrement sensibles à la N-oxydation, en l'apparition d'un radical libre trichlorométhyl.



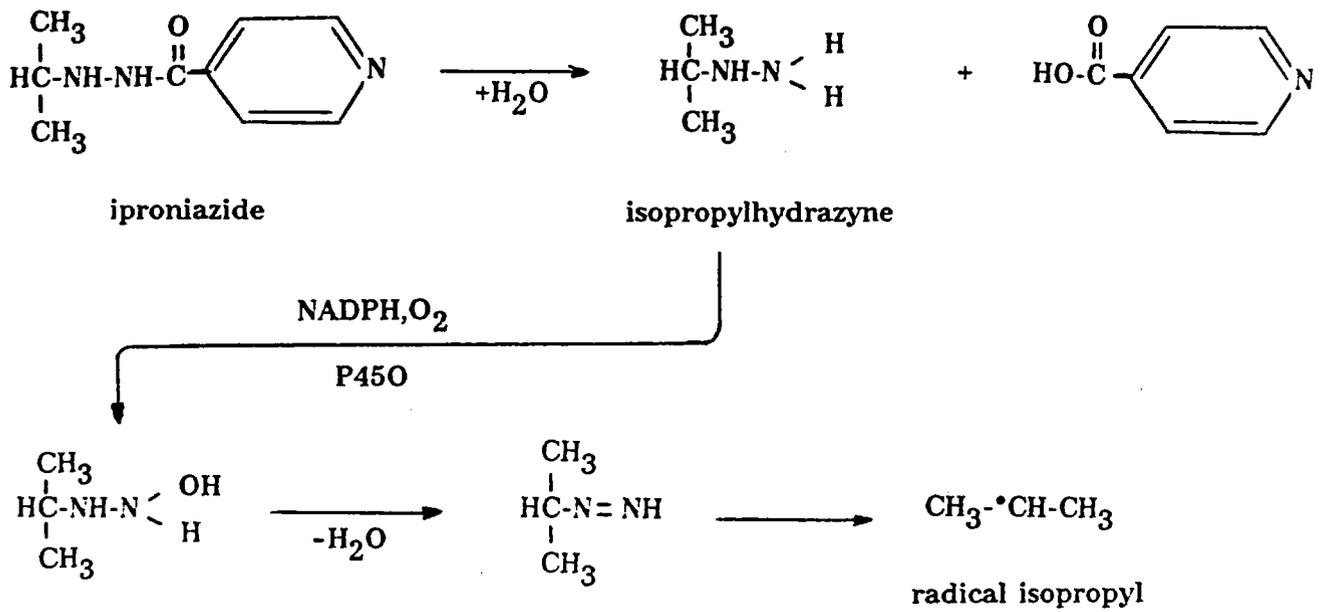


Schéma toxique de l'Iproniazide

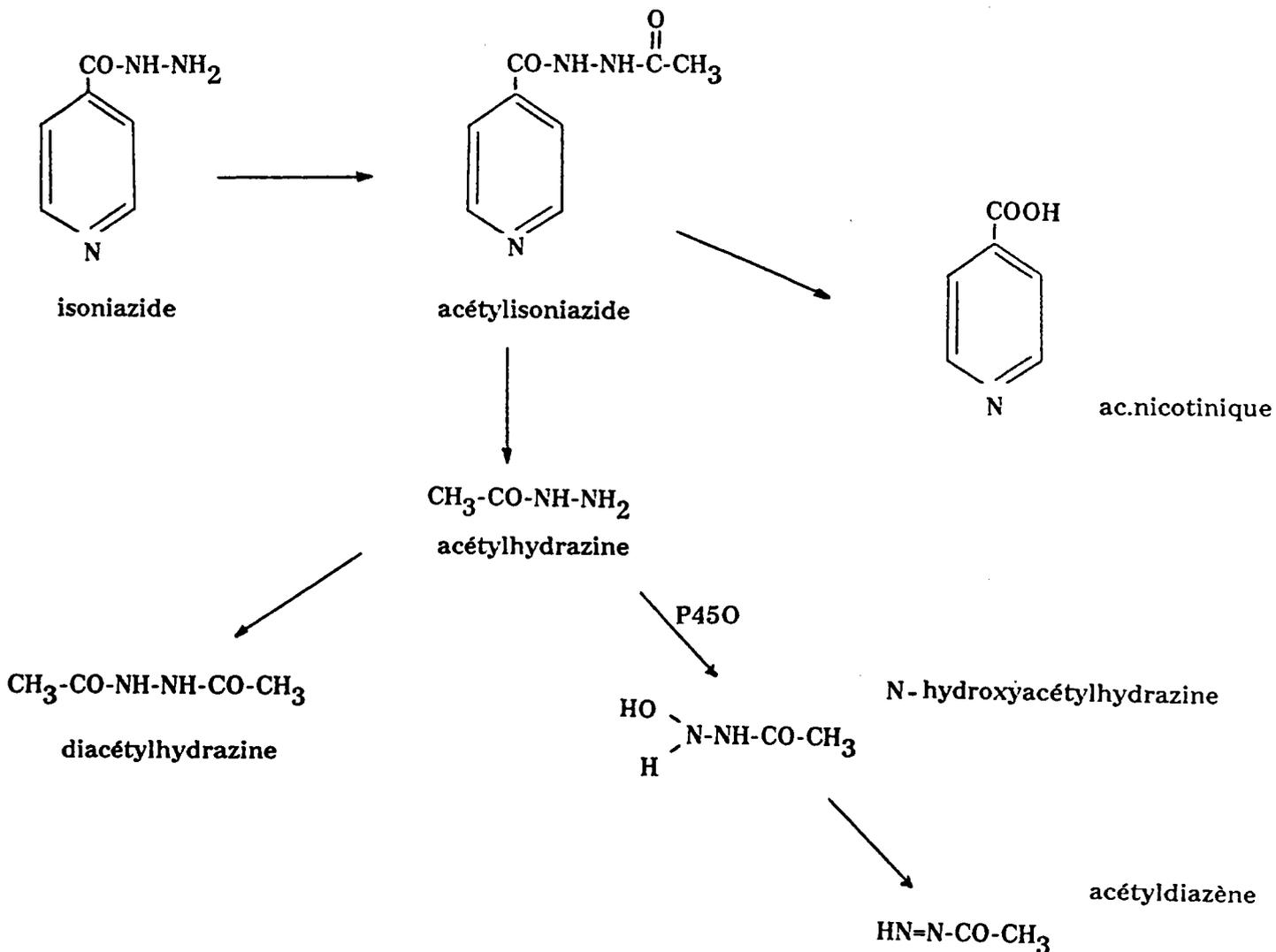


Schéma toxique de l'Isoniazide

L'apparition de formes radicalaires est également envisagée au cours de la métabolisation de certaines hydrazines utilisées en thérapeutique humaine :

- l'iproniazide -

Utilisé en thérapeutique comme antidépresseur, il fait partie du groupe des inhibiteurs de la monoamine oxydase. Il subit une hydrolyse aboutissant à l'acide isonicotinique d'une part et à l'isopropylhydrazine d'autre part. Ce dernier composé, après oxydation au niveau du cytochrome P-450 puis déshydroxylation, donne naissance à un composé azo aliphatique pouvant former un radical libre isopropyle, $\text{CH}_3\text{-}^\bullet\text{CH-CH}_3$, qui peut se fixer aux macromolécules cellulaires ou induire un processus peroxydatif.

Bien que l'élévation des transaminases soit fréquente (10 à 20 % des patients traités), l'incidence des ictères n'est estimée qu'à 1 % et celui des hépatites mortelles à 0,2 %. L'ictère est en relation avec une hépatite par nécrose cellulaire, souvent extensive, apparaissant 1 à 3 mois après le début du traitement. La cholestase est secondaire. Les signes immunoallergiques sont rares; cependant un anticorps antimitochondrial spécifique, l'anti M6, a été découvert chez les patients atteints d'hépatite à l'iproniazide. Un double mécanisme, toxique et dans certains cas immunitaire, semble donc pouvoir exister (Homberg et coll., 1985).

- l'isoniazide

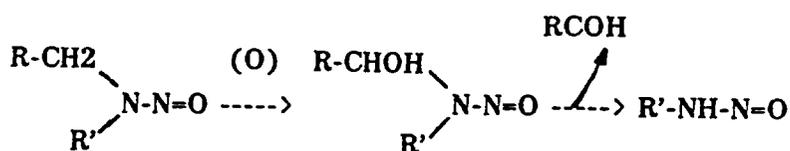
Largement utilisé dans le traitement des tuberculoses, il peut entraîner des lésions hépatiques à type de cytolyse chez 0,5 à 2 % des patients traités. Ce risque augmente lors d'utilisation concomitante de rifampicine en raison de l'effet inducteur de cette dernière. La toxicité peut s'exprimer par un mécanisme identique à celui décrit précédemment pour l'iproniazide, cette voie semble cependant accessoire chez l'homme. La voie principale de métabolisation comporte en effet une acétylation de la molécule d'isoniazide formant l'acétylisoniazide. Après scission du résidu isonicotinique par hydrolyse, l'acétylhydrazine peut subir une seconde acétylation en diacétylhydrazine mais surtout une hydroxylation au niveau des cytochromes P-450 aboutissant à une N-hydroxy-acétylhydrazine puis à un acétyldiazène instable. La nécrose cellulaire est consécutive à une atteinte des macromolécules cellulaires par liaisons covalentes dans lesquelles le groupement acétyl est retrouvé en entier. Ce fait permet de suspecter l'existence de deux métabolites toxiques ultimes potentiels, l'ion acétyl-omnium et le radical acétyl, sans que les produits formés puissent préférer une forme chimique par rapport à l'autre (Mitchell et coll., 1976).

- Les autres hydrazines thérapeutiques

La toxicité d'autres hydrazines utilisées en thérapeutique semble plus discutée. La phénelzine, qui donne expérimentalement des angiosarcomes hépatiques chez la souris, et la phéniprazine peuvent entraîner des lésions hépatiques sévères alors que l'isocarboxacide et l'hydralazine s'avèreraient moins hépatotoxiques. Cette toxicité différentielle est probablement en relation avec la structure chimique, dans la mesure où les trois composés qui paraissent les plus "dangereux", l'iproniazide, la phéniprazine et la phénelzine, peuvent tous trois aboutir à la formation d'un radical libre au sein duquel peuvent apparaître des phénomènes de résonance électronique ou de réarrangements radicalaires internes les rendant plus stables.

III-3 Dérivés N nitrosés

La responsabilité des nitrosamines et des nitrosamides dans la cancérogénèse est reconnue chez l'animal et fortement suspectée chez l'homme. Dès 1954, Barnes relève la toxicité de la diméthylnitrosamine chez l'homme et en 1956 Magee démontre le pouvoir cancérigène de ce composé chez le rat où des doses de 200 ppm entraînent la mort en 5 à 6 semaines suite à des lésions hépatiques graves et celles de 50 ppm l'apparition de tumeurs hépatiques malignes en moins d'un an. Ce pouvoir cancérigène est retrouvé chez le rat pour 80 % des nitrosamines et pour toutes les nitrosamides ; de nombreuses autres espèces animales y étant également sensibles. Ce pouvoir résulte de la formation d'un métabolite réactif alkylant produit à la suite de l'hydroxylation microsomiale de l'azote.



IV Formes toxiques de l'oxygène

Voilà plus de cent ans que l'on sait que l'oxygène, essentiel à l'expression de la plupart des systèmes vivants, peut dans certains cas s'avérer toxique.

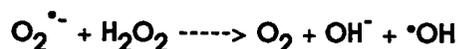
L'oxygène à l'état fondamental est biradicalaire, il présente deux électrons non appariés de spin électronique parallèle. L'oxygène est donc un triplet, ce qui explique son inertie par rapport aux structures organiques. Par apport d'énergie suffisante les deux électrons célibataires peuvent s'apparier, on obtient l'oxygène singulet ${}^1\Delta_g$ à électrons uniformément paires, extrêmement réactionnel.

En règle générale l'oxygène est utilisé dans les chaînes respiratoires mitochondriales où il subit une réduction à 4 électrons, par l'intermédiaire de la cytochrome oxydase, le transformant en H_2O sans libération d'intermédiaires réactifs qui restent liés à l'enzyme. Dans certains cas, l'oxygène peut être réduit pas à pas, ces états de réduction intermédiaires représentant les formes toxiques de l'oxygène.

Lors de la réduction monoélectronique de l'oxygène, l'un des deux électrons célibataires est apparié, il ne reste qu'un seul électron non apparié, l' O_2 forme un radical libre, l'anion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$. Un degré de réduction supplémentaire aboutit au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier pouvant à son tour être réduit en une nouvelle forme radicalaire, le radical hydroxyle ($\bullet OH$). La formation du peroxyde d'hydrogène se fait par dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$, soit spontanée, soit catalysée par la superoxyde dismutase, une molécule est réduite tandis que l'autre est oxydée.



En 1934, Haber et Weiss proposent la formation du radical hydroxyle selon la réaction :

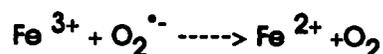


Cette réaction devenue classique est énergétiquement impossible ; en fait elle doit être décomposée en deux étapes :

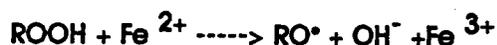
- la première conduit à la formation d' $\bullet OH$ à partir d' H_2O_2 en présence de fer ferreux (réaction de FENTON)



- la seconde permet la réduction du fer ferrique en présence d'anion superoxyde qui se transforme en oxygène



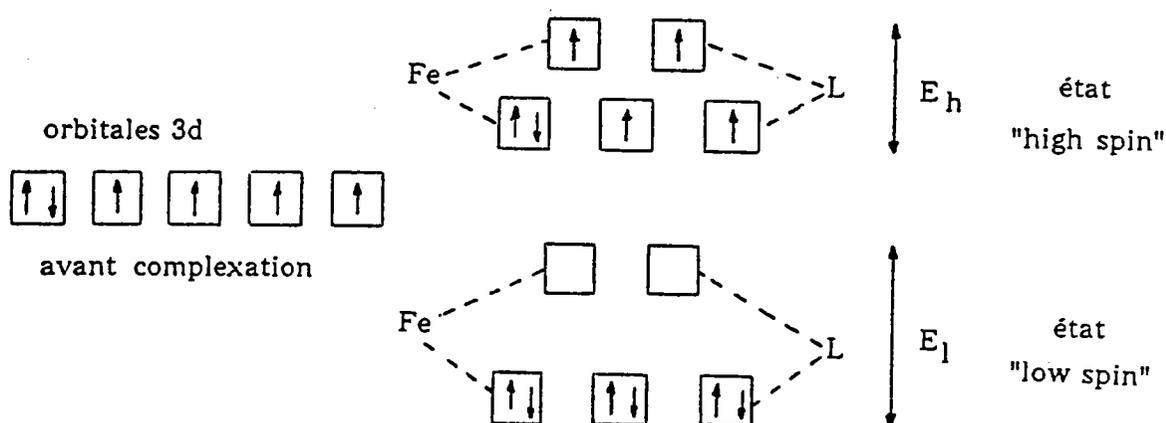
La présence simultanée de fer, d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène permet donc la création d'un cycle produisant le radical hydroxyle. D'autres hydroperoxydes organiques et notamment lipidiques peuvent, à l'instar du peroxyde d'hydrogène, former des radicaux alkoxydes en présence de fer.



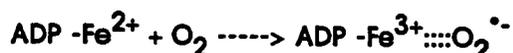
De toutes ces formes toxiques de l'oxygène, le radical hydroxyle est de loin le plus réactif entraînant des réactions d'addition sur les macromolécules cellulaires (protéines, lipides, acides nucléiques) et étant un redoutable initiateur de la peroxydation lipidique.

La toxicité de l'anion superoxyde a été très discutée (Fee et Valentine, 1977; Mc Cord et Fridovich, 1969); ses propriétés se manifestent surtout dans les milieux aprotiques comme les membranes cellulaires où il provoque la désestérification des phospholipides conduisant à la formation de lysolécithines en désorganisant l'architecture membranaire.

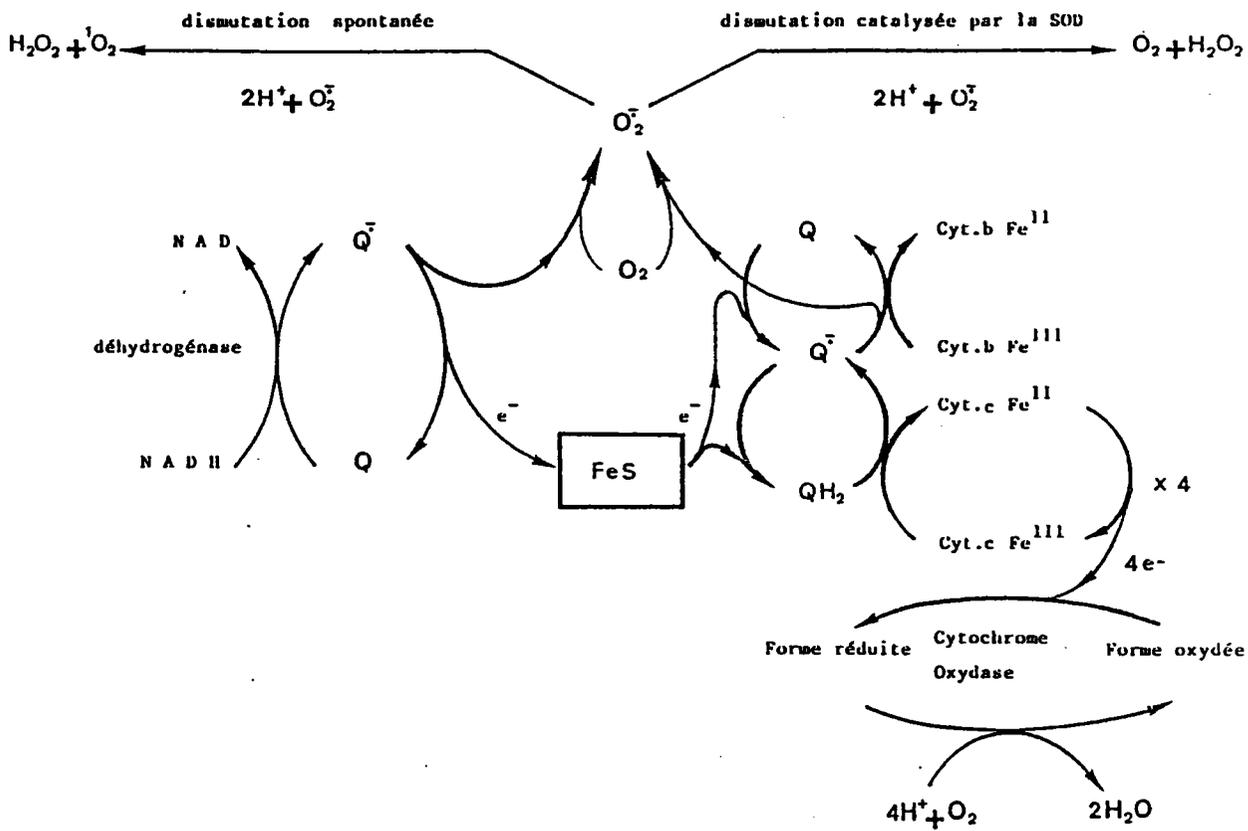
Les métaux de transition ont un rôle très important dans les mécanismes toxiques de l'oxygène. Outre la réactivation des hydroperoxydes, le fer peut subir des phénomènes de complexation, ses orbitales 3d s'hybrident avec les orbitales 2d du ligand (L) et il se produit alors la formation de deux sous-niveaux d'énergie (splitting). Si l'apport d'énergie du ligand est faible, le complexe présente 4 électrons célibataires et se trouve à l'état "high spin" très réactif.



Ainsi coordonné, le fer peut réagir avec l'oxygène pour former l'ion perferryle considéré comme aussi efficace que le radical hydroxyle pour former des hydroperoxydes.



Des expérimentations récentes ont montré que d'autres métaux comme le cuivre et le zinc complexés (ML) peuvent réagir avec l' H_2O_2 et former un



Production d' $O_2^{\bullet -}$ au niveau des mitochondries par autooxydation

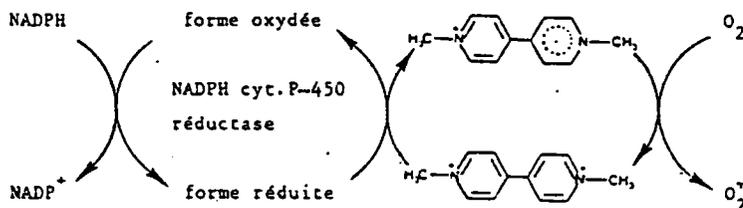
des ubiquinones réduites

complexe transitoire $ML\cdot O_2H^-$ pouvant réagir directement sur certains substrats avant la décomposition en $\cdot OH$.

Dans certains cas, les composés aboutissant à la formation d'anion superoxyde sont d'origine endogène, l'aérobiose ne pouvant se concevoir sans l'existence de formes activées de l'oxygène normalement prises en charge par des systèmes de protection cellulaire variés, systèmes pouvant être dépassés dans des circonstances pathologiques précises. L'autooxydation des quinones réduites de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de situations post anoxiques pourrait ainsi expliquer certaines lésions cellulaires apparaissant paradoxalement lors de la phase de réoxygénation des accidents vasculaires cérébraux (Demopoulos et coll., 1979).

Les substances xénobiotiques sont également à l'origine de formes radicalaires de l'oxygène.

- Le **Paraquat** est un herbicide qui peut subir une réduction monoélectronique par les flavoenzymes et former un cation radical qui peut secondairement réduire l'oxygène en anion superoxyde (Bus et Gibson, 1976).



Pour des produits de structure identique, l'activité herbicide est parallèle à leurs potentiels de réduction. Cette activité nécessite de l'oxygène et entraîne une peroxydation lipidique également retrouvée chez les animaux intoxiqués. Les intoxications au Paraquat évoluent en plusieurs temps chez l'homme et aboutissent après un stade d'hépatonéphrite aiguë à une fibrose pulmonaire généralement d'évolution défavorable (Smith et Heath, 1976).

- Les dérivés aromatiques ou hétérocycliques nitrés

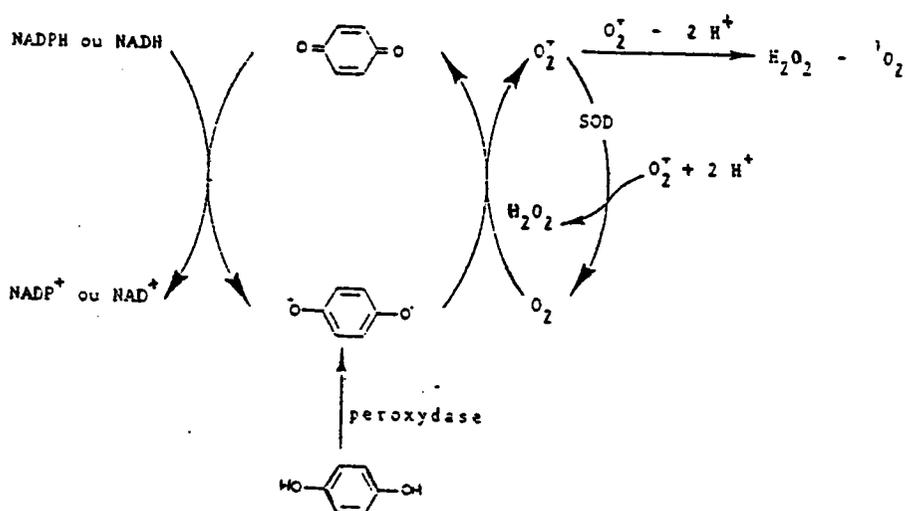
Les nitrobenzènes et plusieurs médicaments antibactériens nitrés provoquent à hautes doses une toxicité qui semble due à une surproduction d'anion superoxyde. Les composés de structure $ArNO_2$ sont réduits en présence de nitroréductases intestinales ou hépatiques en anion radical $ArNO_2^{\cdot-}$ qui peut

secondairement se transformer en dérivés nitroso $ArN=O$ ou redonner le composé parent en réduisant l'oxygène en anion superoxyde (Boyd, 1980).

Les nitrofurantoïnes et le métronidazol peuvent ainsi à forte dose provoquer une toxicité liée à la production d' $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 (Masson et Holtzman, 1975).

- Les dérivés quinoniques ou apparentés

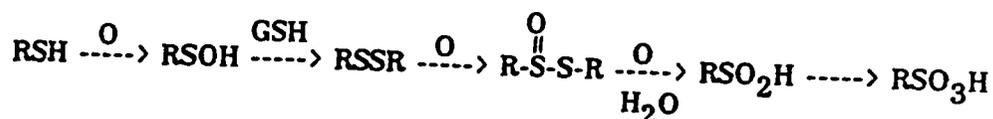
Ils peuvent subir une réduction monoélectronique et donner des semiquinones sous l'action de diverses flavoenzymes (NADPH cytochrome P-450 réductase, NADH cytochrome b_5 réductase, NADH ubiquinone oxydoréductase). Les structures semiquinoniques formées sont autooxydables, redonnant les quinones parentes en réduisant l'oxygène en anion superoxyde. Des substances comme l'adriamycine ou la ménadione peuvent subir un tel mécanisme.



V Composés soufrés

V-1 Alkyl et aryl thiols

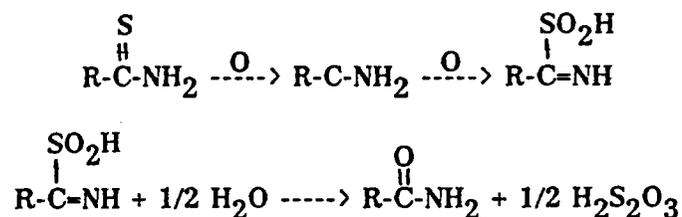
Rapidement métabolisés, ils sont souvent toxiques et une partie de leur toxicité peut s'expliquer par leur facile oxydation en acide sulfénique, très



acide sulfénique, très réactif, qui a tendance à réagir avec d'autres thiols formant alors l'acide thiosulfénique puis l'acide sulfinique. In vivo le glutathion réagit avec le premier produit d'oxydation, l'acide sulfénique, ce qui peut aboutir à une déplétion de ce système essentiel de protection cellulaire.

V-2 Les thioamides

Les thioamides sont très toxiques chez l'animal; certains sont carcinogènes (Fitzhugh et Nelson, 1948); l'administration aiguë aboutit à une nécrose hépatique (Barker et Smukler, 1972), l'administration chronique à des tumeurs hépatiques. Cette toxicité est probablement en rapport avec leur oxydation en sulfoxydes (sulfine) puis en acide iminosulfinique (sulfène) (Cashman et Hanzlik, 1981). Les sulfènes s'hydrolysent donnant l'amide correspondant et du thiosulfate après passage par un intermédiaire extrêmement instable, le sulfoxylate ($\text{H}_2\text{O}_2\text{S}$).



Bien que peu électrophile, il peut cependant réagir avec les nucléophiles, comme les amines, aboutissant à la formamide.

V-3 Les thiocarbamides

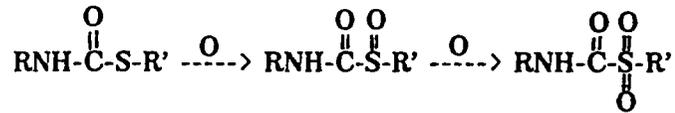
Ils sont rapidement oxydés en acide formamide sulfonique en passant par l'acide formamide sulfénique et l'acide formamide sulfinique.



L'acide formamide sulfénique peut réagir avec le glutathion, tandis que l'acide formamide sulfinique se lie aux macromolécules cellulaires par action probable sur leurs groupements aminés.

V-3 Les thiocarbamates

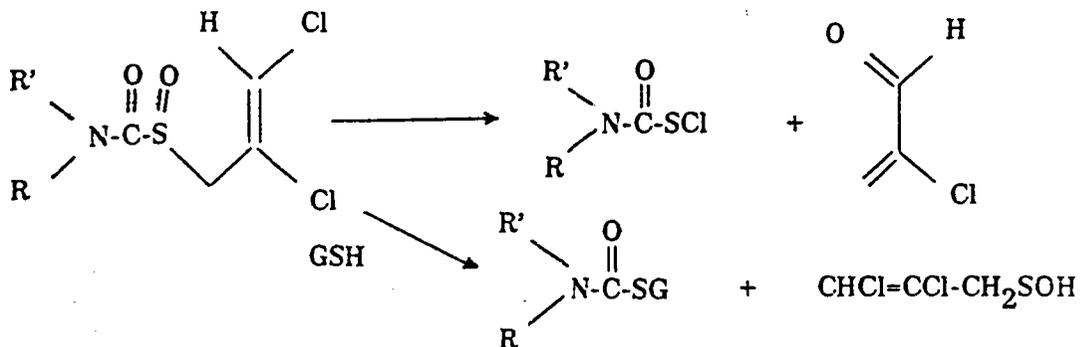
Les thiocarbamates sont oxydés en sulfoxydes et sulfones



Des réactions de carbamylation secondaire pouvant apparaître avec le glutathion ou d'autres thiols



Certains sulfoxydes peuvent subir un réarrangement qui aboutit à la formation de 2-chloroacroléine, un puissant mutagène; c'est notamment le cas des S-chlorallylthiocarbamates. Là encore l'expression de la toxicité semble en relation avec le niveau cellulaire en glutathion (Schuphan, 1979).



VI Les composés halogénés : production de radicaux libres

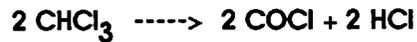
Les composés halogénés représentent un vaste groupe aux propriétés physico-chimiques et structurales extrêmement variées. Leur toxicité s'exprime principalement par l'apparition d'un radical libre au cours de leur métabolisation cellulaire. Ainsi n'envisagerons nous dans ce chapitre que cette seule forme d'activation toxique bien que d'autres mécanismes existent (par ex., époxidation du chlorure de vinyle).

VI-1 Le tétrachlorure de carbone

L'utilisation du tétrachlorure de carbone comme hépatotoxique est relativement ancienne puisque les premières études histopathologiques de Wells et Wipple et de Spery datent respectivement de 1908 et 1909. Deux mécanismes étaient alors retenus pour expliquer la toxicité du CCl₄ :

- une action physique de solvant des lipides membranaires

- une voie métabolique aboutissant à la production d'acide chlorhydrique, basée sur la suggestion de Muller en 1911 et développée par Graham selon laquelle l'action toxique du chloroforme est due à sa transformation en phosgène qui lui-même aboutit par hydrolyse à l'acide chlorhydrique.



En fait, il a fallu attendre les années soixantes et les travaux de Buttler pour assister au véritable début d'explication de la bioactivation du CCl_4 . Cet auteur suggérait en effet que le tétrachlorure de carbone agissait sur les constituants cellulaires non pas par ses propriétés de solvant mais par une interaction d'ordre chimique reposant sur le clivage homolytique d'une liaison C-Cl avec formation d'un radical libre (Buttler, 1961). Le fait que l'événement primaire de l'hépatotoxicité du CCl_4 soit représenté par sa transformation en radical libre est aujourd'hui unanimement reconnu.

La première étape consiste en une réduction électronique du CCl_4 au niveau du système NADPH cytochrome P-450 réductase-cytochrome P-450 agissant comme une chaîne de transport d'électrons. Le niveau exact de la genèse du radical trichlorométhyl a dans un premier temps prêté à controverse entre les partisans d'une activation à proximité de la flavoenzyme NADPH dépendante (Slater et Sawyer, 1971) et les partisans d'une activation au niveau du cytochrome P-450 lui-même (Reiner et coll., 1972; Suarez et coll., 1976; Wolf et coll., 1977). Cette dernière solution est actuellement retenue mais l'on pense que le lieu d'activation pourrait ne pas être unique, les différents coenzymes du cytochrome P-450 y participant de manière non identique et réagissant de façon différente selon les inhibiteurs enzymatiques employés (Slater, 1982). Cette réduction monoélectronique fait apparaître un radical libre, le radical trichlorométhyle $\cdot\text{CCl}_3$ dont l'existence a pu être mise en évidence de manière formelle par des techniques de résonance paramagnétique électronique (Poyer et coll., 1980). Le radical trichlorométhyle peut être le point de départ de nombreuses manifestations toxiques :

- interaction avec des protéines ou d'autres composants membranaires au voisinage du lieu d'activation. L'impact se situe généralement au niveau des acides aminés aromatiques, hétérocycliques ou soufrés et des doubles liaisons sous la forme de liaisons covalentes qui se traduisent par des perturbations fonctionnelles et structurales.

- interactions avec les nucléotides sous la forme de liaisons covalentes ou de transferts radicalaires.

- interaction avec d'autres composés de voisinage : ubiquinones, glutathion, vitamine E.

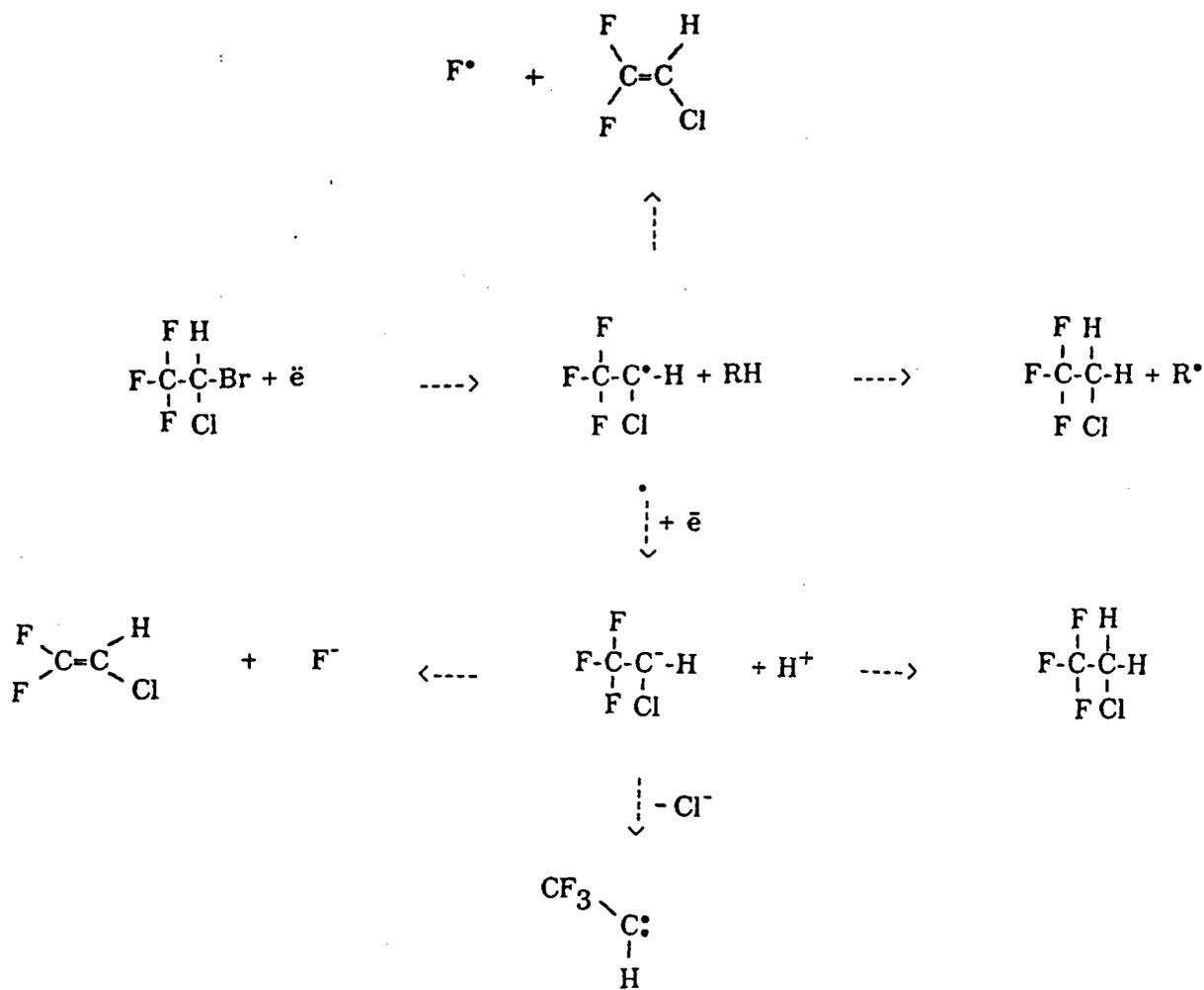


Schéma toxique de l'Halothane

- interaction avec les lipides conduisant à la formation de chloroforme parallèlement à l'initiation de la peroxydation lipidique, le CHCl_3 pouvant lui-même être secondairement métabolisé en phosgène.

Le radical peut subir une seconde réduction avec formation de carbanion trichlorométhyle $^-\text{CCl}_3$ pouvant de manière accessoire (Ahr,1980; Kubic et Anders,1980) donner du chloroforme (Hine et coll.,1954); ou surtout, après élimination chlorée, du dichlorocarbène qui peut aboutir au monoxyde de carbone par hydrolyse ou au phosgène par interaction avec le cytochrome P450 réduit (Mansuy et coll.,1980).

Enfin et surtout le radical $^*\text{CCl}_3$ peut se lier à l'oxygène pour aboutir à la formation d'une nouvelle entité radicalaire, le radical trichlorométhylperoxy $^*\text{OCCl}_3$ (Packer et coll.,1978), hautement réactif, pouvant induire une lipoperoxydation parallèlement à la formation d'un hydroperoxyde qui, après réaction avec le glutathion, aboutit au phosgène (Mansuy et coll.,1980). Ce radical trichlorométhylperoxy est un initiateur de la peroxydation lipidique plus puissant que le radical $^*\text{CCl}_3$, alors que son interaction par liaisons covalentes au niveau des macromolécules cellulaires est probablement plus faible, car il devrait alors passer par le stade intermédiaire de radical $^*\text{OCCl}_3$ pour former une liaison stable.

Force est donc de constater que le toxique le plus largement utilisé jusqu'à ce jour pour induire expérimentalement des lésions hépatiques possède un métabolisme des plus complexes au cours duquel apparaissent des produits secondaires susceptibles de développer une toxicité propre (phosgène, chloroforme, CO).

VI-2 Halothane

L'halothane peut également subir une réduction monoélectronique au niveau du cytochrome P-450 (Mukai et coll.,1977; Maiorino et coll.,1979; Sharp et coll.,1979).

La formation d'un radical libre, le radical 1 chloro-2,2,2 trifluoroéthyle, a pu être vérifiée de manière directe par R.P.E. et indirecte par l'apparition de diènes conjuguées au niveau d'AGPI après intoxication in vitro de microsomes hépatiques (Poyer et coll.,1981). Cette réduction cytochrome P-450 dépendante conduit ainsi au 2 chloro-1,1,1 trifluoroéthane dont la formation est parallèle à l'initiation d'une peroxydation lipidique.

De plus, des études ont montré que le second produit de réduction de l'halothane, le 2 chloro-1,1 difluoroéthylène, était formé par β élimination fluorée du 1 chloro-2,2,2 trifluorocarbanion plutôt que par clivage homolytique du radical 2,2,2 trifluoro-1 chloroéthyle (Ahr et coll.1982), ce qui confirme que ce dernier semble représenter le métabolite toxique ultime.

VII Conséquences biochimiques à l'échelon cellulaire

Comme nous venons de le voir, les mécanismes de biotransformation des xénobiotiques sont extrêmement complexes et peuvent aboutir à des métabolites toxiques infiniment variés. Cependant, l'expression de cette toxicité au niveau hépatique passe, pour un grand nombre de composés, par deux modalités essentielles :

- l'apparition d'entités radicalaires d'une part
- l'apparition d'entités électrophiles d'autre part

Il convient donc de connaître les conséquences, à l'échelon cellulaire, de ces deux voies toxiques prépondérantes afin de mettre en oeuvre les modèles pharmacologiques les plus adaptés.

VII-1 Conséquence de l'apparition d'entités radicalaires: la peroxydation lipidique.

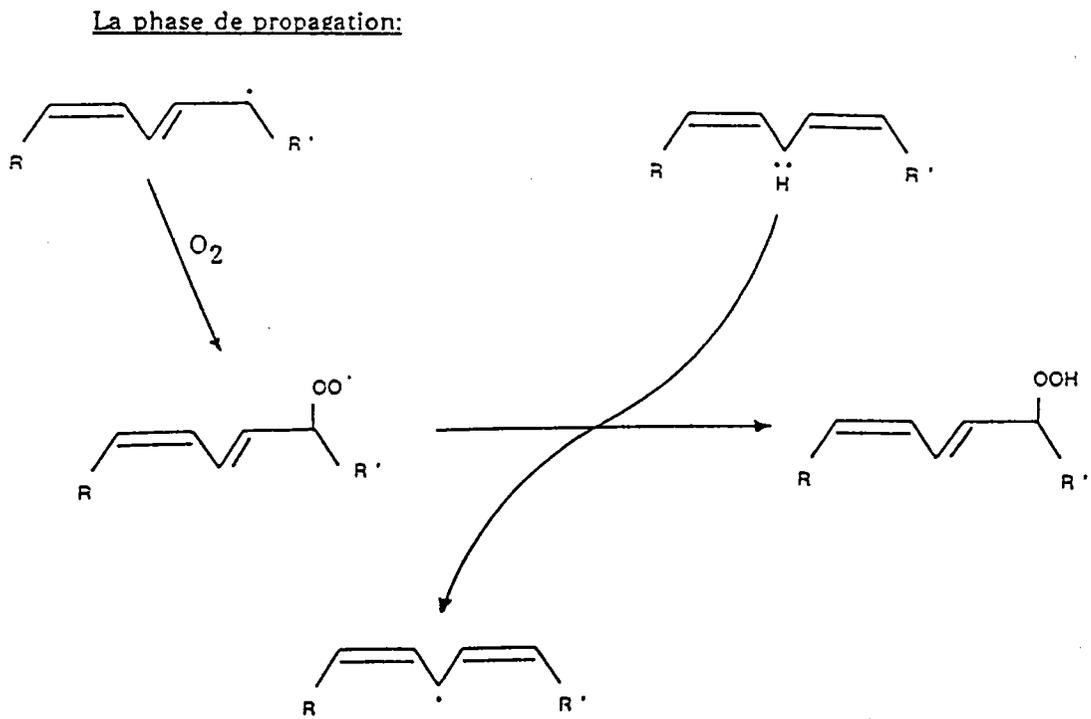
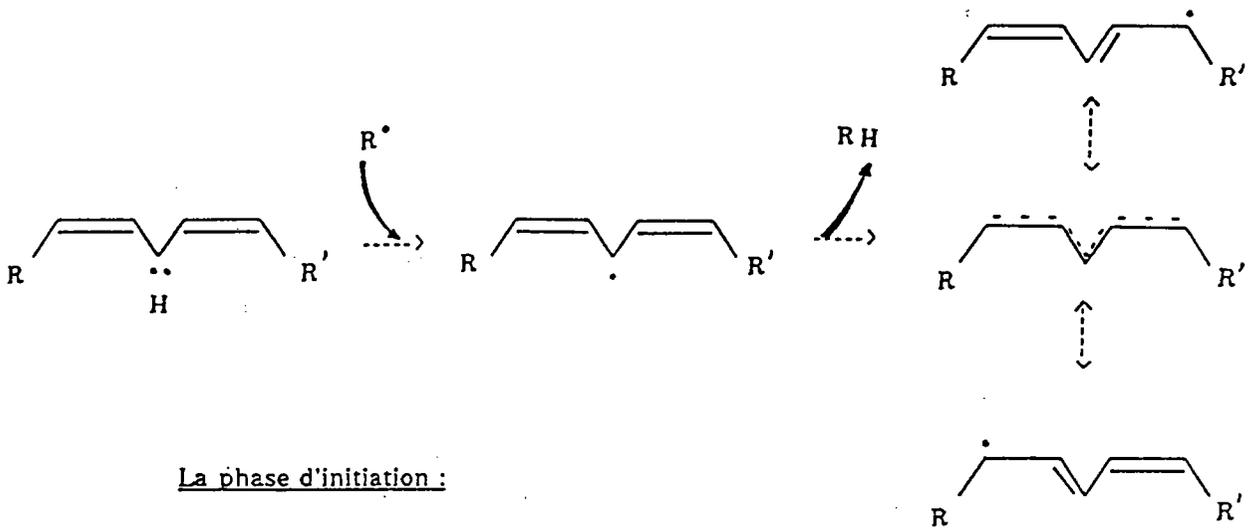
La peroxydation lipidique se définit comme étant une dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et représente une forme d'expression toxicologique commune à un grand nombre de substances chimiques. Elle peut résumer l'essentiel de la toxicité de certains composés mais, le plus souvent, évolue parallèlement à d'autres mécanismes délétères. Parfois même elle agit en tant qu'épiphénomène se surajoutant aux conséquences directes de l'étiologie causale. Si son rôle exact est difficile à quantifier de manière précise en raison des limitations dues aux modèles d'étude actuellement utilisés, son implication dans la pathogénie de nombreux processus morbides, toxicologiques ou d'autre nature est largement reconnue. Son effet néfaste s'explique par le fait que sa cible, l'acide gras polyinsaturé, représente un des éléments constitutifs des phospholipides, structures de base des membranes cellulaires; l'acide gras estérifié en position 2 sur le glycérol étant généralement un acide gras polyinsaturé.

Le mécanisme biochimique de la lipoperoxydation se scinde classiquement en 3 étapes:

la phase d'initiation : équivalente à un mécanisme de transfert radicalaire entre le radical libre initiateur et l'acide gras polyinsaturé cible.

la phase de propagation : caractérisée par des réactions en chaîne

la phase de terminaison : définie comme étant la réaction entre deux entités radicalaires.



La phase d'initiation

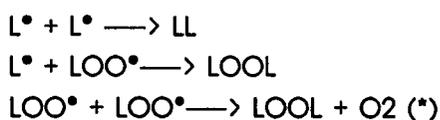
Le radical libre initiateur dont la nature a été exposée précédemment agit généralement au niveau du groupement méthylène situé entre deux doubles liaisons de l'acide gras polyinsaturé. Il se transforme en entité non radicalaire en arrachant l'atome d'hydrogène et son électron. L'AGPI cible présente alors un électron célibataire et forme un radical libre d'AGPI. Dès lors les doubles liaisons de type malonique (tous les 3 carbones) peuvent se rapprocher (doubles liaisons conjuguées) réalisant les conditions nécessaires à un mécanisme de délocalisation électronique qui permet d'assurer une certaine stabilité de l'état radicalaire.

La phase de propagation

Ce phénomène de résonance, en retardant les possibilités de recombinaison ou de dimérisation, permet à l'oxygène de fixer un de ses électrons célibataires au côté de celui du radical libre d'AGPI (L^{\bullet}), ce qui aboutit à la formation d'un radical peroxyde d'AGPI (LOO^{\bullet}). Ce dernier apparie à son tour son électron célibataire en arrachant un atome d'hydrogène sur une chaîne d'AGPI voisin, laquelle devient un radical lipidique (L^{\bullet}) apte à fixer une nouvelle molécule d'oxygène. Le processus de réaction en chaîne est amorcé, le mécanisme toxique peut dès lors évoluer à son propre compte.

La phase de terminaison

Cette phase correspond du point de vue chimique à l'interaction de deux centres actifs, c'est-à-dire de deux radicaux libres entre eux et aboutit à la formation de composés non radicalaires :

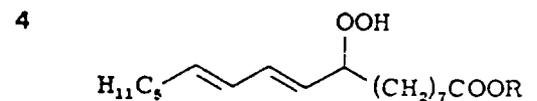
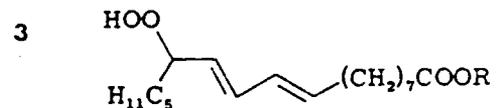
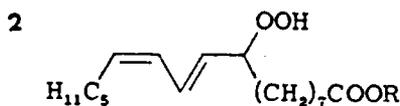
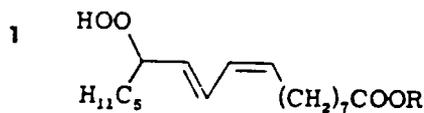


Elle ne s'applique donc pas à la peroxydation lipidique dans sa globalité mais ne correspond qu'à des réactions ponctuelles entre deux radicaux libres, sans par ailleurs tenir compte des mécanismes de protection mis en jeu par la cellule (superoxyde dismutase, glutathion, vitamine E,...). Son individualisation est donc quelque peu théorique lors de phénomènes biologiques. De plus, les réactions précédemment décrites ne sont pas aussi simples. La combinaison de deux radicaux libres peut former des produits comme des oléofines, des alcools,

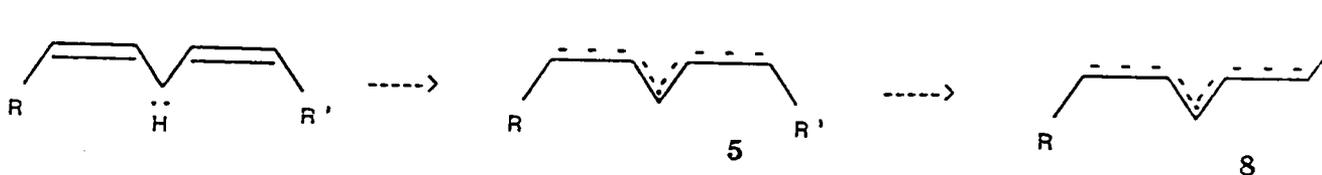
des alcanes et des produits carboxylés, pouvant prendre part à l'activité toxique. En particulier, il est connu que la réaction (*) forme d'abord un tétraoxyde LOOOOL extrêmement instable qui se décompose en deux radicaux LO[•] et en O₂. Les radicaux alkoxydes formés pouvant se combiner en LOOL mais également réintégrer le circuit des réactions radicalaires en chaîne.

Les hydroperoxydes lipidiques

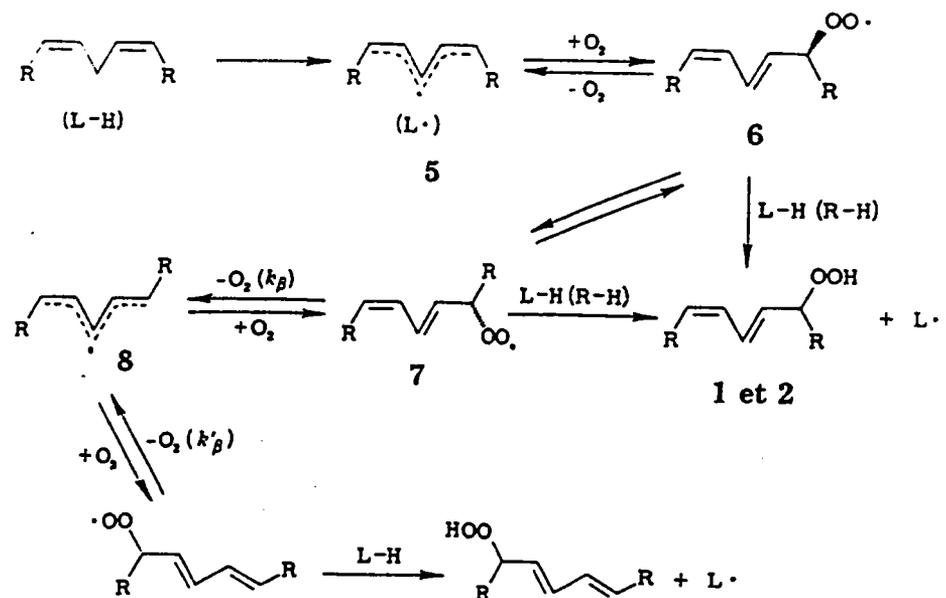
Les hydroperoxydes lipidiques formés peuvent être très nombreux. En considérant le plus simple des AGPI, l'acide linoléique (C18,2), Borland, dès 1950, en fonction de l'existence de phénomènes de résonance, propose l'existence de deux hydroperoxydes, l'un en C9 l'autre en C13. En fait, dans les années 70, à l'aide de techniques analytiques plus sophistiquées, quatre types sont retrouvés, deux ont une structure trans-cis (1 et 2), deux une structure trans-trans (3 et 4).



L'existence de formes trans-cis a été reliée, dans un premier temps, à des phénomènes d'isomérisation au niveau du radical libre d'AGPI selon le schéma suivant :



Un mécanisme plus complexe est actuellement retenu, le processus d'isomérisation n'apparaissant qu'au stade de radical peroxyde d'AGPI.



En effet, le rapport entre les formes trans-cis et trans-trans dépend directement de la concentration en donneur d'hydrogène du milieu, une forte concentration favorisant la conversion en composés trans-cis plutôt que le passage par perte d'oxygène en 7 puis en 8, source de composés trans-trans. Les produits d'autooxydation des phospholipides des vésicules membranaires néoformées sont identiques à ceux formés à partir d'acides gras polyinsaturés libres; le rapport entre les formes trans-cis et trans-trans reflète plus étroitement encore les possibilités d'attraction des atomes hydrogènes par le radical peroxy au sein de la double couche lipidique.

Des diènes non conjuguées sont retrouvées en faible proportion (3%) et il est intéressant de noter que ces hydroperoxydes non conjugués sont rares lors d'autooxydation par les radicaux libres alors qu'ils constituent les produits terminaux prépondérants lors de l'oxydation par l'oxygène singulet dont l'attaque préférentielle se situe au niveau des électrons π des doubles liaisons.

Bien évidemment l'autooxydation d'AGPI triénoïques et tétraénoïques aboutit à des produits terminaux plus nombreux; cependant, la proportion relative des hydroperoxydes formés est inégale en raison de l'atteinte préférentielle de certains groupements méthylènes par rapport à d'autres et des phénomènes de cyclisation des radicaux peroxy.

Les hydroperoxydes formés sont donc extrêmement nombreux et variés, et leurs études du point de vue analytique extrêmement complexes. Etant eux-mêmes à l'origine d'un grand nombre de réactions, ils peuvent amplifier ou prolonger les effets délétères de la peroxydation lipidique :

- Les hydroperoxydes lipidiques peuvent subir un phénomène de réactivation sous l'influence du fer



Fe^{2+} pouvant être régénéré par l'action de divers réducteurs.

- Les radicaux alkoxydes formés (RO^{\bullet}), très réactionnels, sont capables de réamorcer une nouvelle chaîne de peroxydation en agissant comme radical initiateur créant ainsi une amplification des phénomènes.

- Les hydroperoxydes lipidiques peuvent subir des réactions de fragmentation entraînant des perturbations profondes de l'architecture membranaire qui se traduisent par des modifications de la fluidité et de la perméabilité membranaire. La réduction de la fluidité diminue la probabilité des collisions aléatoires, au sein de la membrane, indispensables à la collaboration entre les différents protagonistes de nombreux systèmes enzymatiques et grève ainsi lourdement les possibilités fonctionnelles des endomembranes.

- Enfin, certains hydroperoxydes possèdent une toxicité propre, celle-ci pouvant s'exprimer au voisinage de leurs lieux de genèse (effet de réticulation de malonaldéhyde) mais également, du fait de leur durée de vie plus longue, au niveau du reste de l'économie cellulaire. Les 4-hydroxycalcènes ainsi formés peuvent, par exemple, entraîner une inhibition de la mitose cellulaire par action sur la tubuline des fuseaux mitotiques (Dianziani, 1982).

La peroxydation lipidique apparaît donc comme un mécanisme toxique complexe et difficile à suivre dans sa globalité. Les hydroperoxydes, produits terminaux de la lipoperoxydation, sont à l'origine de désordres secondaires, eux-mêmes capables de développer en aval des pathologies variées. L'arborescence des effets secondaires ainsi créés devient rapidement extrêmement ténue. L'importance de tels mécanismes toxiques par rapport à d'autres voies toxiques concomitantes est difficile à quantifier. Les modèles in vitro, seuls capables d'approcher les mécanismes biologiques mis en jeu, étant forcément limités en ne visualisant que les phénomènes apparaissant à l'échelle cellulaire d'une part et d'autre part par l'impossibilité d'approcher des mécanismes de toxicité chronique de manière satisfaisante par de tels systèmes.

VII-2 Conséquences cellulaires de l'apparition d'entités électrophiles

Les entités électrophiles formées au cours de la métabolisation des xénobiotiques agissent dans toute l'économie cellulaire par leur pouvoir alkylant ou arylant. Elles provoquent donc des réactions d'addition par la formation d'une liaison covalente avec de très nombreux composés indispensables à la cellule et notamment des macromolécules comme des protéines, des nucléotides, des lipides. Les conséquences de cette fixation sont bien évidemment très nombreuses et l'on se contentera de citer à titre d'exemples :

- l'action sur les protéines : il existe au moins deux types de conséquences:

* fonctionnelle : que ces protéines soient des protéines de structure, de régulation ou de nature enzymatique, la fixation d'un composé électrophile va modifier la configuration tertiaire de la protéine cible et aboutir à des modifications d'ordre stéréochimique se traduisant par une perturbation de l'activité biologique.

* immunologique : lorsque la fixation se réalise sur une zone secondaire n'entraînant pas un désordre biologique immédiat, le composé électrophile peut jouer le rôle d'haptène. La molécule piratée n'étant plus

reconnue par l'organisme, des processus immunitaires vont alors pouvoir se mettre en place et déterminer secondairement une pathologie immuno-allergique.

- l'action sur les nucléotides : le pouvoir cancérogène de certains composés est en relation avec la formation d'un carcinogène ultime de nature électrophile et de sa fixation aux bases puriques et pyrimidiques avec dépassement des mécanismes de réparation de l'ADN.

Ces exemples pourraient être multipliés, ce qui déborderait le cadre de notre propos. Il faut cependant, pour tenter de comprendre les phénomènes de nécrose cellulaire et notamment hépatocytaire, insister sur les mécanismes très précoces mis en jeu lors d'une atteinte électrophile. Les sites nucléophiles préférentiels sont probablement ceux formés par les radicaux thiols (SH). Les groupements thiols les plus nombreux à l'échelon cellulaire sont portés par les protéines mais également par un tripeptide cytoplasmique, le glutathion, un des éléments de protection cellulaire les plus importants. Avec le système des glutathion S-transférases, il joue un rôle prépondérant dans la détoxification des composés électrophiles en se conjugant à eux, permettant ainsi leur élimination par la voie des acides mercapturiques. En sa présence, les composés électrophiles interagissent préférentiellement avec son groupement SH libre, porté par le radical cystéine, plutôt qu'avec ceux portés par les protéines. La conséquence de cette activité est une diminution de la concentration cellulaire en GSH qui, dans certains cas, peut être excessivement importante et parfois indispensable à l'expression des phénomènes toxiques; l'intoxication aiguë par l'acétaminophène (Paracétamol) en constitue probablement l'exemple le plus accompli. L'effondrement du GSH cellulaire peut avoir comme conséquence une perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire par atteinte des possibilités de stockage intracellulaire d'ions Ca^{2+} libres, notamment au niveau du réticulum endoplasmique. Ce point, essentiel à nos yeux pour expliquer les phénomènes nécrotiques et qui focalise actuellement un nombre important de recherches, sera repris et développé ponctuellement dans certains chapitres ultérieurs.

D LES HEPATOTROPES D'ORIGINE VEGETALE

Les pharmacopées traditionnelles recensent de très nombreuses espèces végétales utilisées dans les affections hépatobiliaires. Certaines sont plus largement représentées que d'autres, Silybum marianum en Europe par l'intermédiaire des silymarines, Schizandra en Chine, Bupleurum au Japon ou encore Cochlospermum en Afrique. Ces utilisations géographiques préférentielles s'expliquent naturellement par le poids de la tradition et par des zones de distribution parfois limitées de ces espèces plutôt que par d'éventuelles différences étiologiques selon ces régions. Certaines difficultés administratives liées à l'utilisation d'espèces non autochtones expliquent également que des préparations renommées dans certains pays ne soient pas utilisées dans d'autres.

D'une manière générale, la cible du remède est plus souvent l'organe lui-même qu'une pathologie particulière; ainsi l'activité cholagogue ou cholérétique est rarement dissociée de l'activité hépatoprotectrice qui est, nous l'avons vu par ailleurs, difficile à définir.

Plutôt que de présenter par groupes les principales espèces végétales traditionnellement utilisées, nous nous sommes contentés de décrire succinctement les groupes chimiques les plus représentatifs de l'arsenal thérapeutique d'origine végétale.

En fait, les travaux pharmacologiques se sont surtout focalisés sur deux familles chimiques. Le vaste groupe des flavonoïdes et de leurs dérivés a été relativement bien exploré il y a quelques années, lors de la mise en évidence des propriétés hépatotropes de la silymarine, une combinaison de flavolignane et du (+) 3 cyanidanol, un flavonol-3. Actuellement, les essais de fractionnement, à partir d'extraits pharmacologiquement actifs, aboutissent le plus souvent à des composés de structure terpénique.

L'activité antihépatotoxique ne semble cependant pas liée à une famille chimique particulière, ce qui n'est d'ailleurs pas surprenant en raison de la synergie ou de la collaboration probable entre différentes familles chimiques d'une même plante. Il est par ailleurs intéressant de noter que les substances d'origine naturelle considérées comme les plus actives sont généralement peu solubles dans l'eau, solvant le plus utilisé traditionnellement.

I. Flavonoïdes

De très nombreux flavonoïdes sont cités dans la littérature comme possédant une activité hépatotrope. Dès 1937, l'activité cholérétique de certains flavonoïdes alors isolés de Helichrysum arenarium (Asteraceae) a été démontrée (kaempférol, naringénine, isohellchrysine); parmi ceux-ci la quercétine a également entraîné une activité protectrice sur la cellule hépatique ainsi qu'une activité antiinflammatoire. En 1984, l'étude d'Artemisia capillaris (Asteraceae)

(Kiso et coll.) met en évidence l'effet hépatoprotecteur de l'eupatoline, l'arcapiline et la capillarisine après intoxication au CCl_4 ou à la D-galactosamine. De même, Butea monosperma Kuntze (Fabaceae) se montre efficace contre ces toxiques par deux de ses flavonoïdes, l'isobutirine et la butirine (Wagner et coll., 1986).

Ces dernières années ont été marquées par l'intérêt pharmacologique d'une classe chimiquement proche et retrouvée dans plusieurs espèces, notamment Uncaria gambir Roxburg (Rubiaceae) et Acacia catechin (Fabaceae), la catéchine et l'épicatéchine. Le composé le plus intéressant est le (+) cyanidanol 3 ou catéchine qui entraîne un effet protecteur indiscutable sur plusieurs modèles pharmacologiques de nécrose expérimentale (Perrisoud et Weibel, 1980). Il a été commercialisé (Catergène) puis retiré en raison d'effets secondaires trop importants.

Enfin, récemment, on a montré que des flavonoïdes, comme la quercétine, la morine, la robinétine et la fisétine, sont actifs contre l'aflatoxine B1, composé connu pour être mutagène et hépatocarcinogène (Bhattacharya et coll., 1988).

II. Lignanes

La silymarine, une des flavolignanes obtenues à partir des fruits de Silybum marianum Gaertner (Asteraceae), est une des substances végétales les plus étudiées pour ses activités hépatotropes. Ce principe actif est en fait constitué d'un mélange de trois isomères, la silybine, la silydiamine et la silychristine ainsi que de la dihydrosilybine, formée par oxydation de la silybine. Dans de très nombreux modèles, la silymarine apporte une hépatoprotection significative notamment lors d'intoxication à alpha amanitine ou à la phalloïdine (Perrisoud et coll., 1981) mais également au CCl_4 (Perrisoud et coll., 1980; Perrisoud et coll., 1981), au thioacétamide, à la D-galactosamine (Perrisoud et coll., 1981), au plomb, au cadmium et à l'imuran. Par contre son effet sur l'alcool allylique reste modéré.

Hikino a également mis en évidence une bonne action protectrice de la silandrine, de la 3-deoxysilychristine, de la silybine et de la silymonine à l'encontre du CCl_4 alors que la silydiamine et la silymonine réduisent le relargage des ALAT après intoxication à la D-galactosamine (Hikino et coll., 1984). Il faut cependant souligner que ces produits sont testés à des doses relativement importantes pour lesquelles apparaît une interférence sur les méthodes de dosage dans le sens d'une diminution de l'activité enzymatique pouvant aboutir à de faux positifs.

Une série de lignanes a également été isolée d'espèces traditionnellement utilisées en Chine pour leurs vertus hépatotropes, Schizandra chinensis et Schizandra sphenanthera (Magnoliaceae) (Hikino et coll., 1984; Kiso et coll., 1985). Ce sont des dérivés dibenzocyclooctanes comprenant les schizandrines, les schizantherines, les wuweizines et les gomisines. Les schizantherines A, B, C et D

diminuent le taux des ALAT sériques des patients porteurs d'hépatite virale chronique. Les schizandrines B et C, le schizandrol B, les schizandrins B et A, le diméthyl 4,4' diméthoxy 5,6,5',6' diméthylène dioxybiphényl 2,2' dicarboxylate inhibent la peroxydation lipidique et réduisent les liaisons covalentes produites par le CCl_4 sur un modèle de microsomes isolés. L'équipe d'Hikino a testé 32 lignanes extraites des fruits de Schizandra chinensis Baillon, la wuweizisu C et la schizantherine D offrent la meilleure protection à l'encontre de l'action du CCl_4 alors que la déoxygomisine A, la gomisine N et C, le wuweizisu E et la schizantherine D freinent significativement les relargage enzymatiques induits par la D-galactosamine. L'analyse des relations structure-activité montrent que les groupements méthylènes dioxy du squelette dibenzo cyclo-octane semblent jouer un rôle important dans l'hépatoprotection (Hikino et coll.,1984).

Des lignanes de Thuopsis dolabrata (Cupressaceae) ont été testées sur cultures cellulaires, la désoxypodophyllotoxine et la picropodophylline protègent les cellules hépatiques de l'action du CCl_4 tandis que alpha et la bêta peltatine et la 4' diméthyl podophyllotoxine les protègent de la D-galactosamine (Hikino et coll.,1979).

III. Coumarines

De nombreuses expérimentations montrent leurs activités cholagogues et hépatotropes. Plusieurs extraits méthanoliques d'Artemisia capillaris Tunberg (Asteraceae) testés in vivo chez la souris pour leurs propriétés antihépatotoxiques à l'encontre du CCl_4 , ont présenté des différences importantes d'activité selon leur provenance et la date de récolte (Kiso et coll.,1984). Plus de treize flavonoïdes et une coumarine; la diméthylesculétine, ont été isolés des bourgeons d'Artemisia capillaris et présentent une activité antihépatotoxique à l'encontre du CCl_4 (10mM) et de la D galactosamine (0.5mM) en culture primaire. Bien que la capillarisine (un flavonoïde) soit plus active que le composé coumarinique, celui-ci en concentration dix fois supérieure est bien le principal composé actif de l'extrait brut (Kiso et coll.,1984).

Des études de relation structure-activité entre les analogues coumariniques comme l'umbelliférone, la méthyl umbelliférone, esculetine, esculetine-6-méthyléther, esculetine-7-méthyléther, esculetine diméthyléther, esculine et esculine méthyléther montrent, sur un modèle d'intoxication au CCl_4 , que la présence d'un hydroxyle ou d'un groupement éther en C_6 ne modifie pas l'activité; les composés porteurs d'un hydroxyle en C_7 ont la plus forte activité, la méthylation en C_7 la diminue généralement (Kiso et coll.,1984).

IV. Caroténoïdes

Diallo a isolé en 1987 deux apocaroténoïdes des rhizomes de Cochlospermum tinctorium (Cochlospermaceae) qui pourraient être responsables de l'activité hépatoprotectrice de cette espèce à l'encontre d'une intoxication au CCl_4 et à la D-galactosamine (Diallo et coll., 1987).

V. Glycosides

V.1 Irido-glycosides

Des extraits alcooliques de Plicorhiza kurroa (Scrophulariaceae) possèdent une action hépatoprotectrice à l'encontre d'une intoxication par le CCl_4 chez le rat; des iridoïdes glycosides présents dans cette espèce, les picrosides I et II, ont montré une activité semblable chez la souris ainsi qu'une activité cholérétique.

L'augmentation de la cholérèse se retrouve d'ailleurs pour de très nombreux autres iridoïdes glycosidiques : géniposide des fruits et feuilles de Gaerdenia jasminoïdes (Rubiaceae), syringopicroside des feuilles de Syringa oblata; patrinoside et villoside. L'aucubine des feuilles et graines de Plantago asiatica posséderait également une action hépatoprotectrice.

V.2 Saponines

Une action cholérétique est décrite pour certaines saponines, notamment celles extraites de Buplurueum rotundifolium (Apiaceae) ou B. exaltatum.

Des saponines de la série gypsogénique sont isolées de Dianthus superbus (Caryophyllaceae), leurs aglycones sont antihépatotoxiques, l'activité semble décroître lorsque le nombre de groupements OH augmente (Hikino et coll., 1984).

Les saponines de Panax ginseng (Araliaceae) diminuent les ASAT et les ALAT chez le lapin intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (ginsenoïdes Rb₁, Rg₁ et Re).

VI. Terpénoïdes

Les monoterpènes sont surtout décrits pour leur action cholérétique.

Kiso a montré que les composés sesquiterpéniques de rhizomes de Atractylodes macrocephala et Atractylodes lancea (Asteraceae) ont une action antihépatotoxique in vitro, les composés les plus actifs étant l'atractylon, le β endesmol et l'hinesol (Kiso et col., 1983). Il faut d'ailleurs noter qu'une étude complémentaire (Kiso et coll., 1985) sur les mécanismes d'action protecteurs de

l'atractylon montre que ce composé semble produire lui-même un radical libre, sans être cytotoxique. Les auteurs expliquent l'effet hépatoprotecteur par un effet de recombinaison entre l'atractylon et les radicaux $^{\circ}\text{CCl}_3$.

Le principal composé sesquiterpénique de Lindera strychnifolia (Lauraceae), le lindstrène, inhibe le relargage d'ALAT et d'ASAT provoqué par le tétrachlorure de carbone, l'éthionine et la D-galactosamine.

Les diterpènes d'Andrographis paniculata (Acanthaceae) minimisent le taux des ASAT, des ALAT et des phosphatases alcalines sériques lors d'hépatites infectieuses; l'andrographolide diminue également le relargage enzymatique chez le rat intoxiqué au CCl_4 mais exclusivement lors d'un traitement préventif.

Les triterpènes sont plus largement représentés. Tetrapanax papyriferum (Araliaceae) donne ainsi plusieurs triterpènes qui diminuent la toxicité du CCl_4 et de la D-galactosamine sur culture primaire, les papyriogénines A, B et C, les propapyriogénines A_2 et A_1 , la 11 déhydro-propapyriogénine A_2 et la 16 épisaikogénine C (Hikino et coll., 1984).

Des saponines triterpéniques, les saikosaponines A, B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , C, D, E et F ont été isolées de Bupleurum falcatum L. (Apiaceae) utilisé en médecine orientale pour les désordres hépato-biliaires (remède "saiko"). Les saikosaponines B_1 , B_2 , B_3 sont des composés apparaissant au cours de l'isolement. Les saikosaponines B_1 et C semblent les plus efficaces à l'encontre de la D-galactosamine tandis que la saikosaponine D protège remarquablement d'une intoxication au CCl_4 . Notons au passage que l'activité antiinflammatoire la plus importante est portée par les saikosaponines A et D.

Des équipes chinoises ont mis en évidence une protection à l'encontre du relargage enzymatique observé lors d'hépatites et de cirrhoses expérimentales et de la stéatose induite par le CCl_4 , par la cucurbitacine B extraite de Cucurbita pepo et la cucurbitacine E isolée d'Ecballium elaterium, composés qui se retrouvent également dans d'autres cucurbitaceae.

Glycyrrhiza glabra L. ou Glycyrrhiza uralensis Fischer (Fabaceae) sont également très utilisés en médecine orientale pour traiter les affections du foie (préparation "kanzo"); la glycyrrizine et l'acide glycyrrhétinique seraient porteur de cette activité qui est retrouvée sur des modèles d'intoxication classiques comme le CCl_4 et la D-galactosamine (Kiso et coll., 1984) mais également sur des modèles immunologiques pour lesquels n'existe encore que peu de recul.

Récemment des triterpènes isolés de Canarium album Raeusch (Burseraceae), utilisé en médecine chinoise, ont également montré une activité protectrice à l'encontre de la D-galactosamine in vitro (Tamai et coll., 1989).

E. Modèles pharmacologiques

I. Evolution des modèles pharmacologiques

Les modèles pharmacologiques utilisés pour approcher le retentissement de substances végétales sur la sphère hépatique ont largement évolué au cours de ces dernières décennies. Cette évolution a d'ailleurs accompagné (ou provoqué !) une modification du concept même de l'hépatoprotection et on peut schématiquement distinguer trois périodes, chacune d'elle étant caractérisée par une approche expérimentale particulière.

I.1 Drainage et sécrétions biliaires

L'approche la plus ancienne de l'hépatoprotection apportée par un extrait végétal est celle recouvrant la notion d'activité dépurative par accroissement des fonctions d'émonction propre au foie. Cet aspect de drainage reste encore vivace voire primordial dans certaines démarches phytothérapeutiques et homéopathiques où les teintures mères d'origine végétale sont largement utilisées dans la préparation du terrain. Cette approche, dont les bases physiologiques restent souvent floues, s'est naturellement prolongée par l'étude des sécrétions biliaires recherchant dans un premier temps une activité amphocholérétique puis plus simplement une activité hypercholérétique.

Le modèle d'étude le plus largement utilisé est réalisé chez le rat anesthésié au pentobarbital à dose filée, la bile étant recueillie par gravimétrie après mise en place d'un cathétérisme du canal cholédoque. Les extraits végétaux sont injectés par voie veineuse jugulaire la plupart du temps. Certains modèles, moins fréquents, utilisent une fistule biliaire permanente et nécessitent de ce fait des animaux plus volumineux comme le chien ou le porc. D'autres techniques, comme le cathétérisme biliaire rétrograde ou l'utilisation d'espèces animales reproduisant génétiquement certaines pathologies humaines, servent uniquement à approcher les mécanismes physiologiques et toxicologiques de la sécrétion biliaire sans exploration du versant thérapeutique.

I.2 Modèles d'intoxication in vivo

Les phénomènes biliaires ne représentant qu'une partie de l'activité hépatique, les études concernant l'hépatotoxicité des substances chimiques se sont rapidement diversifiées et étendues à l'ensemble des potentialités métaboliques du foie à l'aide de modèle d'intoxication in vivo. Ces modèles ont utilisé de nombreuses espèces, le rat étant, de loin, l'animal le plus utilisé. En fait, il existe une très grande diversité de méthodes d'étude; cette diversité touche autant les toxiques utilisés, leurs doses et leurs modes d'administration que les marqueurs de l'intoxication et de l'hépatoprotection ou encore l'expression des doses d'extraits végétaux et les protocoles de traitement.

Les hépatotoxiques sont nombreux et ne procèdent pas tous des mêmes mécanismes. Certains d'entre eux, les toxiques non intrinsèques, par définition, échappent aux expérimentations animales, leurs actions délétères s'exprimant chez l'homme, grâce à une vulnérabilité particulière que sont les réactions d'idiosyncrasie. Parmi les toxiques utilisables chez l'animal, on sépare classiquement les toxiques intrinsèques indirects, dont le chef de file est la D-galactosamine (acétaminophène, amanitine, phalloïdine, éthionine...) et les toxiques intrinsèques directs dont le chef de file au niveau expérimental est le tétrachlorure de carbone (tétrachloroéthane, chloroforme...).

Les modes d'administration et les doses utilisées varient considérablement d'une équipe à une autre, ce qui rend difficile voire impossible les comparaisons entre différents travaux. Ainsi pour le CCl_4 , probablement le toxique le plus largement utilisé, l'administration se fait par voie intrapéritonéale, sous cutanée ou orale et les doses utilisées varient d'un facteur de 1 à 20 selon les équipes.

La quantification de l'atteinte hépatique provoquée par un toxique déterminé demeure un problème central et un très grand nombre de marqueurs ont été proposés tant au niveau histologique que biochimique :

- de nombreuses enzymes, libérées à partir du cytosol et des organites intracellulaires, ont été utilisées comme indicateurs d'hépatotoxicité (Zimmerman, 1982). Les phosphatases alcalines, la 5' nucléotidase, la leucine peptidase et les gamma-glutamyltransférases sont fortement augmentées en cas de cholestase, plus faiblement en cas de nécrose hépatique. L'ornithine carbamoyltransférase, la sorbitol déshydrogénase, la lactate déshydrogénase, l'alanine aminotransférase, la fructose monophosphate aldolase et l'arginase sont fortement augmentées en cas de nécrose aiguë du foie mais plus faiblement en cas de cholestase. D'autres enzymes comme l'aspartate amino transférase et la glutamate oxaloacétate transaminase ont des comportements semblables mais sont moins spécifiques d'atteinte hépatique car elles augmentent également en cas d'atteintes d'autres organes.

- la malonaldéhyde (MAD) et la teneur en diènes conjugués quantifient l'intensité de la lipoperoxydation tandis que le glutathion renseigne sur le potentiel anti-oxydant endogène de la cellule.

- l'altération de certaines fonctions d'excrétion hépatique peut être explorée. Le taux de bilirubine plasmatique est un index relativement peu sensible de la fonction hépatique, le taux d'excrétion de la bromosulfo-phtaléine, plus sensible, diminue en cas d'atteintes hépatiques.

- la répercussion sur certains métabolismes particuliers peut être utilisée, comme dans la mesure du temps de sommeil après administration

concomittante d'un toxique et d'un barbituriques ou encore la durée de la paralysie induite par la zoxazolamine.

- les répercussion sur les synthèses (urée, cholestérol, protéines, prothrombine) ou l'étude histologique de coupes microscopiques de foie renseignent sur l'intégrité ou l'atteinte des cellules hépatiques.

Les extraits végétaux testés sont généralement apportés en traitement préventif et éventuellement poursuivis en traitement curatif. L'administration préventive des extraits peut varier selon les études de 30 minutes à 4 jours avant l'intoxication et le traitement curatif de 30 minutes à 2 jours. Certains traitements sont uniques, d'autres répétés parfois jusqu'à l'administration quotidienne pendant 6 mois.

Cette grande diversité de protocole d'étude rend quasiment impossible tout classement, en fonction de leur efficacité, des extraits végétaux utilisés par des équipes différentes, d'autant plus que l'on peut regretter l'absence quasi générale de produits de référence dans ce type d'expérimentation.

Les modèles in vivo se heurtent enfin à un certain nombre de difficultés :

- la lourdeur des expérimentations, en raison du nombre d'animaux nécessaire dès qu'il s'agit de comparer l'activité de plusieurs extraits ou de différentes fractions d'un même extrait.

- une réponse souvent peu homogène obtenue avec certain toxique ce, qui se traduit par des écart-types parfois important, au cours d'une même expérimentation, obligeant à augmenter le nombre de sujets d'expérience par lots afin de pouvoir visualiser de faible significativité statistique. Il faut d'ailleurs noter que parmi les rongeurs, le rat est préféré à la souris en raison de la moins grande variabilité des ALAT, marqueurs fréquemment utilisés au cours de ces expérimentations.

- enfin et surtout il est quasiment impossible en utilisant des techniques in vivo d'approcher les mécanismes toxiques situés à l'échelon cellulaire et par la même de situer avec précision le point d'impact de l'action thérapeutique éventuellement apportée par un extrait végétal.

1.3 Modèles In vitro

Si les expérimentations sur l'animal entier demeurent par bien des aspects indispensables, cette dernière décennie aura cependant été marquée par l'essor constant des techniques in vitro. Les raisons en sont diverses. Les plus nobles sont sans aucun doute celles d'ordre éthique par rapport aux animaux de laboratoire, même si elles recourent parfois, il faut l'avouer, des contraintes

plus prosaïquement économiques. Mais les plus décisives sont avant tout :

- le maintien de l'activité métabolique hépatocytaire, sur de courtes périodes, de quelques heures pour les hépatocytes en suspension à quelques jours pour les hépatocytes en culture ou en co-culture.

- le contrôle beaucoup plus aisé de l'environnement physico-chimique mais également des conditions d'intoxication lors d'essais pharmacologiques

- une plus grande homogénéité des échantillons; chaque animal étant, en outre, son propre témoin

- une économie non négligeable des produits à tester par rapport aux quantités utilisées au cours d'expérimentations in vivo

Toutes ces raisons font des systèmes cellulaires isolés, un modèle particulièrement adapté au screening toxicologique ou pharmacologique.

Il faut cependant rappeler que les expérimentations in vitro sont étrangères à certaines considérations d'ordre pharmacocinétiques. Comme nous l'avons déjà signalé, la toxicité d'une substance dépend de nombreux mécanismes séquentiels qui conditionnent son devenir et l'intensité de ses effets biologiques comme les phénomènes d'absorption, de distribution tissulaire, d'excrétion, de cinétique de concentration aux niveau des sites d'action. Ce sont autant de phénomènes qui naturellement, ne peuvent être pris en compte par des techniques in vitro.

Une autre limite des tests sur cellules isolées réside dans le fait que précisément ils n'observent que des événements purement cellulaires, alors qu'in vivo une partie des phénomènes toxiques peut être de nature immuno-allergique ou de nature tissulaire, à type de réactions inflammatoires, de fibroses, de scléroses.

Il faut donc toujours garder à l'esprit le caractère restrictif d'une telle approche. En contre partie, seules les techniques in vitro sont capables de fournir à l'expérimentateur des renseignements précis, à la fois sur les mécanismes toxiques mis en jeu et sur les processus conduisant à l'effet thérapeutique.

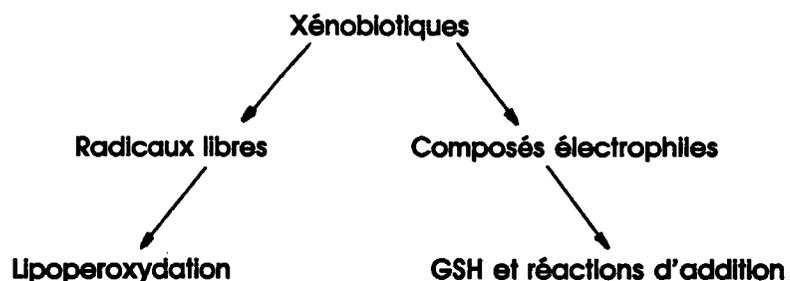
Les progrès accumulés ces dernières années dans les techniques d'approche de la biochimie cellulaire in vitro ont eu pour corollaire une constante évolution des critères d'hépatotoxicité eux-mêmes. Les critères héroïques, comme ceux basés sur l'exclusion ou l'inclusion-métabolisation de colorants vitaux par les cellules viables, ont vécu et ont rapidement fait place à l'étude du relargage vers le milieu extracellulaire d'enzymes cytoplasmiques. Les plus largement utilisées concernent la lactico déshydrogénase (LDH) et les transaminases, alanine aminotransférase (ALAT) et aspartase aminotransférase (ASAT).

Si l'utilisation de tels critères est totalement justifiée pour rendre compte d'altérations importantes de l'économie cellulaire, l'absence de mouvements significatifs les concernant peut cacher des perturbations métaboliques souvent plus sensibles à l'action hépatotoxique et accessible aux seules techniques in vitro. Goethals et coll. (1984) ont pu montrer que la prométhazine à la dose de 0.1mM n'induit aucune répercussion enzymatique alors que la synthèse du glycogène est inhibée de manière significative. Toutes les doses en deçà de 0.5mM n'entraînent aucune variation du relargage enzymatique en LDH. Sur ce seul critère ces doses pourraient être considérées comme non toxiques mais l'étude des possibilités métaboliques fait apparaître un effet toxique dose-dépendant se manifestant aussi bien sur la synthèse du glycogène que sur celles des protéines. Les 2 et 4 acétyl aminofluorène perturbent la synthèse protéique à des doses qui n'entraînent ni relargage enzymatique ni modification de la synthèse du glycogène. Ces exemples qui pourraient être multipliés, démontrent la pertinence d'un tel modèle d'étude et accrédite un point déjà précédemment souligné, à savoir que l'hépatoprotection ne peut s'appliquer que dans un cadre restrictif, limité à un mécanisme biochimique ou à une voie toxique bien déterminée.

II. Stratégie pharmacologique et choix des modèles

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'expression de l'hépatotoxicité directe d'un xénobiotique passe par des mécanismes complexes et variés mais qui peuvent être schématisés par deux modalités essentielles :

- d'une part l'apparition d'entités radicalaires ou de formes toxiques de l'oxygène, qui vont induire des perturbations des endomembranes par l'intermédiaire d'une peroxydation lipidique
- d'autre part l'apparition d'entités électrophiles provoquant des réactions d'addition sur de nombreux composés cellulaires ainsi qu'une action thioloprive qui aboutit à une diminution du glutathion cellulaire.



Les moyens d'investigation pharmacologique doivent permettre de retrouver les divers protagonistes de l'action toxique, si possible de les dissocier,

et naturellement d'apprécier l'impact thérapeutique des extraits végétaux étudiés.

Pour ce faire deux modèles d'étude ont été adaptés à l'utilisation d'un "totum végétal" :

- un test non biologique, le test de décoloration du radical diphényl picryl hydrazyl (DPPH)
- un test biologique utilisant des hépatocytes isolés, maintenus en suspension

II.1 Test du DPPH

Ce modèle, non biologique, permet d'approcher l'activité antiradicalaire des substances testées. Parmi toutes les techniques pouvant être utilisées pour cette étude, la décoloration du radical diphénylpicryl hydrazyl (Deby et coll., 1970), nous a semblé être le moyen le plus adapté dans le cadre d'un screening du fait de sa rapidité, de sa facilité de mise en oeuvre et de son coût modique.

Le radical diphényl picryl hydrazyl est un radical libre, stable sous certaines conditions, qui présente en solution, une intense coloration violette de maximum d'absorption à 517 nm. Cette coloration disparaît lors de la saturation des couches électroniques, c'est à dire lors d'un passage vers une forme non radicalaire. De ce fait, la diminution de la densité optique de la solution rend compte du pouvoir piègeur de radicaux libres de la substance ajoutée. Le degré d'inhibition est exprimé par rapport à un blanc témoin traité dans les mêmes conditions.

Le modèle appliqué jusqu'à présent sur des molécules pures a dû être adapté à l'étude d'extraits végétaux par la définition des concentrations d'étude. Nous avons ainsi pu établir que des solutions d'extraits végétaux à 0.25 et 0.125 g/l permettent, selon les extraits considérés, de couvrir toute la gamme de décoloration de 0 à 100 %. Ne possédant aucun recul bibliographique, le critère d'efficacité α , dans un premier temps été arbitrairement défini à 50 % de décoloration. La valeur prédictive des résultats obtenus sur ce test étant secondairement affinée par la confrontation avec les résultats du test biologique sur hépatocytes isolés.

II.2 Test sur hépatocytes isolés

Le second modèle d'étude est un modèle biologique, ayant pour support des hépatocytes de rat fraîchement isolés et maintenus en suspension. Il permet l'approche du pouvoir antilipoperoxydant des extraits végétaux par le dosage d'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique, la malonaldéhyde (MAD) ainsi que celle de leur pouvoir antinécrotique par la quantification du relargage extracellulaire de la lactico déshydrogénase (LDH) et de l'aspartate

amino-transférase (ASAT), marqueurs biologiques classiques des phénomènes de cytolysse.

De nombreux travaux ont montré que le modèle d'hépatocytes isolés en suspension et maintenus en survie sur de courtes périodes, inférieures à quelques heures, permet de conserver une part essentielle de l'intégrité et de la qualité de la cellule hépatique, autorisant son utilisation dans l'étude de divers mécanismes biochimiques ou toxicologiques (Klaasen et Stacey, 1982; Krack et coll., 1983; Arvis, 1989).

II.2.1 Choix du toxique

Comme nous l'avons vu précédemment, le tétrachlorure de carbone (CCl_4), toxique classique des hépatites expérimentales, présente un certain nombre d'inconvénient et sa très large utilisation semble plus être un héritage des expérimentations in vivo qu'un choix dicté par les possibilités spécifiques des modèles in vitro.

Il possède un métabolisme relativement complexe au cours duquel apparaît un certain nombre de métabolites (chloroforme, phosgène, monoxyde de carbone) qui peuvent développer une toxicité à leurs propres comptes (Anders, 1984).

La peroxydation lipidique qu'il engendre est relativement modeste. En outre les conséquences respectives de la peroxydation lipidique, engendrée par les radicaux trichlorométhyles ou trichlorométhylperoxydes, et des phénomènes d'addition par liaisons covalentes sur les macromolécules cellulaires, sont difficilement appréciables (Poli et coll., 1981), à tel point qu'il a toujours été difficile, sur ce modèle, de quantifier leurs rôles dans les phénomènes nécrotiques liés à ce toxique.

Le caractère non hydrosoluble du CCl_4 pose des problèmes de précision des doses lors d'ajout direct à un milieu en culture ou des problèmes liés à l'utilisation d'un tiers solvant dont la concentration finale parfois importante n'est pas toujours sans effet (Arvis, 1989).

Enfin, un effet solvant direct sur les structures lipidiques membranaires, suspecté par certains travaux pose également problème (Berger et coll., 1986; Berger et coll., 1987).

Pour toutes ces raisons, nous avons cherché à développer un modèle permettant le screening d'extraits végétaux bruts, reposant sur un toxique d'utilisation plus aisée et pour lequel les mécanismes toxiques mis en jeu peuvent être plus finement ciblés, sachant que nous devons retrouver les conséquences d'une atteinte radicalaire d'une part et d'une atteinte électrophile d'autre part.

Dans une première approche, nous avons choisi d'isoler les deux mécanismes toxiques que nous voulions étudier, en utilisant deux modèles d'intoxication différents.

Le premier, à l'aide d'un système Ascorbate-Fer, devait permettre de développer une peroxydation lipidique intense, consécutive à la production de radicaux hydroxyles, sans faire apparaître une majoration des fuites enzymatiques pendant toute la durée d'expérimentation. En effet, certains métaux de transition, notamment le fer, sont connus pour augmenter les processus autooxydatifs membranaires en favorisant la réactivation des hydroperoxydes lipidiques et la génèse de formes toxiques de l'oxygène par l'intermédiaire du cycle d'Haber-Weiss ou de complexes perferryles. Ce type d'activité est amplifié par la présence de réducteurs, comme l'ascorbate, qui permettent le retour du fer à l'état ferreux.

Le second modèle d'intoxication utilisait le diéthylmaléate (DEM), puissant dépléteur du glutathion, et devait permettre d'approcher les conséquences très précoces d'une atteinte électrophile. Les résultats expérimentaux concernant cette approche sont présentés plus loin ainsi que les raisons qui nous ont fait abandonner ces modèles.

D'autres essais utilisant la ménadione et la glucose-oxydase comme producteurs d'entités radicalaires, ont également été abordés puis rapidement abandonnés.

Finalement un hydroperoxyde organique, le tert-butyl hydroperoxyde, a été retenu comme modèle d'intoxication, unique, en raison de ses possibilités métaboliques à l'échelon hépatocytaire.

II.2.2 tert-butylhydroperoxyde (tBH) et hépatocytes

Le tert-butylhydroperoxyde ((CH₃)₃-COOH) est un hydroperoxyde organique, de poids moléculaire égal à 90,1, pouvant être utilisé pour l'étude de mécanismes oxydatifs. Il entraîne, au niveau hépatocytaire, une peroxydation lipidique, la formation de liaisons covalentes sur les macromolécules cellulaires ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie calcique.

La formation de radicaux libres est rapide après l'introduction du tBH, maximale en 10 minutes (Tribble et coll.,1988) et n'est pas modifiée par la concentration en O₂. Outre la formation de radicaux tertbutoxyles et tertbutylperoxyles (Cadenas et coll.,1982; Kalyanaraman et coll.,1983), au cours de laquelle interviennent probablement les métaux de transition, notamment Fe²⁺; les cytochromes P450 pourraient intervenir en provoquant une scission homolytique (Kappus,1981) faisant apparaître des radicaux [•]OOH et [•]OH extrêmement réactifs. Des études de résonance paramagnétique électronique, utilisant la N-tert-butylphénylnitronne comme piègeur, montrent d'ailleurs un signal assymétrique confirmant l'apparition de plusieurs types de radicaux libres (Tribble et coll.,1988).

Le tert-butylhydroperoxyde est également métabolisé au niveau hépatique par la glutathion peroxydase présente au niveau du cytosol et de la mitochondrie, avec passage du glutathion de sa forme réduite (GSH) à sa forme oxydée (GSSG) et formation de tert-butanol (tBOH) (Bellomo et coll.,1982; Sies et coll.,1972).

La disparition du tert-butylhydroperoxyde a été estimée à 35nMol par minute pour 10^6 hépatocytes à l'aide de techniques CLHP (Tribble et coll.,1988). La vitesse d'apparition du tert-butanol n'est pas modifiée par la concentration en O_2 du système et sa concentration reste pratiquement constante pendant 1 heure, ce qui démontre sa faible métabolisation.

Par ailleurs, 0,6 mM de tBOH n'affecte pas la viabilité hépatocytaire sur des expérimentations de 2 heures. Le tBOH n'est donc pas responsable des phénomènes nécrotiques (Tribbel et coll.,1988). Les effets toxiques du tBH ne sont pas en relation avec une toxicité éventuelle de produits de métabolisation, contrairement à ceux du CCl_4 .

Les radicaux libres, formés lors de l'ajout de tBH, induisent une peroxydation lipidique intense aussi bien sur les hépatocytes de souris que de rats (Rush et coll.,1985); celle-ci ne semble cependant pas jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes nécrotiques hépatocytaires puisque l'utilisation de substances antiradicalaires comme la prométhazine (Rush et coll.,1985; Joyeux et coll.,1989) ou le disulfirame (Dogterom et coll.,1988), bien que supprimant totalement la lipoperoxydation, n'empêche pas la nécrose. Ces résultats n'ont pas été retrouvés sur des tubules rénaux isolés, où les phénomènes nécrotiques semblent directement liés aux phénomènes peroxydatifs (Schnellmann,1988).

Le GSH est régénéré à partir du GSSG par la glutathion réductase avec oxydation concomitante de NADPH en $NADP^+$. Rush (1985) a montré que 1 mM de tBH entraînait une oxydation complète du GSH dans les 10 premières minutes d'intoxication, parallèlement à une diminution de NADPH et une augmentation de $NADP^+$ sans variation du pool total de nucléotides ($NADPH + NADP^+$). Rush et Alberto (1986) mettent en évidence qu'une intoxication par le tBH stimule la voie des pentoses augmentant ainsi les possibilités de réduction du $NADP^+$. Le tBH augmente de façon significative le métabolisme du $1-^{14}C$ glucose en $^{14}CO_2$ mais reste sans effet sur celui du $6-^{14}C$ glucose (Rush,1985b).

L'oxydation du GSH et la réduction concomitante de NADPH représentent sans nul doute un des éléments majeurs dans les phénomènes induisant la nécrose cellulaire.

Ces dernières années, de nombreux travaux se sont focalisés sur le rôle des mouvements du calcium intracellulaire au cours de ces phénomènes. La responsabilité du Ca^{2+} extracellulaire prônée par Schanne et Farber et reprise

par certains auteurs a, en effet, été largement mise en doute par de nombreuses expérimentations (Fariss et coll.,1985; Thomas et coll.,1988). Les mouvements calciques intracellulaires sont régulés par la fixation du calcium libre à certaines protéines cytoplasmiques (calmoduline), par l'activité d'une ATPase membranaire mais surtout par des phénomènes de stockage au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (Murphy et coll.,1980; Joseph et coll.,1983).

Lehninger (1978) a pu démontrer que l'oxydation du NADPH mitochondrial par l'oxaloacétate provoquait une sortie du Ca^{2+} mitochondrial insensible au rouge de ruthénium, alors que sa réduction secondaire par le β hydroxybutyrate provoquait le restockage calcique. L'état rédox des nucléotides mitochondriaux régule les mouvements calciques mitochondriaux (Bellomo et coll.,1984). Le stockage au niveau du réticulum, de découverte plus récente, est associé à l'activité de Ca^{2+} ATPases dont deux formes ont été mises en évidence au niveau hépatocytaire.

Le tBH provoque une augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique par plusieurs mécanismes. La diminution des possibilités de stockage mitochondrial est en rapport avec l'oxydation du NADPH (Thor et coll.,1984; Bellomo et coll.,1984). Le catéchol, en diminuant la perte de NADPH après intoxication au tBH, sans modifier la déplétion en GSH, permet une élévation seulement transitoire de l'activité de la phosphorylase a, témoin indirect des mouvements calciques.

La diminution du stockage du réticulum est en relation avec la déplétion du GSH qui normalement joue un rôle protecteur probablement par son action antiradicalaire; en effet, la diminution des possibilités de stockage du réticulum est prévenue par le dithiothreitol, porteur d'un groupement SH, mais qui n'agit pas comme cofacteur de la GSH peroxydase (Bellomo et coll.,1982). En outre, Jones (1983) a démontré que la métyrapone, un inhibiteur du cytochrome P450, prévient l'inactivation de la séquestration calcique sur microsomes isolés après intoxication au tBH., alors que le MnCl_2 , inhibiteur de la peroxydation lipidique, ne le fait pas.

La diminution de l'activité Ca^{2+} ATPasique du réticulum endoplasmique serait une conséquence directe de l'activité radicalaire au niveau des groupements SH des Ca^{2+} ATPases.

L'augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique est parallèle à celle de l'activité des phosphorylases a; leur activation étant strictement dépendante d'une phosphorylase kinase Ca^{2+} dépendante.

La séquestration du Ca^{2+} joue un rôle essentiel dans la stimulation adrénergique et le Ca^{2+} réticulaire pourrait jouer le rôle de cible de l'inositol 1,4,5 triphosphate formé dans la membrane plasmique suite à la stimulation hormonale. Les agents adrénergiques multiplient par 2 ou 3 la concentration

calcique intracytoplasmique et provoquent une stimulation parallèle des phosphorylases a.

Enfin, l'augmentation de Ca^{2+} augmenterait l'activité de la glycogène synthétase kinase AMPC indépendante (Chan et coll.,1984).

Tableau F1: Préparation des extraits

Genre-Espèce	Partie utilisée	Provenance	Mode d'extraction	Rendement
Poa sp.	Parties aériennes	France	Infusion macération 4h.	14.3 %
Momordica charantia	Parties aériennes	Haïti	Infusion macération 4h.	24.0 %
Eschscholzia californica	Parties aériennes	/	Infusion macération 4h.	20.0 %
Cuscuta americana	Parties aériennes	Rep. Dominicaine	Infusion macération 4h.	18.5 %
Annona reticulata	Feuilles	Rep. Dominicaine	Décoction 5' + Infusion 30'	10.1 %
Annona muricata	Feuilles	Rep. Dominicaine	Décoction 5' + Infusion 30'	10.2 %
Eupatorium cannabinum	Parties aériennes	France	Décoction 10' + macération 24h.	14.7 %
Eupatorium odoratum	Feuilles	Rep. Dominicaine	Infusion macération 4h.	18.6 %
Justicia pectoralis	Parties aériennes	Rep. Dominicaine	Infusion macération 4h.	12.4 %
Carthamus tinctorium	Fleurs	Corée	Décoction 1h.	15.3 %
Capparis spinosa	Parties aériennes	Egypte	Infusion macération 4h.	5.6 %
Capparis spinosa	Racines	Egypte	Infusion macération 4h.	7.5 %
Curcuma domestica	Rhizomes	Haïti	Infusion macération 4h.	27.3 %
Pulicaria orientalis		Yemen	Infusion macération 4h.	13.1 %
Crepis rueppellii		Yemen	Infusion macération 4h.	17.1 %
Vaccinium myrtillus	Fruits	/	Percolat hydro.alcool. 4x6h.	10.0 %
Kalanchoe crenata	Parties aériennes	Gabon	Infusion macération 4h.	25.3 %
Staudia gabonensis	Ecorces	Gabon	Infusion macération 4h.	4.6 %
Juniperus communis	Parties aériennes	France	Infusion macération 4h.	8.5 %
Tamarindus indica	Feuilles	Rep. Dominicaine	Infusion macération 4h.	17.5 %
Bidens pilosa	Feuilles	Gabon	Infusion macération 4h.	22.3 %
Euphorbia hirta	Parties aériennes	Nouvelles Hébrides	Infusion macération 4h.	17.1 %
Cochlospermum tinctorium	Rhizomes	Afrique	Infusion macération	10.5 %
Cochlospermum planchonii	Racines	Afrique	Infusion macération 4h.	12.0 %
Peumus boldus	Feuilles	/	Percolat hydro.alcool. 4x6h.	25.0 %
Terminalia catappa	Feuilles	Haïti	Décoction 30'	12.6 %
Rosmarinus officinalis	Jeunes Pousses	France	Infusion macération 4h.	16.2 %
Xanthoxylum xanthoxyloides	Racines	Afrique	Infusion macération 4h.	8.95 %

F. Méthodologie expérimentale

Ce chapitre décrit les méthodologies expérimentales utilisées au cours de la phase de screening pour la recherche d'extraits végétaux hépatoprotecteurs. Les méthodologies propres à la phase de fractionnement sont détaillées dans les chapitres correspondants.

I Préparation des extraits végétaux

Le tableau F1 précise la provenance, la partie utilisée et le mode de préparation des différentes espèces végétales étudiées. Les variations quant au mode de préparation, notamment du temps d'extraction, s'expliquent par le fait que certaines préparations ont été réalisées par d'autres équipes utilisant leur propre méthodologie. Pour notre part, les drogues sèches sont grossièrement contusées puis jetées dans de l'eau distillée bouillante à raison de 60 g de plante sèche pour 600 ml d'eau. La préparation est alors placée à l'étuve à 37°C pendant 4 heures. Les extraits ainsi obtenus sont filtrés sur Büchner, puis concentrés sous pression réduite à une température de 40°C. Une lyophilisation (lyophilisateur CD 52-1, Heto, Danemark) permet leur conservation dans de bonnes conditions. Le rendement exprimé en pourcentage représente le rapport de la quantité de lyophilisat obtenu sur la quantité, en poids sec, de matière végétale utilisée. **Toutes les doses mentionnées dans les tests de screening sont exprimées en mg de plantes sèches.**

II Identifications chimiques

Les diverses procédures expérimentales utilisées au cours de l'identification chimique sont celles décrites par Weniger (1985)

II-1 Recherche des alcaloïdes

5g de drogue sont triturés dans un mortier; on ajoute 10 ml d'HCl 0,1 N et la solution est filtrée après quelques minutes; à 1 ml de filtrat sont ajoutées 5 gouttes de réactif de Mayer (1,36g de chlorure mercurique + 5g d'iodure de potassium pour 100 ml d'eau distillée) dans un tube à essais. De la même manière, 5 gouttes de réactif de Wagner (2g d'iodure de potassium + 1,27g d'iode pour 100 ml d'eau distillée) sont ajoutées à 1 ml de filtrat dans un autre tube à essais.

La réaction est considérée comme négative si aucune turbidité ni précipitation n'est observée dans les minutes qui suivent la manipulation. En cas de réaction positive, la confirmation de la présence d'alcaloïdes est réalisée de manière suivante: à 10g de drogue triturée dans un mortier on ajoute 1ml de

NH_4OH 0,5 N puis 30 ml d'un mélange éther-chloroforme (3:1 V/V); après une macération de plusieurs heures, la solution est filtrée et une quantité suffisante d' HCl 0,2 N est ajoutée pour acidifier le milieu; la phase acide est recueillie après partage dans une ampoule à décanter. La recherche des alcaloïdes est faite sur cette solution acide à l'aide des réactifs de Mayer et de Wagner selon la méthode exposée précédemment.

II-2 Recherche de composés flavoniques

La recherche de ces composés est réalisée à l'aide de la réaction à la cyanidine :

A 10g de poudre pulvérisée sont ajoutés 100 ml d'eau, le mélange est porté à ébullition pendant cinq minutes; après refroidissement et filtration, on ajoute 5 ml d' HCl 0,2 N, 0,5g de copeaux de magnésium et quelques gouttes d'alcool isoamylique. La présence de flavonoïdes est mise en évidence par une coloration rose, rouge ou violette dans la phase supérieure de la solution (phase isoamylique).

II-3 Recherche des saponosides

Les propriétés moussantes des saponosides sont mises à profit dans cette réaction : 15 ml de décoction sont agités vigoureusement dans un tube à essais; l'existence d'une mousse persistante après 10 minutes indique la présence éventuelle de saponosides.

II-4 Recherche de dérivés stéroïdiques ou terpéniques

On laisse macérer 1g de drogue dans 20 ml d'éther éthylique dans un erhlenmeyer bouché pendant 24 heures. Quelques gouttes de la macération sont évaporées sur un verre de montre et le résidu est dissout dans 2 gouttes d'anhydride acétique. Une coloration allant du vert au mauve après ajout d'une goutte d' H_2SO_4 , permet de conclure à la présence probable de dérivés stéroïdiques et/ou terpéniques.

II-5 Recherche des tannins

La présence de tannins est indiquée par l'apparition d'une coloration bleu-noire après ajout de 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1% dans 5 ml de solution aqueuse à 5% d'extrait végétal.

II-6 Recherche des quinones

A 2 ml de la décoction à 10% de la drogue sont ajoutées quelques gouttes d'une solution de NaOH à 33%. La présence d'une coloration rouge ou violette indique la présence probable de quinones.

III Identifications par chromatographie en couche mince

III-1 Recherche des flavonoïdes

Support : plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (20x20cm) (Merck).

Solvant de migration :

100 vol. d'éthyl acétate
 11 vol. d'acide formique
 11 vol. d'acide acétique glacial
 27 vol. d'eau

Révélateur :

1. solution méthanolique d'ester éthylamino-diphényl borique (Roth) à 1% (réactif de NEU)
2. solution éthanolique de polyéthylène glycol 4000 (Serva) à 5%

Méthodologie employée : les lyophilisats d'extraits végétaux sont solubilisés dans de l'eau déionisée dans les proportions de 100 mg de plante sèche pour 1 ml d'eau. La quercétine, le kaempférol, la rutine, l'acide chlorogénique et l'acide gallique (Roth) sont solubilisés dans l'éthanol à raison de 5 mg/ml. Le dépôt des échantillons se fait sous un volume de 10 μ l, à 2 cm de la base de la plaque de silice. La migration est arrêtée à une distance d'environ 15 cm. Après séchage, le réactif de NEU puis le PEG 4000 sont pulvérisés. Les chromatogrammes sont observés après 15 minutes, sous U.V. à 366 nm.

III-2 Recherche de composés réducteurs

Support : plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (20x20cm) (Merck).

Solvant de migration :

100 vol. d'éthyl acétate
 11 vol. d'acide formique
 11 vol. d'acide acétique glacial
 27 vol. d'eau

Systeme révélateur :

- 0,11 ml d'anisaldéhyde
- 0,25 ml d'acide phosphomolybdique à 10% dans du méthanol
- 1,13 ml d'acide sulfurique concentré (d=1.84)
- 2,25 ml d'acide acétique
- 22,00 ml de méthanol

Méthodologie employée : les lyophilisats d'extraits végétaux sont solubilisés dans de l'eau déionisée dans les proportions de 100 mg de plante sèche pour 1 ml d'eau. Les chromatogrammes n'ayant aucun but d'identification spécifique mais servant uniquement de référence, aucun témoin n'est utilisé. Le dépôt des échantillons se fait sous un volume de 10 μ l, à 2 cm de la base de la plaque de silice. La migration est arrêtée à une distance d'environ 15 cm. Après séchage, le réactif est pulvérisé, la plaque est ensuite placée à l'étuve à 120°C pendant 10 minutes puis lue dans le visible.

IV Test d'inhibition du radical diphényl picryl hydrazyl (DPPH)

Le radical DPPH est solubilisé dans du méthanol dans des proportions telles que la densité optique (DO) de la solution à 517 nm soit voisine de 0,5 (2 mg/100 ml). Les lyophilisats d'extraits végétaux sont solubilisés dans de l'eau déionisée à une concentration de 0,25 et 0,125 g de plante sèche par litre. Dans un tube à essais, 750 μ l des solutions d'extraits végétaux sont ajoutés à 1,5 ml de la solution méthanolique de DPPH. Au bout de 5 minutes de contact, l'extraction du DPPH est réalisée par l'ajout de 4 ml de toluène par tube. Après agitation très vigoureuse, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes; deux phases sont alors nettement individualisées et la lecture s'effectue sur la phase supérieure, à 517 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon (Kontron). Les blancs témoins sont réalisés de façon identique en utilisant 750 μ l d'eau déionisée. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH représente :

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - \frac{\text{DO (DPPH+EXTRAIT)}}{\text{DO (DPPH+EAU)}}$$

A l'issue de ces expérimentations, l'ensemble des extraits végétaux testés sont classés en deux catégories :

- catégorie 1 : % d'inhibition < 50%
- catégorie 2 : % d'inhibition > 50%

V Hépatocytes en suspension

V.1 Isolement des hépatocytes

V.1.1 Animaux

Rats mâles Sprague - Dawley OFA (Iffa Credo, l'Arbresle), 200 à 250 grammes, nourris (croquettes M25C Extralabo) et abreuvés ad libitum. Les animaux sont stabulés dans des cages en macrolon et maintenus dans une animalerie cyclée (12 heures d'éclairage/12 heures d'obscurité) et thermostatée ($21 \pm 1^\circ\text{C}$)

V.1.2 Matériels

Les produits utilisés ont été les suivants: collagénase (Sigma), milieu minimum de Eagle (Flow Laboratory), tert-butyl hydroperoxyde (Sigma), hépes (Sigma), acide trichloroacétique (Prolabo), acide 2-thiobarbiturique (Prolabo), diméthyl-sulfoxyde (Prolabo), kit LDH Opt. (Boehringer), kit GOT Opt. (Boehringer).

V.1.3 Technique d'isolement des hépatocytes

L'animal est anesthésié au pentobarbital sodique (Clin Midy) à la dose de 60 mg/kg par voie IP puis hépariné à raison de 1 ml/kg (héparine 50 Fournier 5000 UI) selon la même voie d'injection et placé en décubitus dorsal dans une enceinte thermostatée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Après laparotomie et excision de la paroi abdominale, un cathéter (Critikon 18G) est mis en place dans la veine porte hépatique. La veine cave inférieure est sectionnée sous les veines rénales et le foie est perfusé à un débit de 30 ml/minute au moyen d'une pompe péristaltique (Masterflex) par un tampon phosphate, pH 7,4. Durant cette phase de lavage, après thoracotomie, un second cathéter est poussé par voie auriculaire dans la veine cave supérieure permettant la mise en place du dispositif assurant la recirculation du milieu de perfusion. Lorsque le lavage est jugé correct, le foie est perfusé à l'aide d'une solution de collagénase 0,05% p/v et de CaCl_2 5mM à un débit de 20 ml/mn. Lorsque l'action dissociatrice de l'enzyme est jugée suffisante, le foie est excisé puis placé dans une boîte de Pétri. La capsule de Glisson est délicatement retirée et les cellules sont mises en suspension par agitation douce. Le tissu conjonctif et le système artério-veineux ainsi que les amas cellulaires non dissociés sont écartés par filtration sur tamis de soie (68μ).

Deux décantations-lavages sont alors effectuées, le culot cellulaire étant remis en suspension dans un milieu minimum d'Eagle (MEM) tamponné par 20mM d'Hépes. Le comptage est réalisé sur une cellule de Malassez. La viabilité

est appréciée par le test d'exclusion du bleu Trypan. Le rendement est de l'ordre de $3 \text{ à } 5 \cdot 10^8$ cellules et la viabilité initiale doit être supérieure à 90%.

V.1.4 Protocole expérimental

La concentration de la suspension d'hépatocytes est ajustée à 1 million de cellules par ml de milieu nutritif. Des fractions aliquotes de 4 ml de suspension sont réparties dans des Erlenmeyer de 25 ml recouverts de parafilm, maintenus à 37°C au bain-marie sous agitation (60 oscillations/mn); chaque échantillon est gazé individuellement par un mélange O_2/CO_2 (95%/5%). Les différents toxiques utilisés sont ajoutés au milieu de culture directement ou après solubilisation dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). La concentration finale en DMSO est de 0,5% v/v. Les conditions d'utilisation propres à chaque toxique sont décrites dans les paragraphes les concernant. Les extraits végétaux sont ajoutés directement au milieu de suspension sous un volume de 20 μ l apportant la concentration finale voulue (1 mg ou 0.5 mg /ml de suspension). Les doses sont exprimées en mg de plante sèche par ml de suspension. Les dosages sont effectués après 30 minutes d'incubation.

V.1.5 Déterminations biochimiques

La lipoperoxydation est exprimée en terme de malonaldéhyde (MAD), déterminée par la méthode à l'acide 2 thiobarbiturique (Bernheim et coll, 1949). 1 ml de suspension hépatocytaire est mélangé à 2 ml d'acide trichloroacétique à 10%. Après 10 minutes de repos, les tubes sont centrifugés. 1 ml de surnageant est ajouté à 1 ml d'acide thiobarbiturique à 1%. Les tubes sont alors placés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes puis refroidis avant lecture à 535 nm. Les résultats sont donnés en nMoles/ 10^6 cellules.

Les fuites enzymatiques de LDH et d'ASAT sont déterminées par une méthode de cinétique enzymatique à l'aide de kits Boehringer, les résultats sont exprimés en mUI/ 10^6 cellules. Les lectures sont faites au spectrophotomètre (Uvikon 810, Kontron), dans l'UV à 340 nm et à 25 °C

V.1.6 Traitements statistiques

Le test de Cochran est utilisé pour vérifier l'homogénéité des variances et les évaluations statistiques sont effectuées à l'aide d'un simple test t de Student. Au cours de chaque expérimentation, un seul lot témoin est réalisé, pour plusieurs lots traités. Nous avons cependant considéré, au sein d'une même expérimentation, les comparaisons comme étant indépendantes malgré que les différents traitements soient comparés à un lot témoin unique. Cette attitude a été choisie pour alléger les calculs et en raison du caractère largement exploratoire de ce type d'expérimentation qui autorise une certaine incertitude sur le risque de première espèce (risque α). Cela explique également que le

nombre de sujets utilisés dans le lot témoin est identique à ceux des lots traités (triplicat) les possibles écarts de la moyenne observés dans le groupe témoin par rapport à sa moyenne théorique, en raison des fluctuations d'échantillonnage, pouvant être détectés du fait de la répétition des expérimentations. D'autre part pour le calcul du t, l'estimation de la variance n'a pas été établie sur l'ensemble des groupes, mais utilise, de manière classique, les variances estimées de chacun des deux lots comparés. De même la table de Dunnet n'a pas été utilisée, la phase de screening cherchant, avant tout, à révéler des activités importantes, statistiquement mais surtout biologiquement significatives, le test t de Student a été jugé suffisant.

VI Choix du toxique

VI.1 Etude du modèle ascorbate-fer

VI.1.1. Méthodologie

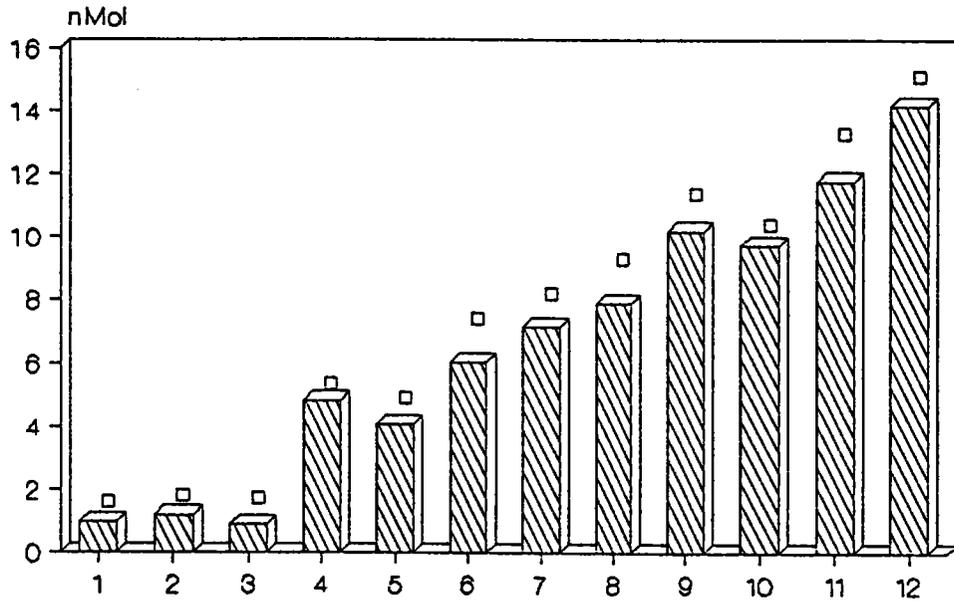
Les techniques d'isolement et de culture sont identiques à celles décrites précédemment. L'intoxication cellulaire est assurée par un mélange de sulfate de fer, apportant les ions Fe^{2+} , entrant dans la réaction de Fenton, et d'ascorbate destiné à réduire les ions ferriques produits au cours de cette réaction. L'acide ascorbique est testé à la dose de 250 et 500 μM ; le sulfate de fer (FeSO_4) aux doses de 20, 40 et 80 μM . L'ascorbate, le FeSO_4 ou le mélange des deux produits sont ajoutés directement au milieu de suspension sous un volume de 20 μl apportant la concentration finale voulue. Les dosages sont effectués après 30', 45' et 60' minutes. Lipoperoxydation et fuites enzymatiques sont quantifiées selon les méthodes précédemment décrites.

VI.2.2. Résultats et discussion

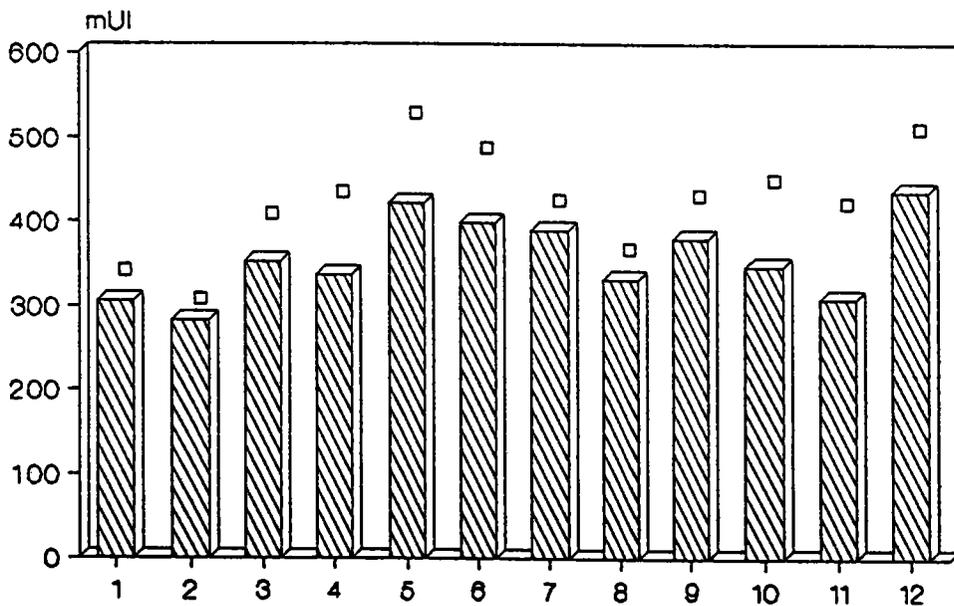
L'acide ascorbique seul, aux deux concentrations étudiées, n'entraîne aucune variation significative de la valeur de la MAD, par rapport aux lots témoins, aux différents temps d'incubation (Fig. F1 et F2). Par contre l'ajout dans le milieu de suspension de Fe^{2+} (FeSO_4 20, 40 ou 80 μM) aboutit à une augmentation très significative ($p < 0.001$) de la MAD, corroborant l'influence de ce métal dans les phénomènes autooxydatifs. Les rapports séries intoxiquées / séries témoins varient de 4 à 7 selon les doses de FeSO_4 ajoutées et le moment de prélèvement. Cette activité prooxydante est potentialisée lors de l'ajout simultané d'ascorbate, phénomène déjà observé sur microsomes (Slatter et coll., 1972) et hépatocytes en suspension (Poli et coll., 1982). Une représentation triaxiale des valeurs de MAD en fonction des différentes conditions expérimentales (Fig. F3) rend parfaitement compte de ce comportement potentialisateur.

Le dosage de la lactico-déshydrogénase (Fig. F1) ne montre aucun mouvement biologique significatif, ce système d'intoxication n'entraîne donc pas de chute de la viabilité cellulaire aux doses testées, ce qui est retrouvé par Russ (Russ et coll., 1985) et aisément confirmé par le test d'exclusion du bleu trypan. Le modèle d'hépatocytes isolés, maintenus en suspension et intoxiqués par un mélange ascorbate- FeSO_4 permet de développer de façon constante une lipoperoxydation dont le niveau est toujours très significatif par rapport aux lots non intoxiqués, et suffisant pour tester l'activité antiperoxydante d'une substance ajoutée. Les ALAT et la LDH ne sont jamais modifiées. Cependant dans tous les cas nous avons observé une augmentation isolée des ASAT.

MAD



LDH



F1 : Action de l'ascorbate et du sulfate de fer sur des hépatocytes isolés en suspension, à 30 minutes.

1 = témoin

2 = Ascorbate 250 μ M

3 = Ascorbate 500 μ M

4 = FeSO₄ 20 μ M

5 = FeSO₄ 40 μ M

6 = FeSO₄ 80 μ M

7 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 20 μ M

8 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 40 μ M

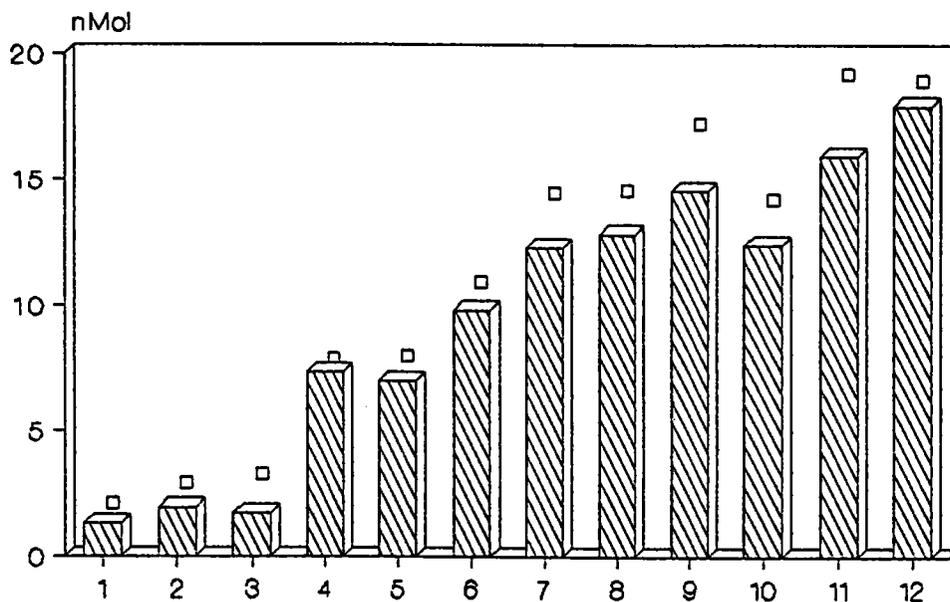
9 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 80 μ M

10 = Ascorbate 500 μ M + FeSO₄ 20 μ M

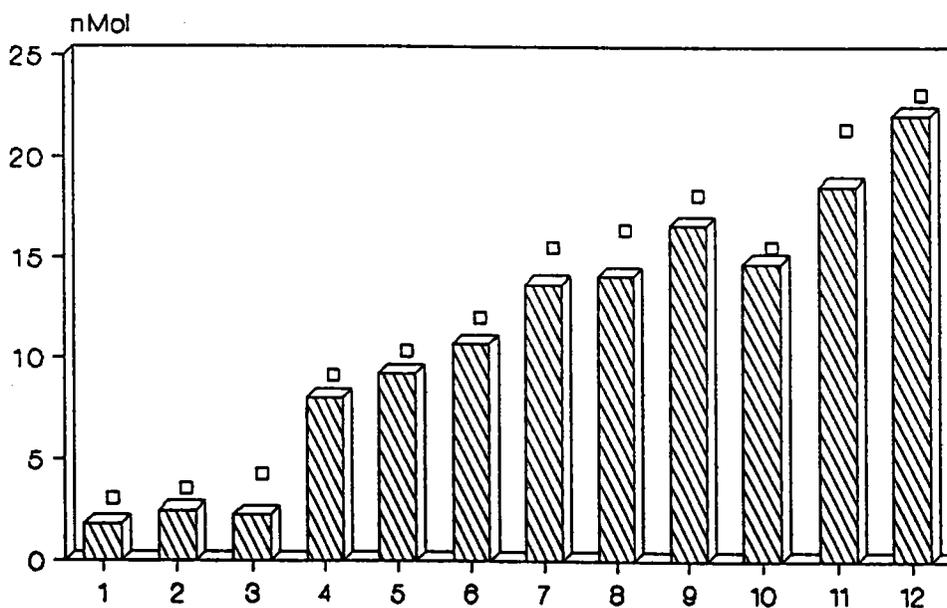
11 = Ascorbate 500 μ M + FeSO₄ 40 μ M

12 = Ascorbate 500 μ M + FeSO₄ 80 μ M

MAD à 45'



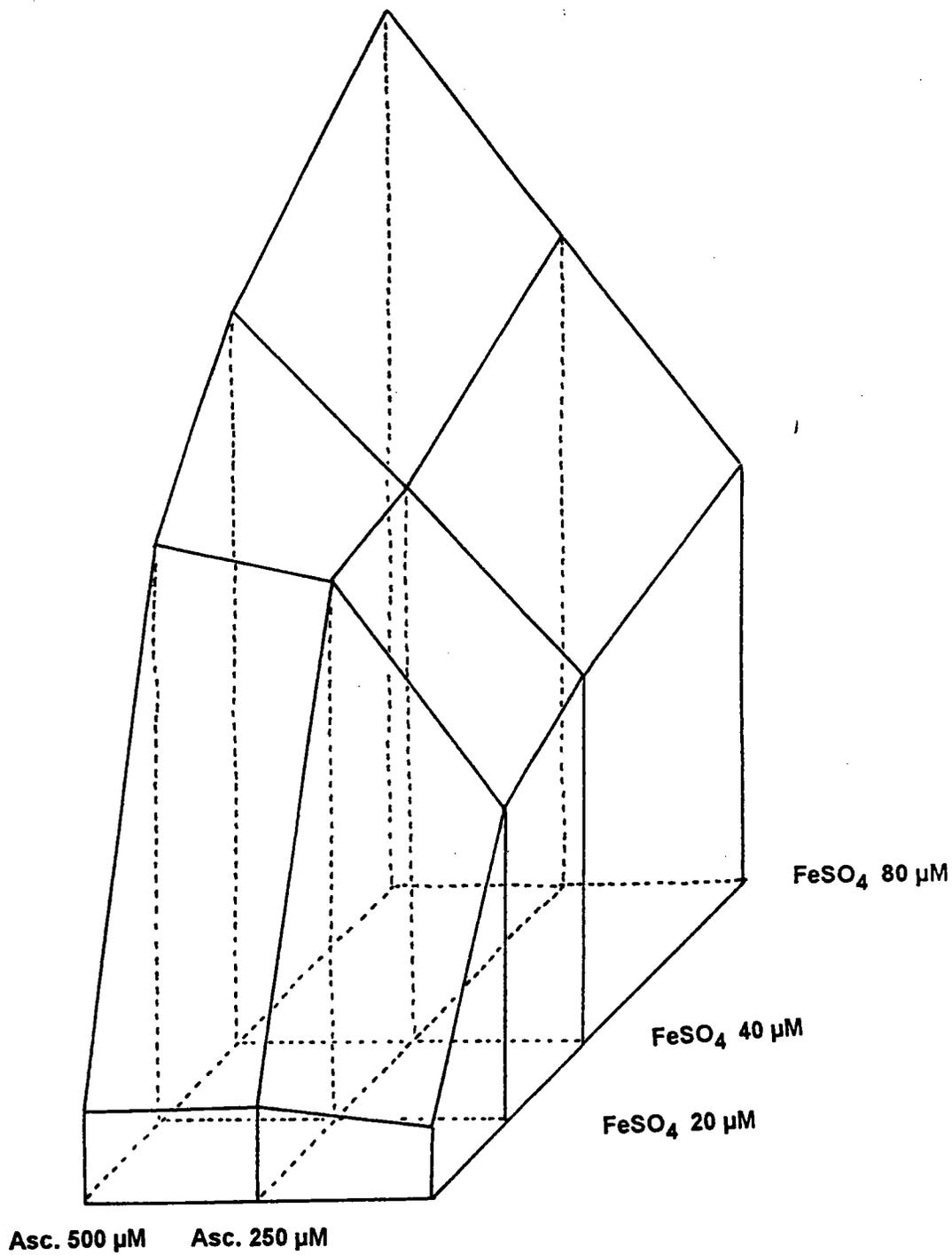
MAD à 60'



F2 : Action de l'ascorbate et du sulfate de fer sur des hépatocytes isolés en suspension, Effet sur la production de malonaldéhyde à 45 et 60 minutes.

1 = témoin
 2 = Ascorbate 250 μ M
 3 = Ascorbate 500 μ M
 4 = FeSO₄ 20 μ M
 5 = FeSO₄ 40 μ M

7 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 20 μ M
 8 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 40 μ M
 9 = Ascorbate 250 μ M + FeSO₄ 80 μ M
 10 = Ascorbate 500 μ M + FeSO₄ 20 μ M
 11 = Ascorbate 500 μ M + FeSO₄ 40 μ M



F3 : Effet de l'ascorbate et du sulfate de fer sur la production de malonaldehyde par des hépatocytes isolés maintenus en suspension.

	LDH	ASAT	ALAT
Exp.A	1.13	/	/
Exp.B	1.08	2.01	1.04
Exp.C	0.99	2.05	1.03
Exp.D	1.08	2.18	1.08
EXP.E	0.95	2.76	/
Moyenne	1.05±0.07	2.25±0.34	1.05±0.03

Tableau F2 : Rapport série intoxiquée / série témoin pour la LDH, les ASAT et les ALAT après intoxication par un mélange ascorbate - FeSO₄ (500µM/20µM)

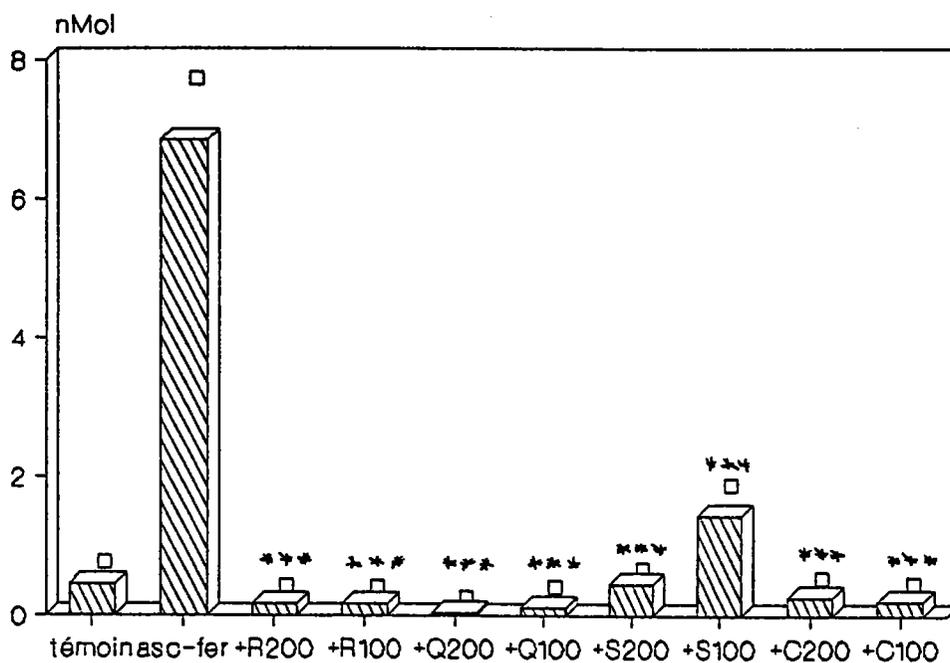
Le tableau F2 représente la valeur, pour chacune des trois enzymes, du rapport série intoxiquée / série témoin après une intoxication par le mélange ascorbate-FeSO₄ (500µM/20µM) au cours de quelques expérimentations. Les valeurs de LDH et d'ALAT restent très proches de celles observées dans les lots témoins, contrairement à ce qui se passe pour les ASAT. L'élévation des ASAT sans fuite concomitante des LDH et des ALAT est d'interprétation délicate. Elle pourrait éventuellement être en rapport avec une atteinte limitée au compartiment mitochondrial, atteinte se situant dans les phases précoces de la nécrose cellulaire. Elle montre en tous cas que ce système d'intoxication ne se limite pas à une activité strictement lipoperoxydative.

* Action de substances flavoniques et apparentées

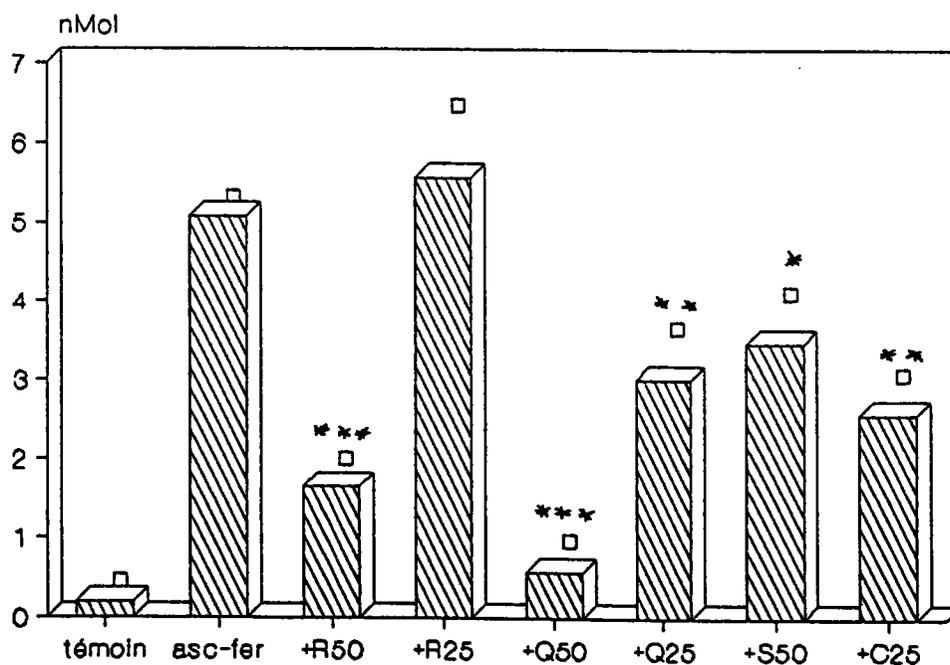
L'intoxication est assurée par l'association Ascorbate 500µM et FeSO₄ 20µM. La rutine, la quercétine, la sylimarine et la (+) cathéchine sont solubilisées dans le diméthyl sulfoxyde puis rajouté au milieu de suspension. La concentration finale en DMSO est de 0.5% v/v. Les figures F4 et F5 montrent l'influence de ces composés sur la formation de malonaldéhyde après 30' d'intoxication. A 25 µM la cathéchine et la quercétine montrent l'activité la plus importante, la rutine et la sylimarine étant moins actives. Les divers flavonoïdes utilisés confirment leur réputation sur ce modèle; en effet, si l'utilisation des flavonoïdes dans le traitement de nombreux processus morbides a longtemps reposé sur des données empiriques, des études récentes ont mis en évidence pour certains de ces composés, une activité antiradicalaire et antilipoperoxydante manifeste. Les résultats obtenus ici peuvent être rapprochés de ceux d'autres auteurs. Fraga et coll. (1987) étudiant l'activité antilipoperoxydante de divers flavonoïdes sur homogénat de foie de souris ont montré que la (+) catéchine présente la CI50 la plus faible. Slater et Eakins, sur microsomes de foie de rat intoxiqués par un système NADPH/ADP Fer/O₂, trouvent pour des doses de (+) cyanidol 3 de 2 10⁻⁴ moles, un pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène de l'ordre de 65%. Enfin, Pincemail et coll. (1985) sur microsomes, intoxiqués par un système ADP/Fer, ont démontré la supériorité de la quercétine sur la rutine. Des tendances identiques sont donc retrouvées ici.

* Action d'extraits végétaux

La figure F6 montre l'activité d'un extrait aqueux de Rosmarinus officinalis et de Poa sp. sur le modèle ascorbate-fer, Poa sp. étant utilisé ici comme témoin négatif. Le romarin diminue de manière importante la formation de malonaldéhyde alors que Poa sp. reste sans effet. L'extrait aqueux de Tamarindus indicus, testé dans les mêmes conditions montre un comportement similaire au romarin sur la production de MAD (fig F6). Des résultats superposables sont retrouvés lors d'autres expérimentations sur Tamarindus indicus (fig F7 et F8). Pour ces expérimentations, où le niveau de MAD formée varie du simple au double, ce qui peut s'expliquer par des variations

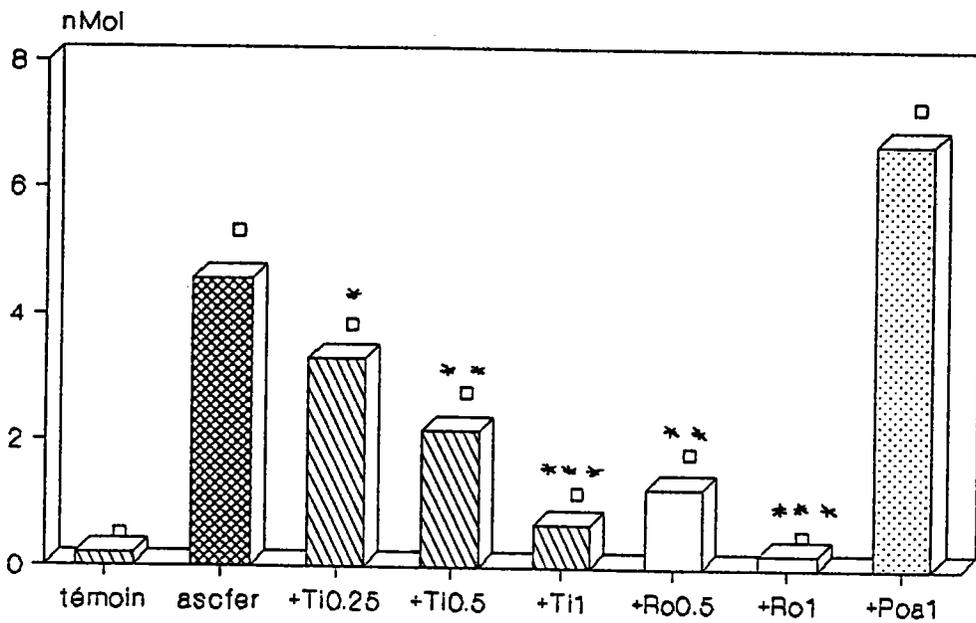


F4 : Effets de la rutine (R), de la quercetine (Q), de la silymarine (S) et de la cathéchine (C) à 100 ou 200 μ M sur la production de malonaldéhyde après intoxication d'hépatocytes en suspension par un système ascorbate-fer.



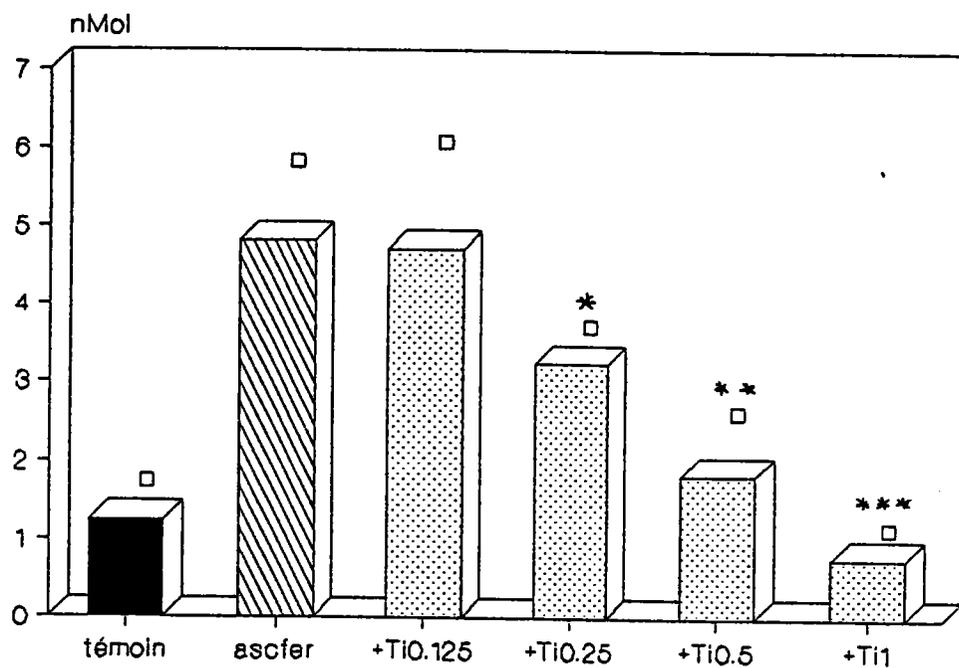
F5 : Effets de la rutine (R), de la quercetine (Q), de la silymarine (S) et de la cathéchine (C) à 50 ou 25 μ M sur la production de malonaldéhyde après intoxication d'hépatocytes en suspension par un système ascorbate-fer.

MAD

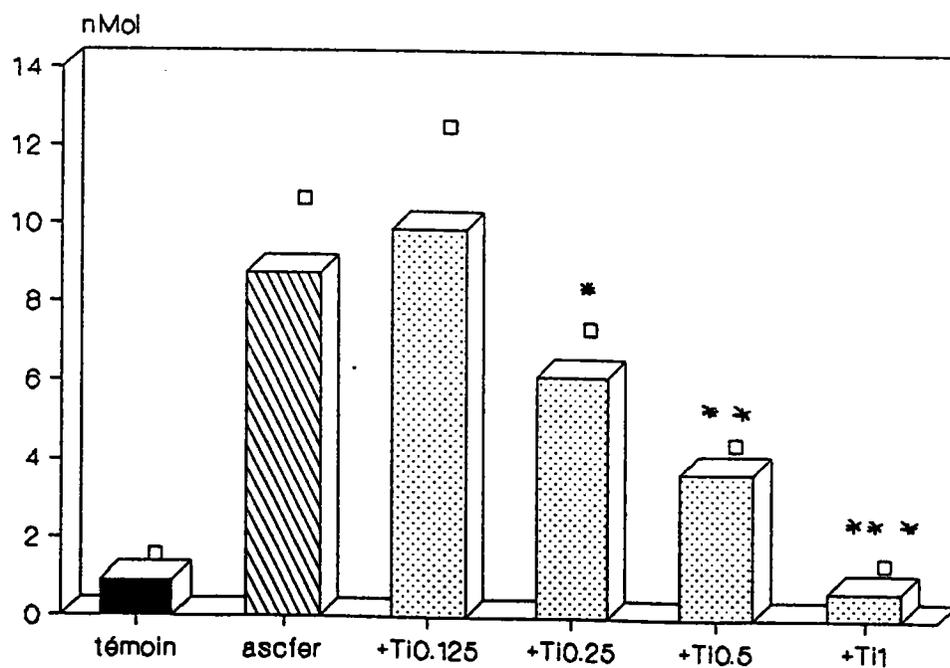


F6 : Effets à 30 minutes de Tamarindus indicus, de Rosmarinus officinalis et de Poa sp. sur la production de MAD par des hépatocytes intoxiqués par un système ascorbate - sulfate de fer (500 μ M - 20 μ M).

* p<0,05
 ** p<0,01
 *** p<0,001



F7 : Effet à 30 minutes de *Tamarindus indicus* sur la production de MAD par des hépatocytes intoxiqués par un système ascorbate - sulfate de fer ($500\mu\text{M}$ $20\mu\text{M}$).



F8 : Effet à 30 minutes de *Tamarindus indicus* sur la production de MAD par des hépatocytes intoxiqués par un système ascorbate - sulfate de fer ($500\mu\text{M}$ $20\mu\text{M}$).

métaboliques initiales, on peut remarquer qu'après modélisation de la diminution de la production de MAD en fonction des doses de Tamarindus indicus, la concentration en plante dans le milieu de culture apportant une diminution de 50% de MAD formée est très proche d'une expérimentation à l'autre (0.390; 0.397; 0.413 mg/ml); le romarin donnant quant à lui des valeurs variant entre 0.431 et 0.446 mg/ml.

VI.1.3. Conclusion

Le mélange Ascorbate-Fer se montre un excellent inducteur de la peroxydation lipidique sur laquelle son action est intense et rapide. Il provoque cependant un relargage enzymatique important en aspartate aminotransférase (tableau F2) et donc ne se limite pas à une action strictement lipoperoxydative. De plus la difficulté d'apprécier si les éventuels phénomènes de complexation entre le système ferreux et certains constituants des extraits végétaux étudiés (notamment des flavonoïdes) se situaient au niveau extra ou intracellulaire nous ont finalement conduit à abandonner ce modèle.

VI.2 Modèle au diéthyl maléate

Les conditions d'isolement et de culture sont identiques à celles précédemment décrites. Le diéthyl maléate (DEM) est solubilisé dans du diméthyl sulfoxyde puis ajouté au milieu de culture sous un volume de 20 μ l, la concentration finale étant de 0.5 ou 1 mM.

Les figures F9 a,b,c montrent l'activité du DEM sur la formation de MAD et le relargage de LDH et d'ASAT à 30', 45' et 60' d'incubation. Seule la dose de 1 mM entraîne un relargage enzymatique significatif. Celui-ci apparaît tardivement à 45' et devient franc à 60'. Une augmentation de la MAD est par contre significative dès la trentième minute; les phénomènes peroxydatifs ne sont donc pas consécutifs à la nécrose cellulaire qu'ils précèdent mais évoluent à leur propre compte.

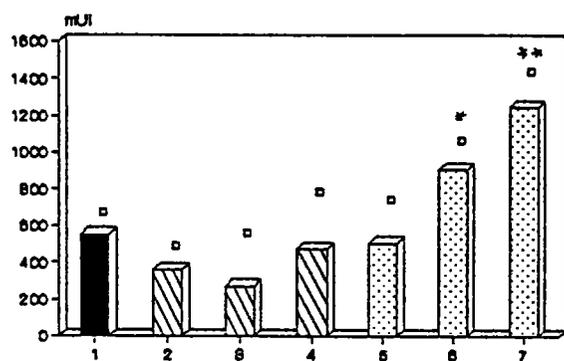
Le modèle au DEM repose sur un mécanisme toxique plus complexe qu'une simple activité thioloprive et de ce fait n'a pas été poursuivi.

VI.3 Modèle au tert-butyl hydroperoxyde

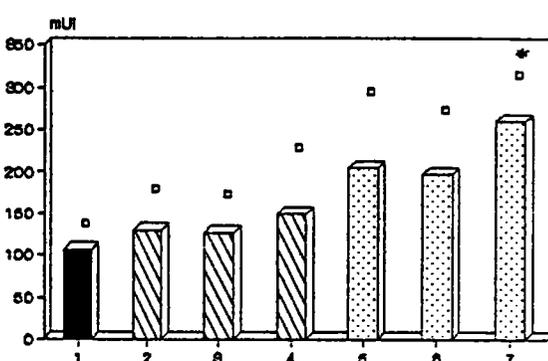
VI.3.1 Effets à court terme du tBH sur des hépatocytes isolés de rat

Une étude cinétique sur une courte période (5',10',20',30') réalisée dans les conditions précédemment décrites met en évidence une augmentation de la lipoperoxydation, exprimée en terme de malonaldéhyde formée, significative à 30 minutes, dès la dose de 0.75 mM (Fig. F10). Une concentration de 1.5 mM montre

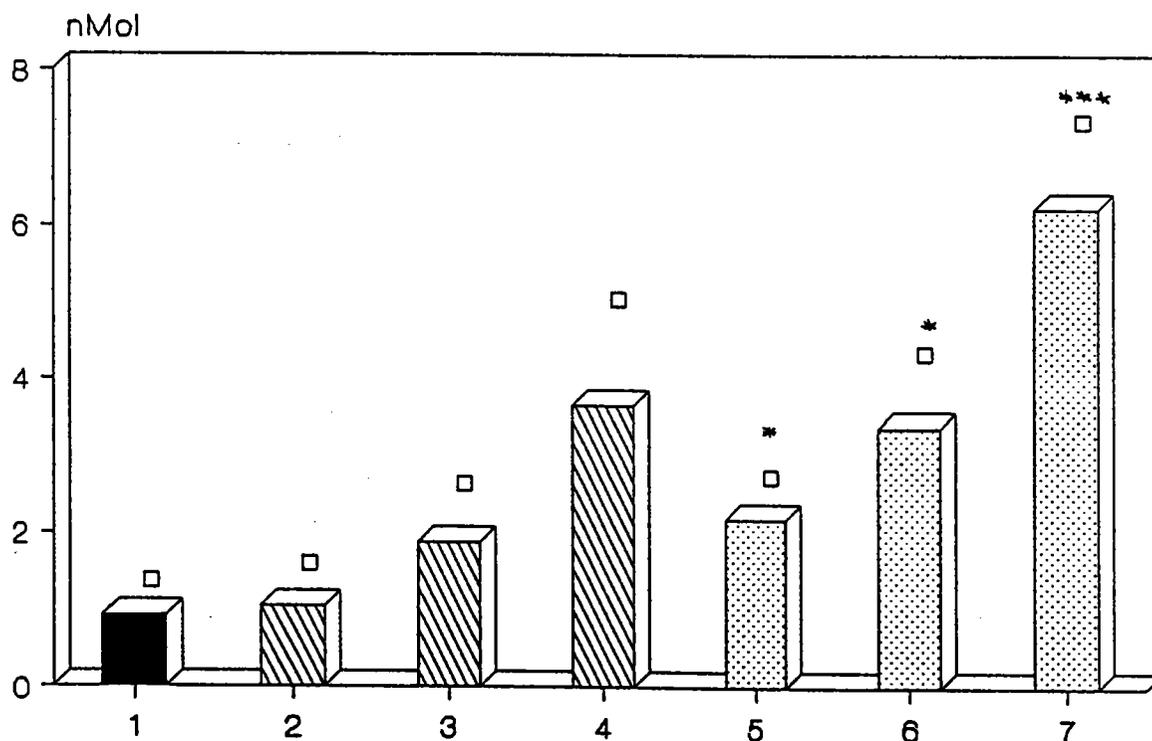
LDH



ASAT



MAD

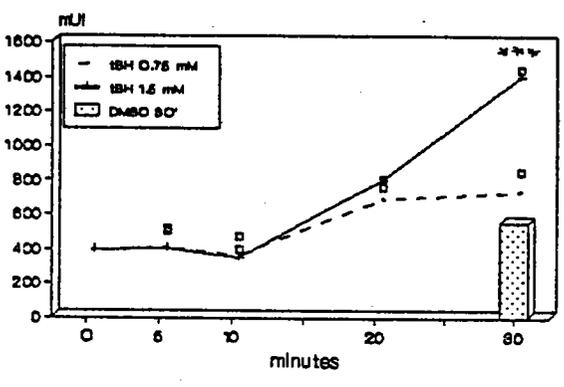


F9 : Effets à 30, 45 et 60 minutes sur la production de MAD et la fuite enzymatique en LDH et ASAT du Diéthylmaléate (0.5 et 1 mM) dans un modèle d'hépatocytes isolés en suspension.

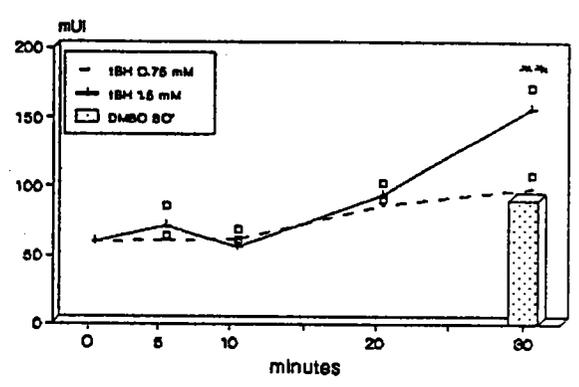
1 = témoin 60 minutes
 2 = DEM 0.5 mM à 30 minutes
 3 = DEM 0.5 mM à 45 minutes
 4 = DEM 0.5 mM à 60 minutes

5 = DEM 1 mM à 30 minutes
 6 = DEM 1 mM à 45 minutes
 7 = DEM 1 mM à 60 minutes

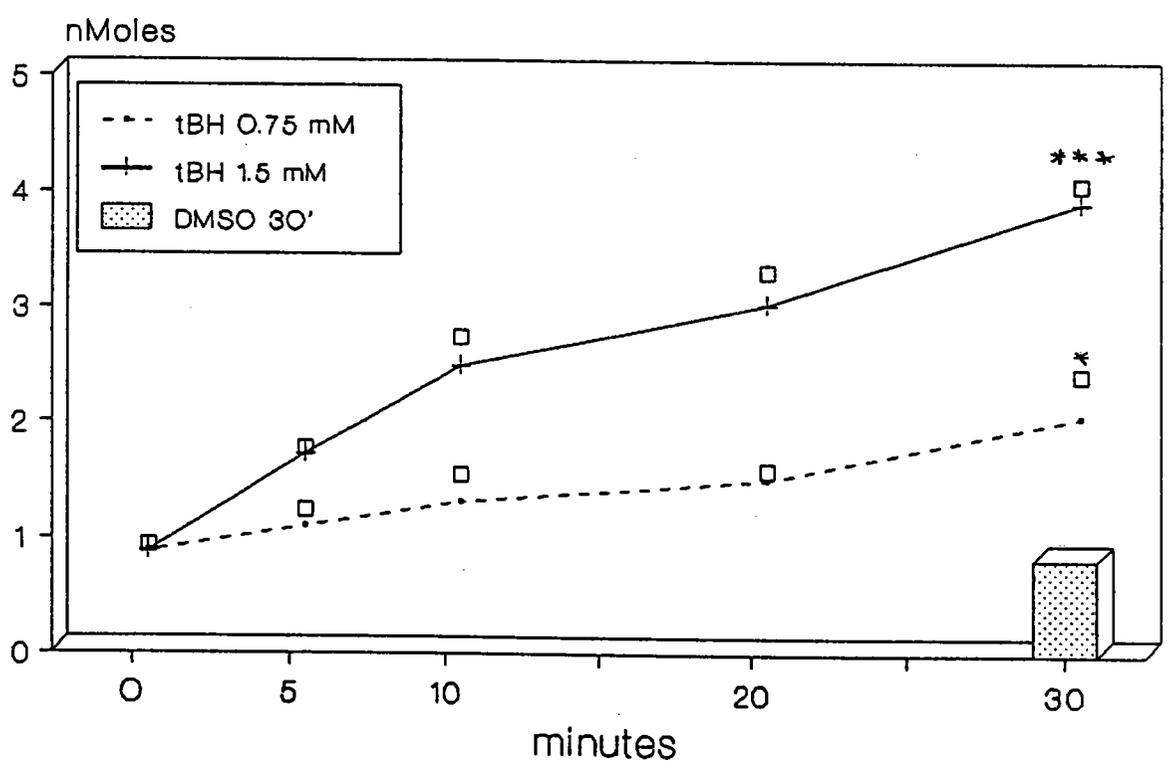
LDH



ASAT



MAD



F10 : Effets à court terme sur la production de MAD et la fuite enzymatique en LDH et ASAT d'une intoxication par le tert-butyl hydroperoxyde (0.75 et 1.5 mM) dans un modèle d'hépatocytes isolés en suspension.

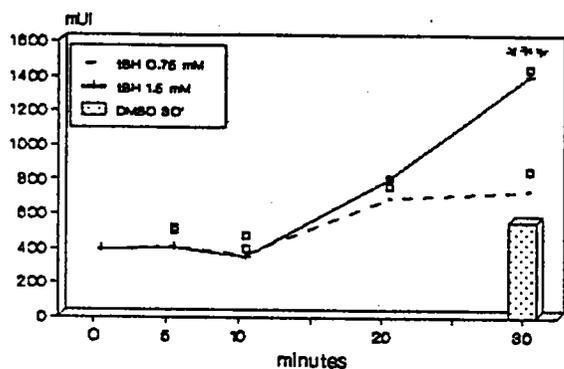
Tableau F3 : Effets d'une dose de 0.75 mM de tert butyl-hydroperoxyde sur le modèle d'hépatocytes isolés

	DMSO			tBH 0.75 mM		
	LDH	ASAT	MAD	LDH	ASAT	MAD
30 min	848 ± 281	161 ± 62	0.25 ± 0.02	859 ± 256	103 ± 29	0.86 ± 0.29
60 min	615 ± 107	119 ± 21	0.65 ± 0.15	742 ± 107	118 ± 24	2.05 ± 0.28
120 min	1121 ± 48	209 ± 38	0.54 ± 0.23	945 ± 191	170 ± 52	1.87 ± 0.07
180 min	1031 ± 127	228 ± 14	0.78 ± 0.08	1129 ± 40	211 ± 41	2.32 ± 0.16

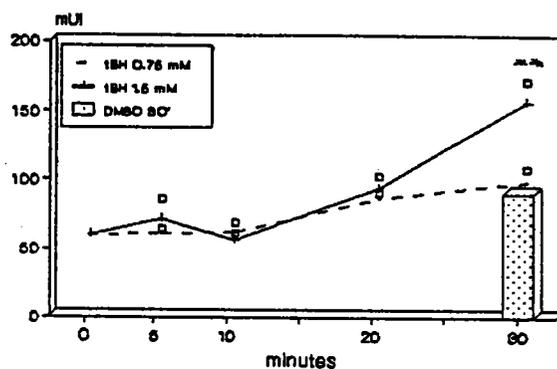
Tableau F4 : Action de la prométhazine après intoxication par le tBH

	MAD	LDH	ASAT
DMSO	1.23 ± 0.17	217 ± 36	68 ± 10
tBH 1.5 mM	7.09 ± 0.27	1068 ± 69	157 ± 9
tBH + Prométhazine 100µM	1.10 ± 0.06 *	938 ± 108	135 ± 23

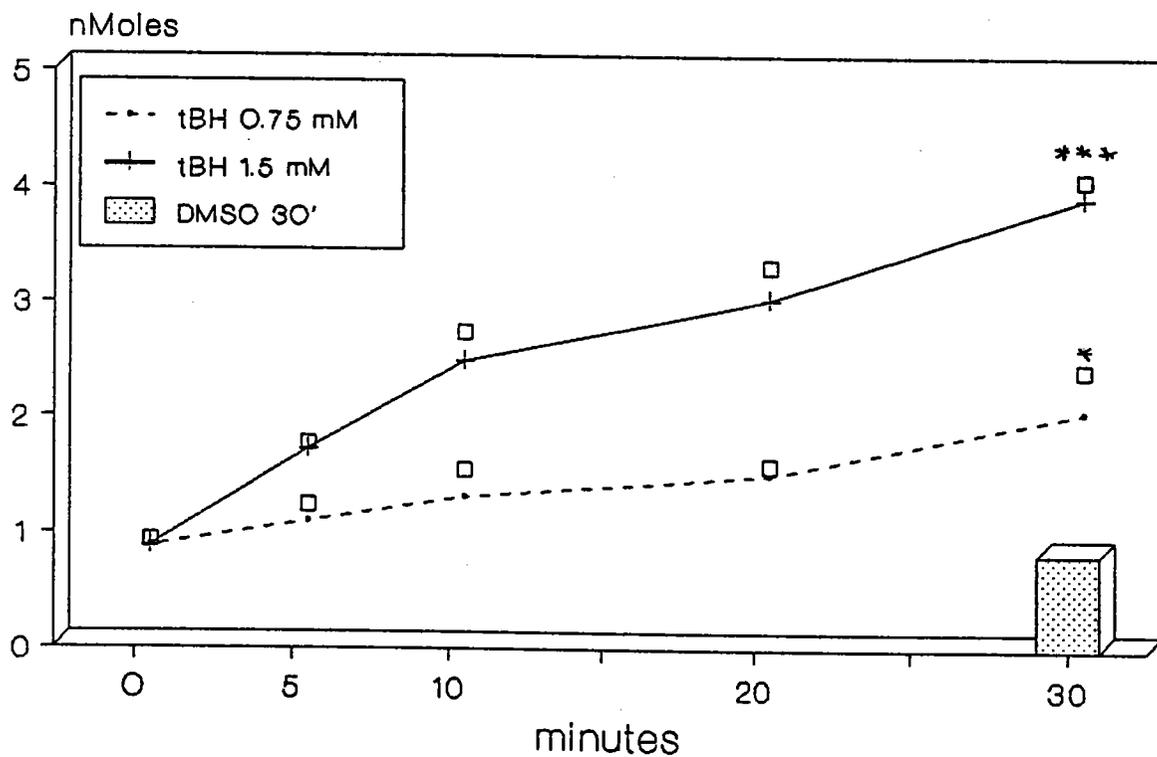
LDH



ASAT



MAD



F10 : Effets à court terme sur la production de MAD et la fuite enzymatique en LDH et ASAT d'une intoxication par le tert-butyl hydroperoxyde (0.75 et 1.5 mM) dans un modèle d'hépatocytes isolés en suspension.

une évolution parallèle, de plus forte intensité, la lipoperoxydation étant observable dès les premières minutes qui suivent l'ajout du toxique. La progression est constante et au bout de 30 minutes le niveau atteint représente généralement 5 à 10 fois celui des témoins non intoxiqués.

L'activité nécrotique, quantifiée par le relargage d'enzymes cytoplasmiques (LDH et ASAT) dans le milieu de culture, diffère en fonction de la dose de toxique apporté (Fig. F10). A la dose de 0,75 mM, il n'existe aucune variation du relargage de LDH ou d'ASAT par rapport aux témoins non intoxiqués. A la dose de 1,5 mM, par contre, une fuite enzymatique significative apparaît, celle-ci est cependant plus tardive que l'augmentation de la malonaldéhyde. Le relargage enzymatique apparaît toujours dans un deuxième temps, le plus souvent après 10 minutes d'intoxication, lactate déshydrogénase et aspartate aminotransférase évoluant de manière similaire.

Sur de courtes périodes les doses de 0,75 et 1,5 mM ont des comportements similaires concernant la lipoperoxydation, l'effet le plus intense étant obtenu avec la dose la plus élevée; par contre l'augmentation significative de la MAD provoqué par 0,75 mM ne s'accompagne pas de phénomènes nécrotiques. La lipoperoxydation est donc de toute évidence le phénomène primaire. Cependant, la relation entre les phénomènes nécrotiques et les phénomènes peroxydatifs peut être précisée, d'une part à l'aide d'une étude cinétique plus longue, sur trois heures, d'autre part au moyen de substances inhibant la lipoperoxydation, afin de voir si les deux mécanismes sont indépendants l'un de l'autre ou s'ils sont liés, la lipoperoxydation étant alors simplement plus précoce que le relargage enzymatique.

VI.3.2 Etude cinétique sur trois heures d'une dose de 0,75 mM de tBH

L'étude cinétique d'une dose de 0,75 mM de tBH sur une période de trois heures (Tableau F3) montre une augmentation manifeste de la teneur en MAD dans la série intoxiquée. La production de malonaldéhyde ne s'accompagne d'aucun relargage enzymatique significatif tant pour la LDH que pour les ASAT. Les phénomènes peroxydatifs peuvent donc évoluer indépendamment des phénomènes nécrotiques à cette dose.

VI.3.3 Action de la prométhazine

L'utilisation de prométhazine (100 μ M), connue pour être un puissant inhibiteur de la lipoperoxydation, aboutit à un blocage total des phénomènes peroxydatifs trente minutes après l'ajout d'une dose de 1,5 mM de tBH (Tableau F4). Le niveau de MAD reste de l'ordre de celui des témoins non intoxiqués sans que pour autant les fuites enzymatiques soient diminuées dans les séries

intoxiquées. Les phénomènes nécrotiques peuvent donc évoluer indépendamment des phénomènes peroxydatifs.

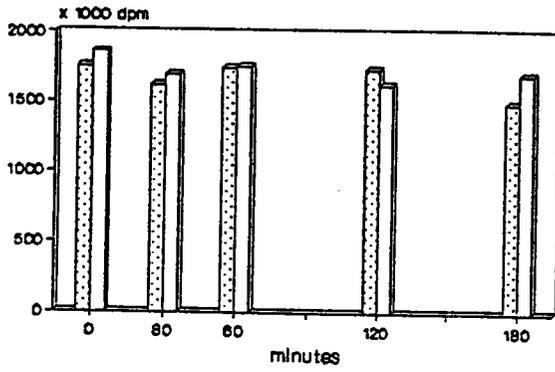
VI.3.4 Répercussion métabolique d'une dose de 0.75 mM de tBH

Les conditions d'isolement sont identiques à celles précédemment décrites. Les hépatocytes sont incubés pendant 3 heures dans du milieu Waymouth additionné de 10% de sérum de veau nouveau né, les dosages sont effectués à 0, 30, 60, 120 et 180 minutes (fig F11). L'évaluation de la synthèse protéique se fait par incorporation de leucine marquée au carbone 14 (leucine U - ^{14}C Activité spécifique 322 mCi/mMol CEA France) dans les protéines. La méthode a été adaptée à partir de celle de Seglen (1975) et celle de Goethals (1983). La leucine est ajoutée à la suspension cellulaire à raison de 5 $\mu\text{Ci/ml}$ au temps 0. Au cours de l'incubation, on effectue des prélèvements de 500 μl de suspension cellulaire, stockés dans des microtubes de 1,5 ml et mis à décanter dans la glace. Le culot est lavé avec 1 ml de solution de NaCl 0.9%. Après une nouvelle décantation, le culot est repris par 1 ml d'acide perchlorique à 10% afin de lyser les cellules et de faire précipiter les protéines. Après centrifugation (1500g, 2min.), le surnageant est conservé tandis que le culot est remis en suspension par un mélange de 0.4 ml de HClO_4 à 2% et de 0.2 ml de NaCl 0.9%. Cette opération est renouvelée une seconde fois. Les surnageants servent à la détermination de la leucine ayant pénétrée dans les cellules mais qui n'a pas été incorporée dans les protéines. Le culot de protéine est alors dissous dans 1 ml de NaOH (0.5 N). Pour l'évaluation de la synthèse protéique, 50 μl sont ajoutés à 10 ml d'instagel (Packard 601 3009) dans des fioles à scintillations. L'évaluation de la radioactivité des différents surnageants se fait de la même manière. Le comptage s'effectue à l'aide d'un compteur à scintillation (1211 minibeta LKB Wallac). Les résultats sont exprimés en dpm après établissement d'une courbe de quenching. Les teneurs en MAD et LDH sont déterminées selon la procédure habituelle.

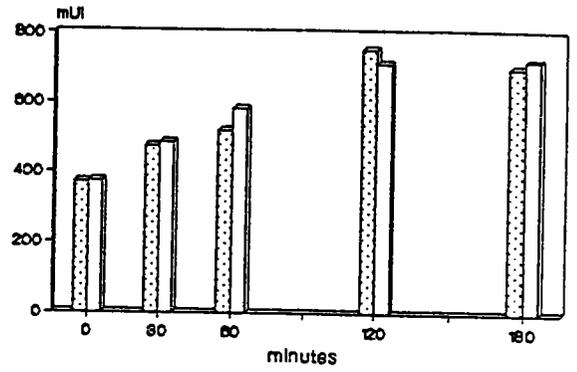
Les niveaux de LDH relarguée dans le milieu de culture sont identiques dans la série témoin et la série intoxiquée, de même la pénétration intracellulaire en leucine marquée est superposable dans les deux séries ce qui autorise les comparaisons métaboliques (fig F11).

Le tert butyl hydroperoxyde freine de manière tout à fait significative les mécanismes de la synthèse protéique alors que celle-ci augmente dans les séries témoins de façon progressive dès la trentième minute et jusqu'au terme de l'expérimentation. L'utilisation d'une dose de 0.75 mM de tBH permet donc, sur une période de trois heures au moins, d'induire des perturbations métaboliques sans nécrose concomitante et peut constituer un modèle d'intoxication, a minima, pour des cultures cellulaires en suspension.

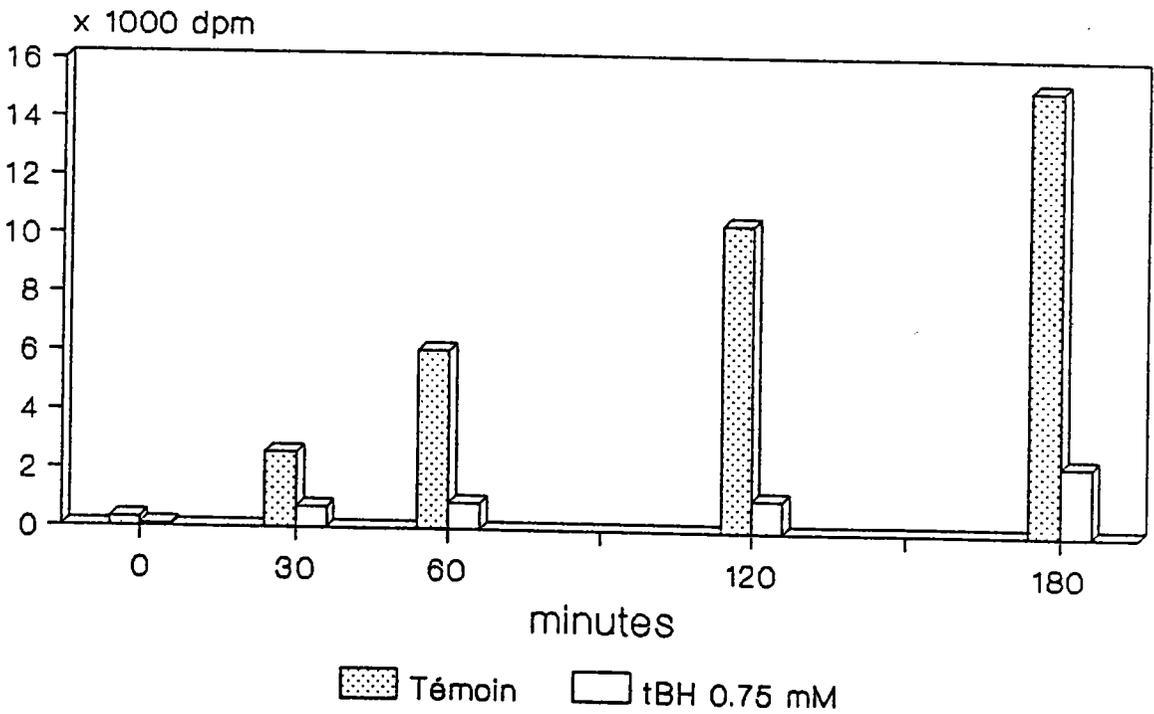
Leucine intracellulaire



Evolution de la LDH



Synthèse protéique



F11 : Effet du tert-butyl hydroperoxyde (0.75 mM) sur la synthèse protéique d'hépatocytes en suspension.

VI.3.5. Conclusion

Il semble donc, au moins sur de courtes périodes, que sur un modèle d'hépatocytes isolés, la peroxydation lipidique et les phénomènes nécrotiques induits par le tBH soient des événements indépendants l'un de l'autre, pouvant évoluer pour leur propre compte. Du fait de la dualité des effets observés, l'intérêt du modèle d'hépatocytes isolés, intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde est double puisqu'il permet d'approcher l'effet antilipoperoxydant et l'effet antinécrotique dans le même temps d'expérimentation. On peut noter également qu'à la dose de 1,5 mM la relargage enzymatique n'apparaît généralement qu'après 10 minutes d'intoxication, ce qui correspond précisément au temps nécessaire à l'effondrement des teneurs cellulaires en glutathion et en NADPH après une intoxication au tBH à cette dose (Rush et coll., 1989). Après 10' d'intoxication, les facteurs responsables du relargage calcique intracellulaire sont donc en place, le processus nécrotique est enclenché, indépendamment de la peroxydation membranaire.

Par contre on peut noter que l'indépendance entre les phénomènes radicalaires et les processus nécrotiques n'est pas strictement vérifiée. Certains radicaux libres peuvent, en effet, en provoquant des réactions d'addition, perturber le fonctionnement des ATPases calciques du réticulum endoplasmique. Des substances antiradicalaires préservent donc les mécanismes de stockage calcique au niveau du réticulum endoplasmique. Comme nous l'avons signalé précédemment, la diminution du stockage du réticulum est en relation avec la déplétion du GSH qui, dans ce cas, joue un rôle protecteur probablement par son action antiradicalaire. En effet, la diminution des possibilités de stockage du réticulum est prévenue par le dithiothreitol, porteur d'un groupement SH, mais qui n'agit pas comme cofacteur de la GSH peroxydase (Bellomo et coll., 1982). En outre, Jones (1983) a démontré que la métyrapone, un inhibiteur du cytochrome P450, prévient l'inactivation de la séquestration calcique sur microsomes isolés après intoxication au tBH., alors que le $MnCl_2$, strictement inhibiteur de la peroxydation lipidique, en est incapable. Par contre, le pouvoir antiradicalaire d'une substance n'intervient pas au niveau des perturbations calciques d'origine mitochondriale, qui sont d'une autre nature (Lehninger, 1978).

Au total, s'il semble possible, à l'aide de ce modèle, de distinguer le pouvoir antilipoperoxydant du pouvoir antinécrotique d'une substance hépatoprotectrice, il est plus délicat lors de l'existence d'une activité antinécrotique de quantifier la part relevant d'un effet strictement antiradicalaire, ces deux activités n'étant pas forcément indépendantes. Cela renforce donc l'intérêt d'utiliser, parallèlement au modèle hépatocytaire, le test de décoloration du DPPH, dans le cadre d'une telle recherche.

Le tert-butyl hydroperoxyde répond donc aux conditions que nous nous étions imposés pour la réalisation d'un screening d'extraits végétaux à tropisme

hépatique. Par rapport au tétrachlorure de carbone, hépatotoxique direct classique des modèles in vitro, le tBH présente des avantages certains :

- un métabolisme simple aboutissant à un composé de faible toxicité propre, le tert butanol
- l'apparition d'une peroxydation lipidique plus intense que celle induite par le tétrachlorure de carbone
- une séparation plus aisée des processus peroxydatifs et des processus nécrotiques
- une meilleure homogénéité des résultats expérimentaux et une reproductibilité du niveau d'intoxication qui ne pose généralement aucun problème
- un possible ajout direct dans le milieu de culture, évitant éventuellement l'utilisation d'un tiers solvant
- la possibilité, à faible dose, d'isoler des répercussions purement métaboliques, correspondant mieux à certains mécanismes d'agression a minima.

Si les possibilités d'exploration biochimique d'un tel modèle semblent plus limitées que celles offertes par des systèmes plus complexes, notamment de co-culture cellulaire, celui ci répond cependant mieux aux impératifs de simplicité et de rapidité que nous nous étions fixés, et permet non seulement un screening large d'extraits végétaux hépatoprotecteurs mais également, lorsque cet effet est retrouvé, d'orienter de manière rapide le fractionnement en vue de l'isolement éventuel des principes actifs.

G Screening primaire d'extraits végétaux

I Les espèces étudiées

Comme nous l'avons déjà souligné, les espèces végétales traditionnellement indiquées dans les "affections hépatiques" sont extrêmement nombreuses. Au cours de ce travail 26 espèces végétales ont été étudiées. Pour chacune d'elles, lorsque cela a été possible, une rapide identification chromatographique est réalisée sur couche mince. Celle-ci ne recherche que les flavonoïdes et les composés réducteurs et n'a d'autre prétention qu'une caractérisation sommaire de l'extrait.

Pour chaque extrait végétal, l'activité antiradicalaire est recherchée à l'aide du test de décoloration du radical diphenyl picryl hydrazyl. Les extraits sont classés en deux catégories selon que la décoloration obtenue est inférieure ou supérieure à 50% de celle du blanc témoin. L'étude de l'activité antilipoperoxydante et antinéocrotique est réalisée à l'aide du modèle d'hépatocytes isolés, intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde dont la méthodologie a été précédemment décrite. Les doses expérimentées sont toujours exprimées en mg de plantes sèches.

Une présentation identique est utilisée pour chaque espèce afin de faciliter la lecture; un tableau récapitulatif des activités de l'ensemble des extraits étudiés est présenté au chapitre II de cette partie (page 182).

A coté d'espèces végétales traditionnellement utilisées pour leurs vertus hépatotropes, d'autres plantes, en cours d'étude au laboratoire, et dont les indications traditionnelles sont étrangères à la sphère hépatobiliaire sont également testées afin d'approcher la pertinence des modèles pharmacologiques retenus.

Les espèces végétales, traditionnellement hépatotropes, étudiées au cours de ce travail sont au nombre de 17, il s'agit de :

Rosmarinus officinalis
Cuscuta americana
Curcuma domestica
Terminalia catappa
Tamarindus indica
Kalanchoe crenata
Staudia gabonensis
Cochlospermum tinctorium
Cochlospermum planchonii
Eupatorium cannabinum
Euphorbia hirta
Juniperus communis
Crepis rueppellii
Pulicaria orientalis

Bidens pilosa
Carthamus tinctorium
Peumus boldus

Les autres espèces végétales étudiées sont au nombre de 9, il s'agit de :

Momordica charantia
Justicia pectoralis
Annona muricata
Eupatorium odoratum
Xanthoxylum xanthoxyloides
Eschscholzia californica
Vaccinium myrtillus
Annona reticulata
Capparis spinosa

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae)

Répartition géographique :

Espèce répandue dans tout le bassin méditerranéen et dans le sud-ouest de l'Asie.

Description botanique :

Rosmarinus officinalis est un arbrisseau toujours vert de 50 cm à 2 mètres de haut, très touffu, à nombreux rameaux dressés. Les feuilles étroites et coriaces sont sessiles et opposées, à bord enroulé en dessous, vertes sur la face supérieure, velues et blanchâtres sur la face inférieure. Les inflorescences, en grappes courtes, disposées à l'aisselle des feuilles, sont formées de fleurs de couleur bleue pâle ou lilas. Les fleurs ont un calice bilabié et une corolle tubuleuse, élargie au sommet en deux lèvres. La lèvre supérieure a deux lobes et la lèvre inférieure a trois lobes dont un lobe médian très large et concave. Le fruit est un tétrakène brun foncé dont chaque unité contient une graine à cotylédons bombés.

Usage traditionnel :

Les indications thérapeutiques de Rosmarinus officinalis sont très nombreuses et utilisent les différentes parties de la plante. On relève notamment des propriétés diurétiques, antiseptiques, antirhumatismales, cicatrisantes, astringentes, emménagogues. Rosmarinus officinalis a surtout une place privilégiée dans le domaine des affections hépatobiliaires.

Chimie :

Les recherches phytochimiques démontrent la présence d'acides phénols (acide rosmarinique, acide caféique, acide chlorogénique), de flavonoïdes (lutéoline, apigénine, diosmétine, genkwanine, hispiduline), de triterpènes (α et β amyrine, acide ursolique, acide oléanolique), de lactones diterpéniques (carnosol, rosmanol), d'acides organiques (acide glycolique, acide citrique, acide glycérique).

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Rosmarinus officinalis

et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figure G1 a,b.

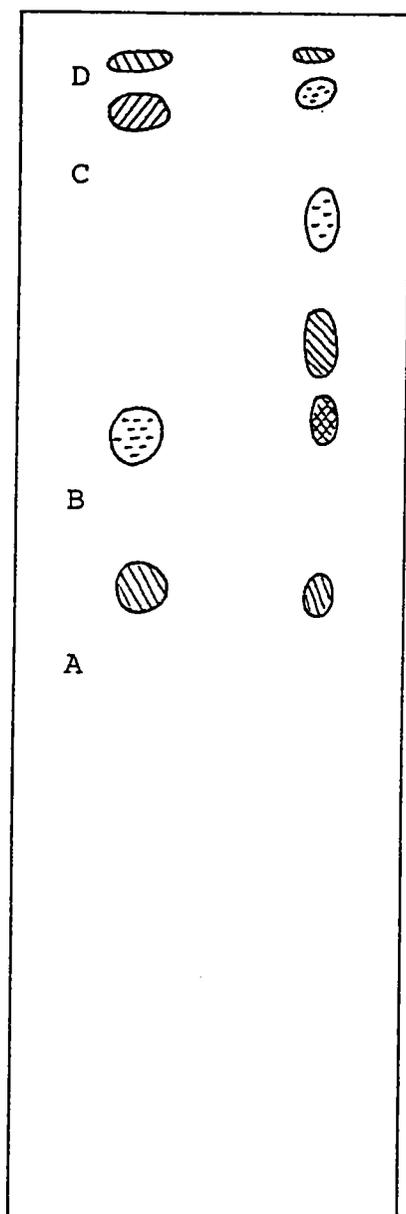
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites l'extrait aqueux de Rosmarinus officinalis provoque une décoloration de 84 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 65 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Rosmarinus officinalis est classée en type II (% de décoloration > 50%).

Test sur hépatocytes isolés :

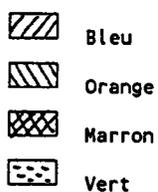
L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G2 a,b,c. Rosmarinus officinalis présente un effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation et des phénomènes nécrotiques engendrés par le tert-butyl hydroperoxyde. Rosmarinus officinalis (0,5 et 1 mg de plante sèche / ml de suspension hépatocytaire) s'oppose de manière tout à fait significative au relargage enzymatique et à la production de malonaldéhyde, confirmant sur ce modèle son intérêt dans le traitement des affections hépatiques d'origine toxique. L'extrait aqueux de jeunes pousses de R. officinalis sera présenté dans les tests suivants comme produit de référence positif.

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercetine

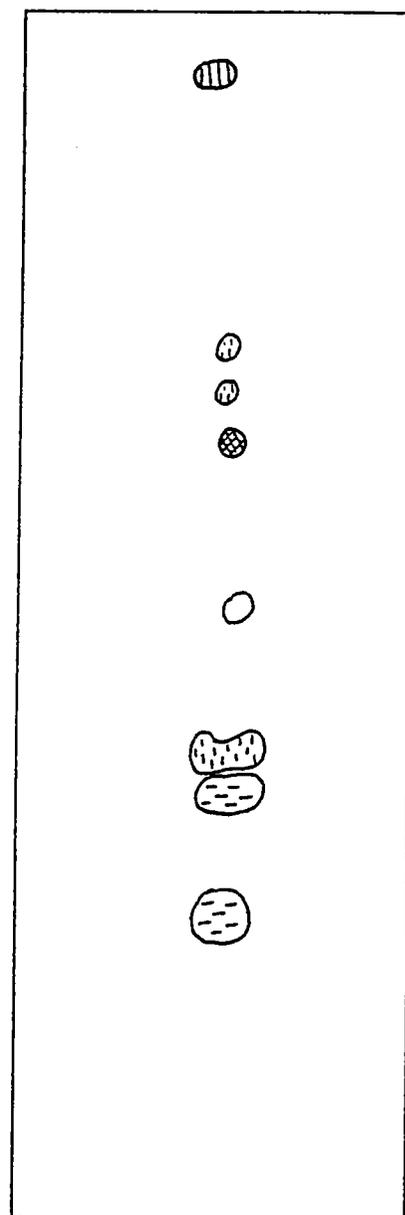
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

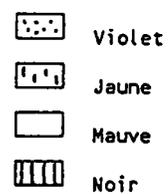
Rf 0.75

Rf 0.5

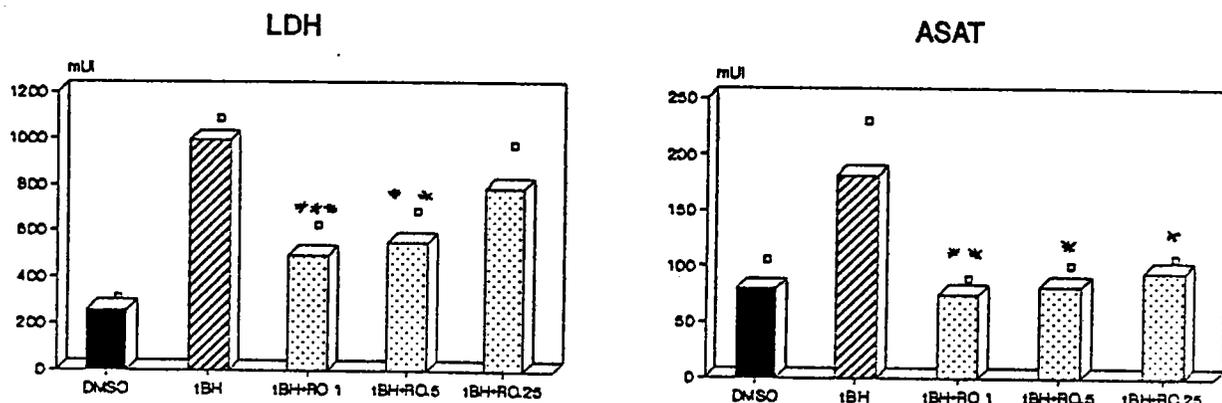
Rf 0.25



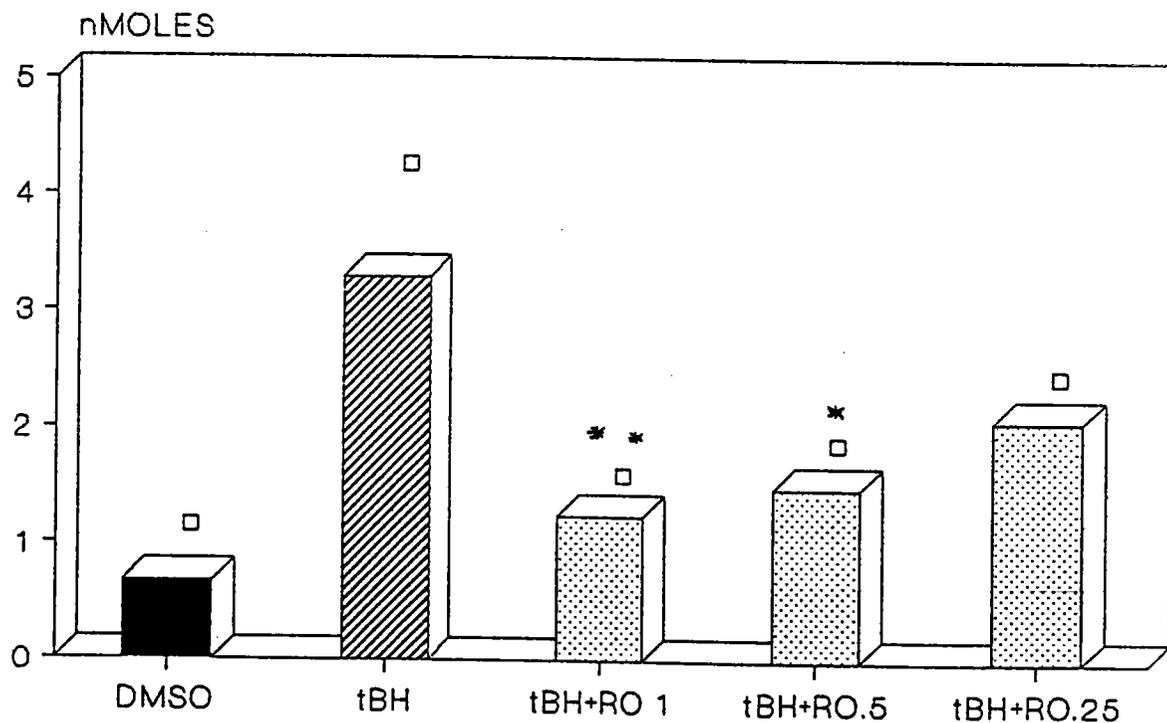
Extrait



G 1 : Profils chromatographiques d'identification de
Rosmarinus officinalis



MAD



G2 : Effet de *Rosmarinus officinalis* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Cuscuta americana L. (Convolvulaceae)

Répartition géographique : Régions tropicales du continent américain

Description botanique : Liane parasite.

Usage traditionnel :

Cuscuta americana est traditionnellement utilisée comme hépatotrope dans les cas d'ictère et de troubles hépatiques; on utilise soit le jus de la plante entière, additionné de sucre ou de sel, soit une macération aqueuse de la plante entière. Cependant, certaines observations de praticiens haïtiens suggèrent que Cuscuta americana pourrait être hépatotoxique (Robineau et Weniger, comm. pers.). Cuscuta americana est également utilisée comme dépuratif, laxatif, carminatif, vulnéraire, antidysentérique, antigrippal et emménagogue dans tout le bassin caraïbe.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Cuscuta americana et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G3 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

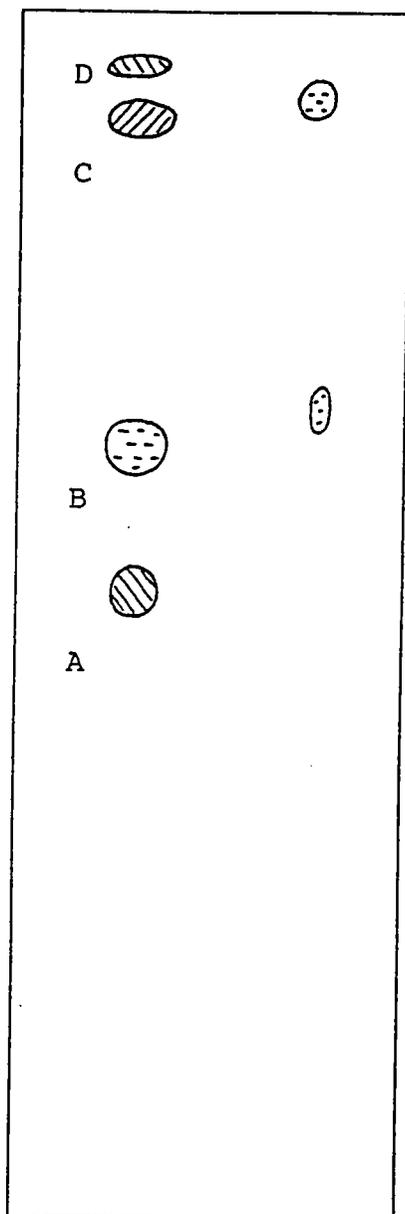
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Cuscuta americana provoque une décoloration de 10 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 4 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Cuscuta americana est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G4 a,b,c. Cuscuta americana (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite

enzymatique signant la nécrose cellulaire. L'indication traditionnelle n'est donc pas confirmée sur ce modèle; des travaux antérieurs avaient par ailleurs démontré qu'un extrait hydroalcoolique de feuilles de Cuscuta americana présentait un effet cytotoxique sur hépatocytes isolés (Arvis et coll., 1986).

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercetine

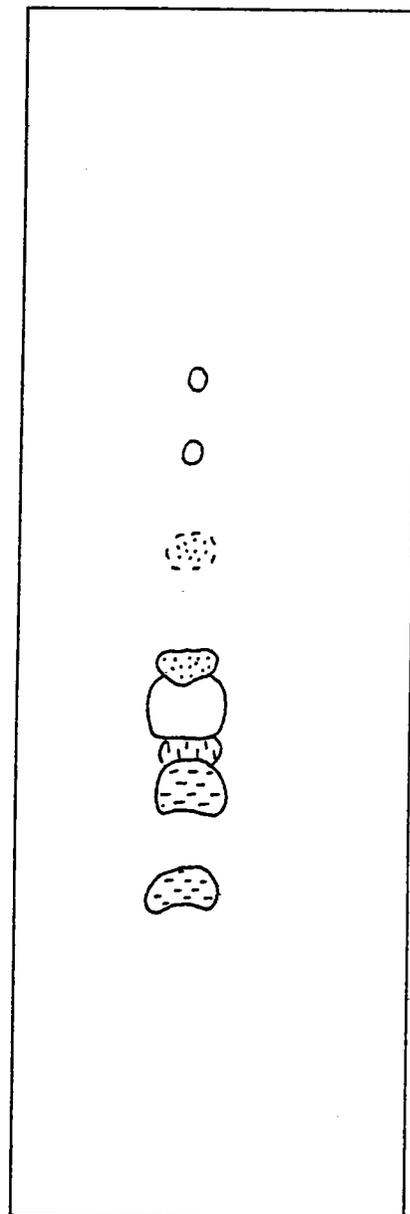
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

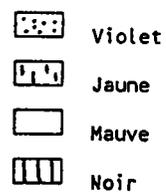
Rf 0.75

Rf 0.5

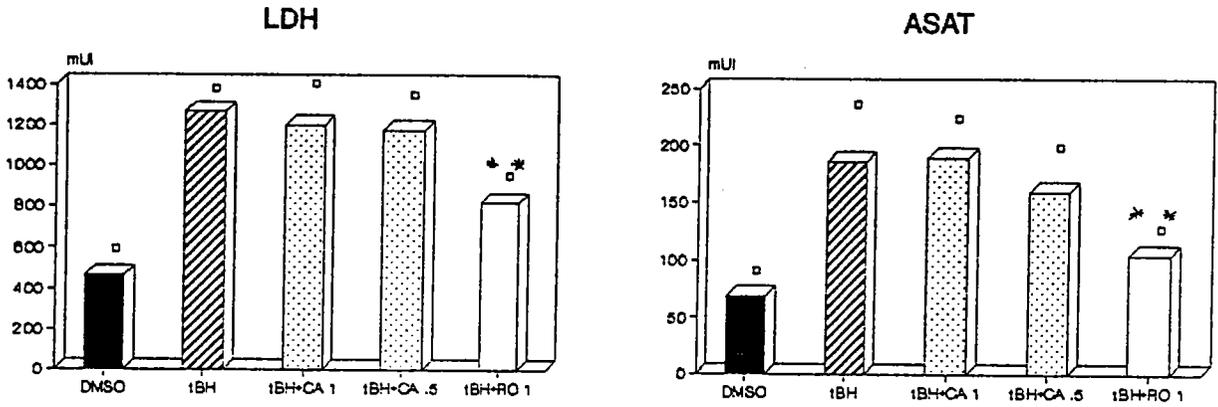
Rf 0.25



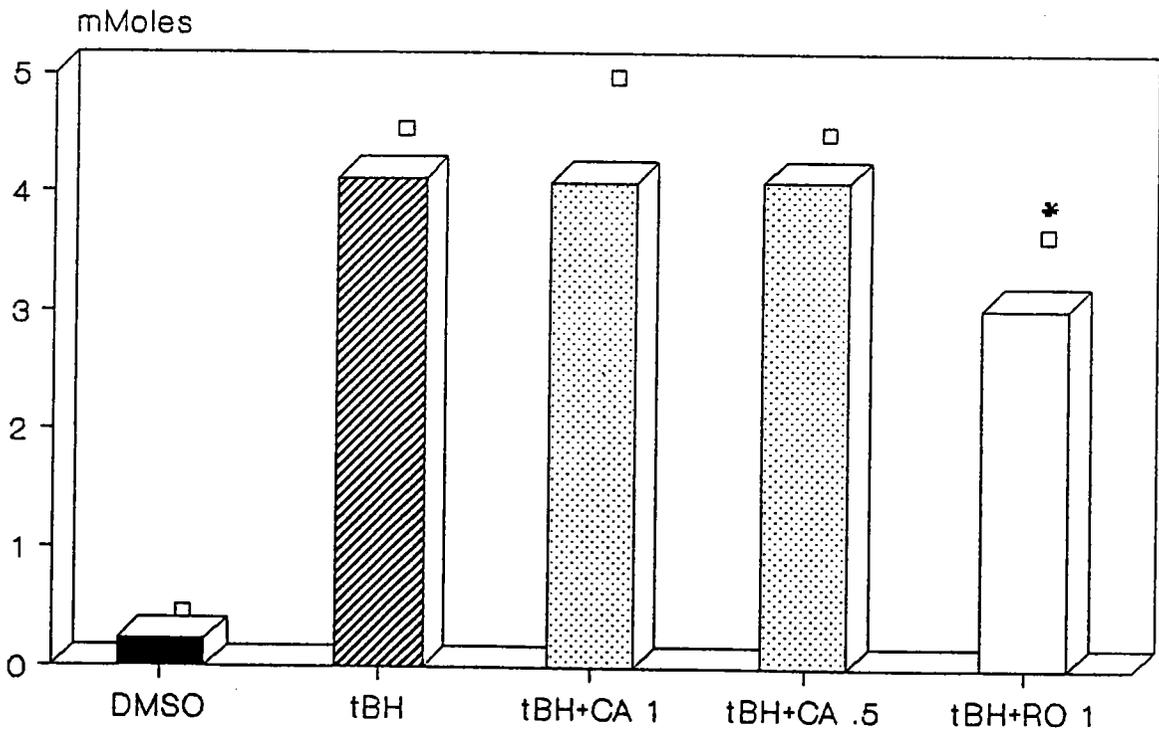
Extrait



G 3 : Profils chromatographiques d'identification de
Cuscuta americana



MAD



G4 : Effet de *Cuscuta americana* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

- effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)
- effet sur la fuite de lacticoxydase (LDH)
- effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae)

Répartition géographique :

Régions tropicales et sub tropicales.

Description botanique :

Momordica charantia est une liane grêle, grimpante de 3 à 4 mètres; les feuilles de 5 à 7 lobes ont 4 à 12 cm de diamètre, les lobes sont plus étroits à la base, dentés ou lobés, obtus ou mucronés; la corolle est jaune, le fruit jaune-orange de 5 à 15 cm de long, oblong, ellipsoïde, tuberculé à 3 valves; la graine, de 10 à 16 mm, a une pulpe rouge.

Usage traditionnel :

Cette espèce constitue un des remèdes les plus renommés du Bassin Caraïbe et d'Amérique centrale. Les principales indications sont :

- les états fébriles, où les parties aériennes ou les feuilles sont utilisées en décoction salée.
- les affections cutanées, où les feuilles sont utilisées soit en bain, soit en friction directement ou après macération aqueuse
- les états d'anorexie où la feuille en décoction salée ou en macération aqueuse est utilisée pour ses vertus apéritives.

De nombreux autres usages sont également répertoriés comme l'usage antirhumatismal, vermifuge, hypotenseur, vulnéraire, tonique.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les parties aériennes donne les résultats suivants :

alcaloïdes : +/-	saponosides : +
stéroïdes, terpénoïdes : +	tanins : +
composés phénoliques : +	quinones : -
flavonoïdes : +/-	

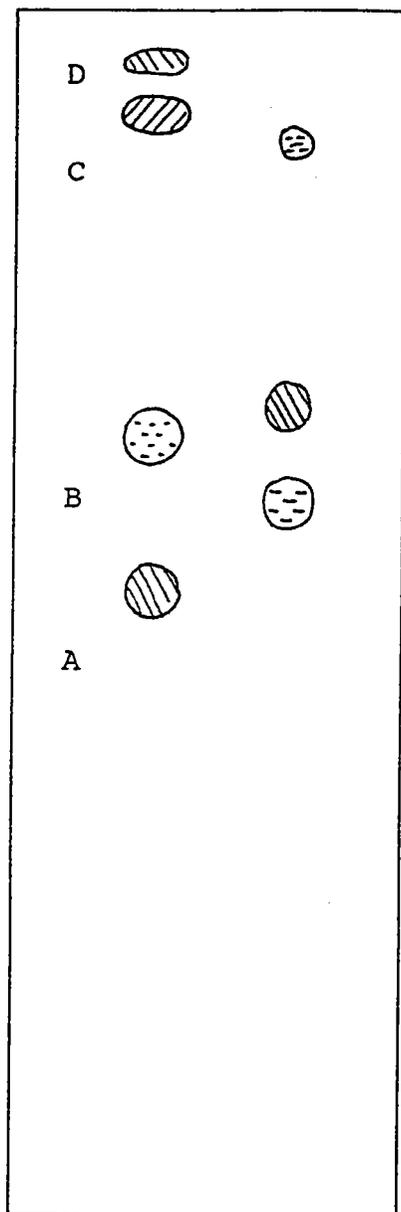
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Momordica charantia et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G5 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Momordica charantia provoque une décoloration de 6 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 3 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Momordica charantia est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

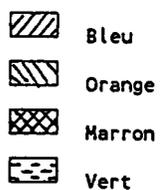
Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G6 a,b,c. Momordica charantia (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et ne s'oppose ni au relargage de la LDH ni à celui des ASAT.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercetine

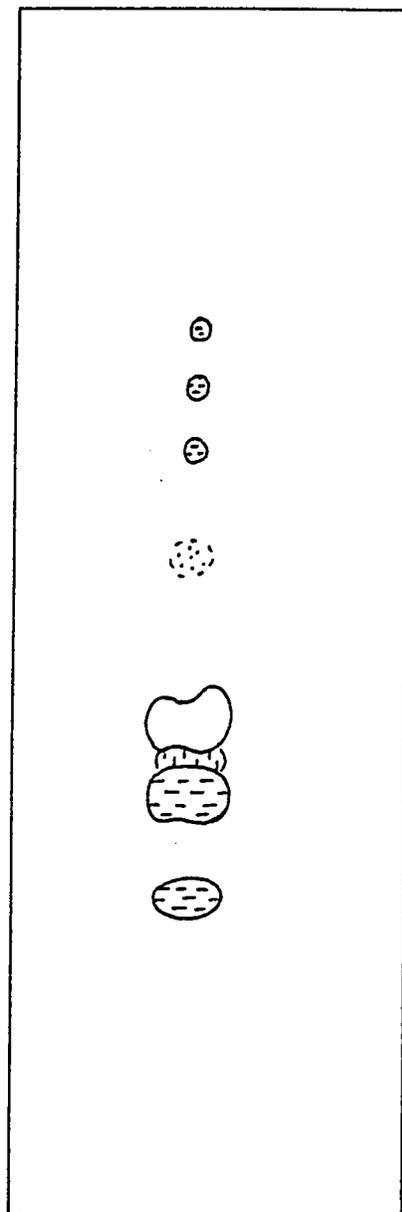
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

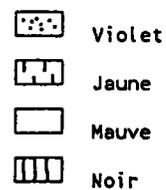
Rf 0.75

Rf 0.5

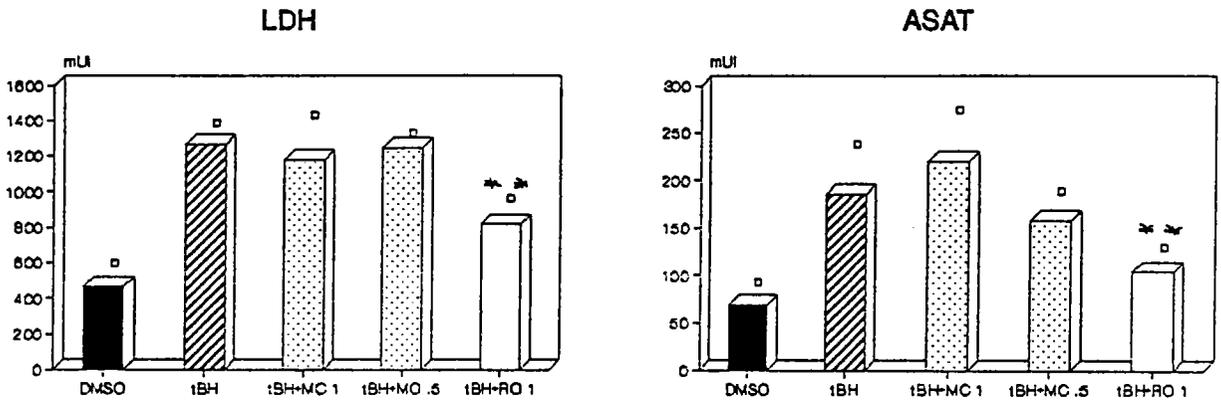
Rf 0.25



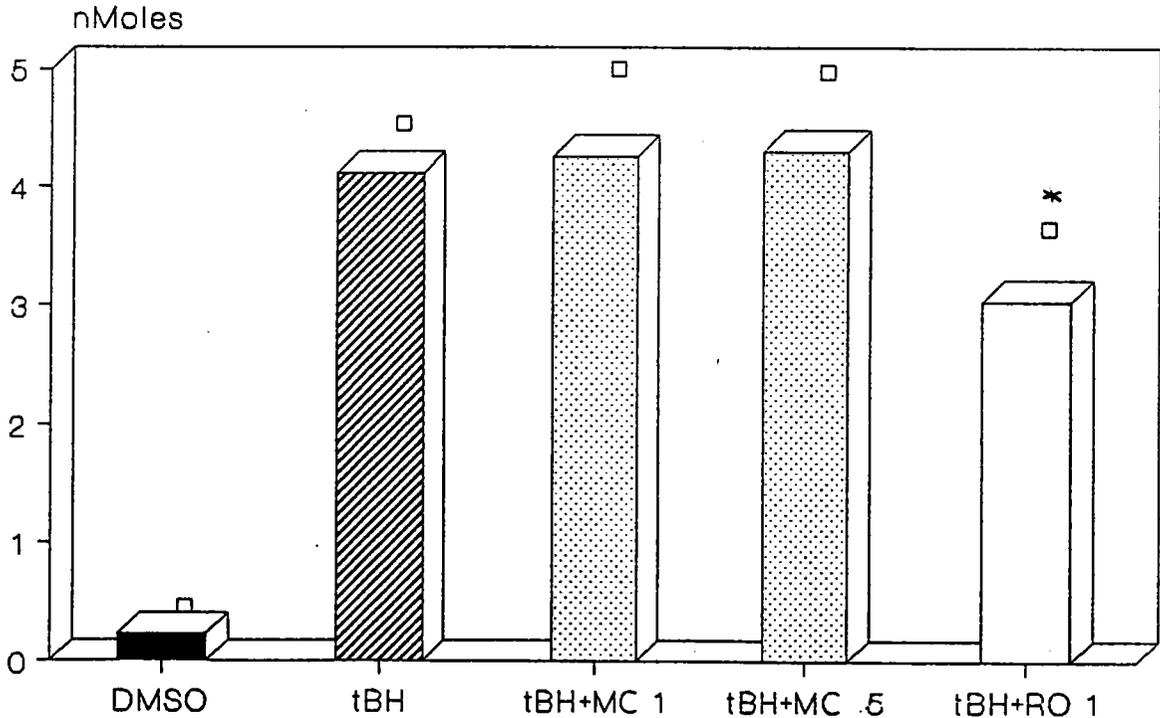
Extrait



G 5 : Profils chromatographiques d'identification de
Momordica charantia



MAD



G6 : Effet de *Momordica charantia* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Curcuma domestica Valetton (Zingiberaceae)

Répartition géographique : pantropicale.

Description botanique :

Curcuma domestica est une herbe pérenne à rhizome jaune, court et tubéreux. Les feuilles elliptiques peuvent avoir jusqu'à 45 cm de long et 20 cm de large. L'inflorescence terminale forme un épi de 15-20 cm de long, vert pâle, à bractées terminales blanches et à fleurs jaunes pâles.

Usage traditionnel :

L'usage traditionnel principal concerne, sans conteste, la sphère hépatique; le rhizome est utilisé en cas d'ictère par voie orale, en décoction salée ou en macération aqueuse, plus rarement par friction directe sur l'ongle. Curcuma domestica est également utilisée en médecine traditionnelle comme antiscorbutique et sert d'antidote dans certains cas d'empoisonnement. Curcuma domestica sert couramment de condiment (safran) et de colorant.

Chimie :

Le rhizome est riche en cétones terpéniques (tumérones) et en colorants jaunes (curcumines). Les tumérones possèdent des propriétés cholagogues et anti-inflammatoires dont les effets seraient potentialisés par les curcumines.

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Curcuma domestica et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G7 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de

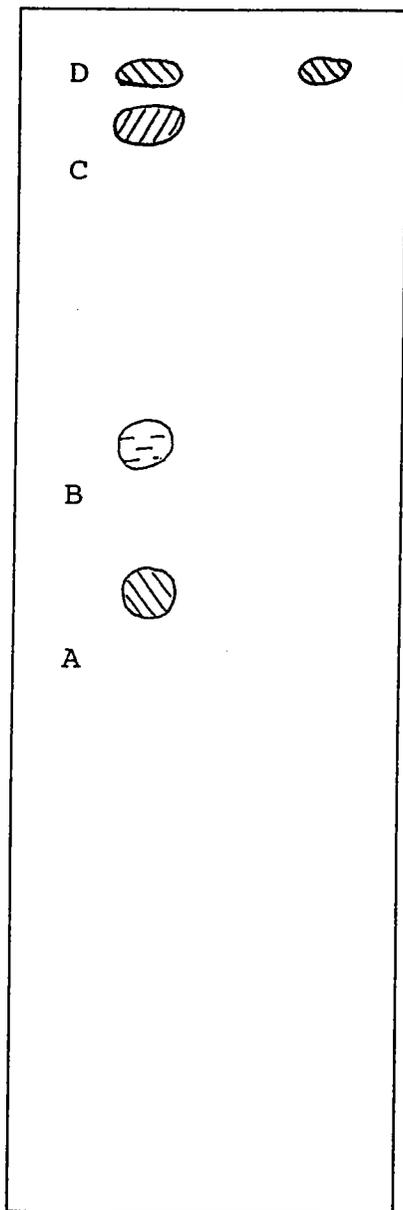
Curcuma domestica provoque une décoloration de 6 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 4 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Curcuma domestica est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G8 a,b,c. Curcuma domestica (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde. Par contre, elle provoque une diminution significative du relargage de la LDH et des ASAT aux doses de 1 et 0.5 mg de plante sèche / ml de suspension hépatocytaire, sur le modèle utilisé. Ces résultats corroborent ceux de Kiso (1983), obtenus après intoxication au tétrachlorure de carbone .

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

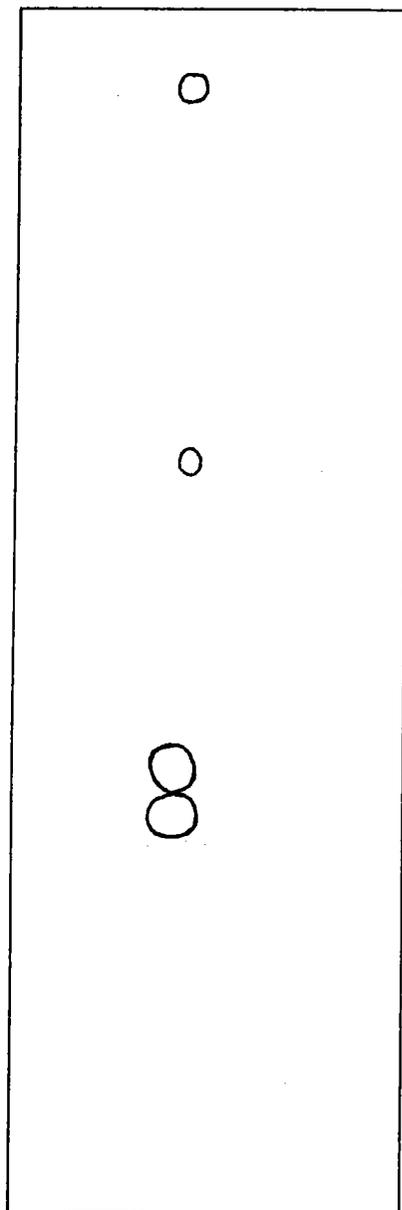


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

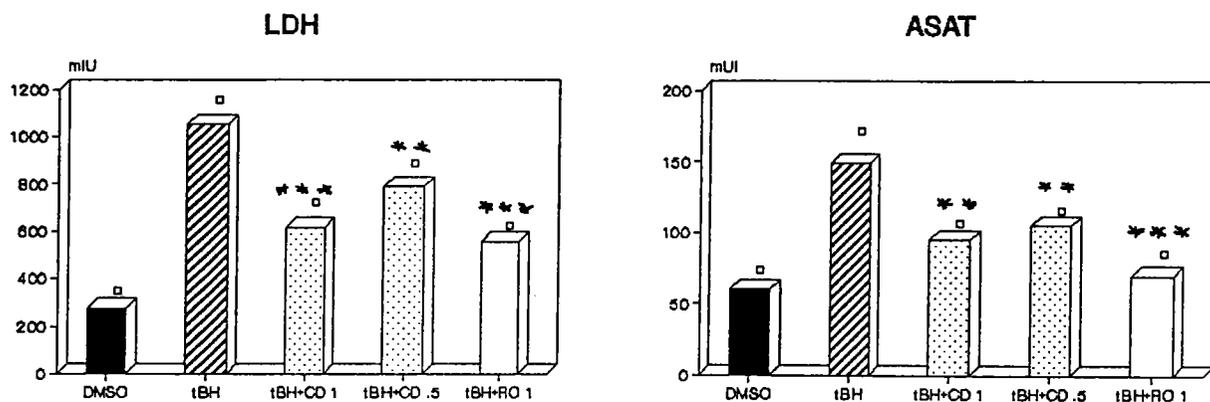
A = rutine

B = ac. chlorogénique

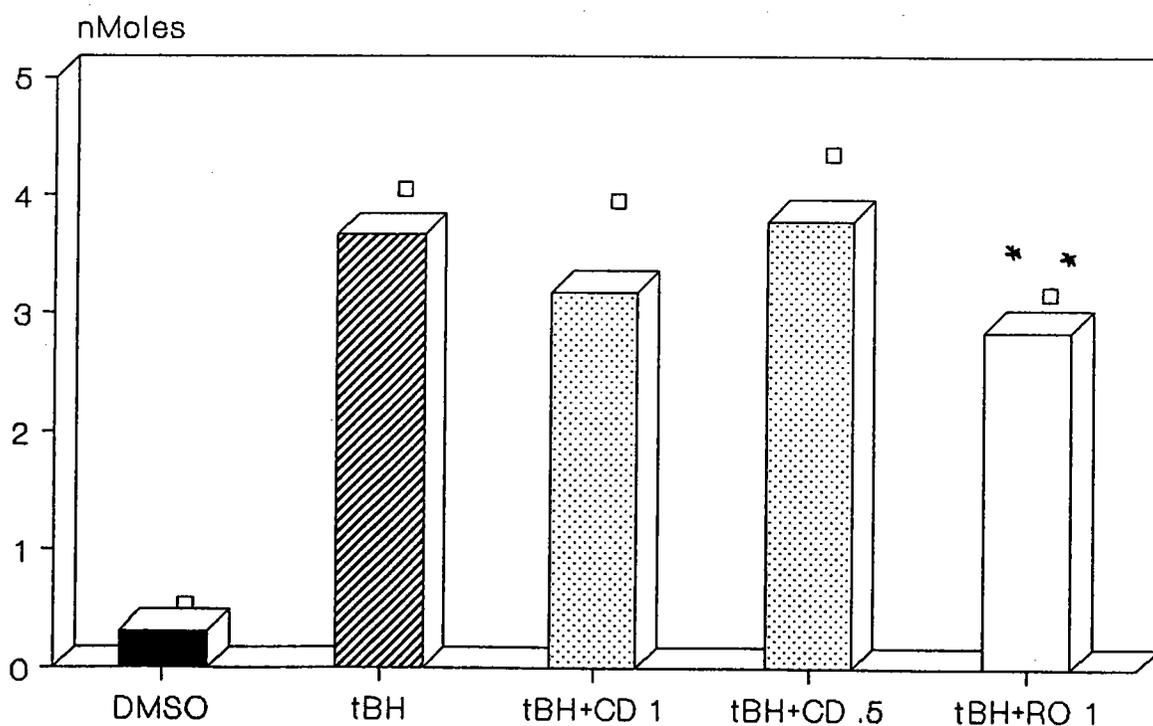
C = ac. gallique

D = quercétine

G 7 : Profils chromatographiques d'identification de Curcuma domestica



MAD



G8 : Effet de Curcuma domestica sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Justicia pectoralis Jacq. (Acanthaceae)

Répartition géographique :

Bassin caraïbe et Amérique centrale

Description botanique :

Plantes herbacées

Usage traditionnelle :

Justicia pectoralis est utilisée dans le bassin caraïbe pour ses vertus antigrippales, pectorales et antitussives. Les feuilles sont également réputées vulnéraires et sédatives. Les indications de Justicia pectoralis sur la sphère digestive se résument à une activité antigastrolgique et stomachique. En Guadeloupe, certains tradipraticiens utiliseraient Justicia pectoralis comme hépatotrope mais l'utilisation dans cette indication particulière est probablement limitée.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les parties aériennes donne les résultats suivants (Weniger, 1984):

alcaloïdes : +/-	saponosides : +
stéroïdes, terpénoïdes : +/-	tanins : -
composés phénoliques : +	quinones : -
flavonoïdes : +	

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Justicia pectoralis et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G9 a,b.

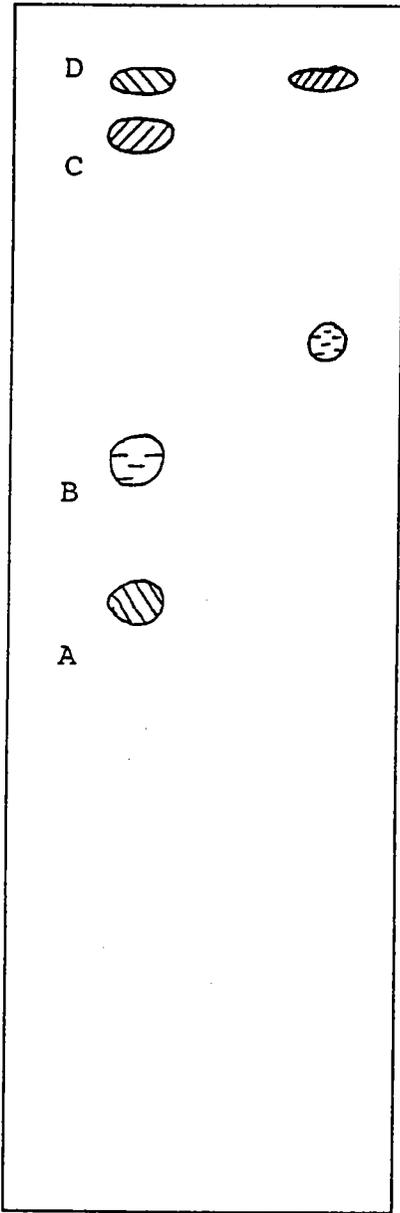
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Justicia pectoralis provoque une décoloration de 19 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 11 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Justicia pectoralis est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G10 a,b,c. Justicia pectoralis (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite extracellulaire de la LDH et des ASAT signant la nécrose cellulaire. Aucun effet antilipoperoxydant ou antinécrotique n'est mis en évidence pour cette espèce sur ce modèle.

a/ Flavonoïdes



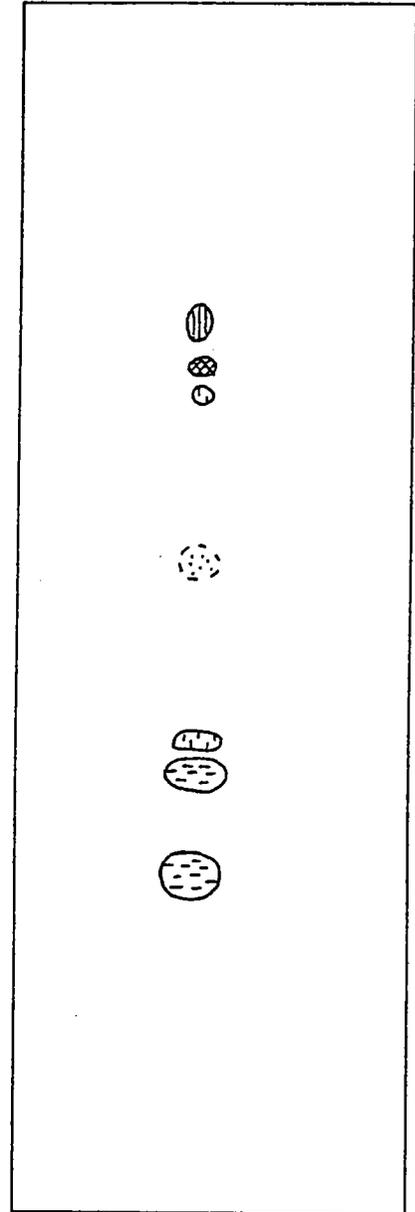
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

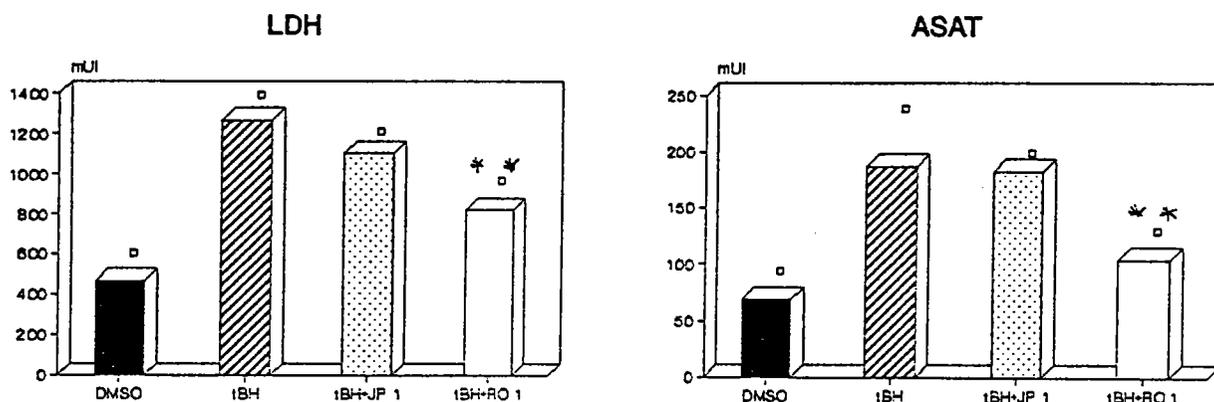
A = rutine

B = ac. chlorogénique

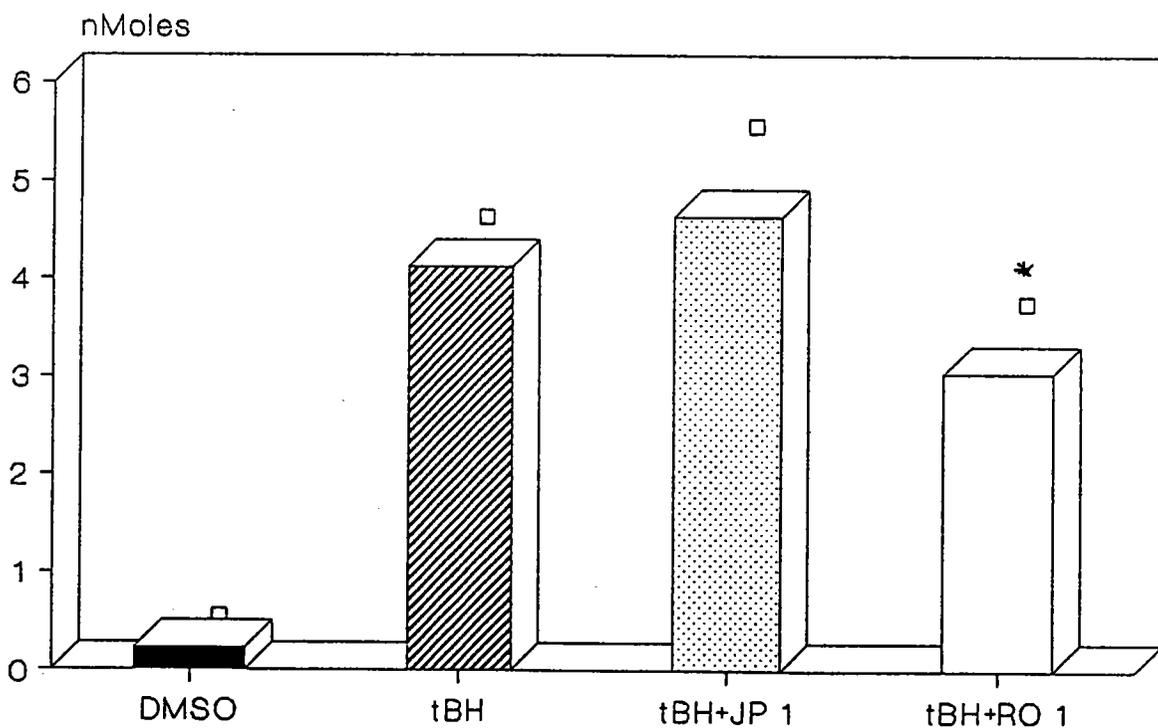
C = ac. gallique

D = quercetine

G 9 : Profils chromatographiques d'identification de Justicia pectoralis



MAD



G10 : Effet de *Justicia pectoralis* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Terminalia catappa L. (Combretaceae)

Répartition géographique : pantropicale

Description botanique :

Terminalia catappa est un arbre pouvant atteindre 25 mètres de hauteur. Les branches horizontales, en verticille, portent des feuilles oblongues de 20 à 30 cm de long, arrondies, apiculées. Les épis sont étroits, axillaires, de 5 à 15 cm de long; le calice tomenteux a 8 à 10 mm. Les drupes ellipsoïdes, apiculées ont 4 à 7 cm et renferment une graine de 3 à 4 cm.

Usage traditionnel :

Les feuilles de Terminalia catappa sont traditionnellement utilisées contre l'hypertension, en décoction (avec du sel) en Haïti ou en infusion légèrement sucrée en médecine créole. Au Sénégal, elles sont également recommandées contre les douleurs gastriques et les fièvres liées aux infections intestinales. Terminalia catappa est également recommandé pour ses propriétés anti-diarrhéiques, pour lesquelles on utilise les feuilles en Indochine et la racine en Colombie. En macération les feuilles vertes sont utilisées contre les maladies hépatiques et en infusion les feuilles rouges auraient des propriétés hypnotiques. Les feuilles sont également utilisées pour leurs vertus hémostatiques au Costa Rica, antiasthmatiques au Mexique et à Cuba, antitussives en Nouvelle Guinée et antidiabétiques à l'île Maurice.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les feuilles de Terminalia catappa donne les résultats suivants (Weniger, 1984):

alcaloïdes : -	saponosides : -
stéroïdes, terpénoïdes : +	tanins : +
composés phénoliques : +	quinones : +/-
flavonoïdes : +	

Dans les feuilles on note la présence de diterpènes libres, de triterpènes, de stérols ou de substances polycycliques voisines et de tanins catéchiques. La plante entière est riche en ellagi-tanins. Le quercétol, la leucocyanidine et le kaempférol ont été mis en évidence dans les feuilles; l'écorce contient également des flavonoïdes.

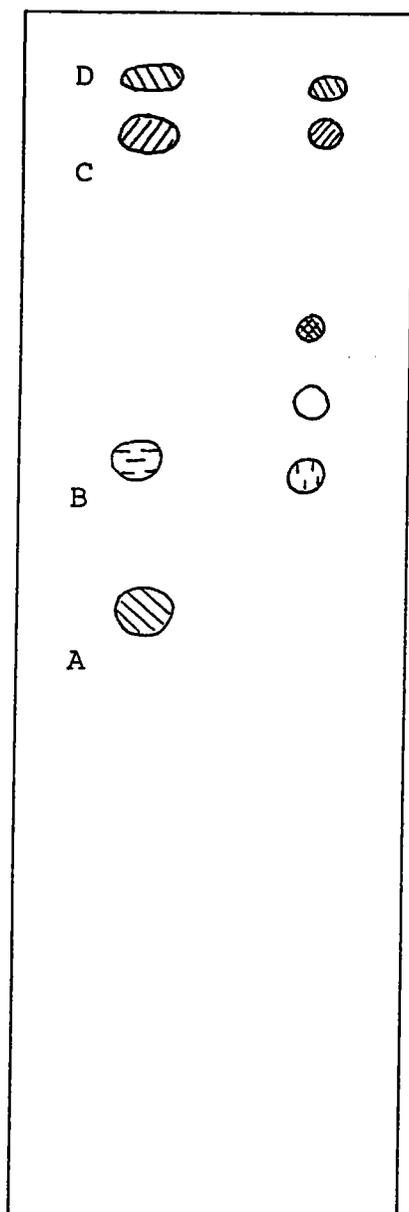
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Terminalia catappa et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G11 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Terminalia catappa provoque une décoloration de 86 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 74 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Terminalia catappa est classée en type II.

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G12 a,b,c. Terminalia catappa (0,5 et 1 mg/ml) présente une activité significative sur l'ensemble des paramètres étudiés. Elle offre un bon niveau de protection sur un système d'hépatocytes isolés en suspension à l'encontre de la nécrose cellulaire et présente une activité antilipoperoxydante intéressante.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



Bleu



Orange



Marron



Vert

A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

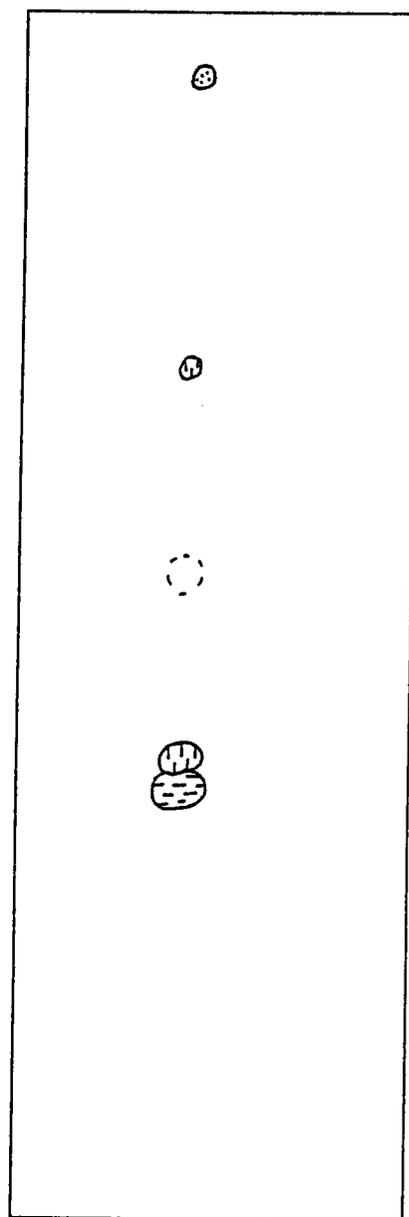
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Extrait



Violet



Jaune

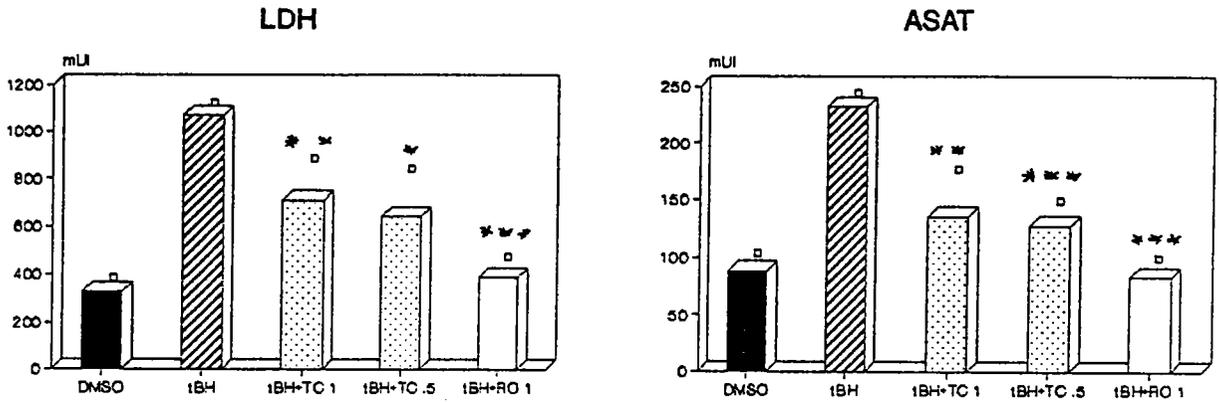


Mauve

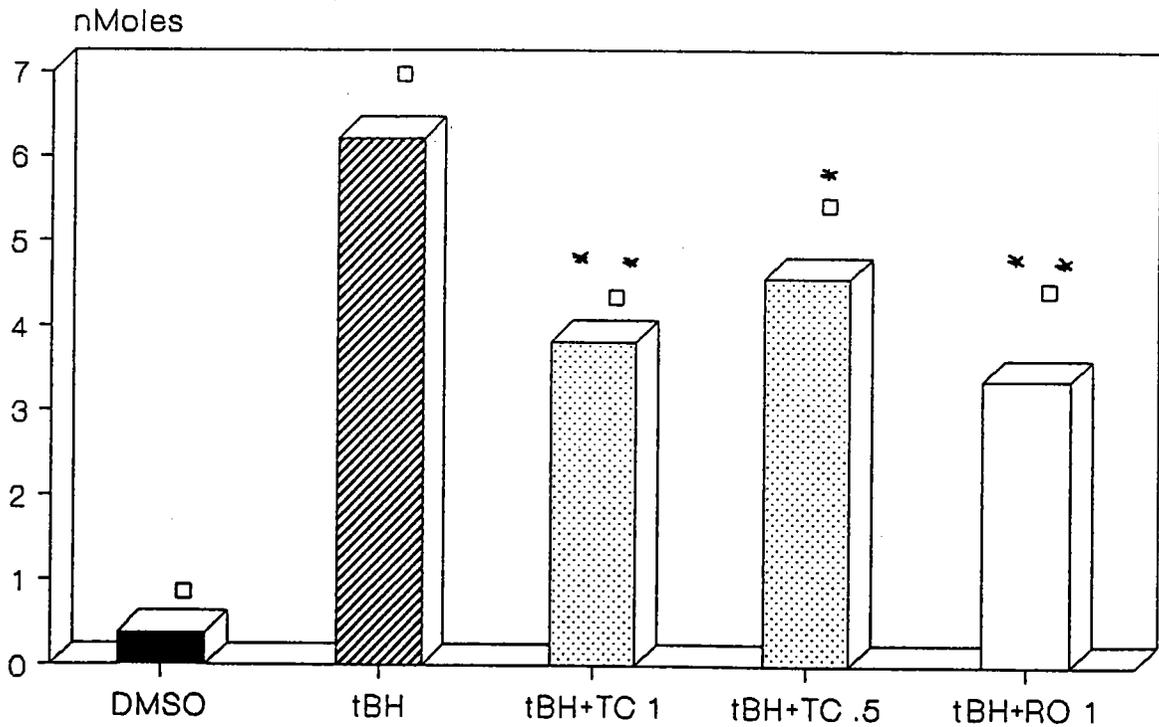


Noir

G 11 : Profils chromatographiques d'identification de
Terminalia catappa



MAD



G12 : Effet de Terminalia catappa sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

- a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)
- b. effet sur la fuite de lacticoxydase (LDH)
- c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Tamarindus indicus L. (Fabaceae)

Répartition géographique : pantropicale.

Description botanique :

Tamarindus indicus est un arbre pouvant atteindre plus de quinze mètres de haut. Ses feuilles présentent 10 à 18 paires de folioles oblongues de 12 à 25 mm. Les fleurs ont un calice de 8 à 10 mm, une corolle jaune un peu plus large que le calice. Des gousses brunes, duveteuses, de 5 à 15 cm de long, renferment des graines brillantes de 1 cm.

Usage traditionnel :

Tamarindus indicus est souvent indiqué dans les affections hépatiques et notamment dans les cas d'ictère où des décoctions de feuilles, mais également d'écorce et de fruits, sont utilisées. L'usage comme laxatif de la pulpe de fruit est très largement répandu. Parmi les autres usages on peut citer les utilisations comme antigrippal, antidiabétique, antalgique et fébrifuge, aphrodisiaque.

Chimie :

Les feuilles sont riches en acide α oxoglutarique, oxaloacétique et oxalosuccinique. Les fruits contiennent également de l'acide tartrique, acétique, malique, succinique.

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Tamarindus indicus et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G13 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

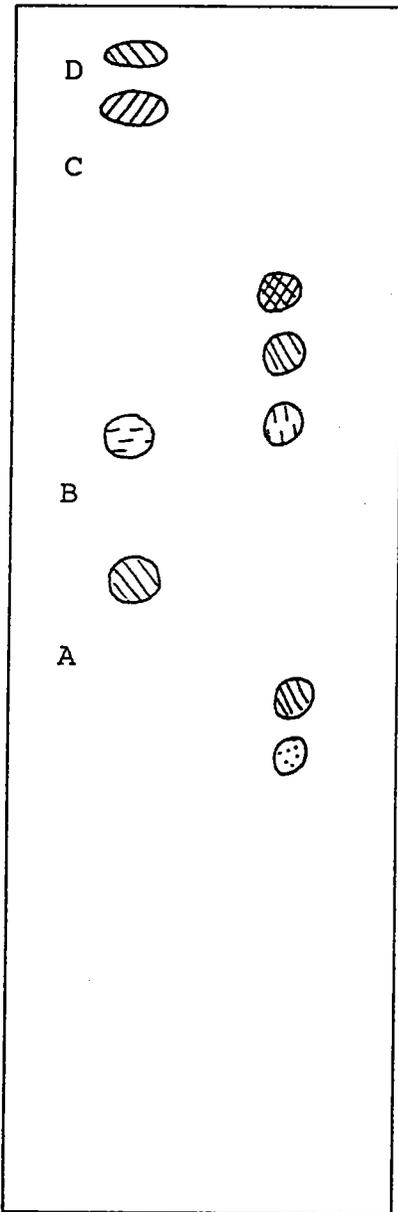
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Tamarindus indicus provoque une décoloration de 57 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 32 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Tamarindus indicus est classée en type II.

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G14 a,b,c. Tamarindus indicus (1 mg/ml) présente une activité significative sur les trois paramètres étudiés; son action antilipoperoxydante est relativement modeste, celle sur la fuite enzymatique est plus intéressante notamment sur les ASAT où son activité est la plus significative du point de vue biologique.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

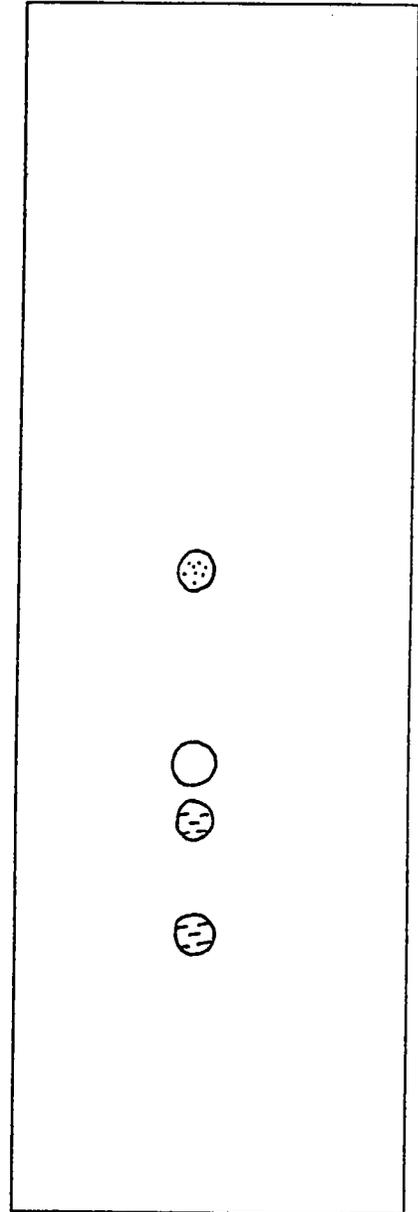


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait



Bleu



Orange



Marron



Vert



Violet



Jaune



Mauve



Noir

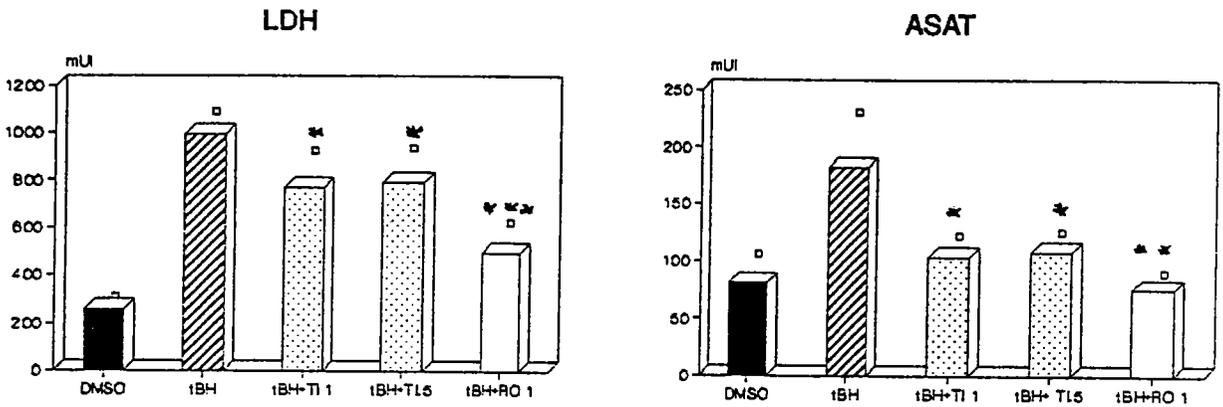
A = rutine

B = ac. chlorogénique

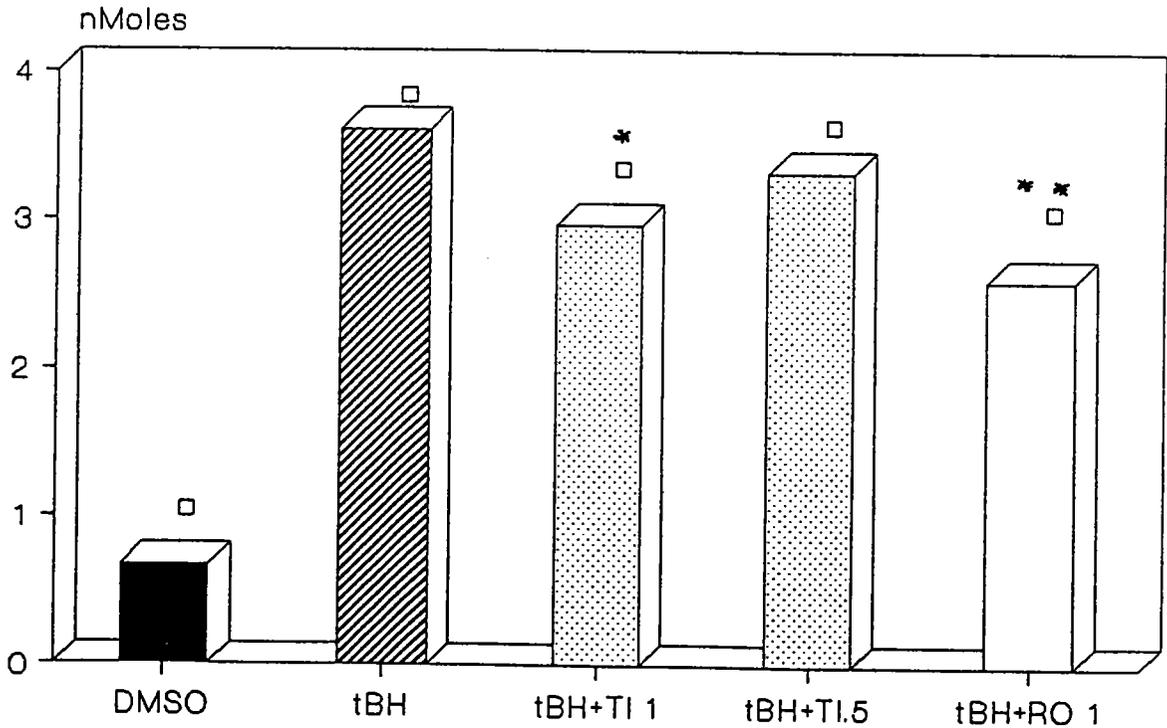
C = ac. gallique

D = quercétine

G 13 : Profils chromatographiques d'identification de Tamarindus indicus



MAD



G14 : Effet de *Tamarindus indicus* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malondaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Annona muricata L. (Annonaceae)

Répartition géographique :

Originnaire des Antilles et d'Amérique centrale, le corossolier est largement cultivé dans de nombreuses régions tropicales. Abondant aux Grandes et Petites Antilles, on le retrouve sur le continent américain depuis le Mexique jusqu'au Brésil mais également à la Réunion, à l'île Maurice, aux Indes, au Sri Lanka, en Indochine, dans l'archipel Indien et en Afrique tropicale.

Description botanique :

Annona muricata est arbuste de 3 à 8 mètres de haut, ramifié près de la base, à rameaux brun-rougeâtres et glabres. Les feuilles sont bisériées, simples, à pétioles de 5 à 8 mm, sans stipule. Les limbes sont ovales, oblongs de 6 à 18 cm de long, acuminés à l'apex, coriaces, verts foncés dessus, vert-jaunâtre dessous. Les fleurs sont solitaires, odorantes, hermaphrodites; le calice a 3 sépales valvaires; la corolle a 6 pétales épais, charnus, verts puis jaunes pâles, en deux rangs; les étamines sont nombreuses, à filet très court. Le gynécée est formé de nombreux carpelles plus ou moins cohérents. Le fruit est syncarpe, ovoïde ou cordiforme, de 5 à 20 cm de long et de 10 à 15 cm de diamètre, vert-foncé, couvert d'épines charnues de 3 à 6 mm et recourbées vers le sommet; il renferme de nombreuses graines obovoïdes, brunes, brillantes d'environ 2 cm de long dans une pulpe charnue, acidulée, juteuse, blanc crème.

Usage traditionnel :

L'emploi traditionnel d'Annona muricata est dominé par son utilisation en tant que sédatif aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Les feuilles d'Annona muricata sont utilisées en infusion ou en bain pour des symptomatologies variées allant de la poussée dentaire (Guadeloupe) à l'insomnie (Guadeloupe, Martinique, Côte d'Ivoire, Sénégal, Asie du sud-est) en passant par les convulsions (Guadeloupe) ou encore les crises d'hystérie (Haïti). Certains tradipraticiens veillent d'ailleurs à enlever la nervure centrale de la feuille (le "nerf") dont la présence pourrait conduire à un état contraire à celui escompté, l'excitation. On retrouve également des utilisations à visées pectorales (Antilles, Côte d'Ivoire) ou cutanées (Asie, Guadeloupe). Son action au niveau de la sphère digestive semble passer au second plan, les feuilles d'Annona muricata sont essentiellement utilisées pour leurs

vertus stomachiques (Antilles) et pour lutter contre le météorisme abdominal; leurs activités spasmolytiques et antidiarrhéiques sont fréquemment citées (Vénézuéla, Côte d'Ivoire, Asie). Aucune utilisation à visée hépatique n'est indiquée dans les pharmacopées traditionnelles.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les parties aériennes donne les résultats suivants (Weniger,1984):

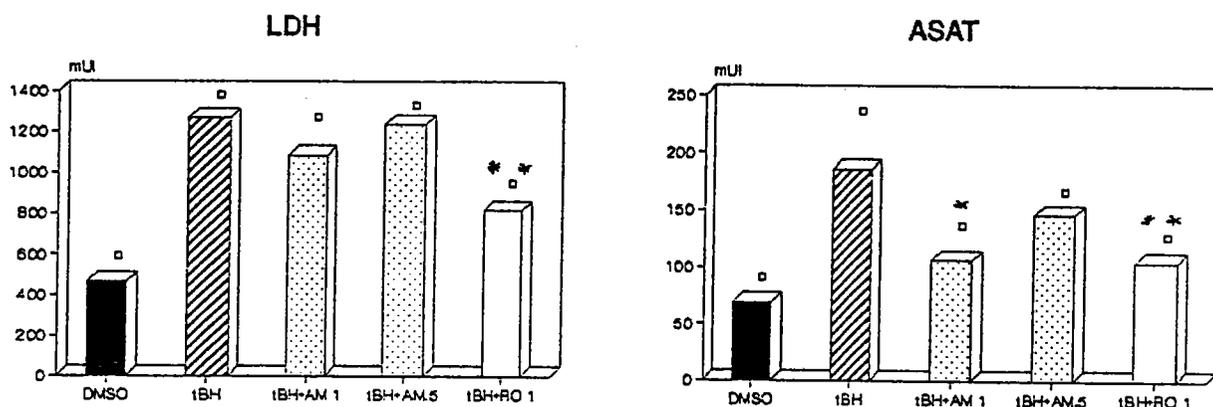
alcaloïdes : +	saponosides : -
stéroïdes,terpénoïdes : +	tanins : +
composés phénoliques : +	quinones : -
flavonoïdes : +	

Test d'Inhibition du radical DPPH :

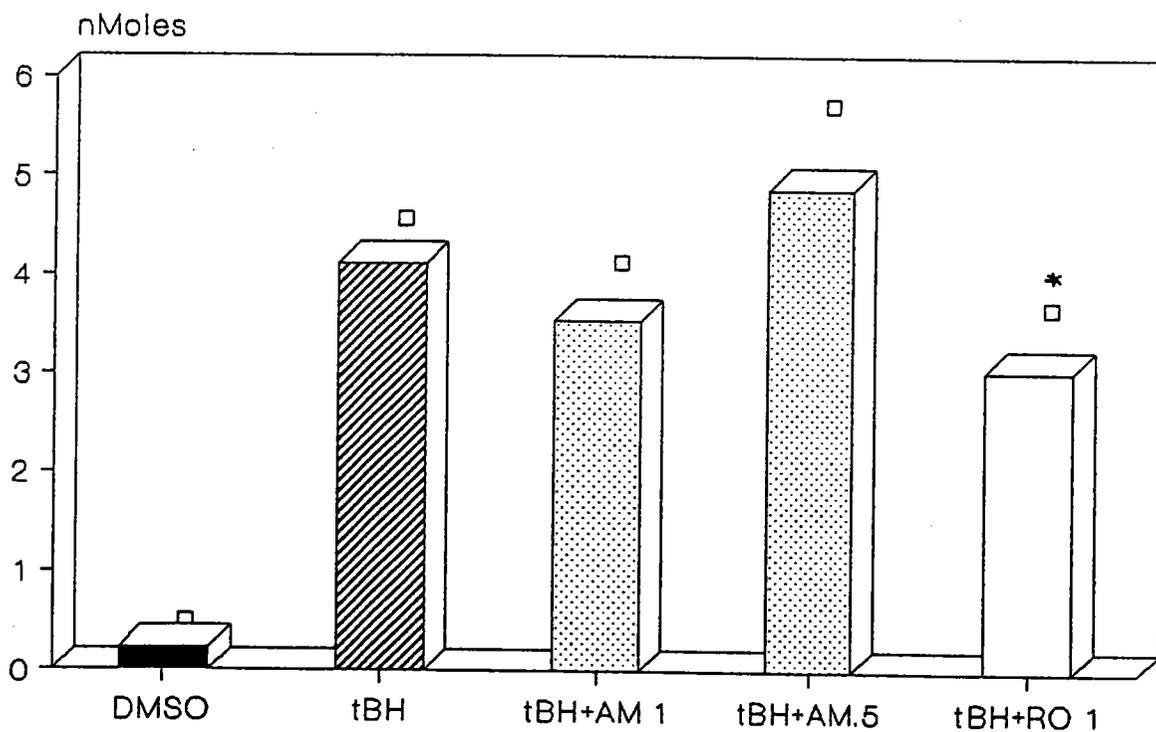
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux d'Annona muricata provoque une décoloration de 16 % pour une solution de 0.25 g / l et de 8 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Annona muricata est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G15 a,b,c. Annona muricata (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite de LDH. Par contre elle s'oppose de manière tout à fait significative au relargage des ASAT. Cette situation est rarement retrouvée sur ce modèle au cours du screening d'extraits végétaux, son interprétation est donc délicate et en tout état de cause l'absence d'action sur la fuite de LDH ne plaide pas en faveur d'une activité hépatotrope marquée.



MAD



G15 : Effet de *Annona muricata* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

Eupatorium odoratum L. (Asteraceae)

Répartition géographique :

Régions tropicales du continent américain.

Description botanique :

Eupatorium odoratum est un arbuste très rameux, pubescent, dressé, de 1 à 3 mètres. Les feuilles de 5 à 15 cm sont ovées à ovée-lancéolées, dentées, acuminées. Les capitules forment des corymbes terminaux de 5 à 10 cm de large, cylindriques de 8 à 12 mm. Les bractées de l'involucre sont imbriquées en 4 séries, obtuses. Les fleurs sont bleues ou blanches.

Usage traditionnel :

Les indications traditionnelles d'Eupatorium odoratum sont variées et utilisent presque exclusivement les feuilles. On retrouve son utilisation en cas de toux et de grippe sous forme de décoction, dans le traitement des ulcères cutanés ainsi que pour ses vertus fébrifuges, antidiabétiques, emménagogues, antirhumatismales.

Chimie :

Dans la plante entière ont été mis en évidence des composés de la classe des flavonoïdes (acacétine, vélutine, tamarixétine, mikamine), des flavonones (sakuranétine, isosakuranétine), une flavone (salvigénine), une chalcone (odorantine)

La feuille renferme des triterpènes : β amyrine, β et sistostérol, lupéol, époxylupéol et des dérivés sesquiterpéniques : (+) et (-) eupatène.

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux d'Eupatorium odoratum et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G16 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

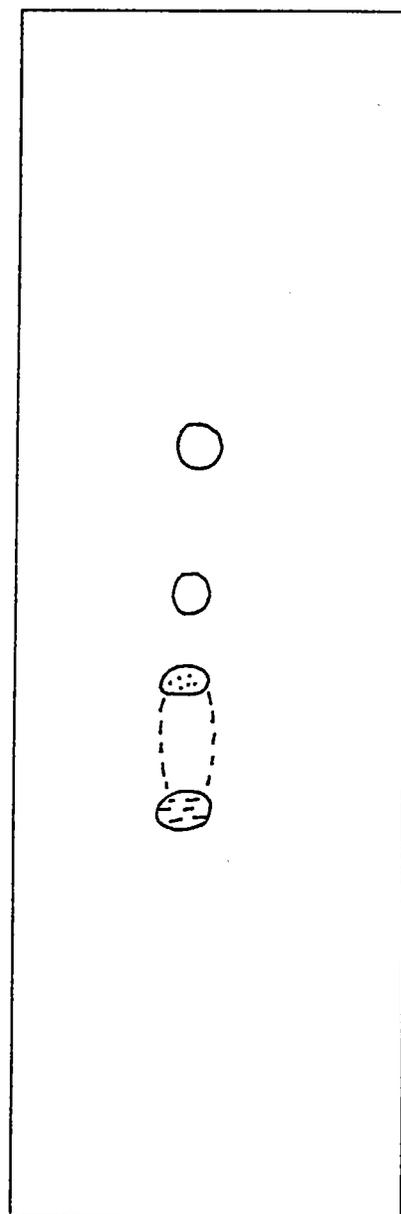
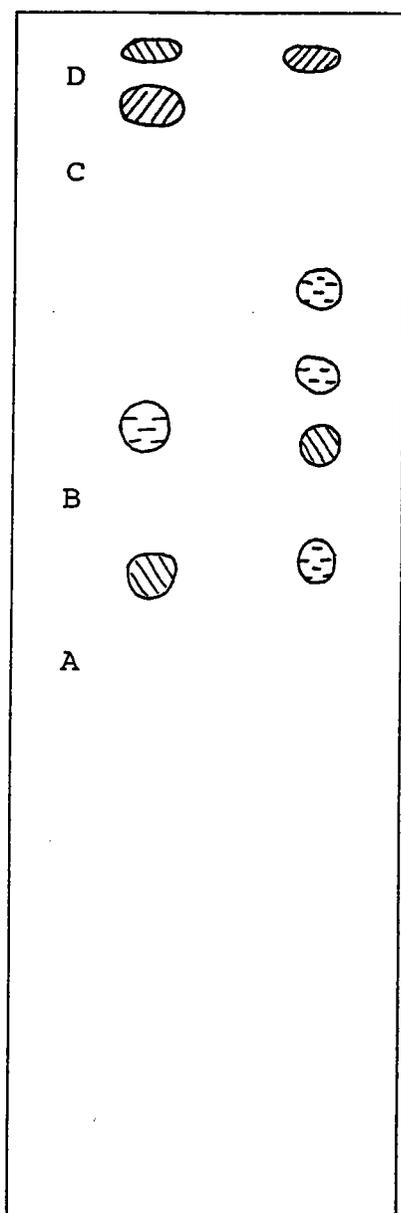
Testé dans les conditions précédemment décrites l'extrait aqueux d'Eupatorium odoratum provoque une décoloration de 42 % pour une solution de 0.25 g / l et de 36 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Eupatorium odoratum est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G17 a,b,c. Eupatorium odoratum ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde. Les doses de 1 et de 0.5 mg de plante sèche /ml de suspension freinent significativement le relargage de LDH et présentent un effet protecteur face à la fuite en ASAT. Eupatorium odoratum ne montre sur ce test aucune activité antilipoperoxydante mais une action antinérotique intéressante; cela contre toute attente, l'espèce n'étant pas utilisée dans le traitement des hépatites en médecine traditionnelle.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

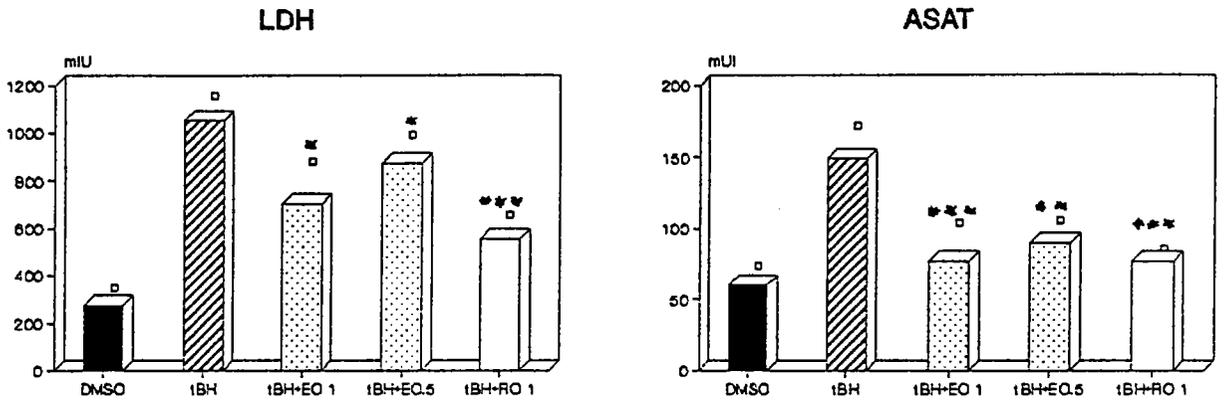
A = rutine

B = ac. chlorogénique

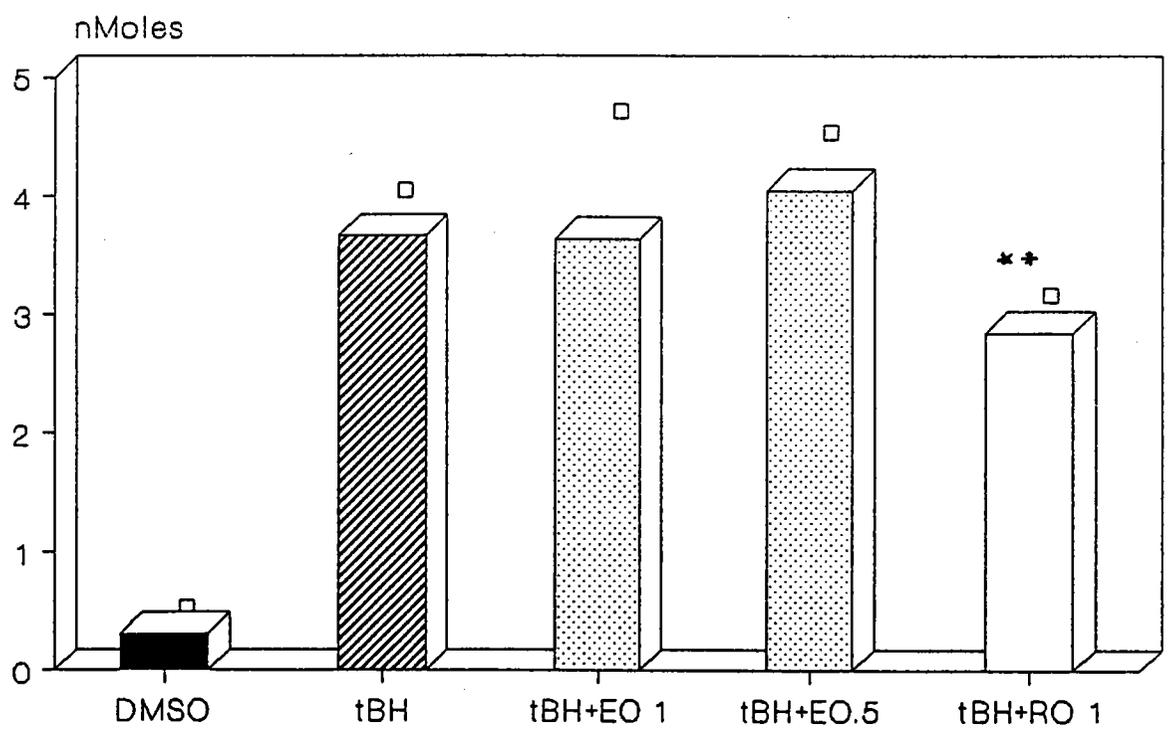
C = ac. gallique

D = quercetine

G 16 : Profils chromatographiques d'identification de Eupatorium odoratum



MAD



G17 : Effet de Eupatorium odoratum sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.
 a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)
 b. effet sur la fuite de lacticoxydohydrogénase (LDH)
 c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Xanthoxylum xanthoxyloïdes Waterm. (Rutaceae)

Répartition géographique : Afrique occidentale

Description botanique :

Xanthoxylum xanthoxyloïdes est un arbre sarmenteux de 5 à 15 mètres de haut. Le tronc, les branches, les rameaux et la nervure médiane des folioles portent de grosses épines coniques et recourbées. Les feuilles, à disposition alterne, sont composées, imparipennées et comportent 5 à 9 paires de folioles ovales, elliptiques, oblongues ou oblancéolées, souvent émarginées à l'apex et finement crénelées sur les bords ou entières de 5 à 10 cm de long et de 2 à 4 cm de large. Les fleurs, groupées en panicules lâches, terminales ou axillaires sont de petite taille, unisexuées, pentamères. La fructification se présente sous la forme de panicules de petites capsules globuleuses de la taille d'un pois de 5 à 6 mm. Chaque fruit contient une seule graine, noire et brillante. Les tiges sont cylindriques, de 3 à 5 cm de diamètre, l'écorce est lisse, brune violacée. Les racines, de 2 à 4 cm de diamètre, ont un bois jaune.

Usage traditionnel :

L'écorce des racines de Xanthoxylum xanthoxyloïdes est couramment utilisée en Côte d'Ivoire, au Sénégal, au Bénin comme cure-dent analgésique; les propriétés mécaniques du cure-dent sont associées aux propriétés thérapeutiques de l'écorce de la racine contre les maux de dents, les gingivites ou les stomatites. Les racines provoquent une salivation et un engourdissement de la langue. Au Bénin on applique la racine directement sur la dent cariée, la décoction de racines de Xanthoxylum xanthoxyloïdes est également recommandée per os contre les maux de dents. Les feuilles et les écorces sont utilisées en usage externe dans les migraines et les névralgies en application sur la tête et le front. La pulpe est également recommandée en usage externe en cas de douleurs articulaires, lumbagos, rhumatismes. Xanthoxylum xanthoxyloïdes est réputé pour ses propriétés parasitocides externes et internes. La décoction de racine et le fruit sont prescrits comme vermifuge per os. En usage externe la poudre d'écorce mélangée à l'huile de palme est utilisée pour le traitement de la gâle. Les feuilles sont utilisées chez les Wolofs contre la dysenterie, les diarrhées et les entérites. La racine serait aussi sudorifique, fébrifuge, sialagogue, antitussive et est utilisée en usage externe contre les morsures de serpents, les plaies infectées et les ulcères. Enfin, dans les pays africains, Xanthoxylum xanthoxyloïdes entre dans la composition de remèdes antictériques mais toujours en association (Cochlospermum, Combretum...).

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Xanthoxylum xanthoxyloïdes et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G18 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

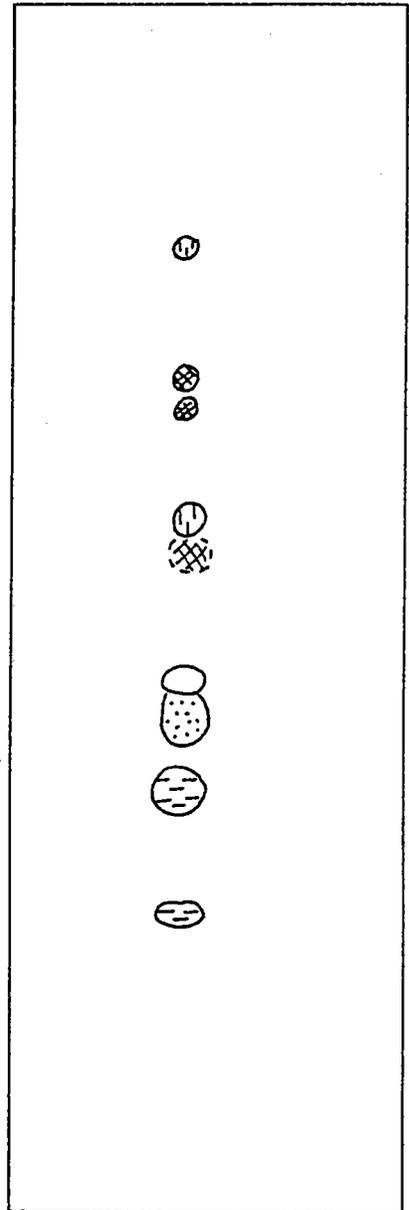
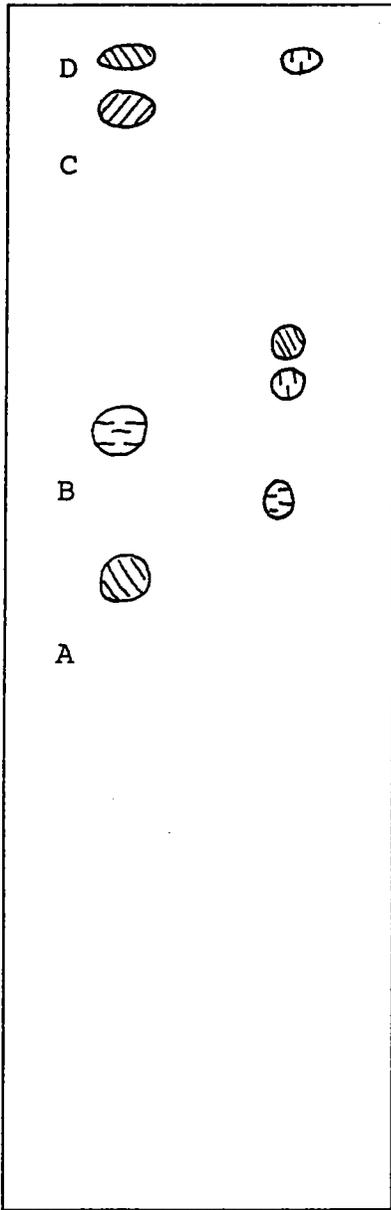
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Xanthoxylum xanthoxyloïdes provoque une décoloration de 5 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 0 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Xanthoxylum xanthoxyloïdes est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G19 a,b,c. Xanthoxylum xanthoxyloïdes (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite enzymatique de la LDH ou des ASAT.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

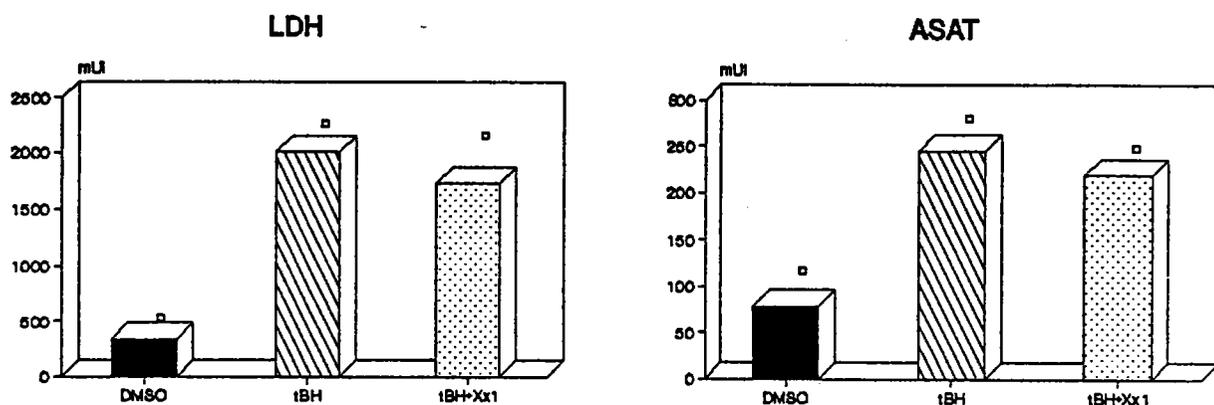
A = rutine

B = ac. chlorogénique

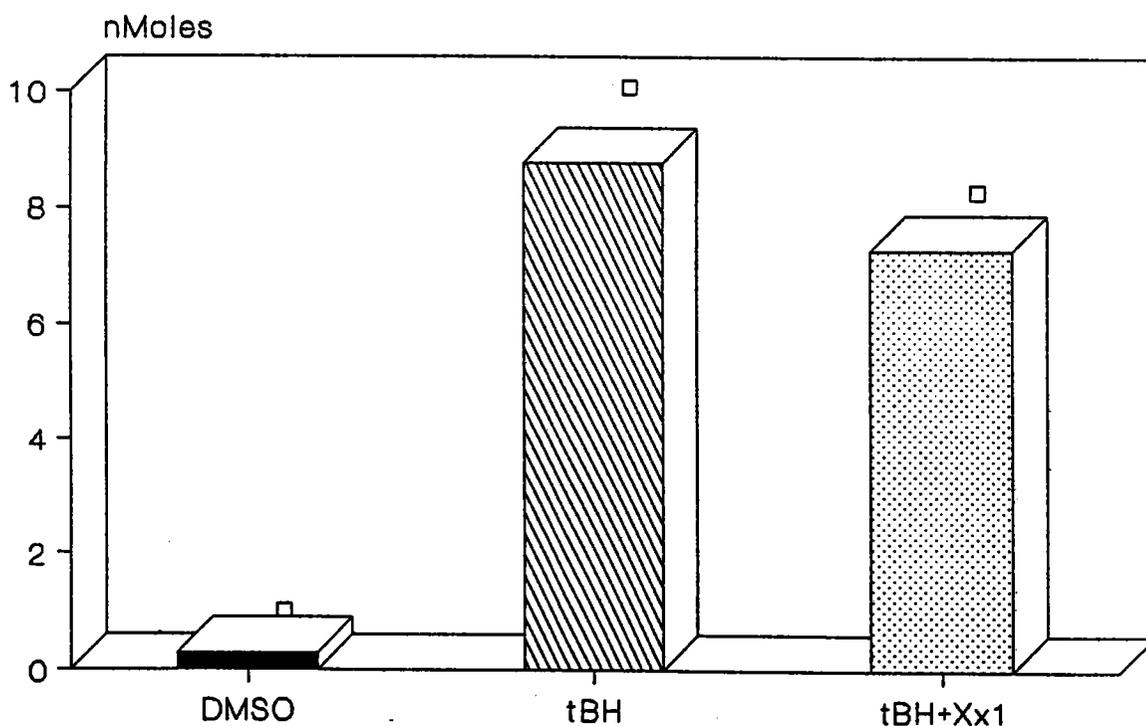
C = ac. gallique

D = quercetine

G 18 : Profils chromatographiques d'identification de Xanthoxylum xanthoxyloïdes



MAD



G19 : Effet de Xanthoxylum xanthoxyloïdes sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldehyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Kalanchoe crenata Andr. (Crassulaceae)

Répartition géographique :

Espèce répandue du Sénégal au Cameroun.

Description botanique :

Kalanchoe crenata est une plante herbacée, succulente, atteignant 1 à 2 mètres de hauteur. La tige est de section circulaire. Les feuilles sont crénelées, à pétioles distincts. Les inflorescences sont plus ou moins denses, pileuses. Les fleurs sont jaunes rougeâtres.

Usage traditionnel :

Le suc des feuilles, légèrement flambé, est administré per os contre les vomissements; il est également utilisé pour le traitement des otites. Le décocté de la tige feuillée est recommandé par voie orale pour le traitement des ictères.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Kalanchoe crenata et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G20 a,b.

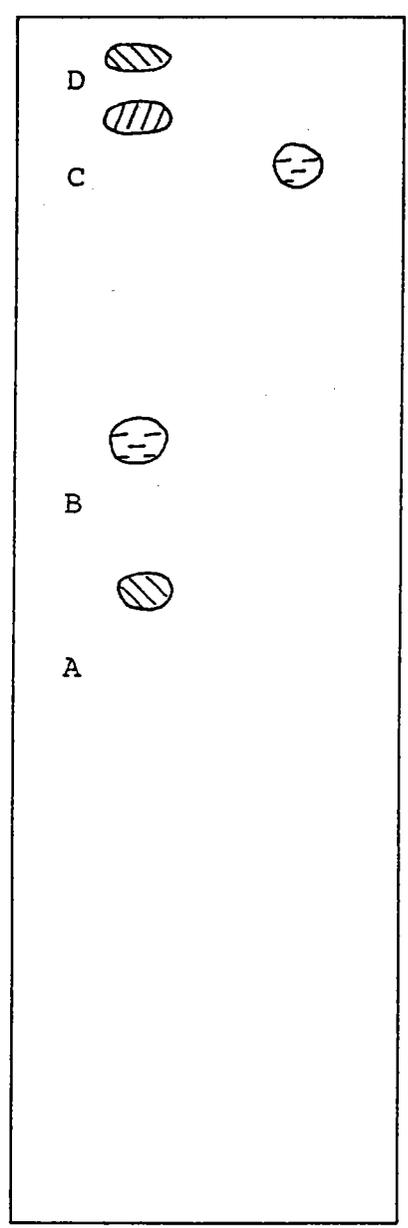
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Kalanchoe crenata provoque une décoloration de 13 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 6 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Kalanchoe crenata est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G21 a,b,c. Kalanchoe crenata ne présente aucune action sur la lipoperoxydation induite par le tert-butyl hydroperoxyde; par contre la dose de 1mg de plante sèche /ml de suspension possède une activité antinécrrotique significative tant pour la LDH que pour les ASAT.

a/ Flavonoïdes



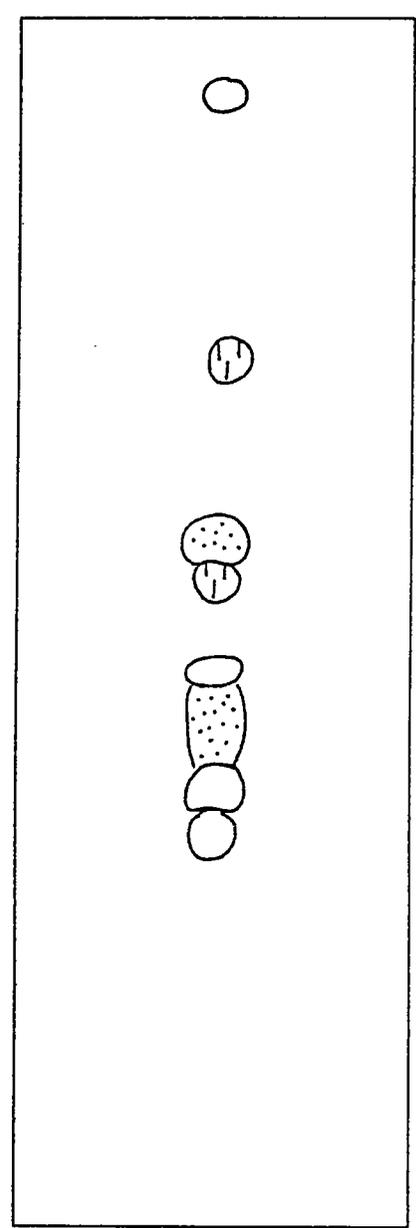
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins Extrait

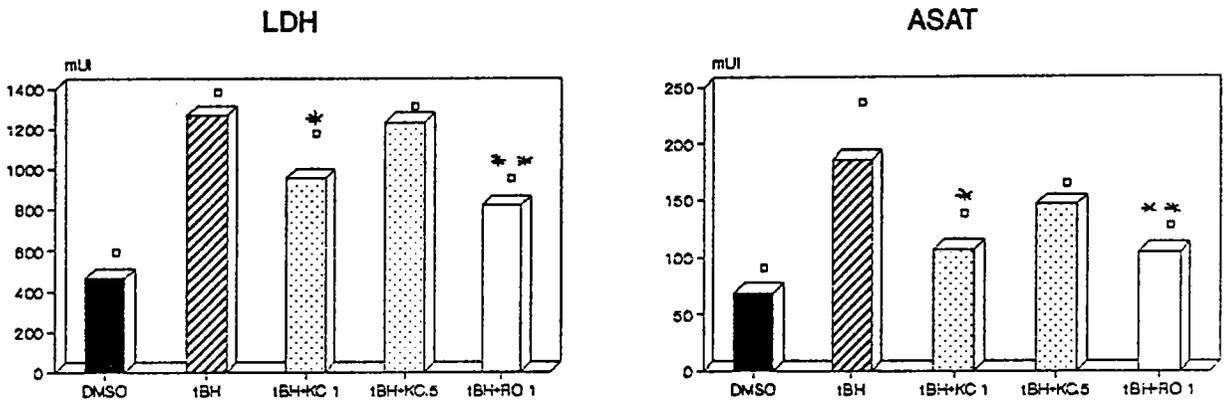
Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

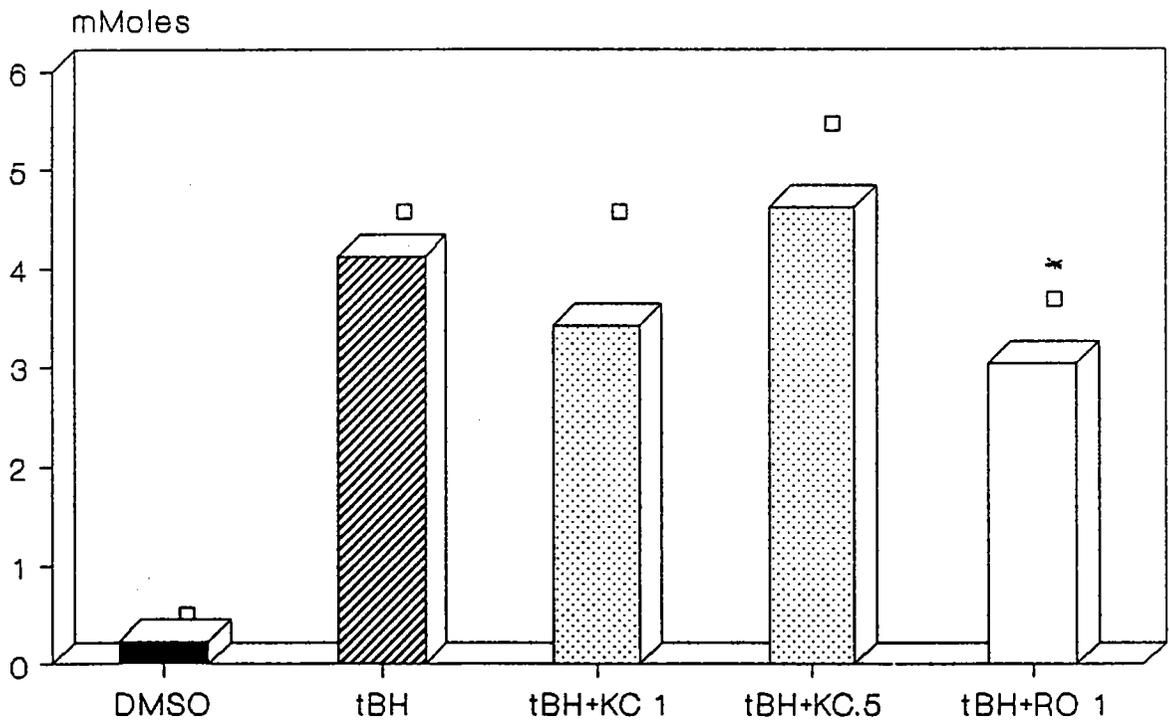
-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

A = rutine B = ac. chlorogénique C = ac. gallique D = quercetine

G 20 : Profils chromatographiques d'identification de Kalanchoe crenata



MAD



G21 : Effet de *Kalanchoe crenata* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Staudia gabonensis Warb. (Myristicaceae)

Répartition géographique :

Espèce répandue du Nigéria au Zaïre.

Description botanique :

Staudia gabonensis est un arbre de 30 à 35 mètres de haut, la base du tronc peut atteindre 75 cm de diamètre, le fut cylindrique et droit peut exuder un liquide rouge-sang, la cime est étagée. Les feuilles oblongues, acuminées, glabres ont 10 à 18 cm de long et 3 à 6,5 cm de large. Les inflorescences mâles de 5 à 7 mm de diamètre, brièvement stipitées comportent 20 à 30 fleurs de 2 mm de long. Les fruits sont ellipsoïdes de 2 à 3,5 cm de long et de 1,4 à 1,8 cm de large avec un stipe de 2 à 8 mm de long.

Usage traditionnel :

Le décocté de l'écorce est utilisé comme hémostatique en usage externe, il serait également revitalisant par voie interne. L'écorce est également utilisée au Gabon pour traiter les états ictériques.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Staudia gabonensis et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentées en figures G22 a,b.

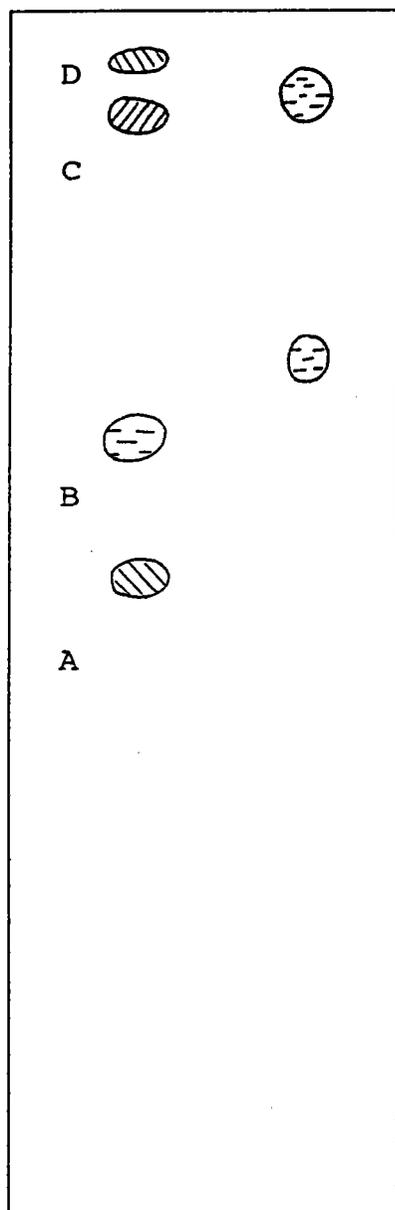
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Staudia gabonensis provoque une décoloration de 19 % pour une solution de

0.25 g/ l et de 11 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Staudia gabonensis est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

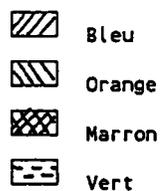
Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G23 a,b,c. Staudia gabonensis (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde. Par contre, elle s'oppose de manière significative au relargage des ASAT et de la LDH, bien que son action reste relativement modeste.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

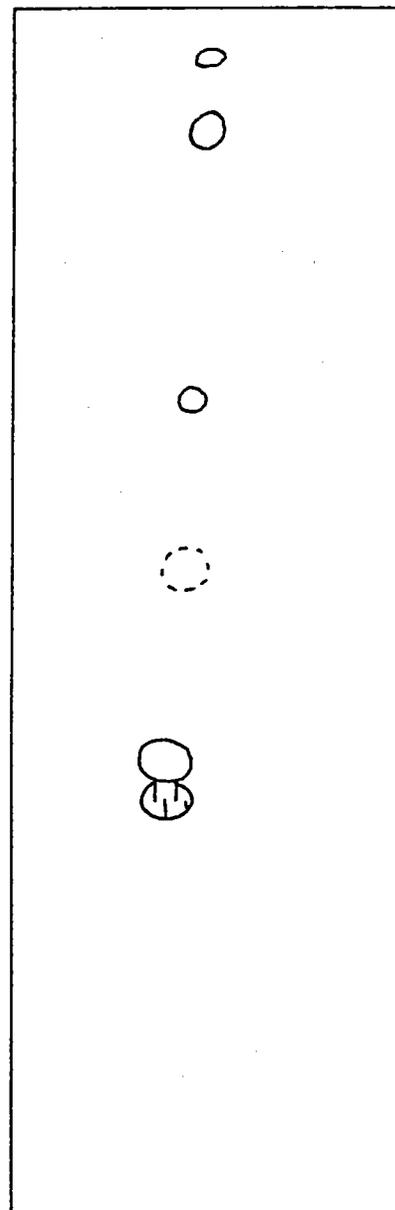
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

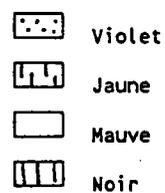
Rf 0.75

Rf 0.5

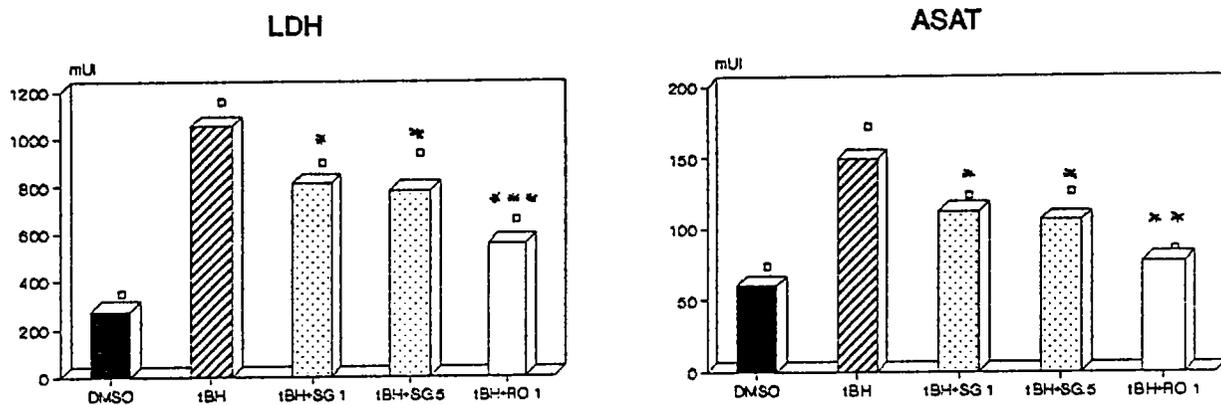
Rf 0.25



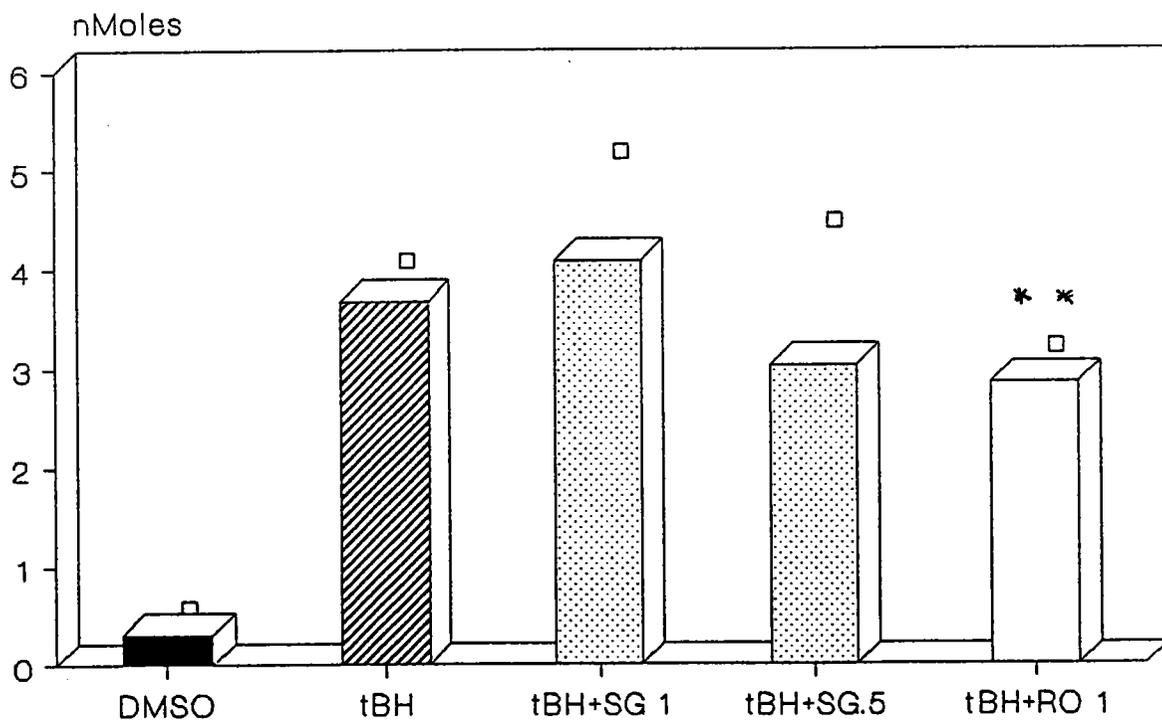
Extrait



G 22 : Profils chromatographiques d'identification de
Staudia gabonensis



MAD



G23 : Effet de *Staudia gabonensis* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldehyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Cochlospermum tinctorium A.Rich (Cochlospermaceae)

Répartition géographique :

Espèce répandue du Sénégal à l'Ouganda.

Description botanique :

Cochlospermum tinctorium est une plante à souche vivace semi-tubéreuse et ligneuse dont les racines et les tiges vivaces restent enterrées, seules se développent, en surface, l'appareil végétatif annuel et l'appareil florifère. Les tiges feuillées ont 30 à 80 cm de hauteur. Les feuilles palmatilobées sont à lobes effilés. Des fleurs jaune-d'or apparaissent au ras de la terre. Le fruit est une capsule ovoïde contenant des graines noires entourées de longs poils.

Usage traditionnel :

Le décocté des tubercules est bu en cas de dysménorrhée et est également utilisé tiède, en bain de siège pour traiter le prolapsus anal. Ces mêmes tubercules, en macération (parfois dans l'urine de boeuf), sont réputés anti-ictériques par voie orale et sont très largement utilisés par les tradipraticiens africains dans cette indication.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Cochlospermum tinctorium et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G24 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

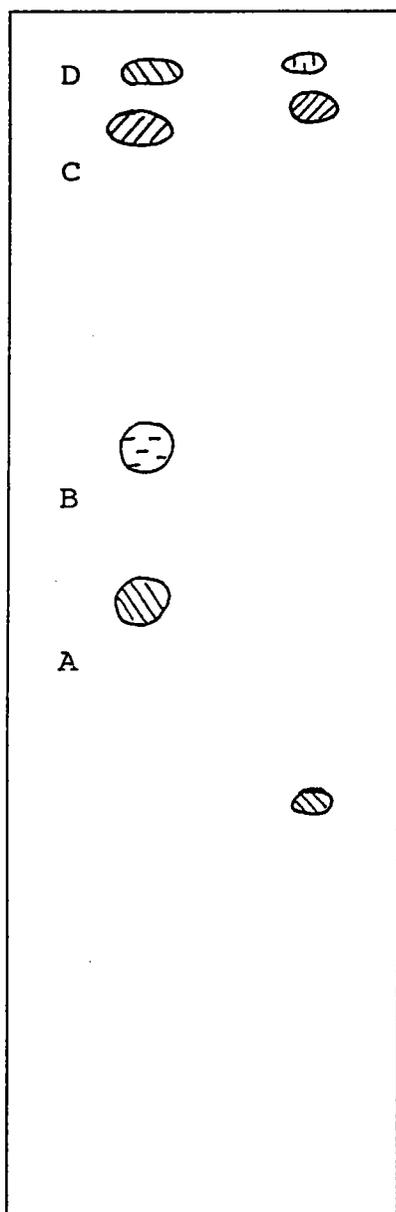
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Cochlospermum tinctorium provoque une décoloration de 70 % pour une

solution de 0.25 g/ l et de 43 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Cochlospermum tinctorium est classée en type II.

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G25 a,b,c. Cochlospermum tinctorium (1 mg/ml) présente un effet protecteur, relativement moyen, à l'encontre de la peroxydation lipidique engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde. Par contre elle s'oppose de manière tout à fait significative au relargage extracellulaire des ASAT et de la LDH. Cochlospermum tinctorium confirme donc, sur ce modèle, l'activité hépatotrope traditionnellement reconnue.

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait



A = rutine

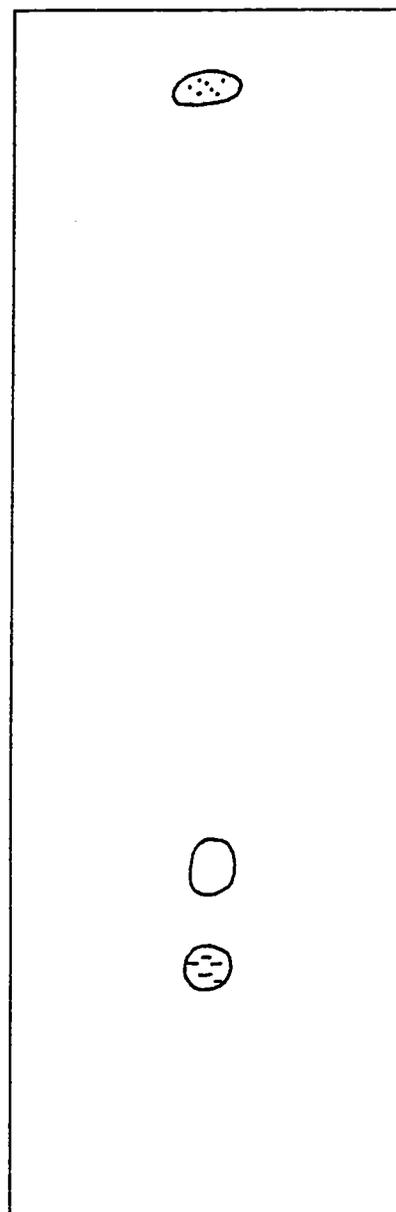
B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercetine

b/ Composés Réducteurs

Rf 1

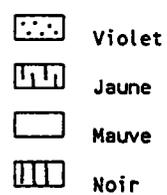


Rf 0.75

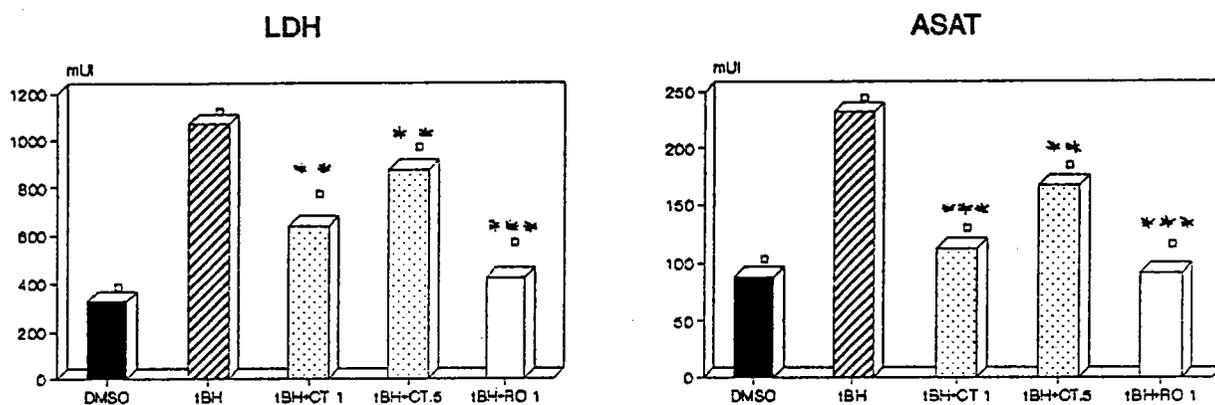
Rf 0.5

Rf 0.25

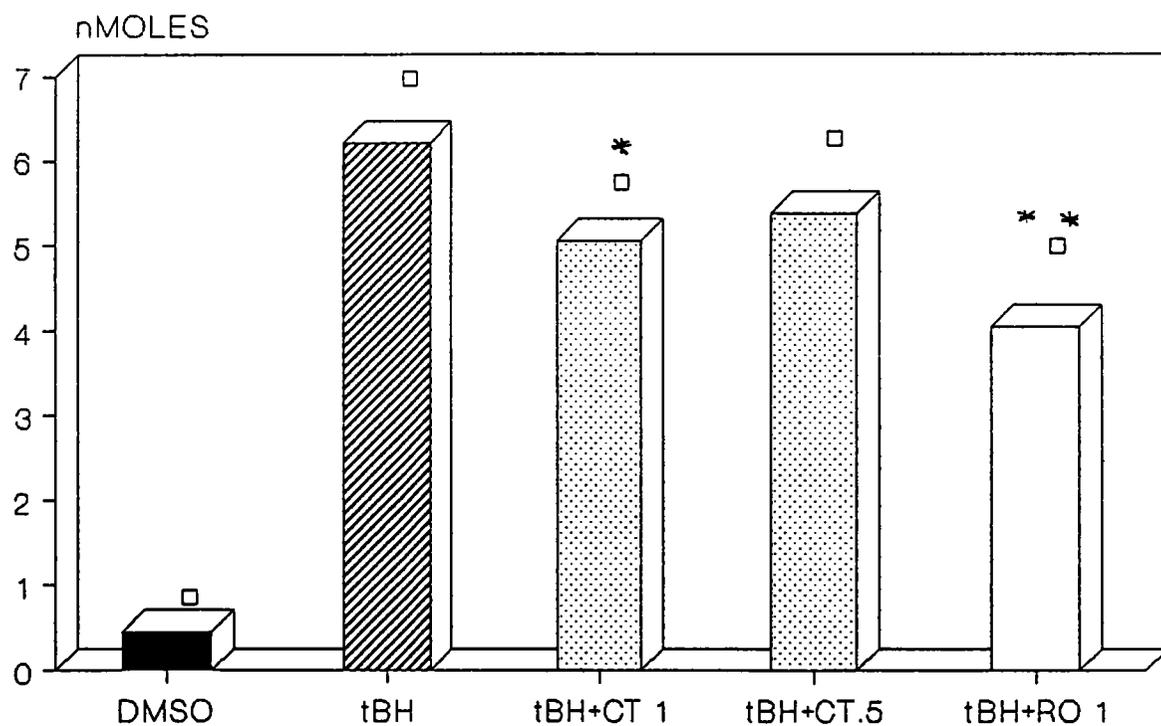
Extrait



G 24 : Profils chromatographiques d'identification de
Cochlospermum tinctorium



MAD



G25 : Effet de *Cochlospermum tinctorium* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Cochlospermum planchonii Hook. (Cochlospermaceae)

Répartition géographique :

Espèce de savane présente depuis la Guinée jusqu'au Cameroun.

Description botanique :

Cochlospermum planchonii est un arbuste atteignant 1,50 mètre de hauteur. Les feuilles sont profondément lobées, les lobes sont oblongs, arrondis, rarement dentés. La face inférieure des feuilles est plus ou moins laineuse. Les fleurs, jaune or, sont regroupées au sommet de la tige. Le fruit est une capsule ovoïde contenant des graines noires recouvert de poils blancs.

Usage traditionnel :

Les racines sont utilisées pour leur vertu anti-ictérique dans plusieurs pays africains, soit en monothérapie, soit en association avec d'autres espèces, le plus souvent avec Xanthoxylum xanthoxyloïdes.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Cochlospermum planchonii et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figure G26 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

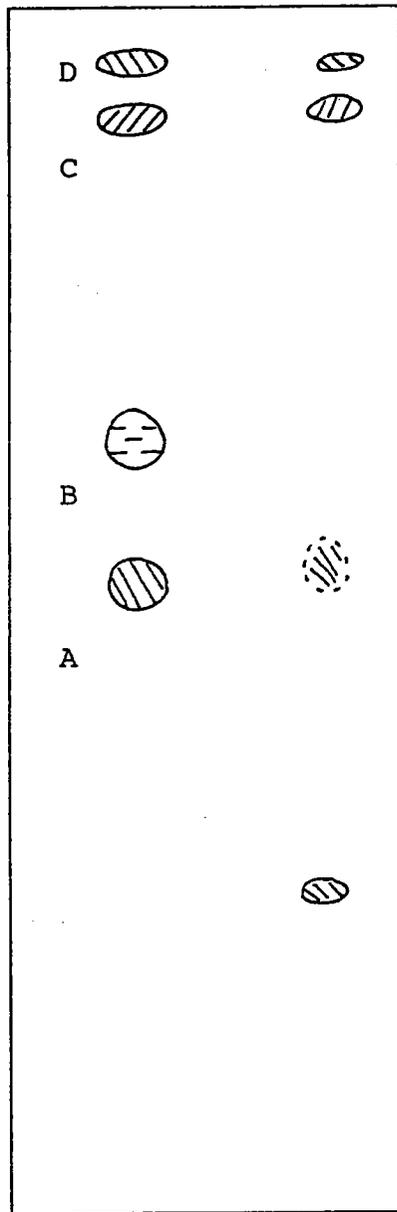
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Cochlospermum planchonii provoque une décoloration de 78 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 49 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Cochlospermum planchonii est classée en type II.

Test sur hépatocytes Isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G27 a,b,c. Cochlospermum planchonii (1 mg/ml) présente un effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et s'oppose également de manière tout à fait significative au relargage extracellulaire des ASAT et de la LDH. Cochlospermum planchonii confirme donc son activité traditionnelle sur ce modèle.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

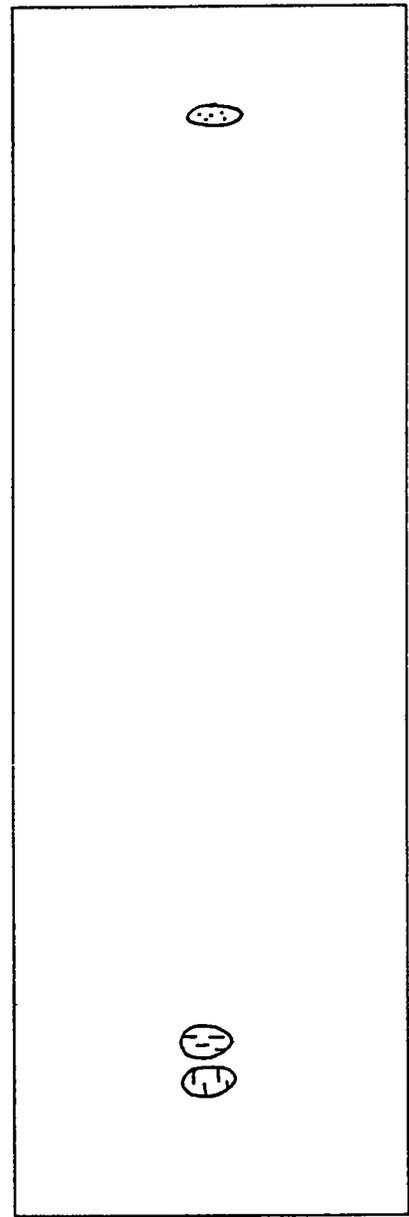


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait



Bleu



Orange



Marron



Vert



Violet



Jaune



Mauve



Noir

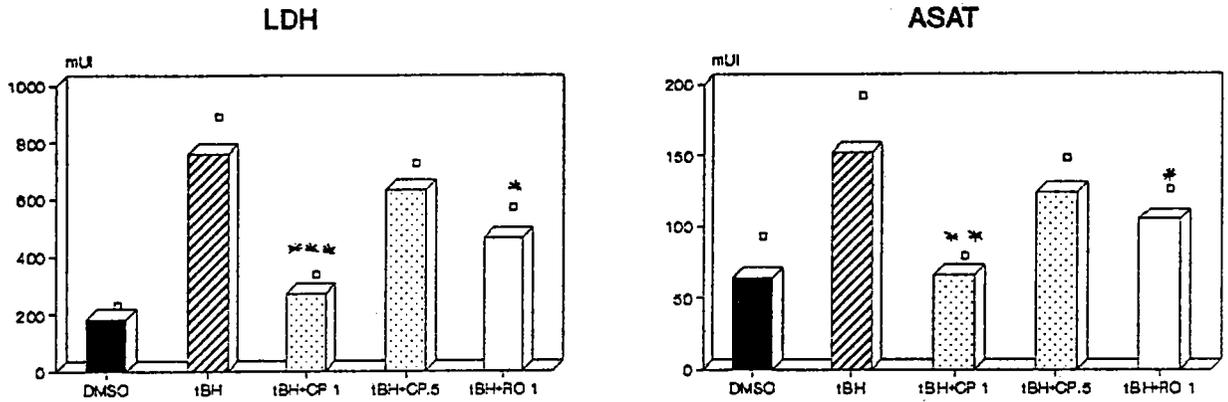
A = rutine

B = ac. chlorogénique

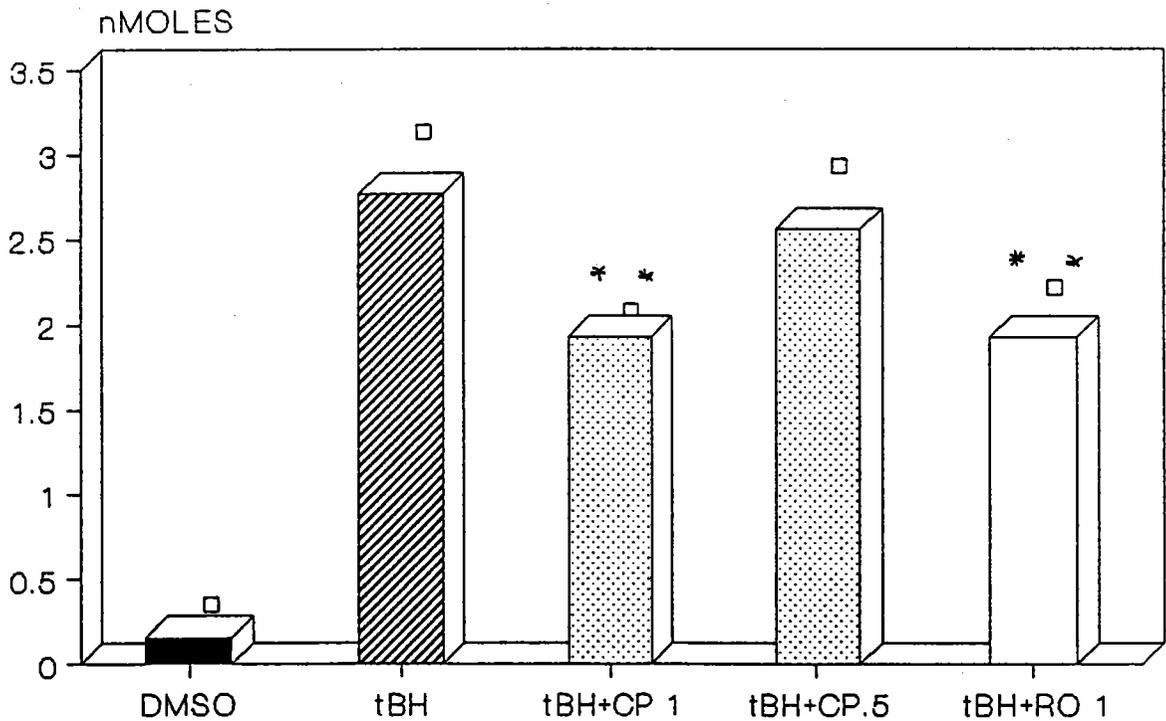
C = ac. gallique

D = quercétine

G 26 : Profils chromatographiques d'identification de Cochlospermum planchonii



MAD



G27 : Effet de *Cochlospermum planchonii* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

Eupatorium cannabinum L. (Asteraceae)

Répartition géographique :

Eupatorium cannabinum se retrouve dans les parties tempérées d'Asie et d'Europe ainsi qu'au Mexique et la partie Est des Etats Unis.

Description botanique :

Plantes naines ou peu élevées, de 30 à 80 cm, grêles; les feuilles sont presque toujours simples; le capitule en corymbe est peu volumineux; l'aigrette égalant au plus l'akène.

Usage traditionnel :

Eupatorium cannabinum est utilisée dans de nombreux pays de culture fort différentes (Europe, Asie, Afrique du nord, Amérique du sud). On reconnaît à cette espèce des propriétés diurétiques, émétiques, antipyrétiques, vulnéraires et anti-inflammatoires. Les pharmacopées traditionnelles mentionnent surtout deux indications principales, l'utilisation en usage externe pour la cicatrisation des plaies et, par voie orale, contre les "maladies du foie" et de la vésicule ou les états ictériques.

Chimie :

Les études chimiques d'Eupatorium cannabinum révèle la présence de lactones sesquiterpéniques, notamment d'eupatoriopicrine, de triterpènes (acétate de dammaradiényle), de stérols (taraxastérol, stigmastérol), de di et monoterpènes (cannaclérodanolide), de flavonoïdes (rutoside, hyperoside, quercétine, astragaline, Isoquercétine) et des acides phénols (ac. caféique, ac. chlorogénique, ac. Isochlorogénique). Il faut noter en outre la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (echinatine, supinine, lycopsamine, intermédiaire)

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux d'Eupatorium cannabinum et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G28 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

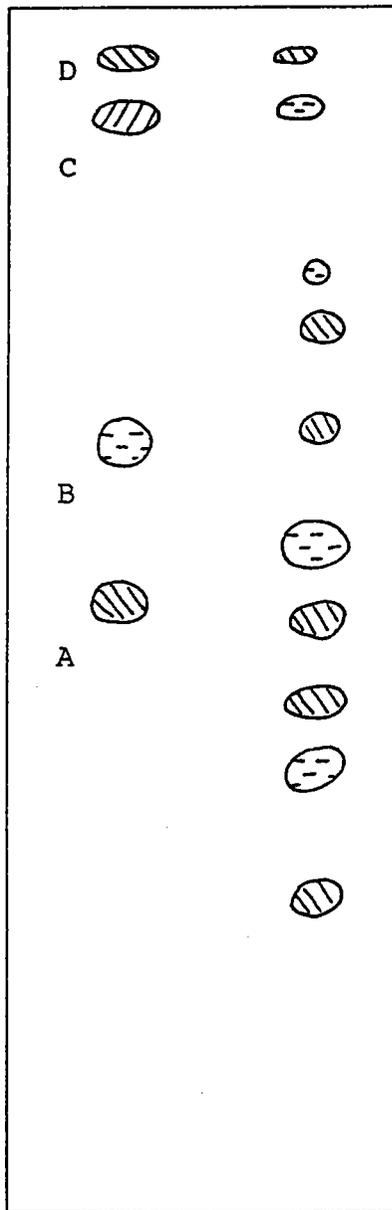
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux d'Eupatorium cannabinum provoque une décoloration de 16 % pour une solution de 0.25 g/l et de 9 % pour une solution de 0.125 g/l. Devant ces résultats, Eupatorium cannabinum est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G29 a,b,c. Eupatorium cannabinum (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite enzymatique.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

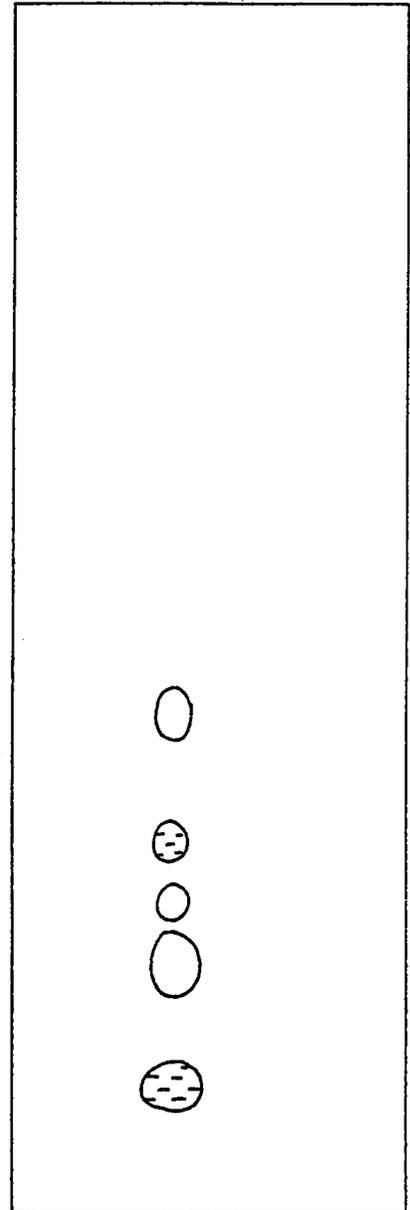


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait



Bleu



Orange



Marron



Vert



Violet



Jaune



Mauve



Noir

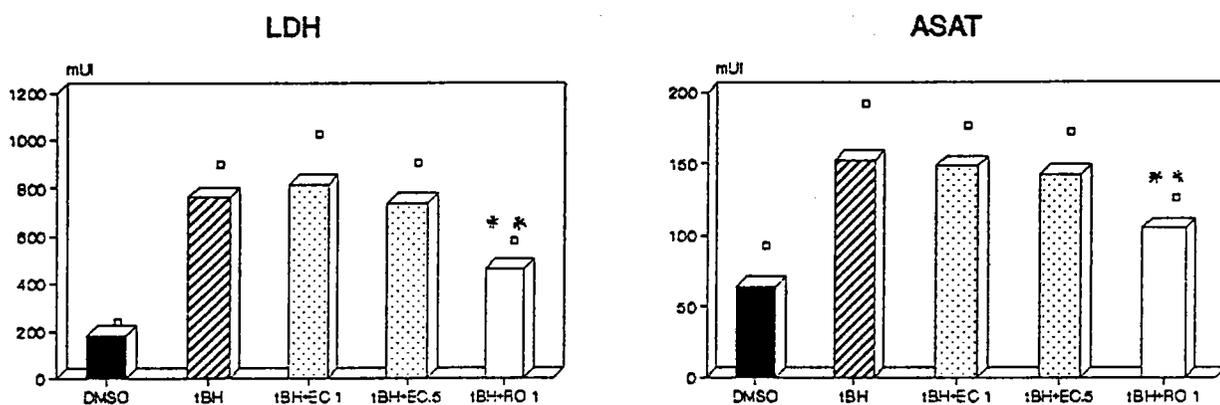
A = rutine

B = ac. chlorogénique

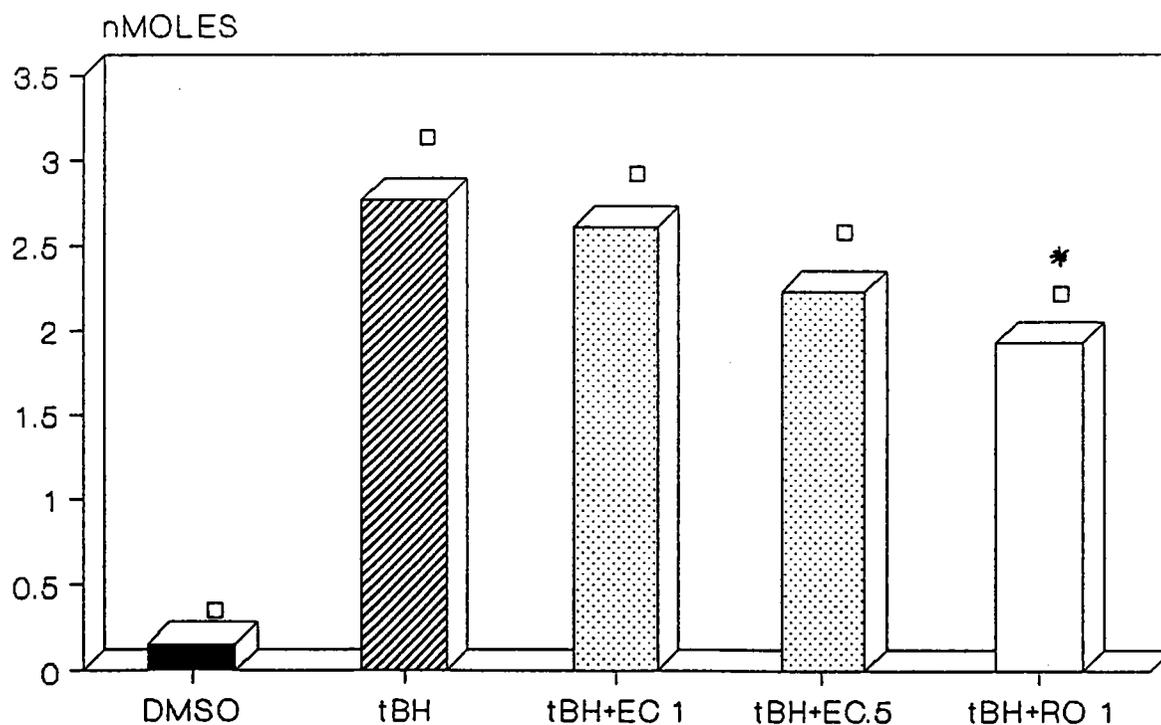
C = ac. gallique

D = quercetine

G 28 : Profils chromatographiques d'identification de Eupatorium cannabinum



MAD



G29 : Effet de *Eupatorium cannabinum* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae)

Répartition géographique :

Originnaire d'Australie, Euphorbia hirta est largement répandue dans tout les pays tropicaux et sub-tropicaux.

Description botanique :

Euphorbia hirta est une plante herbacée, vivace et dressée dans les endroits sombres et humides; annuelle et rampante lorsque le milieu est ensoleillé et sec. Les tiges grossièrement pubescentes peuvent atteindre 40 cm de haut. Simples ou ramifiées, elles sont d'un vert tendre teinté de rouge. Les feuilles de 1 à 5 cm de long sont opposées, obliquement ovées à lancéolées et finement denticulées. Le limbe est pubescent sur les deux faces. Les fleurs mâles et femelles sont distinctes, très petites, blanches, jaunâtres ou verdâtres. Elles sont groupées en petites cymes globuleuses, axillaires de 0,5 à 1 cm. Les involucre sont petits, courtement pédicellés, cupuliformes. Les fruits forment des capsules globuleuses rouges puis brunâtres de 1,5 mm de large et sont composés de trois coques carénées, couvertes de poils et renfermant chacune une graine rouge brique, oblongue, quadrangulaire de 0,7 mm de long.

Usage traditionnel :

Euphorbia hirta est très largement utilisée et occupe une place privilégiée dans les pharmacopées d'Asie orientale et d'Afrique tropicale. Ses indications sont extrêmement variées et on retrouve son utilisation dans le traitement d'affections gastrointestinales (dysenterie), cardiaques, respiratoires et génitales. Ses propriétés antalgiques, fébrifuges, anti-inflammatoires et cicatrisantes sont également connues des tradipraticiens. Le décocté de plantes entières ou de parties aériennes est utilisé, en monothérapie ou en association, dans les cas d'ictère.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les parties aériennes donne les résultats

suivants :

alcaloïdes : -	saponosides : +
stéroïdes, terpénoïdes : +	tanins : +
composés phénoliques : +	quinones : -
flavonoïdes : +	anthocyanosides : -
dérivés cyanogénétiques : -	

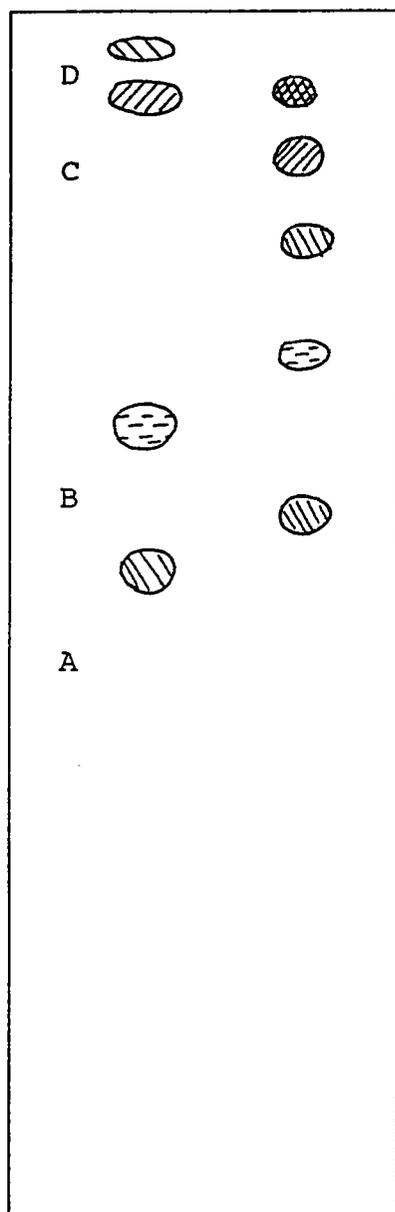
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Euphorbia hirta et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figure G30 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites l'extrait aqueux de Euphorbia hirta provoque une décoloration de 66 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 41 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Euphorbia hirta est classée en type II.

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G31 a,b,c. Euphorbia hirta (1 mg/ml) présente un effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ainsi qu'un effet significatif sur la nécrose cellulaire suivie par le relargage enzymatique de LDH et d'ASAT. Euphorbia hirta confirme pleinement son indication traditionnelle sur ce modèle.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

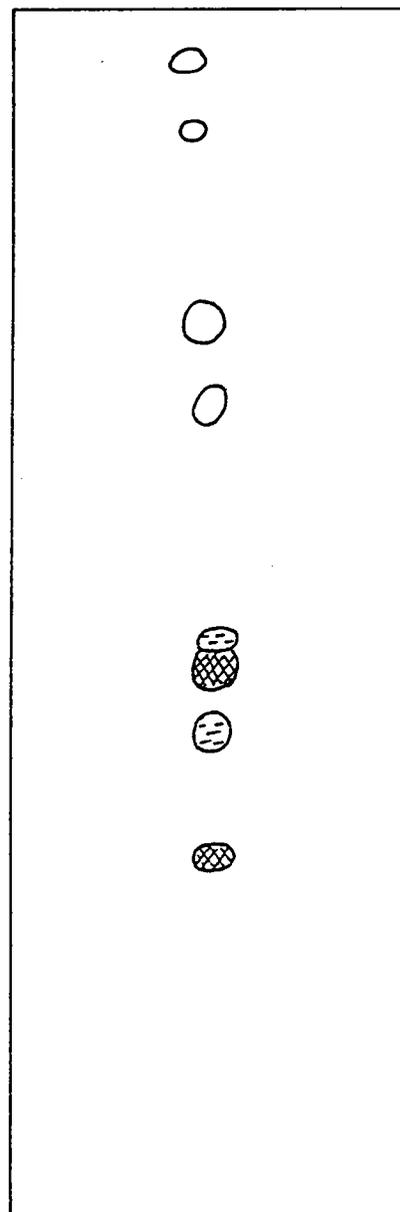
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

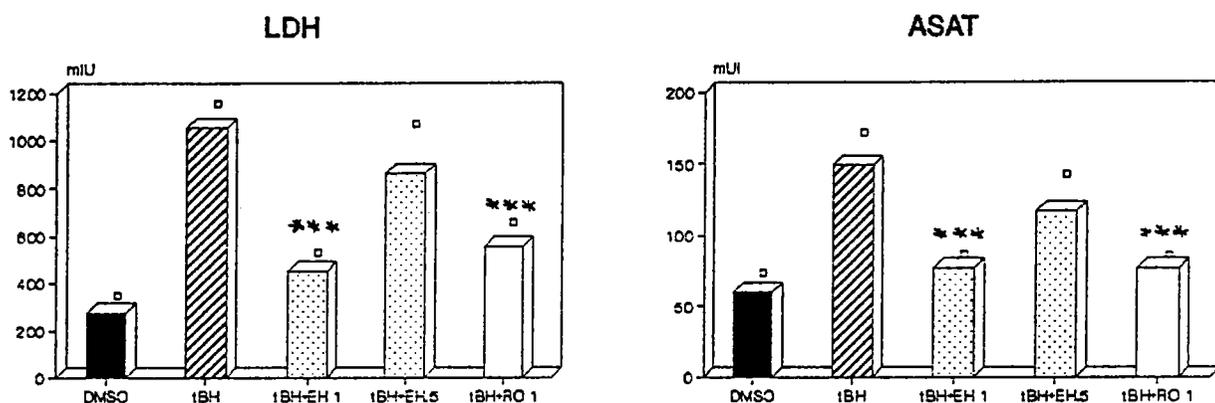
Rf 0.25



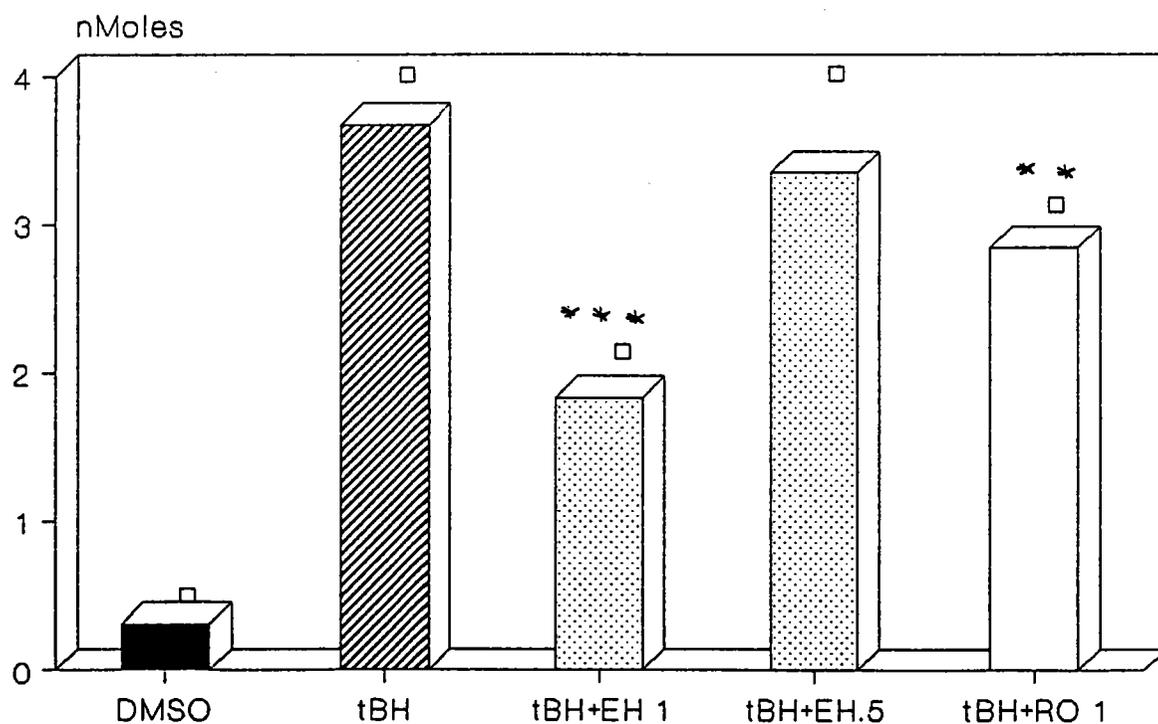
Extrait



G 30 : Profils chromatographiques d'identification de
Euphorbia hirta



MAD



G31 : Effet de *Euphorbia hirta* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldehyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Juniperus communis L. (Cupressaceae)

Répartition géographique :

Espèce répandue en Europe et dans tout l'hémisphère nord.

Description botanique

Juniperus communis est un arbrisseau buissonnant ou un petit arbre de 1 à 6 mètres de haut. Les feuilles sont verticillées par trois, étalées, étroites, effilées en une pointe piquante. Les cônes fructifères charnus sont formés de la soudure de trois écailles ovulifères. Ils sont globuleux, de 6 à 8 mm de diamètre, d'abord verts, puis bleu-noir et recouverts de cire à maturité (2 ans après la floraison).

Usage traditionnel

Du genévrier on emploie les baies, les sommités et les extrémités des rameaux, le bois, les cendres. Toutes ces parties se montrent toniques, stomachiques, diurétiques, sudorifiques, stimulantes, dépuratives, anticatarrhales. Les baies sont apéritives, facilitent la digestion et dissipent les flatuosités. Le bois fournit une décoction sudorifique et diurétique employée contre le rhumatisme chronique, la goutte et les maladies cutanées. L'huile extraite des baies est utilisée en friction dans les lombagos et les névralgies. Juniperus communis est également employé en application sur les ulcères atoniques et les plaies rebelles.

Chimie :

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Juniperus communis et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G32 a,b.

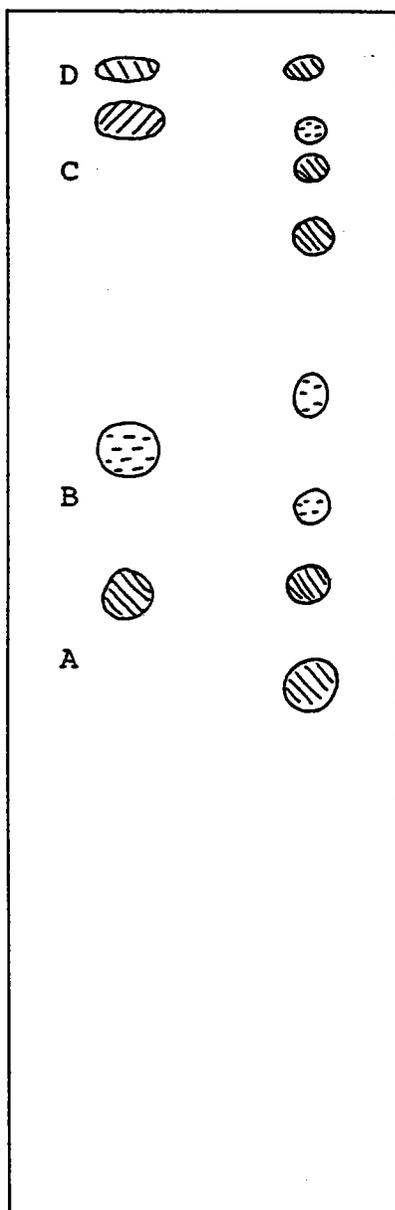
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Juniperus communis provoque une décoloration de 47 % pour une solution de 0.25 g/l et de 31 % pour une solution de 0.125 g/l. Devant ces résultats, Juniperus communis est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

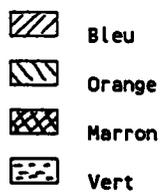
L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G33 a,b,c. Juniperus communis (1 mg/ml) présente un effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation et des fuites enzymatiques en LDH et en ASAT, engendrées par le tert-butyl hydroperoxyde.

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

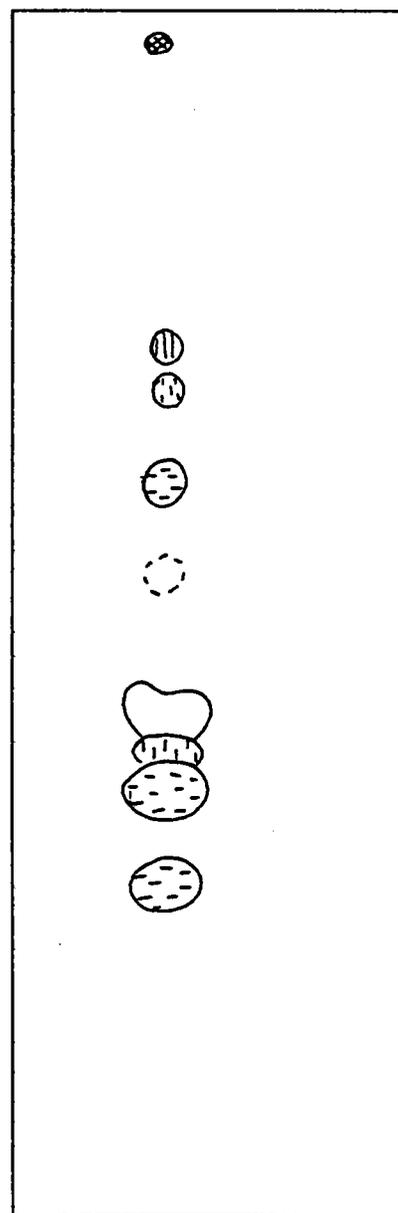
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

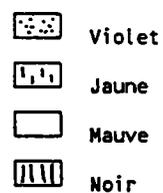
Rf 0.75

Rf 0.5

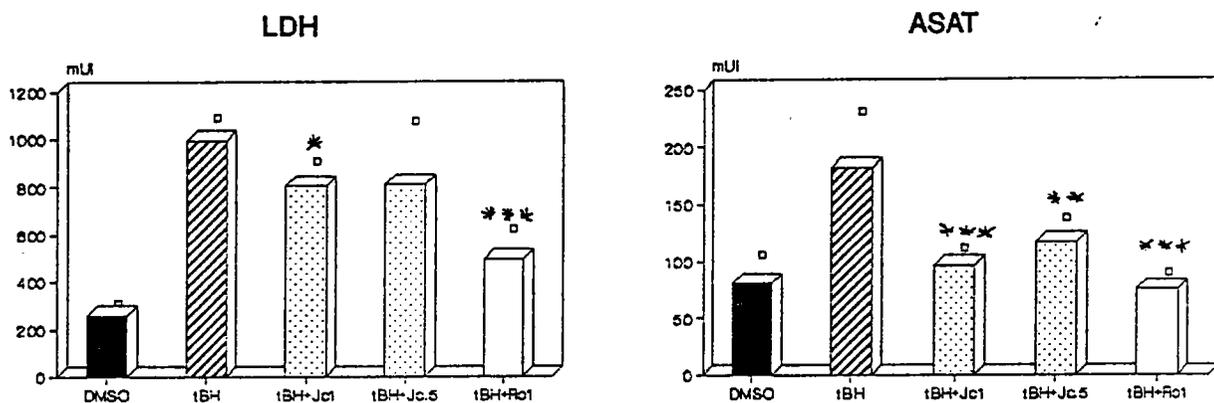
Rf 0.25



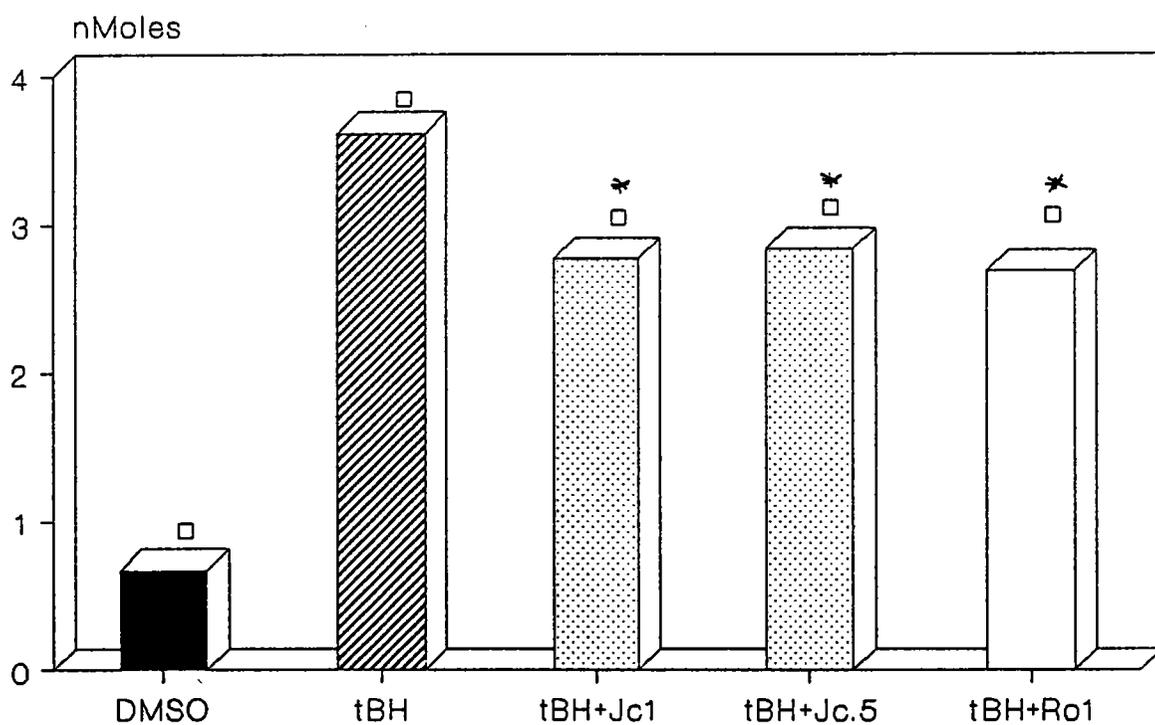
Extrait



G 32 : Profils chromatographiques d'identification de
Juniperus communis



MAD



G33 : Effet de *Juniperus communis* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldehyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Eschscholzia californica Cham. (Papaveraceae)

Répartition géographique :

Espèce originaire du sud californien et du Mexique.

Description botanique :

Eschscholzia californica est une plante herbacée annuelle ou plus rarement vivace, glabre, glauquescente, à tige ascendante pouvant atteindre de 30 à 60 cm de haut. Les feuilles sont alternes, pétiolées, tripennatifides. Une fleur terminale de couleur jaune orangée à jaune d'or se développe au sommet de chacune des tiges. Les fleurs sont régulières, hermaphrodites, oppositifoliées avec de longs pédicelles et un réceptacle concave. Le calice de 1 à 4 cm est composé de deux sépales soudés, caducs et opposés.

Usage traditionnel :

Les feuilles d'Eschscholzia californica sont utilisées traditionnellement en usage interne contre les maux de dents et les coliques et en cataplasme contre les ulcères variqueux. Les parties aériennes ont été indiquées comme hypnotiques, calmantes et analgésiques.

Chimie :

Eschscholzia californica est riche en alcaloïdes, six groupes ont été répertoriés dans la littérature (pavine, protopine, benzophénanthridine, aporphine, benzyl tétrahydro isoquinoléine, protoberberine). On y révèle également la présence d'hétérosides cyanogénétiques (triglochinine, linamarine), de flavonoïdes (rutine), d'acides organiques (fumarate, malate).

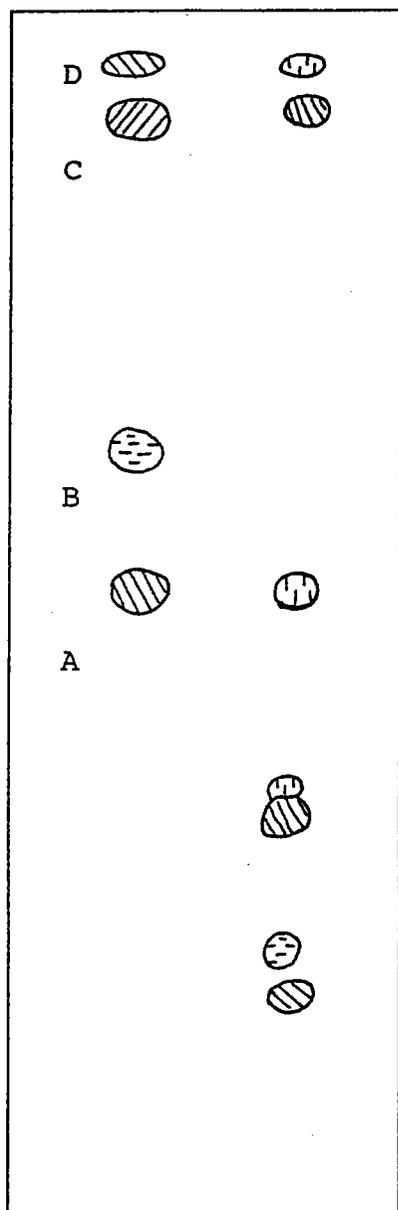
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux d'Eschscholzia californica et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G34 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux d'Eschscholzia californica provoque une décoloration de 10 % pour une solution de 0.25 g / l et de 6 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Eschscholzia californica est classé en type I (faible activité antiradicalaire).

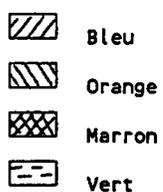
Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G35 a,b,c. Eschscholzia californica (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation ou de la fuite enzymatique engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

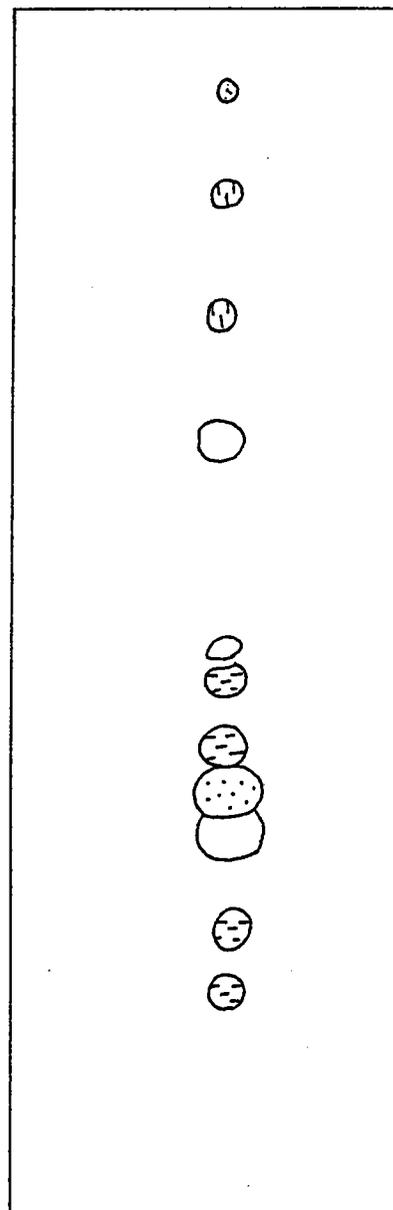
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

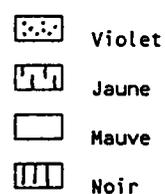
Rf 0.75

Rf 0.5

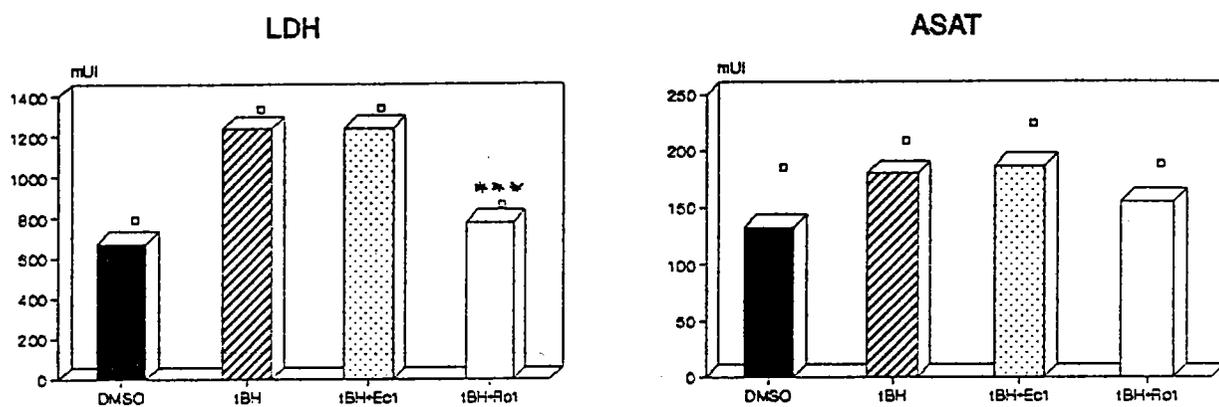
Rf 0.25



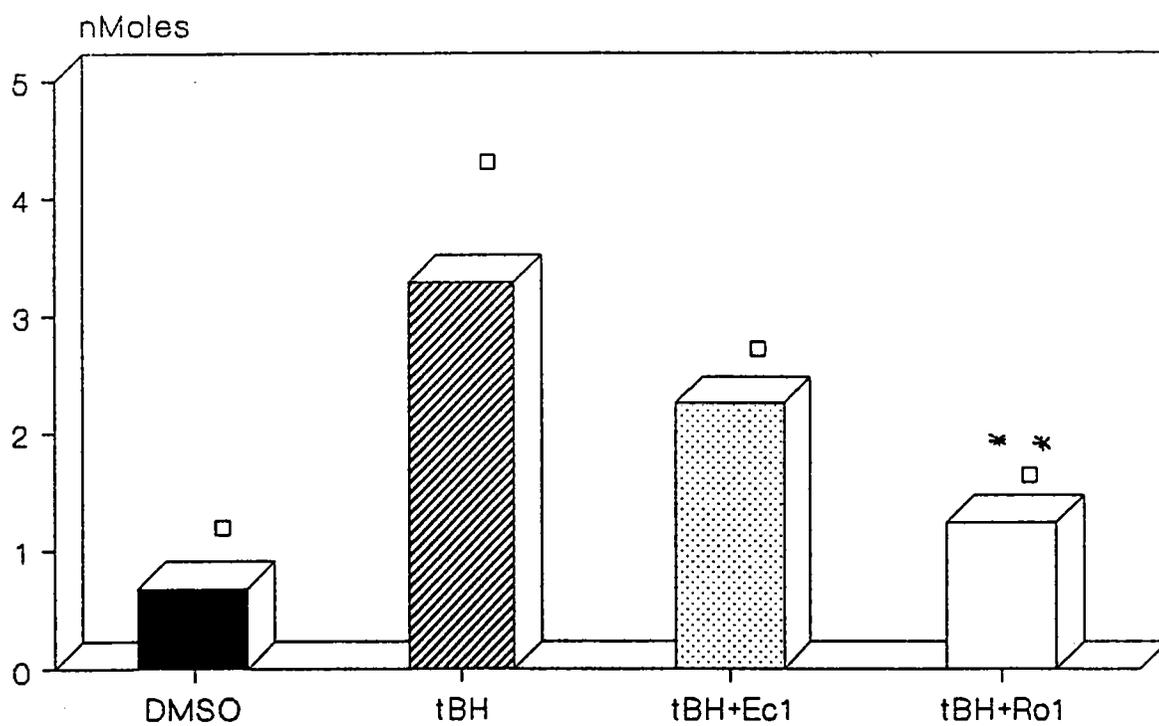
Extrait



G 34 : Profils chromatographiques d'identification de
Eschscholzia californica



MAD



G35 : Effet de *Eschscholzia californica* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldehyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lactodeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Crepis rueppellii Sch. Bip. (Compositae)

Répartition géographique

Bien représentée au Yemen et au nord-est de l'Afrique tropicale, en altitude sur les versants montagneux

Usage traditionnel

Crepis rueppellii est connue pour ses vertus hépatoprotectrices; les parties aériennes sont prescrites fraîches ou en infusion contre tous syndromes hépatiques. Crepis rueppellii est également utilisée comme antispasmodique après les accouchements ou lors de colites et contre les anémies (Fleurentin, 1983).

Chimie

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Crepis rueppellii et obtenus selon les protocoles prédemment décrits sont représentés en figure G36 a,b.

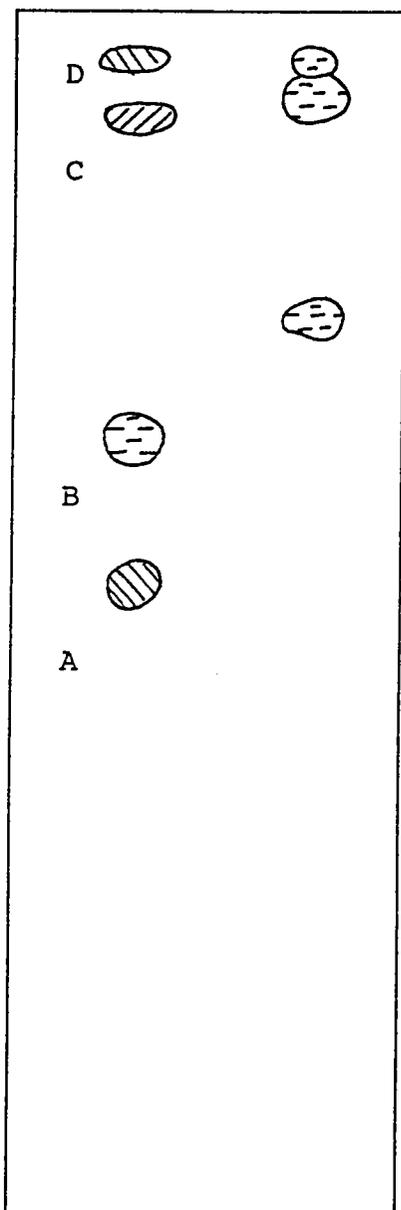
Test d'inhibition du radical DPPH

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Crepis rueppellii provoque une décoloration de 37 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 29 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Crepis rueppellii est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés

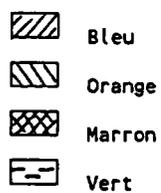
L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G37 a,b,c. Crepis rueppellii (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur notable à l'encontre de la

lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et ne s'oppose ni au relargage de la LDH ni à celui des ASAT.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

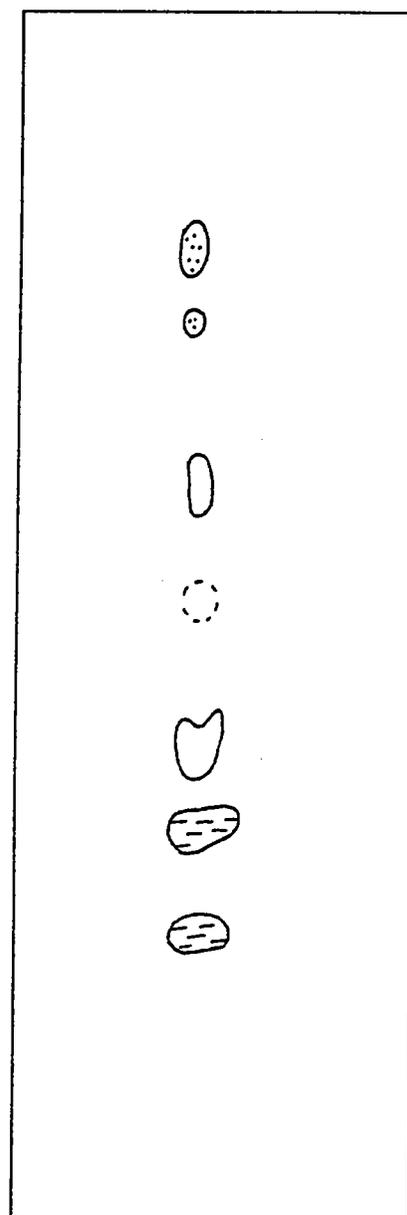
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

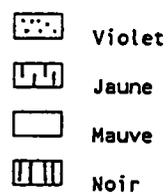
Rf 0.75

Rf 0.5

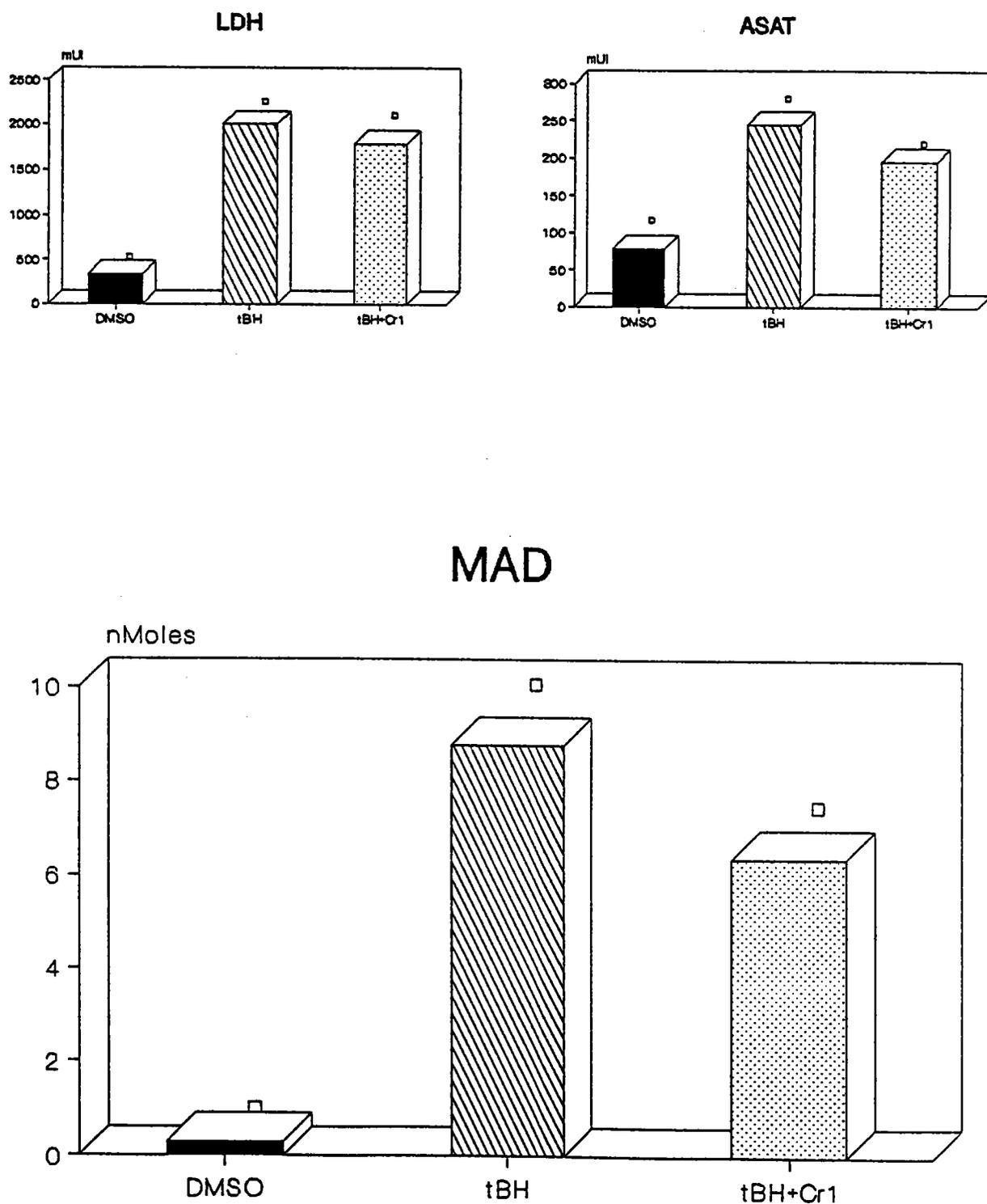
Rf 0.25



Extrait



G 36 : Profils chromatographiques d'identification de
Crepis rueppellii



G37 : Effet de *Crepis rueppelli* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticodehydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

Pulicaria orientalis Jaub. et Spach. (Compositae)

Répartition géographique : Yemen

Usage traditionnel

Pulicaria orientalis est utilisée par voie externe, en friction, pour son action tonique et antirhumatismale. Par voie orale, Pulicaria orientalis est recherchée pour ses vertus apéritive, antipyrétique, antispasmodique et de manière plus générale sur les troubles digestifs.

Chimie

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Pulicaria orientalis et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G38 a,b.

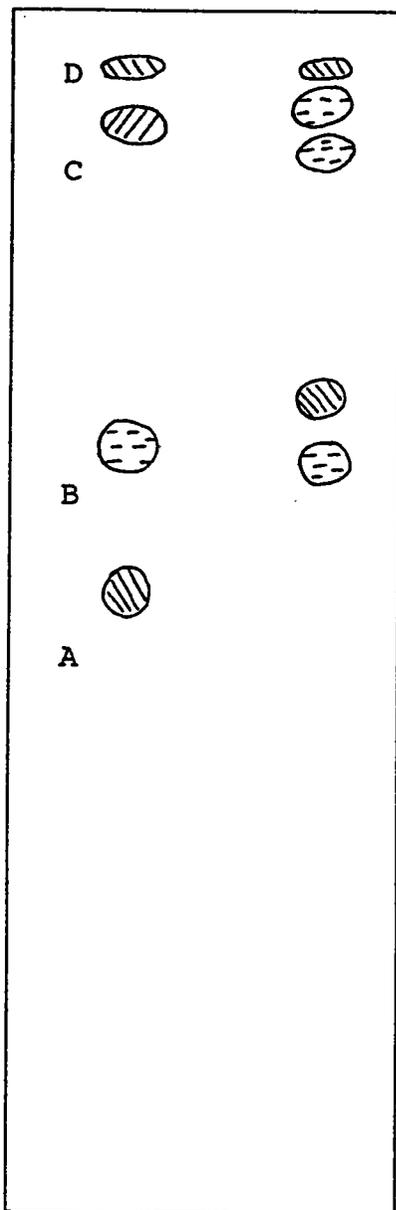
Test d'inhibition du radical DPPH

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Pulicaria orientalis provoque une décoloration de 33 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 18 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Pulicaria orientalis est classée en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G39 a,b,c. Pulicaria orientalis (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur notable à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et ne s'oppose ni au relargage de la LDH ni à celui des ASAT.

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

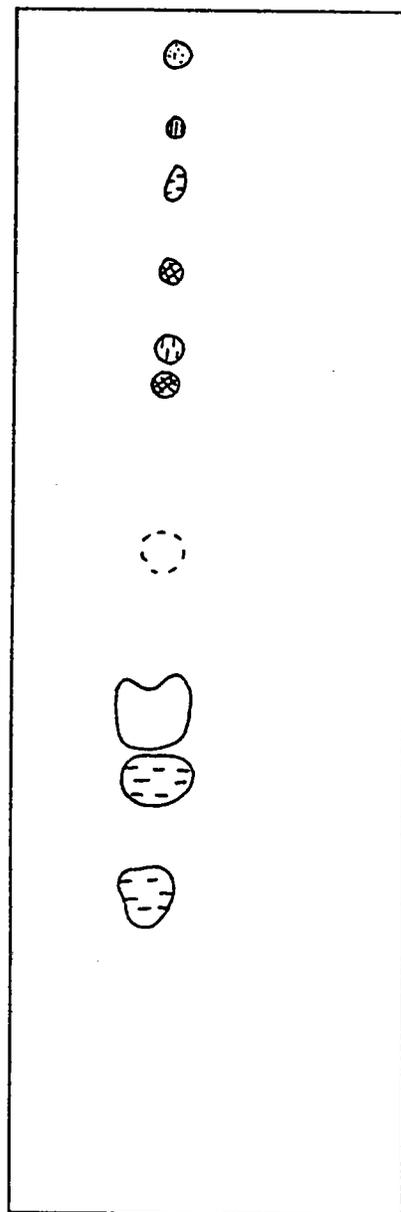
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

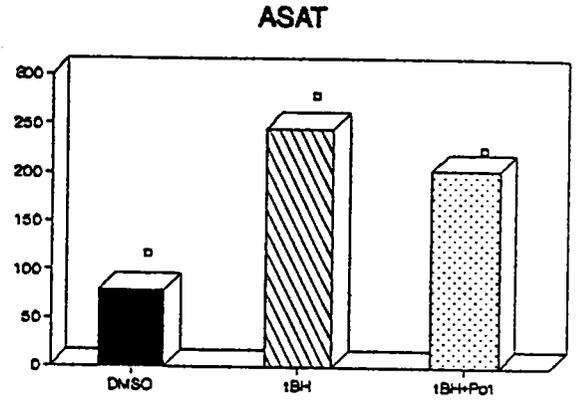
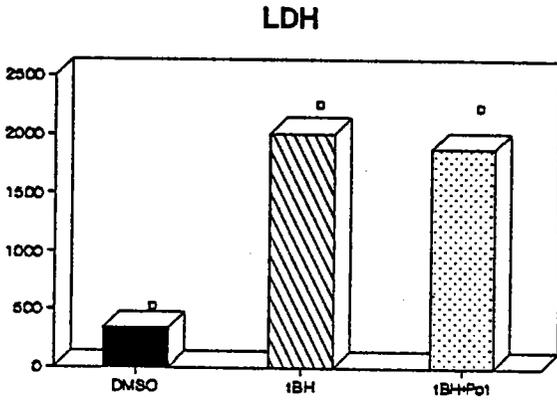
Rf 0.25



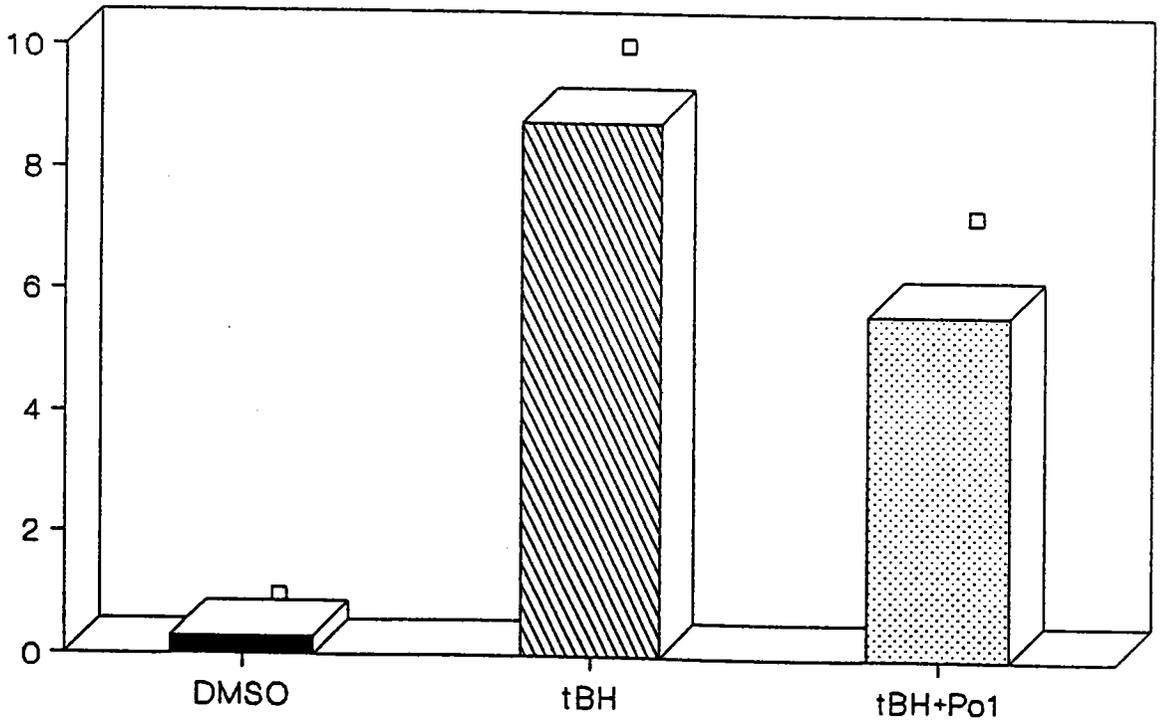
Extrait

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

G 38 : Profils chromatographiques d'identification de Pulicaria orientalis



MAD



G39 : Effet de *Pulicaria orientalis* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

- a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)
- b. effet sur la fuite de lactodeshydrogénase (LDH)
- c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Vaccinium myrtillus L. (Ericaceae)

Répartition géographique

En moyenne montagne, sur des terrains siliceux, dans tout l'hémisphère nord.

Description botanique

Sous-arbrisseau de 20 à 60 cm à feuilles ovales, finement dentées. Les fleurs sont blanc verdâtre ou rosées, en forme de grelot. Les fruits sont de petites baies sphériques, bleu noirâtre, charnues, acidulées ou légèrement sucrées à maturité complète.

Usage traditionnel

Vaccinium myrtillus entre dans le traitement de diverses dyspepsies et différents troubles intestinaux tels que diarrhées, infections intestinales et colites. Vaccinium myrtillus est également utilisé pour ses vertus apéritive et anti-émétique, antidiabétique. On retrouve son emploi dans des cas de dysménorrhées, de douleurs pelviennes et lombosacrées et de tensions mammaires et dans le traitement de divers troubles de la circulation veineuse.

Chimie

Les fruits de Vaccinium myrtillus contiennent des anthocyanosides (myrtillines a et b, delphinidine, malvidine, pétunidine, cyanidine, péonidine), mais également des tanins (cathéchol, procyanidine), des acides phénols (acides caféique et chlorogénique), des triterpènes (acide ursolique et acide oléanolique) et du β carotène.

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Vaccinium myrtillus et obtenus selon les protocoles prédemment décrits sont représentés en figures G40 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH

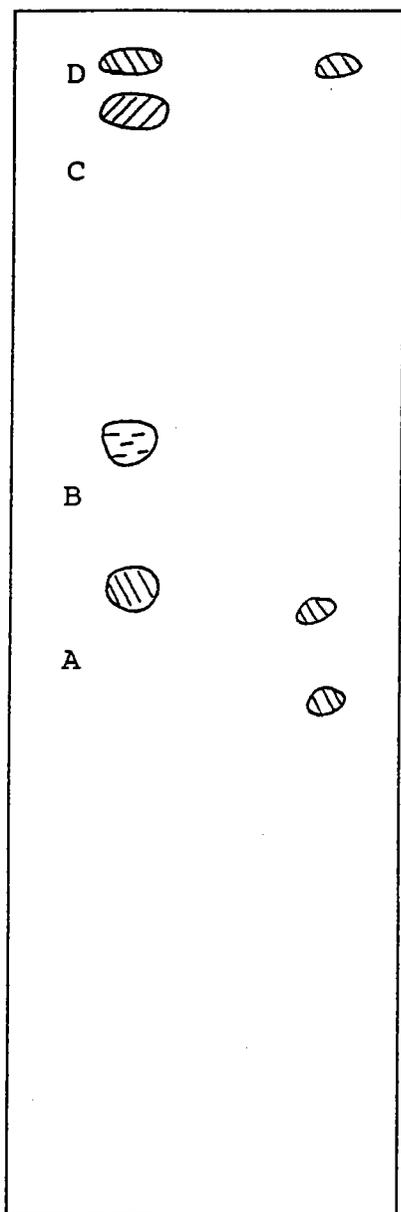
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Vaccinium myrtillus provoque une décoloration de 39 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 28% pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Vaccinium myrtillus est classé en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G41 a,b,c. Vaccinium myrtillus (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation et du relargage extracellulaire de la LDH et des ASAT engendrés par le tert-butyl hydroperoxyde.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

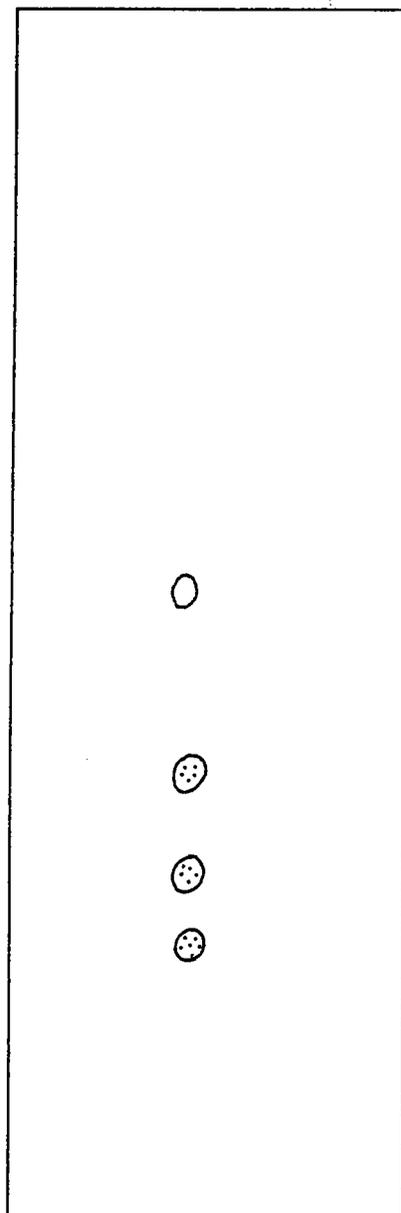


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait

- Bleu
- Orange
- Marron
- Vert

- Violet
- Jaune
- Mauve
- Noir

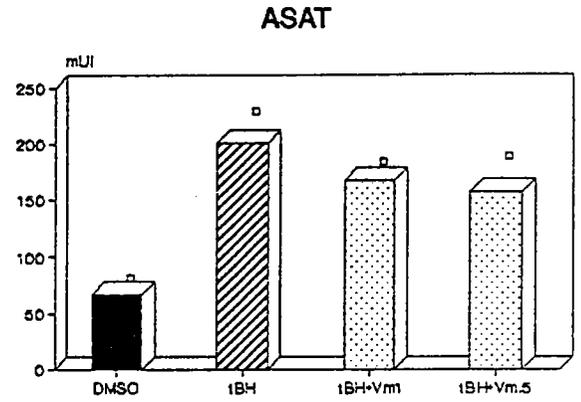
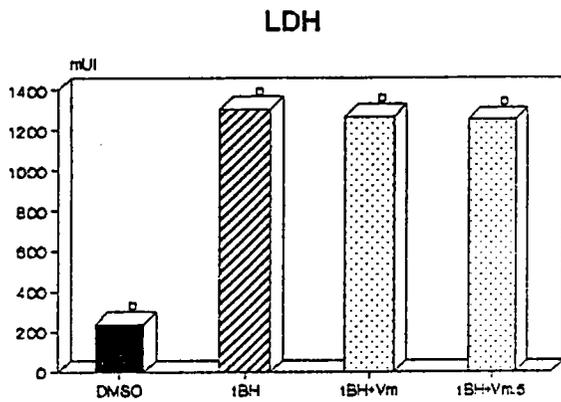
A = rutine

B = ac. chlorogénique

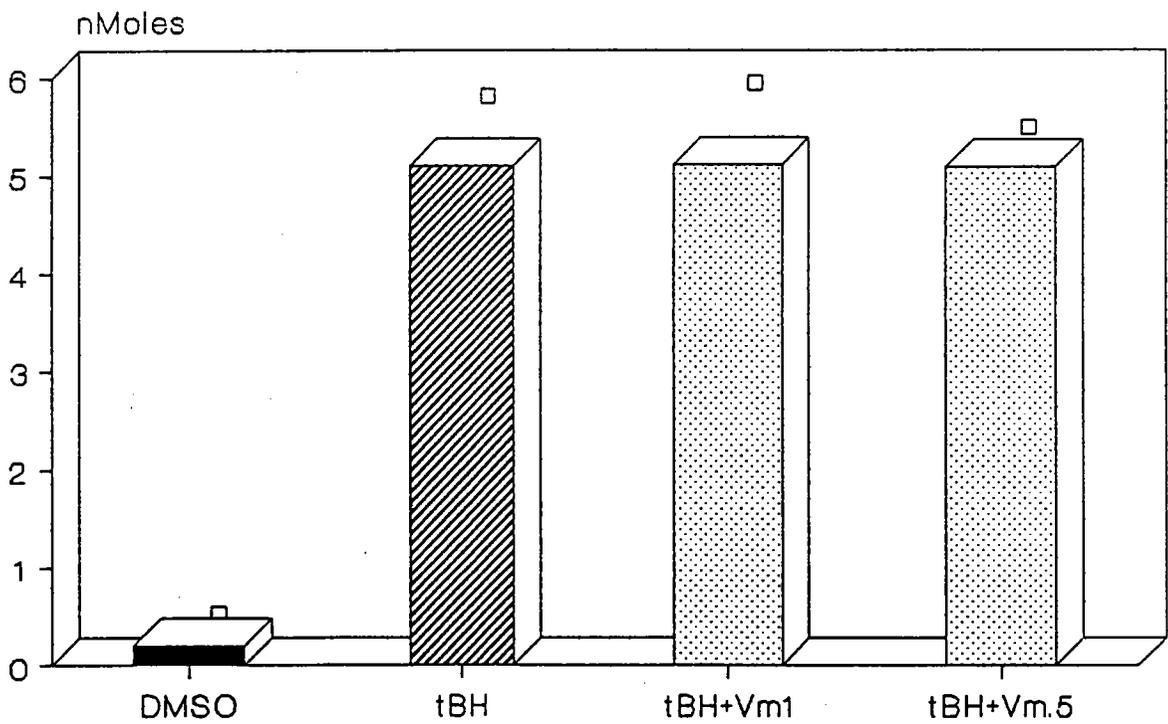
C = ac. gallique

D = quercétine

G 40 : Profils chromatographiques d'identification de Vaccinium myrtillus



MAD



G41 : Effet de *Vaccinium myrtillus* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydéshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Bidens pilosa L. (Asteraceae)

Répartition géographique : Pantropicale

Description botanique

Bidens pilosa est une herbe annuelle, érigée, de 30 à 80 cm de hauteur. La tige est de section tétragonale. Les feuilles sont opposées, les inférieures composées, les supérieures ou florifères souvent simples. Les folioles de 3 à 5, sont ovales ou lancéolées, dentées, de dimensions variables, glabrescentes. Les inflorescences en capitules, corymbiformes sont largement pédiculées. Les fleurs sont ligulées à corolles blanches ou tubuleuses et jaunes. Les akènes, noirs ou gris sont couronnés par 2 ou 3 longs pappus ciliés.

Usage traditionnel

L'infusé des fleurs de Bidens pilosa est réputé pour être cholagogue, antidiarrhéique et antidysentérique par voie orale.

Chimie

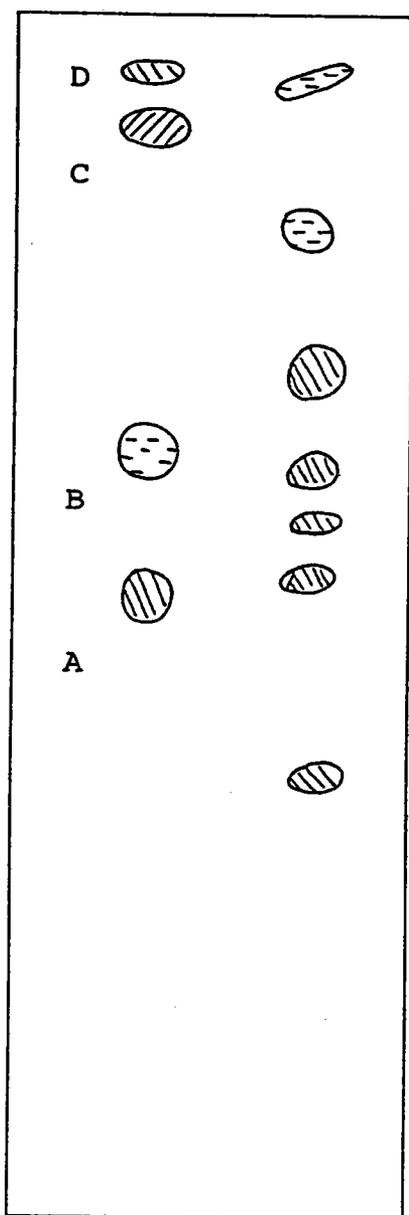
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de Bidens pilosa et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G42 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Bidens pilosa provoque une décoloration de 59% pour une solution de 0.25 g/l et de 31% pour une solution de 0.125 g/l. Devant ces résultats, Bidens pilosa est classé en type II.

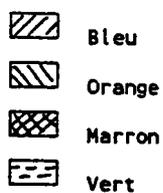
Test sur hépatocytes Isolés

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G43 a,b,c. Bidens pilosa (1 mg/ml) présente un effet protecteur moyen à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et s'oppose de manière tout à fait significative au relargage extracellulaire de la LDH. Les ASAT sont également diminuées mais de manière moins importante.

a/ Flavonoïdes

Témoins

Extrait



A = rutine

B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

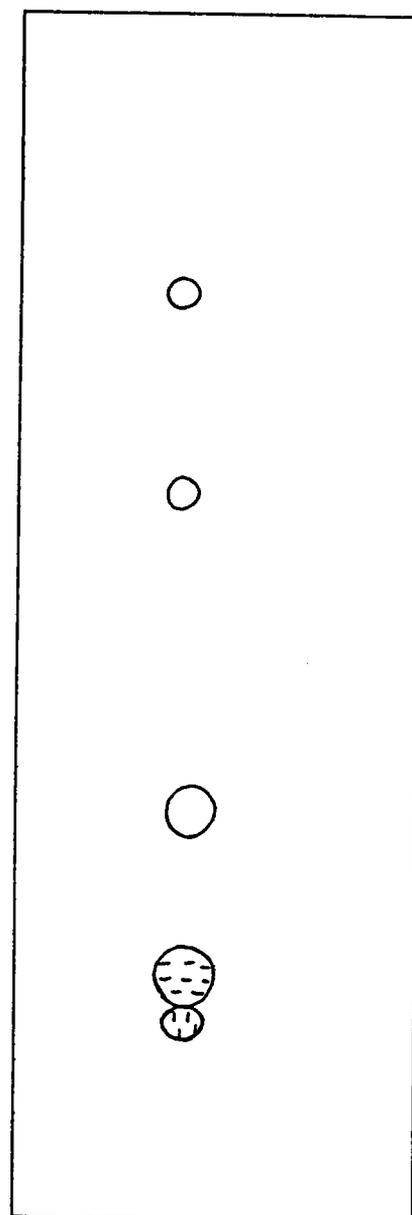
b/ Composés Réducteurs

Rf 1

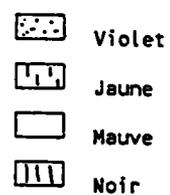
Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Extrait



G 42 : Profils chromatographiques d'identification de
Bidens pilosa



G43 : Effet de *Bidens pilosa* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Annona reticulata L. (Annonaceae)

Répartition géographique : pantropicale

Description botanique :

Annona reticulata est un petit arbre buissonnant pouvant atteindre 7 mètres de haut, très ramifié dès la base, d'écorce brune et rugueuse. Les feuilles distiques, simples ont un pétiole de 8 à 15 mm de long, sans stipule. Le limbe est lancéolé ou oblong-lancéolé, de 5 à 30 cm de long et de 2 à 7 cm de large, aigu à l'apex, vert foncé, légèrement brillant et glabre dessus, terne et légèrement pubescent dessous. Les inflorescences forment de petites grappes de 2 à 10 fleurs sur les jeunes rameaux. Les fleurs sont hermaphrodites avec un calice à 3 sépales, petits, imbriqués. La corolle a 6 pétales en deux rangs; les trois extérieurs sont vert-jaunâtre, les trois intérieurs très petits sont plus ou moins blanc-jaunâtre. Les étamines sont nombreuses, à filets très courts; le gynécée est composé de carpelles nombreux plus ou moins cohérents. Les fruits sont syncarpes, globuleux ou cordiformes de 8 à 12 cm de long, à peau rougeâtre à maturité, la surface est réticulée surtout lorsque le fruit est mûr. Les graines sont nombreuses, oblongues, brunes foncées dans une pulpe molle, juteuse couleur crème ou blanc-grisâtre.

Usage traditionnel :

Les feuilles d'Annona reticulata sont traditionnellement utilisées per os dans les troubles digestifs en Guadeloupe et en Martinique (souvent avec du bicarbonate de soude!) ainsi qu'en Haïti en décoction salée. On relève également des propriétés antidiarrhéiques en Amérique centrale, antiémétisantes, antipyrétiques et antalgiques en Haïti, antiulcéreuses en Jamaïque. Annona reticulata est utilisé contre la "faiblesse des articulations" en Guadeloupe et en Martinique. Enfin, les feuilles sont recommandées comme anxiolytique en usage externe ou en décoction salée.

Chimie :

Le tri phytochimique préliminaire sur les feuilles d'Annona reticulata donne les résultats suivants (Weniger, 1984):

alcaloïdes : +	saponosides : -
stéroïdes, terpénoïdes : -	tanins : +
composés phénoliques : +	quinones : -
flavonoïdes : -	

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits aqueux d'Annona reticulata et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G44 a,b.

Test d'inhibition du radical DPPH :

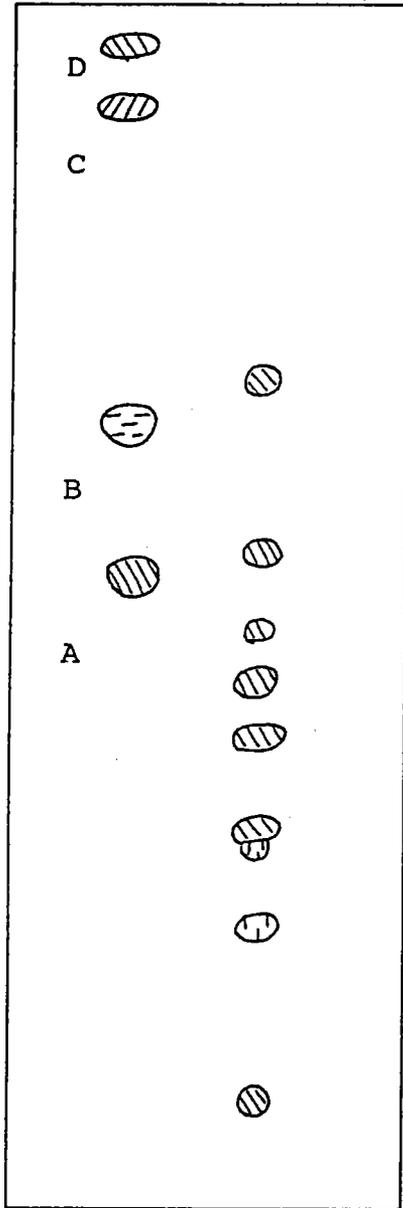
Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux d'Annona reticulata provoque une décoloration de 16 % pour une solution de 0.25 g/ l et de 9 % pour une solution de 0.125 g/ l. Devant ces résultats, Annona reticulata est classé en type I (faible activité antiradicalaire).

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G45 a,b,c. Annona reticulata (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde ou de la fuite de LDH. Par contre, il s'oppose de manière tout à fait significative au relargage des ASAT. Cette situation est rarement retrouvée sur ce modèle au cours du screening d'extraits végétaux, son interprétation est donc délicate et en tout état de cause l'absence d'action sur la fuite de LDH ne plaide pas en faveur d'une activité hépatotrope marquée. Un comportement identique est retrouvé avec Annona muricata.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

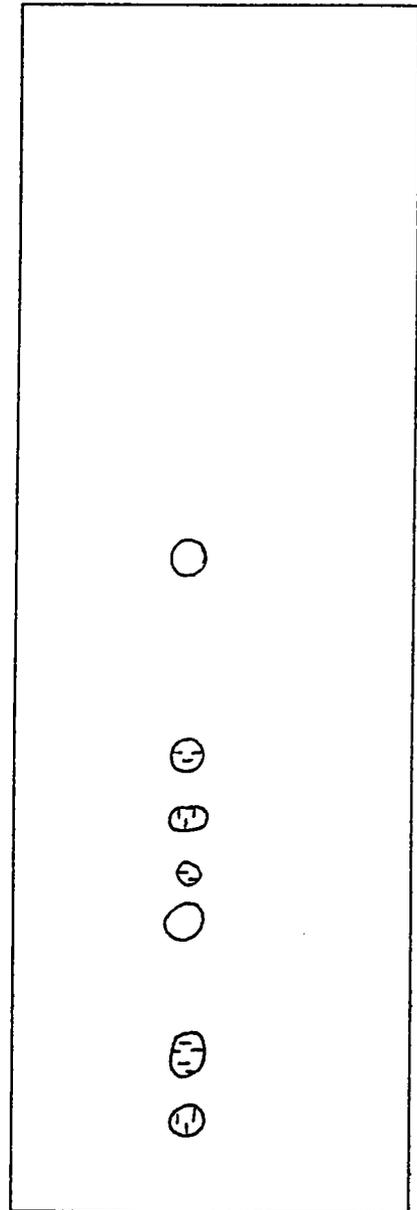


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

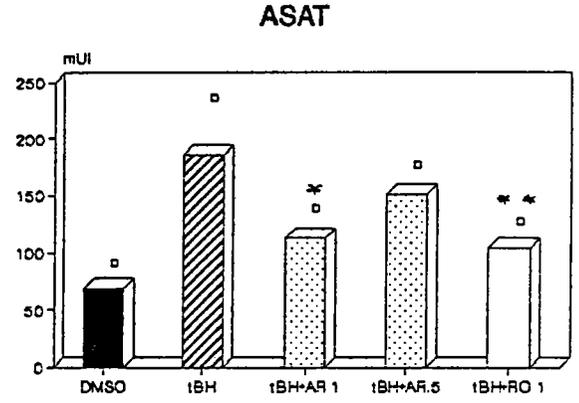
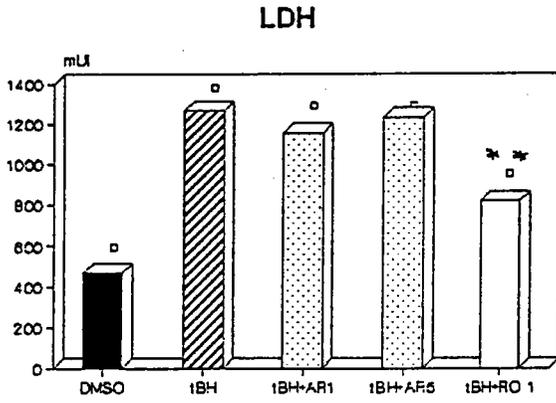
A = rutine

B = ac. chlorogénique

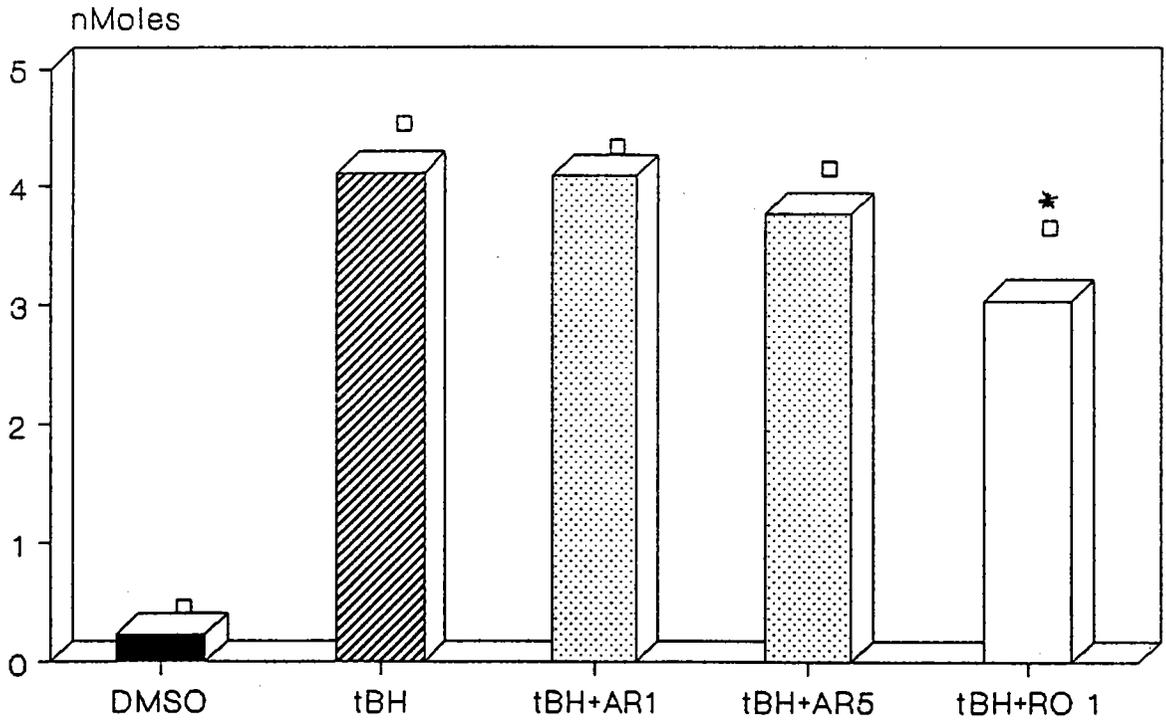
C = ac. gallique

D = quercetine

G 44 : Profils chromatographiques d'identification de Annona reticulata



MAD



G45 : Effet de *Annona reticulata* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

- a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)
- b. effet sur la fuite de lacticoxydohydrogénase (LDH)
- c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Carthamus tinctorium L. (Asteraceae)

Répartition géographique

Originnaire d'Arabie, Carthamus tinctorium est aujourd'hui largement répandue et cultivée dans le bassin méditerranéen oriental, en Egypte et dans une grande partie de l'Europe pour ses fleurs aux pigments rouges et jaunes.

Description botanique

Carthamus tinctorium est une herbe annuelle ou bisannuelle pouvant atteindre 60 cm de haut. Les feuilles, sans stipules, sont alternes, luisantes, coriaces et veineuses. Elles ont des dents courtes et épineuses. Les tiges sont droites, dressées, rameuses et cylindriques. L'inflorescence est un capitule, globuleux, solitaire et terminal. Les capitules sont homogames. L'involucre est formée de plusieurs rangées de bractées élargies à la base; les bractées externes sont foliacées et épineuses au sommet, les bractées internes sont entières, acuminées et terminées par un appendice cilié. Les fleurs (fleurons) sont formées d'un long tube filiforme de 1 cm de long qui loge un ovaire uniloculaire avec un ovule anatrope, dressé, à raphé antérieur. Le fruit est un akène blanc à paroi épaisse. Les graines sans albumen, blanches, luisantes sont oblongues et quadrangulaires.

Usage traditionnel

Carthamus tinctorium est utilisée en usage externe pour ses actions cicatrisantes et antiprurigineuses, sous forme de compresses d'infusé de fleurs, et antirhumatismales, en massage (huiles essentielles des akènes). L'usage interne recouvre des propriétés fébrifuge, sudorifique, laxative, diurétique, emménagogue et dépuratives.

Chimie

Le tri phytochimique préliminaire d'un extrait hydro éthanolique de Carthamus

tinctorium donne les résultats suivants (MYUNG-NYU, 1990) :

anthocyanes : -	flavonoïdes : +
quinones : -	alcaloïdes : +/-
tanins cathéchiques : +	tanins galliques : -
saponosides : -	

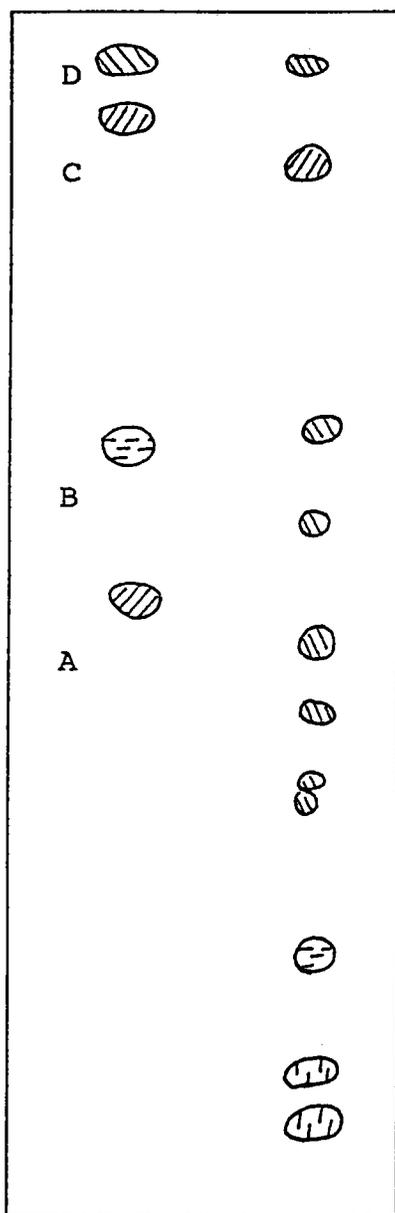
Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans l'extrait aqueux de Carthamus tinctorium et obtenus selon les protocoles prédemment décrits sont représentés en figures G46 a,b

Test sur hépatocytes Isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G47 a,b,c. Carthamus tinctorium (1 mg/ml) ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation et un effet modeste sur le relargage extracellulaire de la LDH engendré par le tert-butyl hydroperoxyde.

a/ Flavonoïdes

b/ Composés Réducteurs

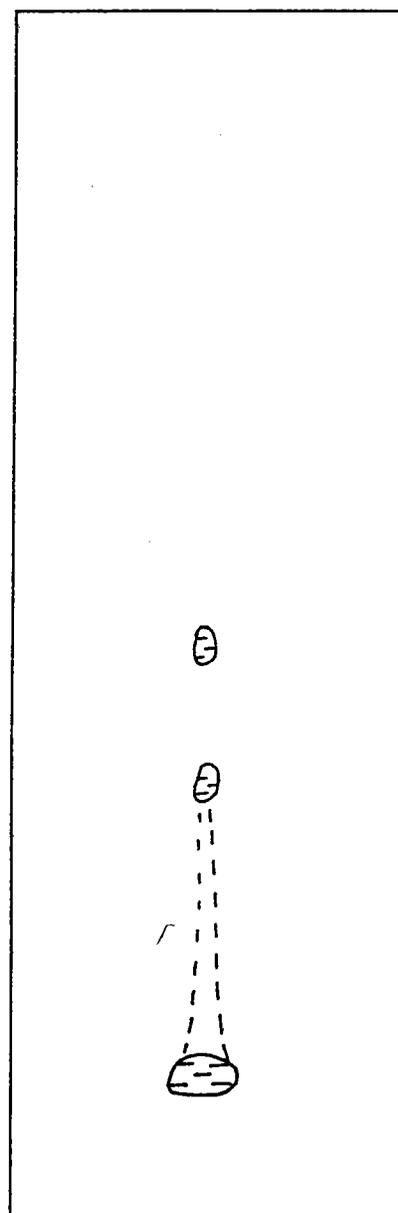


Rf 1

Rf 0.75

Rf 0.5

Rf 0.25



Témoins

Extrait

Extrait

-  Bleu
-  Orange
-  Marron
-  Vert

-  Violet
-  Jaune
-  Mauve
-  Noir

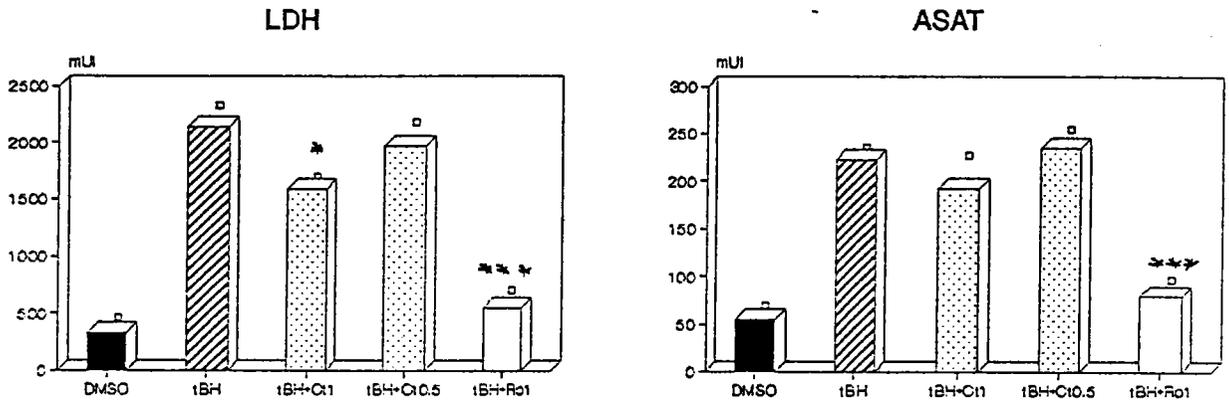
A = rutine

B = ac. chlorogénique

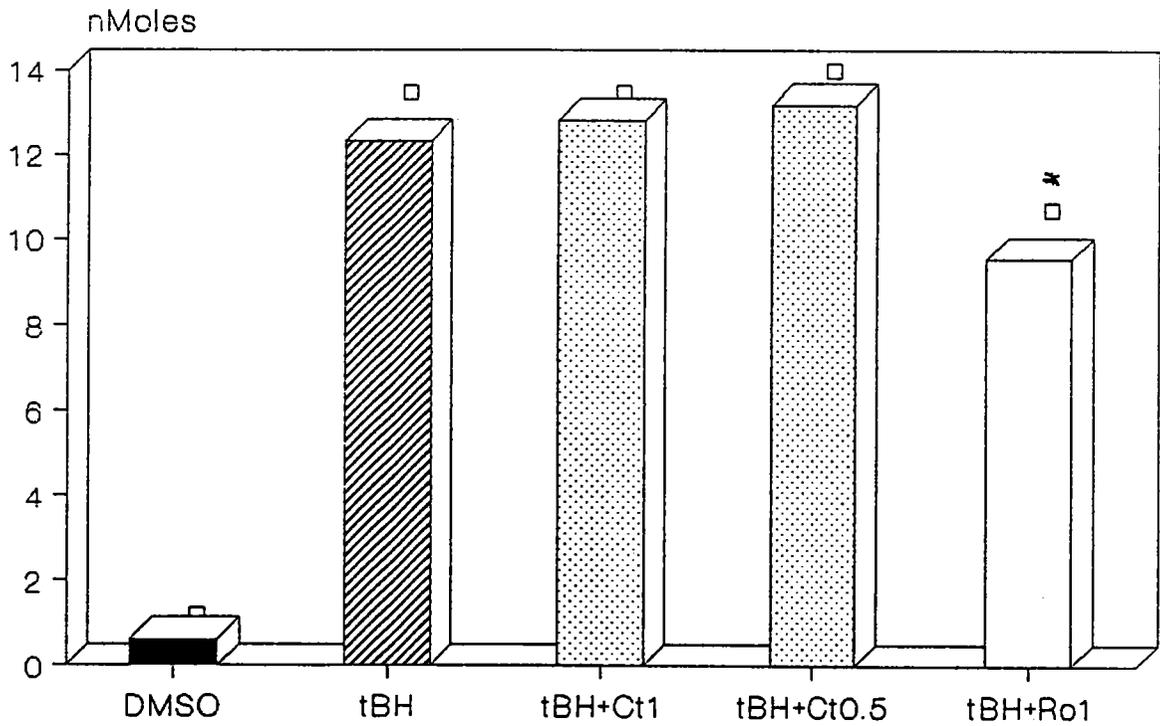
C = ac. gallique

D = quercetine

G 46 : Profils chromatographiques d'identification de Carthamus tinctorium



MAD



G47 : Effet de Carthamus tinctorium sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

- effet sur la production de malonaldehyde (MAD)
- effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)
- effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Peumus boldus Molina (Monimiaceae)

Répartition géographique

Espèce spontanée sur les collines ensoleillées du Chili.

Description botanique

Peumus boldus est un petit arbre buissonnant toujours vert. Les feuilles sont entières, elliptiques, coriaces, d'un vert grisâtre, enroulées sur les bords et d'aspect chagriné. Elles portent de petites cymes terminales de fleurs jaunes très pâles à nombreuses pièces.

Usage traditionnel

Peumus boldus est traditionnellement utilisé dans les affections de la sphère hépatobiliaire. Ses indications sont en fait très large, troubles digestifs, migraines, rhumatismes, otalgies ou encore odontalgies. Peumus boldus est également employé comme diurétique, antiseptique et anti-inflammatoire des voies urinaires. Des effets activateurs des sécretions salivaires et gastriques lui sont également conférés, ainsi que des effets spasmolytiques.

Chimie

Peumus boldus contient plusieurs alcaloïdes tels que la réticuline, la N méthyllaurotétanine, la boldine, l'isoboldine, la laurotétanine, la lauroitsine; mais également des glucosides flavoniques, pneumoside, boldoside, frangoside et des monoterpènes, cinéol, terpinéol, pinène, ascaridol, eugénol.

Les profils chromatographiques en couches minces des flavonoïdes et des composés réducteurs présents dans les extraits de Peumus boldus et obtenus selon les protocoles précédemment décrits sont représentés en figures G48 a,b

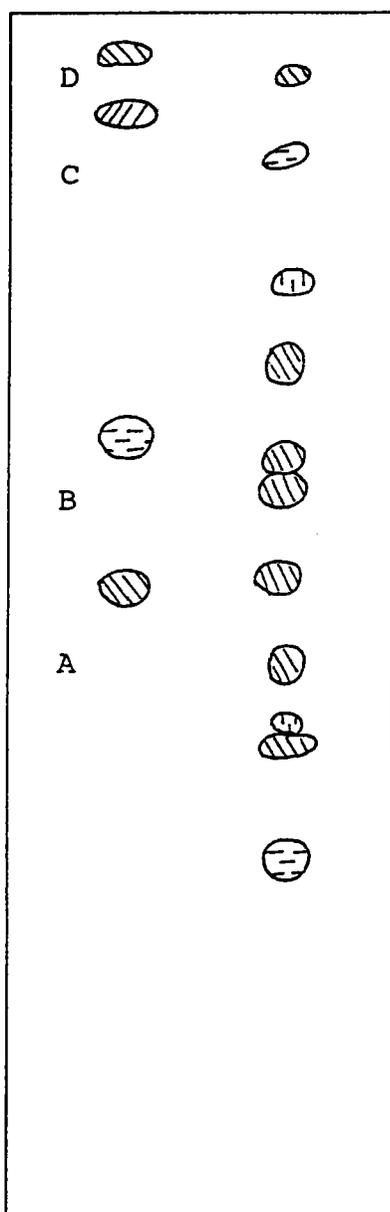
Test d'inhibition du radical DPPH :

Testé dans les conditions précédemment décrites, l'extrait aqueux de Peumus boldus provoque une décoloration de 79% pour une solution de 0.25 g/l et de 51% pour une solution de 0.125 g/l. Devant ces résultats, Peumus boldus est classé en type II.

Test sur hépatocytes isolés :

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G49 a,b,c. Peumus boldus (1 mg/ml) présente un effet protecteur moyen à l'encontre de la lipoperoxydation engendrée par le tert-butyl hydroperoxyde et s'oppose, de manière tout à fait significative, au relargage extracellulaire de la LDH et des ASAT, ce qui est en accord avec son indication traditionnelle principale.

a/ Flavonoïdes



Témoins

Extrait



A = rutine

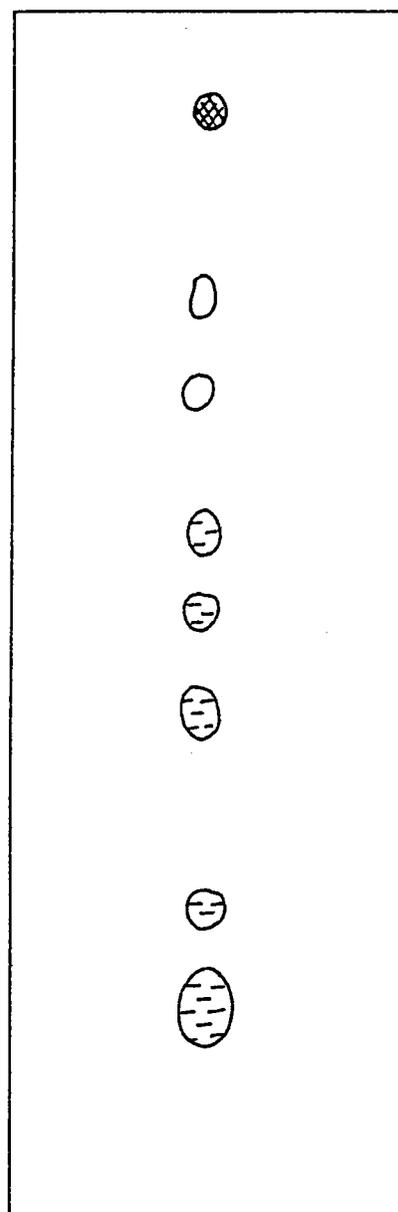
B = ac. chlorogénique

C = ac. gallique

D = quercétine

b/ Composés Réducteurs

Rf 1

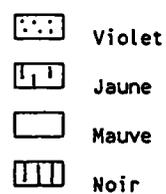


Rf 0.75

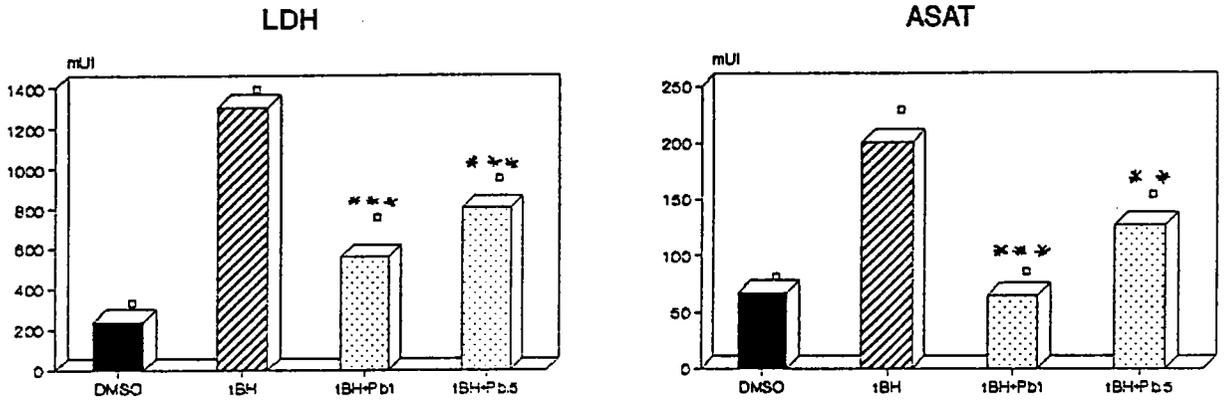
Rf 0.5

Rf 0.25

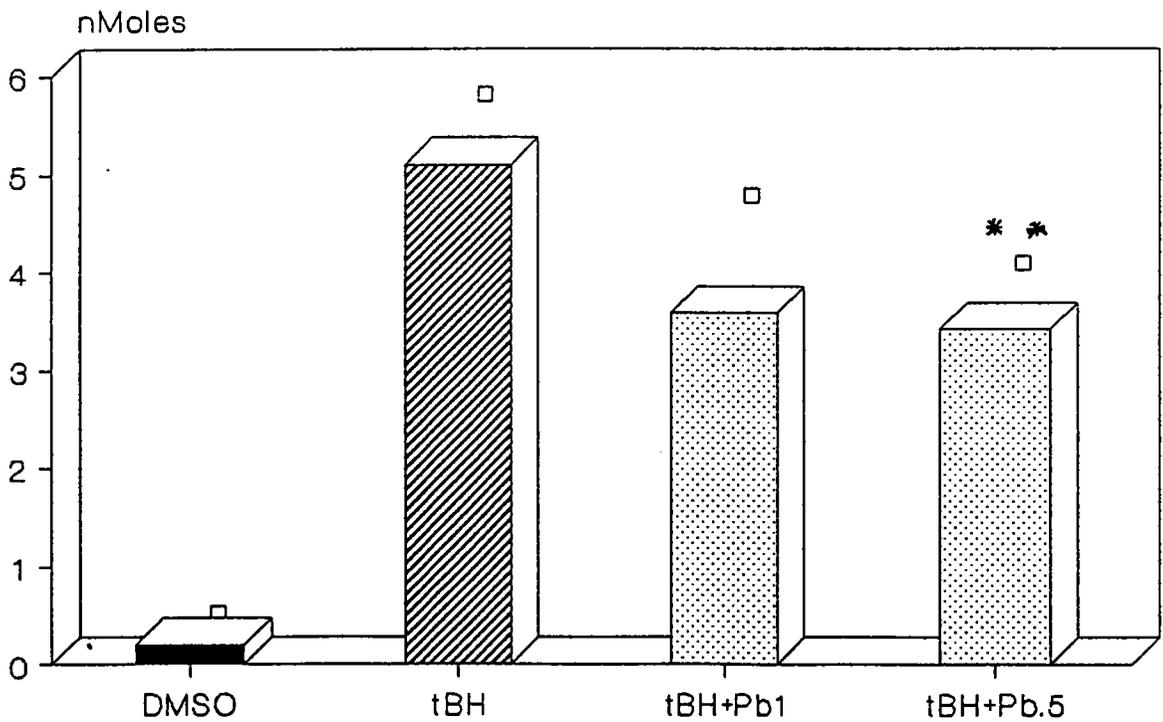
Extrait



G 48 : Profils chromatographiques d'identification de Peumus boldus



MAD



G49 : Effet de Peumus boldus sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Capparis spinosa L. (Capparidaceae)

Répartition géographique : Bassin méditerranéen

Description botanique

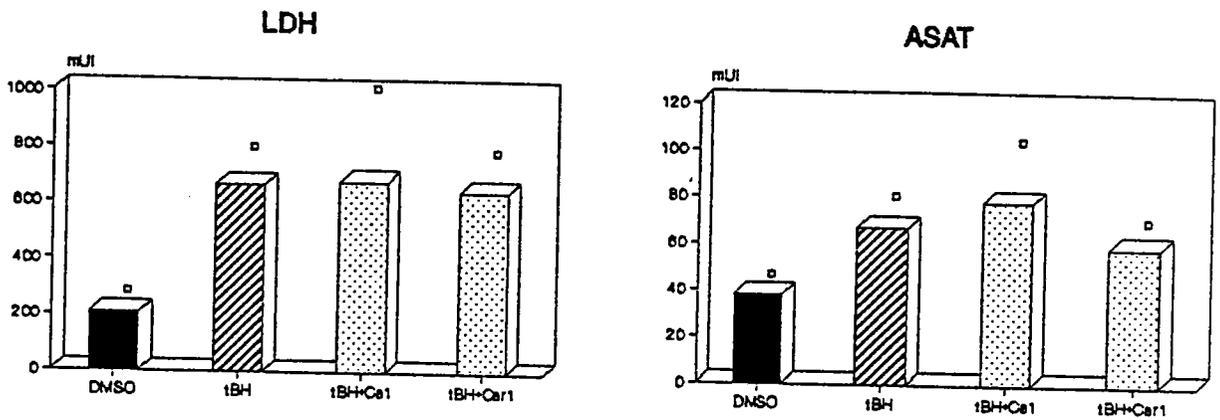
Plante vivace, dont la souche émet chaque année de nombreuses tiges lignifiées, flexueuses, disposées en touffes lâches. Les rameaux portent des feuilles alternes, entières, ovales, à pétioles munis à la base de deux épines recourbées. Les fleurs d'un blanc rose, grandes, zygomorphes, solitaires, à l'aisselle des feuilles supérieures, sont courtement pédiculées. Le fruit est une baie indéhiscente contenant de nombreuses graines réniformes.

Usage traditionnel

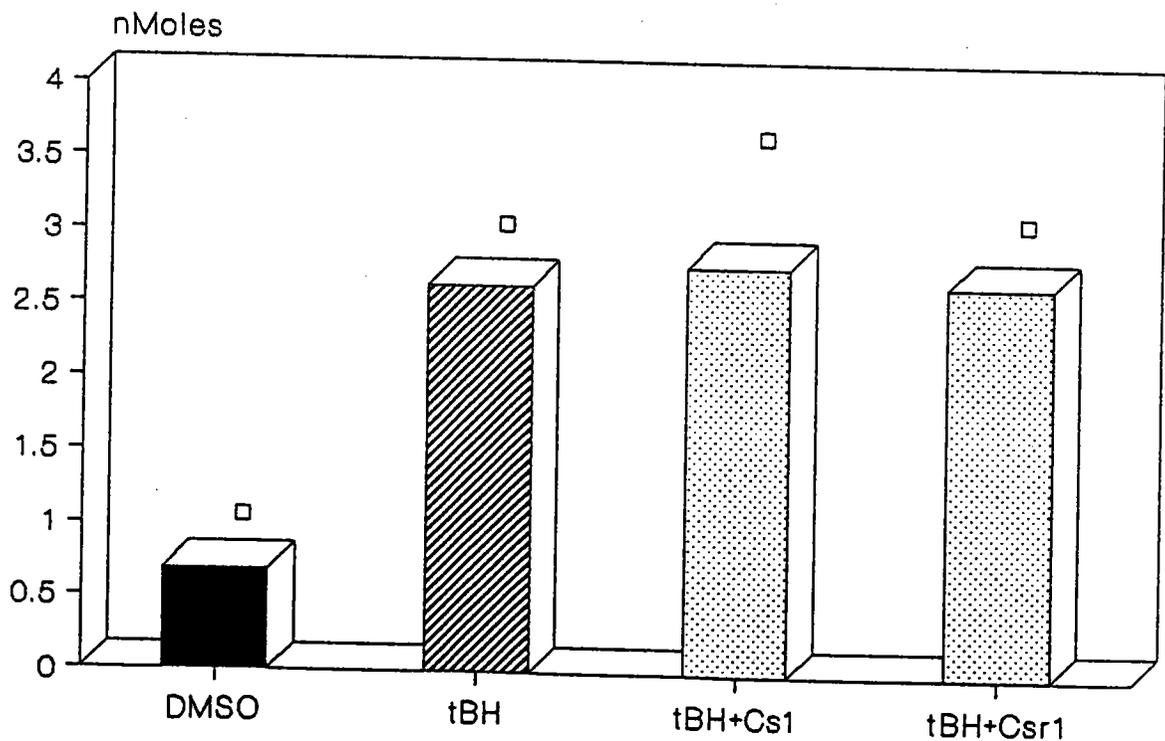
Capparis spinosa est une des panacées du bassin méditerranéen et notamment d'Afrique du nord. L'écorce des racines est utilisée pour ses propriétés antirhumatismales aussi bien par voie orale, sous forme de décocté, qu'en usage externe sous forme de compresses imbibées. Les racines sont également utilisées pour leurs vertus apéritives, antispasmodiques, antiémétiques et antidiarrhéiques. ainsi que dans le traitement de troubles hépatiques. Capparis spinosa est encore utilisé comme fébrifuge, laxatif, antihémoroïdaire et aphrodisiaque.

Test sur hépatocytes isolés

L'expérimentation est menée selon le protocole décrit précédemment et les résultats sont représentés dans les figures G50 a,b,c. Capparis spinosa (partie aérienne,Cs ou racines,Csr) à la dose de 1 mg/ml ne présente aucun effet protecteur à l'encontre de la lipoperoxydation ou du relargage extracellulaire de la LDH et des ASAT engendrés par le tert-butyl hydroperoxyde.



MAD



G50 : Effet de *Capparis spinosa* sur des hépatocytes isolés et intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde (1.5mM) pendant trente minutes.

a. effet sur la production de malonalaldéhyde (MAD)

b. effet sur la fuite de lacticoxydeshydrogénase (LDH)

c. effet sur la fuite d'aspartate aminotransférase (ASAT)

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Tableau G1 : Résultats du screening préliminaire réalisé sur les 26 espèces végétales étudiées (+ Poa sp.)

	DPPH	T	PL	N
Poa sp.	5	-	-	-
Xanthoxylum xanthoxyloïdes	5	-	-	-
Momordica charantia	6	-	-	-
Cuscuta americana	10	+	-	-
Eschscholzia californica	10	-	-	-
Annona reticulata	16	-	-	-
Annona muricata	16	-	-	-
Eupatorium cannabinum	16	+	-	-
Justicia pectoralis	19	-	-	-
Carthamus tinctorium	/	+	-	-
Capparis spinosa	/	-	-	-
Pulicaria orientalis	33	+	-	-
Crepis rueppellii	37	+	-	-
Vaccinium myrtillus	39	-	-	-
Curcuma domestica	6	+	-	+
Kalanchoe crenata	13	+	-	+
Staudia gabonensis	19	+	-	+
Eupatorium odoratum	42	-	-	+
Juniperus communis	47	+	+	+
Tamarindus indica	57	+	+	+
Bidens pilosa	59	+	+	+
Euphorbia hirta	66	+	+	+
Cochlospermum tinctorium	70	+	+	+
Cochlospermum planchonii	78	+	+	+
Peumus boldus	79	+	+	+
Rosmarinus officinalis	84	+	+	+
Terminalia catappa	86	+	+	+

T = traditionnellement utilisé comme hépatoprotecteur

DPPH = % de décoloration du radical DPPH d'une solution à 0.25 g/l au DPPH

PL = effet sur la peroxydation lipidique

N = effet sur la nécrose

II Remarques et conclusions sur la phase de screening

Les résultats obtenus au cours de la phase de screening sont résumés de manière synthétique dans le tableau G1. L'effet des différents extraits testés sur le radical DPPH est représenté par le pourcentage de décoloration d'une solution de 0.25 g de plante sèche par litre. Rappelons que nous avons arbitrairement distingué deux types de comportement selon que le pourcentage de décoloration était inférieur à 50% (groupe de faible activité ou groupe I) ou supérieur à 50% (groupe II). L'action sur la malonaldéhyde ou sur les fuites enzymatiques est codée par (+) ou (-); (+) correspondant à une diminution significative du paramètre considéré par rapport au témoin non traité, à un seuil de risque de première espèce d'au moins 5%. L'absence (-) ou l'existence (+) d'une indication traditionnelle est également indiquée.

II-1 Relation DPPH / lipoperoxydation

Le test d'inhibition du DPPH est une des techniques utilisées pour approcher le pouvoir antiradicalaire d'une substance pure. Economique, relativement rapide, il présente surtout l'avantage de ne nécessiter aucun matériel sophistiqué. C'est un test purement chimique, les renseignements qu'il apporte ne reflète qu'une interaction directe, dans des conditions optimales, en dehors de tout contexte biologique, entre une molécule de DPPH et une molécule "piégeur de radicaux libres". Il ne donne de ce fait qu'une idée théorique des capacités antiradicalaires potentielles des substances testées. L'utilisation de ce test sur des extraits végétaux semble, a priori, être une gageure tant les risques d'interférences chimiques paraissent importants. La confrontation de ces résultats avec ceux obtenus sur un modèle biologique, ici les hépatocytes isolés, permet d'établir le caractère prédictif de ce test, bien que cette comparaison ne puisse être que partielle. En effet, atteintes radicalaires et peroxydation lipidique ne sont pas des manifestations entièrement superposables, les premières englobant la seconde. Cependant la peroxydation lipidique étant induite puis prolongée par des phénomènes radicalaires, il est logique de retrouver une activité antilipoperoxydante pour des extraits présentant un pourcentage d'inhibition important c'est à dire une bonne activité antiradicalaire.

Pour des concentrations de 0.25 gramme de plante sèche par litre (ce qui correspond à des concentrations d'expérimentation de 83 mg/l), les extraits végétaux testés entraînent des pourcentages de décoloration à 5 minutes qui s'échellonnent de 0% à 86% . Seules 8 plantes provoquent une décoloration supérieure à 50%; une neuvième, Juniperus communis est à 47% . Ces neuf plantes entraînent toutes, sur le modèle d'hépatocytes isolés

et intoxiqués au tBH, une diminution significative de la formation de MAD, témoin de la peroxydation lipidique. Parallèlement, les extraits qui n'entraînent qu'une décoloration inférieure à 40%, n'ont aucun effet significatif sur la production de MAD intracellulaire. Dans les conditions d'étude et selon les critères d'activité que nous avons définis, la valeur prédictive du test d'inhibition du DPPH est donc très satisfaisante et cette méthode semble une bonne approche de l'activité antiradicalaire dans le cadre d'un screening primaire d'extraits végétaux.

II-2 Confrontation de la tradition et de l'expérimentation in vitro

Le screening préliminaire a porté sur 26 espèces végétales (tableau G1), 17 d'entre elles sont peu ou prou utilisées en médecine traditionnelle à l'encontre d'affections hépatiques, 9 ont une utilisation qui sort de tout contexte hépatobiliaire. Pour cinq espèces traditionnellement utilisées dans les affections hépatiques, Cuscuta americana, Eupatorium cannabinum, Carthamus tinctorium, Pulicaria orientalis et Crepis ruepellii, aucune activité antinéocrotique n'est retrouvée sur le modèle expérimental utilisé. Les 12 autres espèces possèdent une activité plus ou moins importante sur les tests in vitro. Dans cette étude la tradition se confirme donc dans 71% des cas. Parmi les 10 espèces végétales sans indication hépatique, une seule, Eupatorium odoratum, possède une activité sur hépatocytes isolés. Deux espèces végétales, Annona muricata et Annona reticulata freinent uniquement la fuite des ASAT, ce résultat est difficile à interpréter mais l'absence d'effet sur la LDH ne plaide pas en faveur d'une action hépatotrope marquée. Quatre plantes ont une action exclusive sur le relargage enzymatique et restent sans effet significatif sur les phénomènes peroxydatifs.

D'une façon générale, la tradition est très largement confirmée puisque dans plus de 2/3 des cas, les données empiriques sont vérifiées sur le modèle expérimental. Ces résultats démontrent assez bien l'intérêt de l'approche ethnopharmacologique par rapport à un screening non sélectif, réalisé "à l'aveugle". Cette approche doit cependant se faire avec précaution car elle n'est pas dénuée d'un certain nombre de difficultés. Le problème posé par l'identification botanique précise est une évidence pour chacun et il n'est guère besoin d'y insister. Il paraît clair, en outre, que l'existence de convergence d'usage d'une espèce végétale entre divers tradipraticiens d'une même ethnie et plus encore d'ethnies différentes, renforce l'intérêt de cette espèce. L'ethnologue, en précisant la fréquence d'utilisation de telle ou telle plante et sa place dans l'arsenal thérapeutique du tradipraticien, permet au pharmacologue de pondérer des informations souvent recueillies en très grand nombre et de les hiérarchiser. Les recueils de pharmacopées

traditionnelles gagneraient à préciser plus clairement les fréquences d'utilisation, pour permettre d'écarter des médications mineures. Dans le même esprit, il nous semble préférable de retenir en première intention les plantes utilisées en monothérapie par rapport à celles entrant uniquement dans le cadre d'association. Les remèdes associant plusieurs espèces végétales imposent, par ailleurs, des contraintes expérimentales plus lourdes et exposent au risque d'un résultat faussement négatif lorsque les différents constituants du remède sont testés séparément, ce qui se produit généralement au cours d'un screening primaire.

Le cadre clinique de l'indication traditionnelle est lui aussi souvent fragmentaire. Les données sémiologiques amenant l'usage de telles plantes plutôt que de telles autres sont très fréquemment absentes, au bénéfice d'indications généralement très larges qui appauvrissent considérablement le travail de terrain. Il est évident que les systèmes de décriptage de la maladie sont fort différents en médecine populaire, traditionnelle ou "moderne" et que les "signes" émis par le patient sont interprétés selon des échelles de valeur différentes. Cependant, dans tous les cas, la relation sémiologie-remède reste fondamentale. Cela nécessite un travail de transcription délicat pour l'ethnologue, travail qu'il est cependant seul en mesure d'effectuer.

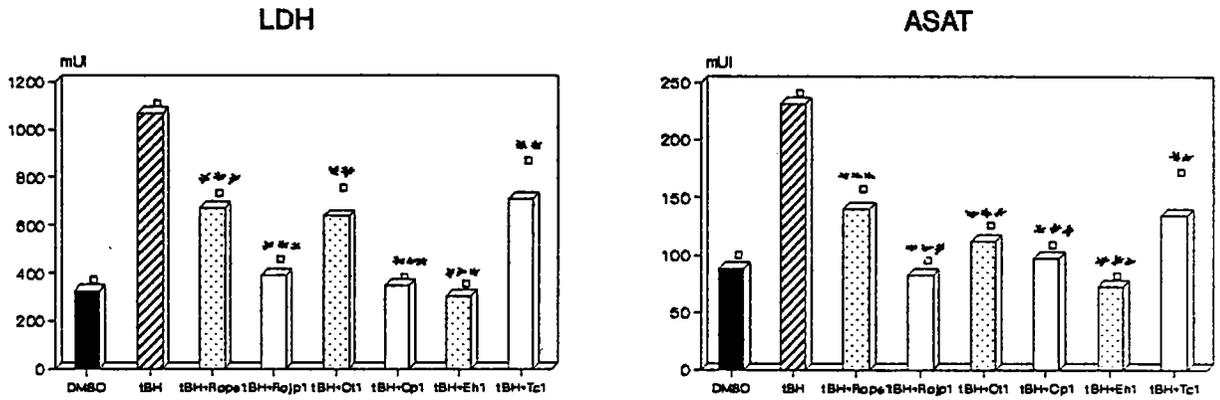
Concernant la sphère hépatique, il est surprenant de retrouver l'indication d'ictère, de manière quasi systématique pour toutes les plantes hépatoprotectrices, sans que ne soit jamais précisé le mode d'installation de l'ictère, sa durée, ses signes d'accompagnement et qu'à aucun moment ne soit fait référence à la palpation et l'observation du malade, à l'état des téguments ou encore à l'existence de douleur ou d'autres signes d'orientation. En un mot, les recueils de pharmacopée traditionnelle négligent généralement les éléments de diagnostic retenus par les tradipraticiens; qui bien que n'étant pas obligatoirement similaires aux nôtres, n'en sont, cependant, pas moins informatifs sur la nature de la maladie.

Le mode de préparation (plante fraîche, solvant d'extraction) est bien évidemment un autre point de divergence éventuelle entre la tradition et l'expérimentation et peut expliquer un certain nombre de résultats pharmacologiques négatifs. On attribue d'ailleurs souvent, les propriétés décrites pour une plante, entité botanique, à des extraits, réalisés à l'aide de solvants divers, qui ne représentent qu'une partie de la composition chimique de cette plante et donc de ses potentialités thérapeutiques.

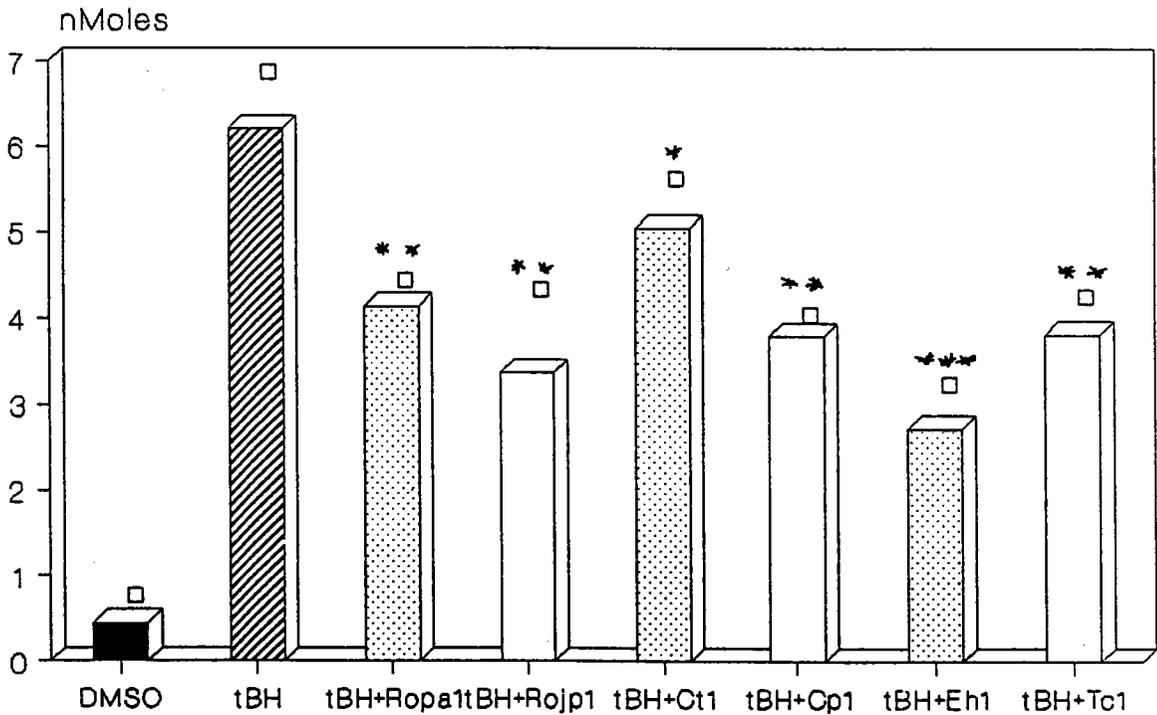
II-3 Comparaison des extraits végétaux les plus actifs

Au terme de la phase de screening, les extraits végétaux paraissant les plus intéressants ont été testés, dans le même temps expérimental et selon les conditions habituellement employées afin de comparer leurs activités.

Les espèces sélectionnées sont Rosmarinus officinalis, Cochlospermum planchonii, Cochlospermum tinctorium, Euphorbia hirta et Terminalia catappa. Les résultats obtenus, représentés figure G 51 montrent que les deux espèces les plus actives, à la fois sur les processus peroxydatifs et sur les relargages enzymatiques, sont Rosmarinus officinalis et Euphorbia hirta. Les investigations pharmacologiques ont été poursuivies dans ces deux directions. Un certain nombre d'investigations ont également été réalisées sur Cochlospermum tinctorium dans le cadre d'un travail en collaboration avec le D^r Diallo de l'Université de Louvain (Belgique) et sont également évoquées.



MAD



G51 : Effets pharmacologiques des extraits aqueux de *Rosmarinus officinalis*, *Cochlospermum tinctorium*, *Cochlospermum planchonii*, *Euphorbia hirta*, *Terminalia catappa* sur des hépatocytes isolés, intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde pendant 30 minutes.

Rop : *Rosmarinus officinalis* plantes entières
 Roj : *Rosmarinus officinalis* jeunes pousses
 Ct : *Cochlospermum tinctorium*

CP : *Cochlospermum planchonii*
 Eh : *Euphorbia hirta*
 Tc : *Terminalia catappa*

H Etude de Cochlospermum tinctorium

Un travail antérieur de Diallo (1987) sur Cochlospermum tinctorium en collaboration avec l'équipe de Kiso et Hikino de l'Université de Seida (Japon) avait mis en évidence l'influence du type d'extraction sur l'activité hépatoprotectrice à l'encontre d'une intoxication par le tétrachlorure de carbone sur un modèle d'hépatocytes en culture primaire. Celui-ci avait montré une amélioration notable de l'effet hépatoprotecteur lors d'utilisation d'extraits méthanoliques ou éthanoliques. Nous avons cherché à confirmer ces résultats sur le modèle d'intoxication au tBH. Les résultats obtenus dans les conditions expérimentales habituelles, d'un extrait aqueux, d'un extrait hydroéthanolique et d'un extrait éthanolique sont regroupés dans le tableau H1

Tableau H1 : Influence du mode d'extraction sur l'effet hépatoprotecteur de Cochlospermum tinctorium.

	MAD	LDH	ASAT
DMSO	0.30 ± 0.08	341 ± 129	80 ± 22
tBH 1.5 mM	8.76 ± 0.70	2011 ± 104	245 ± 17
tBH + Ct aqueux	5.60 ± 1.11 ***	1849 ± 214 ***	242 ± 29 ***
tBH + Ct hydroéth.	1.12 ± 0.35 ***	245 ± 23 ***	50 ± 2 ***
tBH + CT éthanol.	2.31 ± 0.44	538 ± 138	86 ± 13

* p > 0.05

*** p > 0.001

Les résultats confirment les travaux antérieurs et montrent la supériorité manifeste des deux extraits réalisés en présence d'éthanol tant sur la peroxydation lipidique que sur les phénomènes nécrotiques. Fort de ces constatations, Diallo a entrepris le fractionnement des extraits les plus performants, dont les modalités et les résultats ont été publiés par ailleurs (Diallo et coll., 1987). Ces fractionnements aboutissent à l'identification d'un certain nombre de constituants chimiques présents dans les rhizomes de C. tinctorium :

- des acides gallique et éllagique
- des éllagitannins
- divers flavonoïdes dont la 7,3' diméthyl dihydroquercétine et la 5,4' diméthyl quercétine
- des apocaroténoïdes (cochloxanthine et dihydro cochloxanthine)
- des terpènes pentacycliques notamment l'acide arjunolique
- des triacylbenzènes
- des cétones volatiles

Parmi ces composés , les caroténoïdes et les triterpènes ont été présumés responsables de l'activité hépatoprotectrice. Nous avons, au cours de notre travail, recherché l'activité de cinq de ces fractions, sur le test in vitro :

- la fraction 1, correspondant à l'acide arjunolique
- la fraction 2, correspondant aux triacyl benzènes
- la fraction 3, correspondant aux apocaroténoïdes
- la fraction 4, correspondant à l'hydroxy 1 décanone
- la fraction 5, correspondant aux cétones volatiles

Chaque fraction a été testée à la dose de 0.05 mg par ml de suspension hépatocytaire selon les conditions opératoires habituelles. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau H2.

tableau H2 : Effets de fractions isolés de *C. tinctorium* sur hépatocytes de rat intoxiqués au tBH

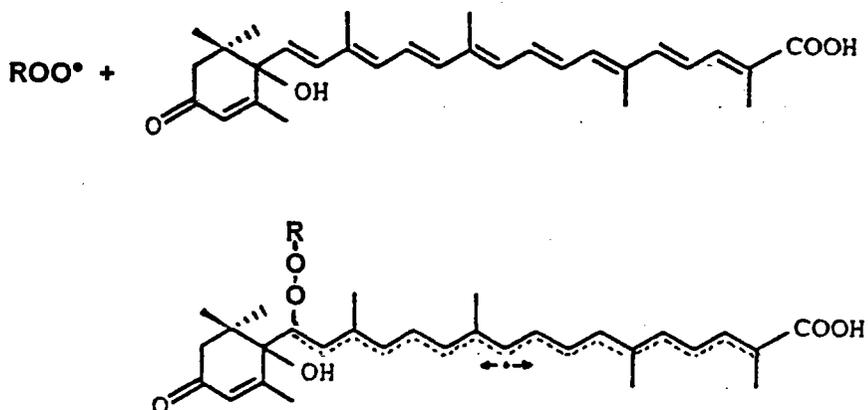
	MAD	LDH
DMSO	0.19 ± 0.09	431 ± 4
tBH 1,5 mM	4.86 ± 1.18	592 ± 20
tBH + F1	3.38 ± 0.99	725 ± 116
tBH + F2	4.58 ± 0.69	594 ± 88
tBH + F3	2.52 ± 0.80	488 ± 8
tBH + F4	4.33 ± 1.32	517 ± 40
tBH + F5	4.95 ± 0.57	571 ± 11

* p > 0.05

Seuls les apocaroténoïdes montrent une action sur le modèle utilisé, leur activité sur le relargage de LDH reste très modeste, mais ils freinent significativement les phénomènes peroxydatifs .

Le rôle possible des caroténoïdes dans les phénomènes de protection antiradicalaire à d'ailleurs été souligné. Du fait de leur structure particulière et leur activité prédominante sur les conséquences peroxydatives induites par le tBH, on peut émettre l'hypothèse d'un mécanisme de protection par délocalisation électronique au niveau de la chaîne latérale des cochloxanthines. Ce mécanisme pouvant éventuellement être confirmé par

des études de résonance paramagnétique électronique et peut être schématisé de la manière suivante :



Il faut cependant constater que la protection apportée par les apocaroténoïdes extraits de *C. tinctorium* reste faible par rapport à celle de l'extrait hydroéthanolique, en particulier sur les phénomènes strictement nécrotiques. Il est donc probable qu'il existe des effets synergiques, d'autres composés, notamment des flavonoïdes (dérivés de la quercétine) étant probablement également impliqués dans l'hépatoprotection observée dans ce modèle.

I Etude d'Euphorbia hirta

L'extrait aqueux d'Euphorbia hirta, obtenu par infusion macération (4 heures) des feuilles et des tiges, a montré au cours de la phase de screening une bonne activité antilipoperoxydante et antinérotique après intoxication au tert butyl hydroperoxyde. Avant d'aborder la phase de fractionnement, nous avons cherché, dans un premier temps, à écarter un artefact éventuel par un mécanisme de "compétition", avec le toxique utilisé, au niveau extracellulaire. en effet, cette interaction aurait pour conséquence un niveau d'intoxication cellulaire moindre et l'activité hépatoprotectrice observée ne serait, en réalité, que la traduction d'une dose de toxique disponible plus faible.

I Etude de l'effet d'un ajout retardé d'E. hirta

La recherche d'une telle interaction est réalisée par l'ajout de l'extrait d'E. hirta, 10 minutes après le début de l'intoxication par le tBH. Nous avons vu précédemment, qu'en raison de la rapidité de la pénétration et de la métabolisation intracellulaire du tBH, cette période était suffisante pour voir apparaître les phénomènes peroxydatifs et l'effondrement du glutathion intracellulaire, c'est-à-dire pour mettre en place tous les facteurs nécessaires à l'expression de la toxicité.

Les figures I1 montrent les résultats obtenus lors de tels expérimentations. Elles font clairement apparaître le maintien de l'effet hépatoprotecteur sur les deux voies toxiques étudiées malgré l'ajout retardé. Comme lors d'un ajout simultané à celui du toxique, Euphorbia hirta a un effet immédiat sur les phénomènes peroxydatifs et plus tardif sur la fuite enzymatique. Les phénomènes protecteurs ne sont donc pas en relation avec une interférence au niveau extracellulaire mais bien de nature intracellulaire. Notons au passage que nous avons vérifié que l'extrait d'Euphorbia hirta n'interférerait pas, aux doses utilisés expérimentalement, sur les méthodes de dosages retenus.

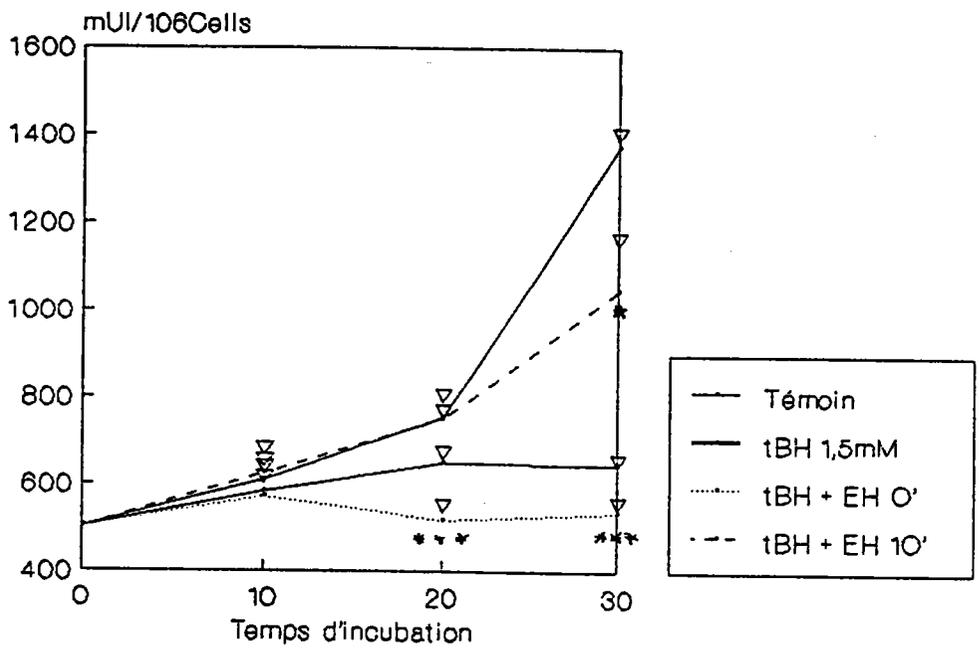
II Influence du solvant d'extraction

Avant d'aborder la phase de fractionnement d'E. hirta, une série d'extraction sélective au Soxhlet est réalisée à l'aide de solvant de polarité croissante selon la séquence suivante, chloroforme, éthyl acétate, éthanol, eau, afin de rechercher le solvant d'extraction le plus performant.

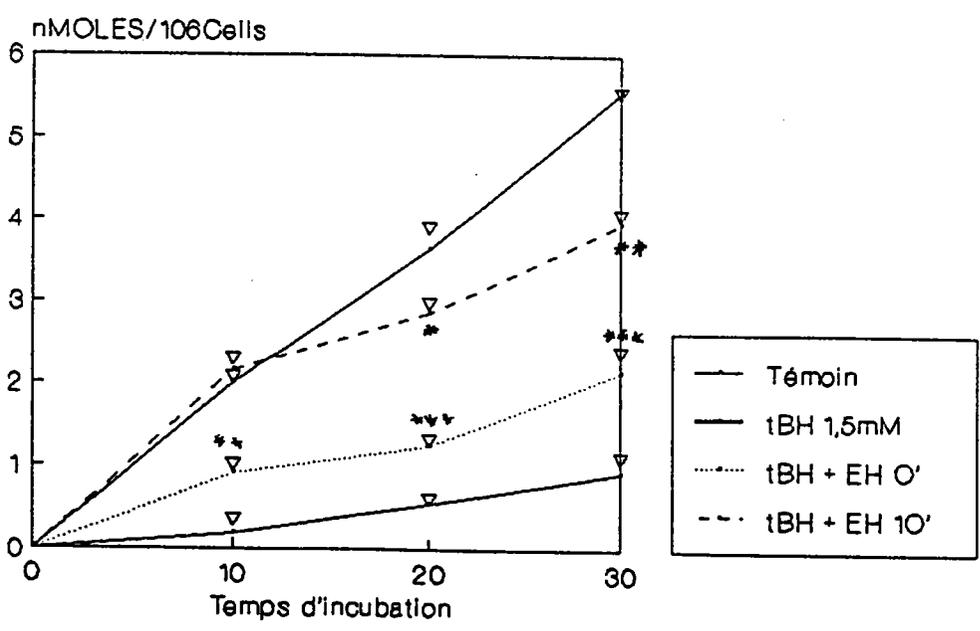
II 1 Mode opératoire

L'extraction est réalisée à partir de 80 grammes de feuilles et de tiges d'E. hirta, finement contusées avant d'être placées dans la cartouche du Soxhlet. Chaque lixiviation est réalisée avec 600 ml de solvant jusqu'à ce que celui-ci ressorte totalement incolore de la cartouche. Les extraits obtenus sont alors concentrés sous vide avant d'être lyophilisés.

LDH



MAD



I1 : Effets sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire, induites par le tBH, d'un ajout simultané et d'un ajout retardé d'un extrait aqueux d'Euphorbia hirta

* p<0,05

** p<0,01

*** p<0,001

Les quantités de lyophilisat obtenues sont les suivantes :

- 1,73 g pour l'extraction chloroformique (R = 2,16%)
- 1,21 g pour l'extraction à l'éthyl acétate (R = 1,51%)
- 3,07 g pour l'extraction à l'éthanol 96° (R = 3,84%)
- 7,80 g pour l'extraction aqueuse (R = 9,76%)

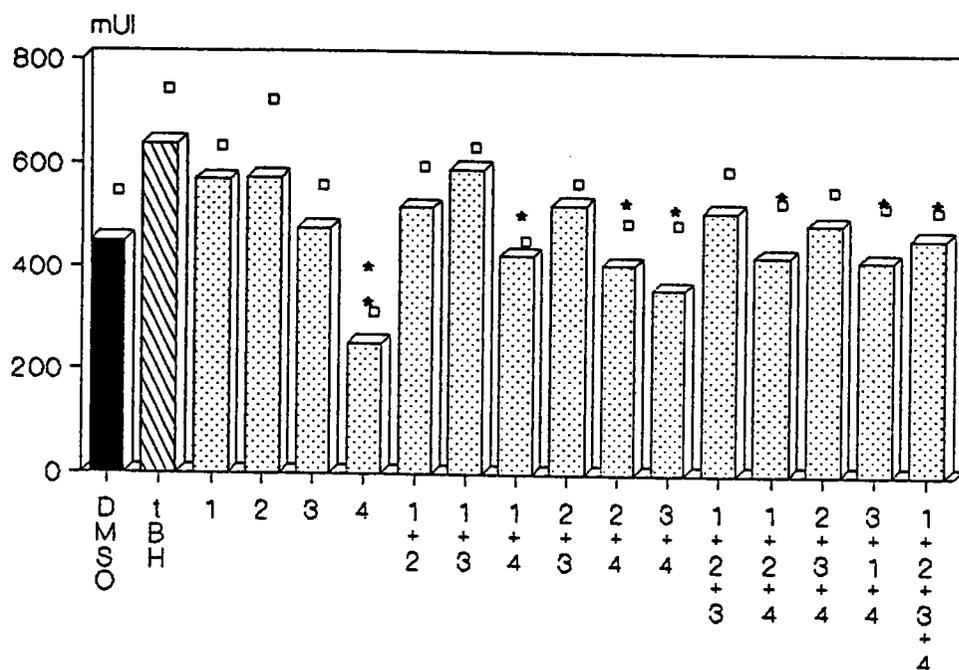
II 2 Contrôle pharmacologique

Les figures I2 montrent les résultats expérimentaux obtenus par les quatre lyophilisats sur hépatocytes isolés après intoxication au tert butyl hydroperoxyde (1.5 mM), ainsi que par les mélanges des différentes fractions selon toutes les combinaisons possibles. Les quantités testées correspondent à des doses de 1 mg de plantes sèches par ml de suspension. Il apparaît que seul l'extrait aqueux apporte une protection significative sur les phénomènes peroxydatifs et nécrotiques, l'ajout d'une ou de plusieurs autres fractions n'ajoutant rien à l'activité de l'extrait aqueux sur ce modèle. On peut donc considérer que les principes hépatoprotecteurs d'E.hirta sont de nature strictement hydrosolubles. Le fractionnement s'est de ce fait poursuivi sur l'extrait aqueux.

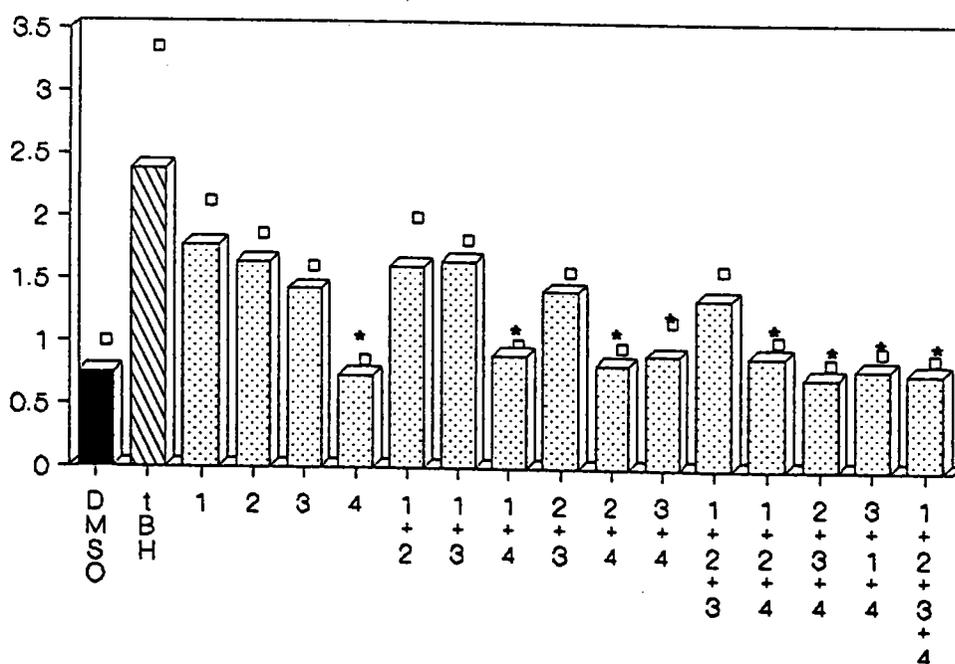
III Tentatives de fractionnement d'Euphorbia hirta

Plusieurs tentatives de fractionnement d'Euphorbia hirta ont été réalisées à partir de l'extrait aqueux précédemment obtenu. Celles ci sont réalisées à l'aide de colonne en verre de 60 cm de long et 2 cm de diamètre, remplies de silice G60 ou de cellulose (Merck); différents systèmes éluants ont utilisé de l'éthanol 96°, du méthanol et de l'eau suprapure en proportions variables. Ces différentes tentatives ne seront pas détaillées car toutes se sont soldées par un échec dans la mesure où aucune des fractions recueillies n'a conservé une activité hépatoprotectrice significative sur le modèle expérimentale utilisé. Aucune autre technique de séparation n'a par ailleurs été envisagée en raison des résultats plus intéressants obtenus par la dernière espèce végétale retenue, Rosmarinus officinalis qui a, dès lors, focalisé toute notre attention.

LDH



MAD



1 = extraction chloroformique
2 = extraction à l'éthyl acétate

3 = extraction à l'éthanol
4 = extraction aqueuse

12 : Effets pharmacologiques des différentes fractions soxhlet d'*Euphorbia hirta* sur hépatocytes isolés intoxiqués au tBH.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

J Etude de Rosmarinus officinalis

I Etude d'un ajout retardé de Rosmarinus officinalis

Comme pour Euphorbia hirta, après avoir vérifié que R. officinalis n'influe pas sur les méthodes de mesure utilisées et avant d'aborder la phase de fractionnement, nous avons cherché à écarter la possibilité d'une éventuelle interaction extracellulaire entre le toxique et l'extrait végétal, à l'aide d'un ajout retardé de l'extrait, 10 minutes après l'intoxication par le TBH. Cette période étant jugée suffisante pour mettre en place les différents facteurs de la nécrose cellulaire. Les figures J1 montrent les résultats obtenus lors de telles expérimentations, l'effet protecteur apparaît malgré l'ajout retardé, les phénomènes protecteurs sont donc bien de nature intracellulaire.

II Influence du solvant d'extraction

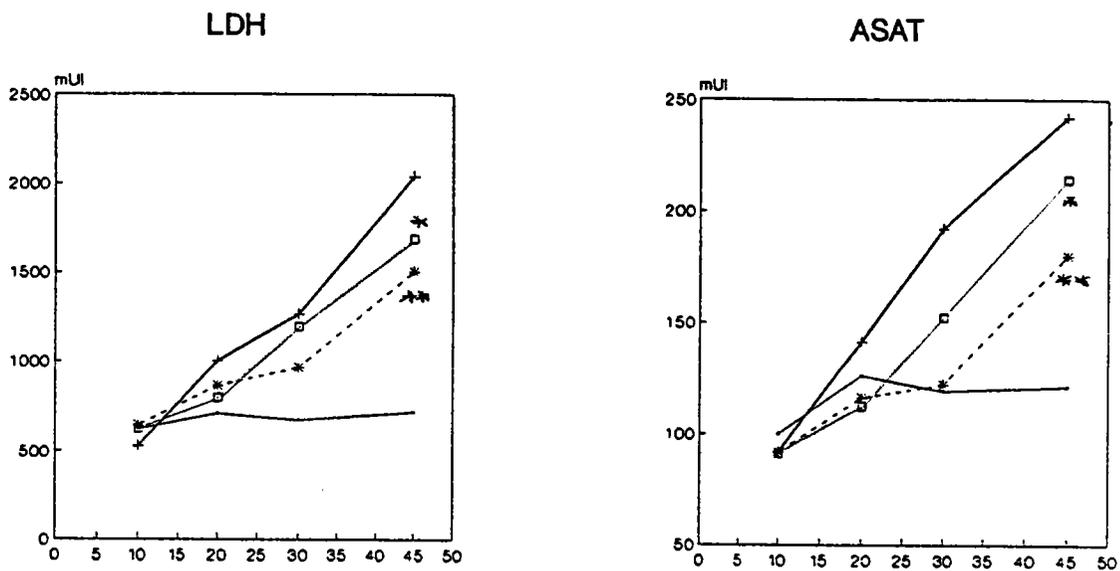
Au cours de la phase de screening, les extractions ont été réalisées en utilisant le solvant le plus souvent retrouvé dans les préparations traditionnelles, l'eau. Avant d'aborder la phase de fractionnement de Rosmarinus officinalis, une série d'extraction différentielle au soxhlet est réalisée à l'aide de solvant de polarité croissante selon la séquence chloroforme, éthyl acétate, éthanol, eau afin de rechercher le solvant d'extraction le plus performant. L'ensemble des travaux de fractionnement est réalisé sur des jeunes pousses de romarin, récoltées en juin 1988, à St Germain des Puits (Aude), en pleine garigue, un jour de beau temps par le coopérative "L'herbier des Pyrénées". A la réception des plantes, 24 heures plus tard, les jeunes pousses (parties terminales de 2 à 3 cm, vert tendre) sont séparées du reste de la partie aérienne et congelées à -20°C.

II-1 Soxhlet 1

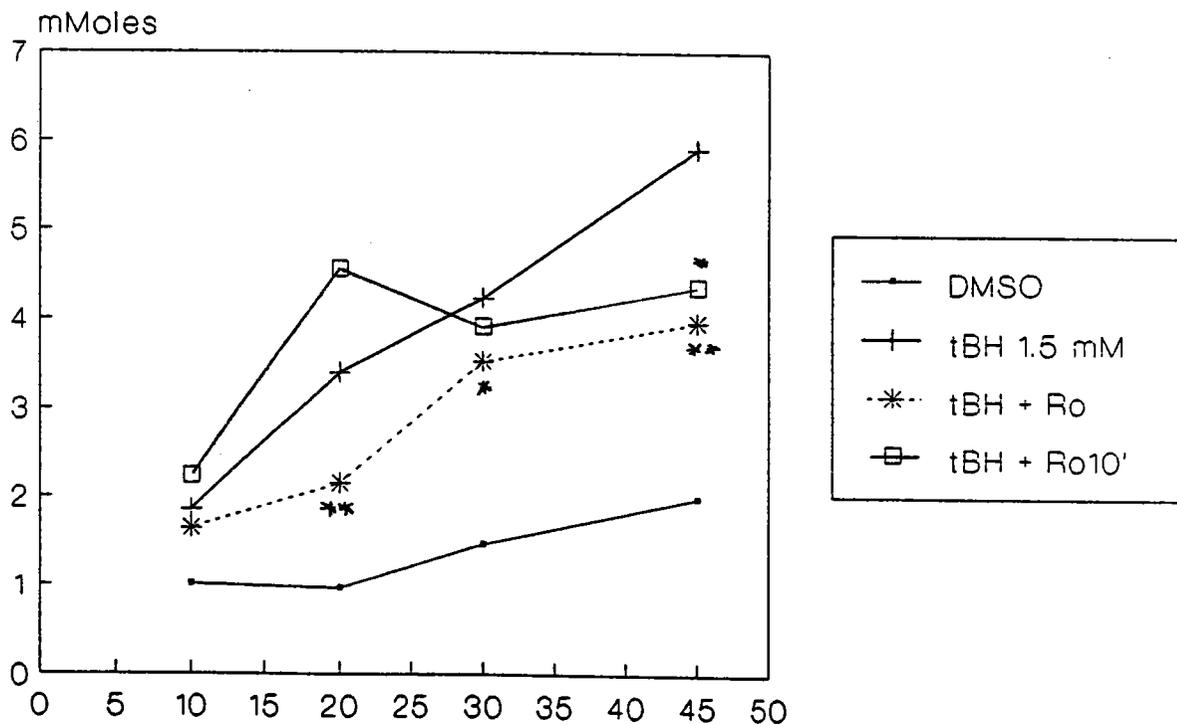
II-1 1 Mode opératoire

Un premier soxhlet (Soxhlet I) est réalisé avec 80 g de jeunes pousses de romarin, décongelées et finement contusées avant d'être placées dans la cartouche du soxhlet. Chaque lixiviation est réalisée avec 600 ml de solvant jusqu'à ce que celui-ci ressorte totalement incolore de la cartouche. Les extraits obtenus sont alors concentrés sous vide puis congelés en coque afin d'être lyophilisés. Les quantités de lyophilisats obtenues sont les suivantes :

- 1.73 g pour l'extraction par le chloroforme
- 0.24 g pour l'extraction par l'acétate d'éthyle
- 2.36 g pour l'extraction par l'éthanol



MAD



J1 : Effets sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire induites par le tBH, d'un ajout simultané et d'un ajout retardé d'un extrait aqueux de Rosmarinus officinalis

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

1.94 g pour l'extraction aqueuse
(80g de plante fraîche donnent 30.08g de plante sèche)

Lors du retour à la température ambiante, l'extrait chloroformique se partage en une phase inférieure, liquide, et une phase supérieure, solide et cireuse. Cette dernière provenant probablement de la cuticule des jeunes pousses est séparée par filtration, séchée à l'air et conservée à part. La partie liquide est, après filtration, traitée comme les autres extraits par lyophilisation.

II-1 2 Contrôle pharmacologique

Les figures J2 montrent les résultats expérimentaux obtenus par les quatre lyophilisats sur hépatocytes isolés après intoxication au *tert*-butyl hydroperoxyde (1,5mM). L'intoxication est franche tant pour la production de malonaldéhyde qu'en ce qui concerne le relargage enzymatique. Deux extraits, celui à l'éthyl acétate et celui à l'éthanol, ne présentent aucune action pharmacologique sur ce modèle. L'extrait aqueux diminue la fuite enzymatique mais contrairement à un extrait aqueux obtenu par infusion macération reste sans effet sur la formation de MAD. L'extrait chloroformique inhibe totalement la fuite de lactico-déshydrogénase et réduit de manière très significative la production de MAD. L'extrait chloroformique à la dose de 1 mg de plante sèche par ml de suspension d'hépatocytes présente une activité supérieure à tous les extraits aqueux testés au cours du screening préliminaire.

II-2 Soxhlet II

II-2 1 Mode opératoire

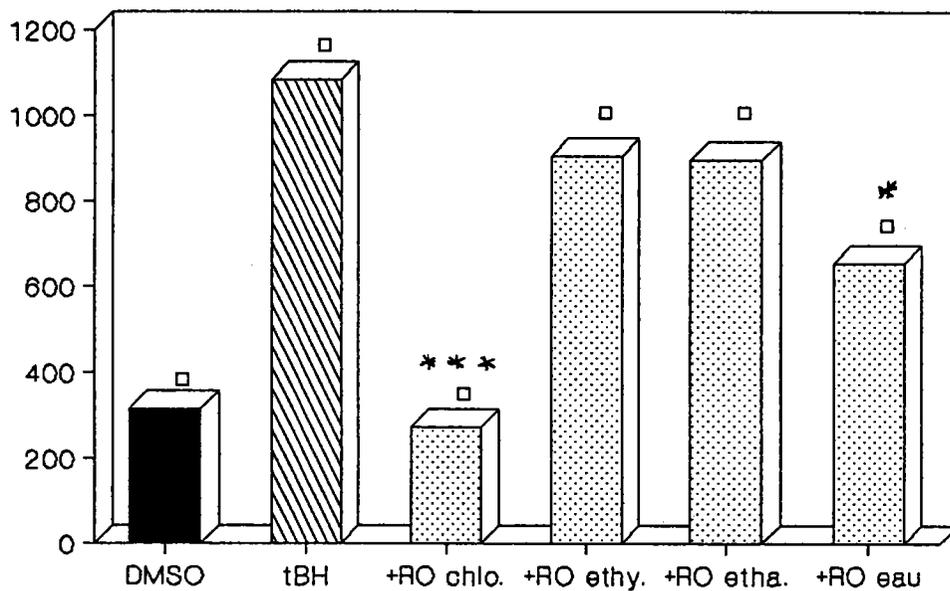
Devant ces résultats une deuxième extraction différentielle par soxhlet (Soxhlet II) est réalisée à partir de 120g de jeunes pousses, décongelée, de Rosmarinus officinalis, en utilisant successivement deux solvants d'extraction, le chloroforme puis l'eau. Le mode de préparation des lyophilisats est identique à celui précédemment décrit. Les quantités de lyophilisats obtenues sont les suivantes :

3.91 g pour l'extrait chloroformique
7.23 g pour l'extrait aqueux

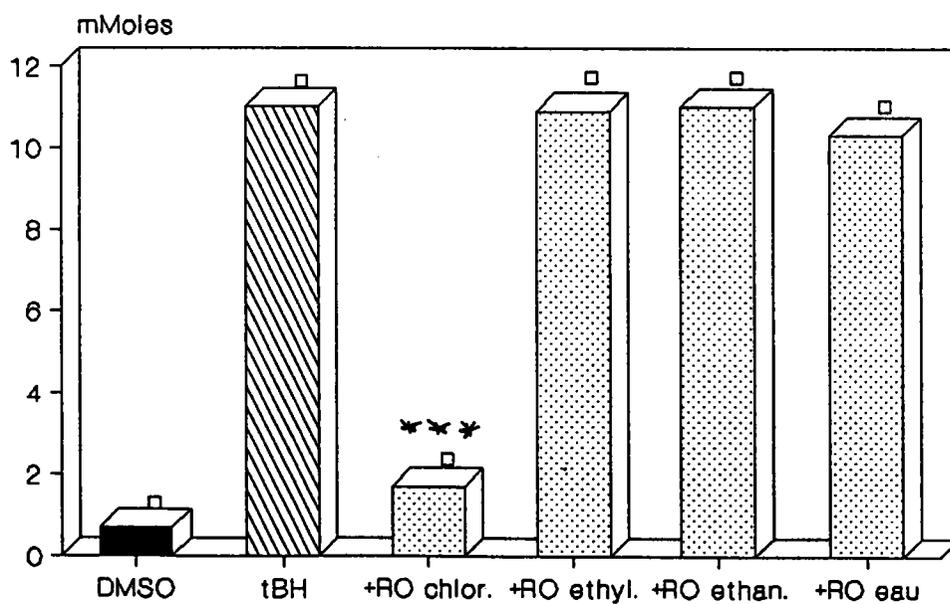
II-2 2 Contrôle pharmacologique

Les résultats des expérimentations réalisées sur ces nouveaux extraits, présentés figure J3 confirment les travaux précédents. L'extrait chloroformique testé à la dose de 1 mg de plante sèche par ml de suspension, révèle une très

LDH



MAD

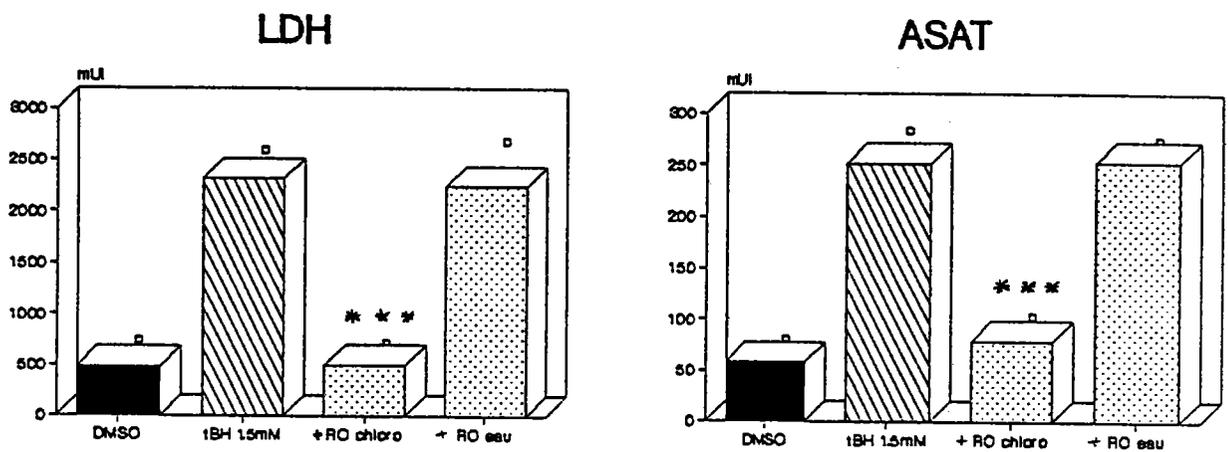


J2 : Effets pharmacologiques des différentes fractions soxhlet de Rosmarinus officinalis sur hépatocytes isolés intoxiqués au tBH.

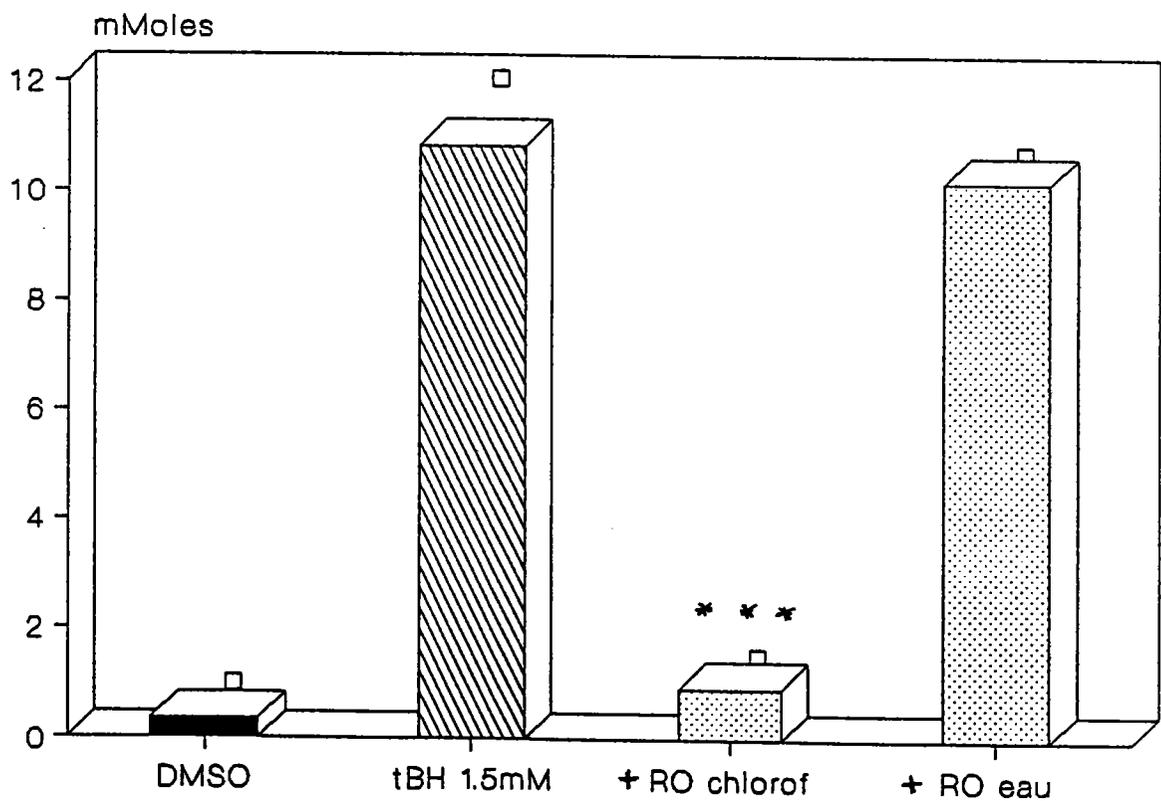
* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$



MAD



J3 : Effets pharmacologiques des différentes fractions soxhlet de Rosmarinus officinalis sur hépatocytes isolés, intoxiqués au tBH.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

forte activité alors que l'extrait correspondant au soxhlet aqueux reste sans effet sur les paramètres étudiés.

II-3 Caractérisations chromatographiques :

Des profils chromatographiques en couche mince sont alors réalisés sur les différents lyophilisats obtenus (Soxhlet I et Soxhlet II) en vue de la recherche de composés réducteurs, de flavonoïdes et d'acides phénols; ces substances étant susceptibles de porter l'activité selon certains auteurs (Kimura et coll.,1985). Les triterpènes, composés extraits par les solvants faiblement polaires et éventuellement impliqués, eux aussi, dans les phénomènes hépatoprotecteurs (Hikino et coll.,1984) sont également recherchés.

II-3 1 Recherche des composés réducteurs sur Soxhlet I et Soxhlet II

La méthodologie employée est décrite dans le paragraphe F III-2. Le révélateur utilisé est un système anisaldéhyde-acide phosphomolybdique.

Les chromatogrammes obtenus sont reproduits figure J4. Le dépôt n°1 correspond à un extrait obtenu par infusion-macération aqueuse de jeunes pousses de romarin. Les dépôts 2 à 6 correspondent aux extraits de Soxhlet I. Les dépôts 7 et 8 sont ceux correspondant à la deuxième extraction différentielle (Soxhlet II). Les différents extraits chloroformiques utilisés ne montrent aucun spot, seules apparaissent des trainées bleuâtres en front de solvant. Les autres extraits présentent des spots qui sont tous retrouvés dans l'infusion macération.

II-3 2 Recherche des flavonoïdes sur Soxhlet I et Soxhlet II

Le protocole suivi est celui décrit dans le paragraphe F III-1. Le révélateur utilisé est le réactif de NEU avec pulvérisation secondaire de PEG 4000.

Le chromatogramme est reproduit figure J5. La rutine, la quercétine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide rosmarinique sont utilisés comme témoins. La numérotation des dépôts est identique à celle utilisée pour la recherche des composés réducteurs. Le réactif de NEU ne révèle aucun spot dans les différents extraits chloroformiques testés, seule une petite bande jaunâtre, mal individualisée apparaît en front de solvant, comme d'ailleurs pour tous les autres extraits. Les extraits réalisés à partir de l'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau aboutissent à des spots que l'on retrouve dans le profil de l'infusion macération.

II-3 3 Recherche de triterpènes sur Soxhlet I et Soxhlet II

La recherche de triterpènes est effectuée sur plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (20x20; Merck). Le système solvant est constitué d'un mélange

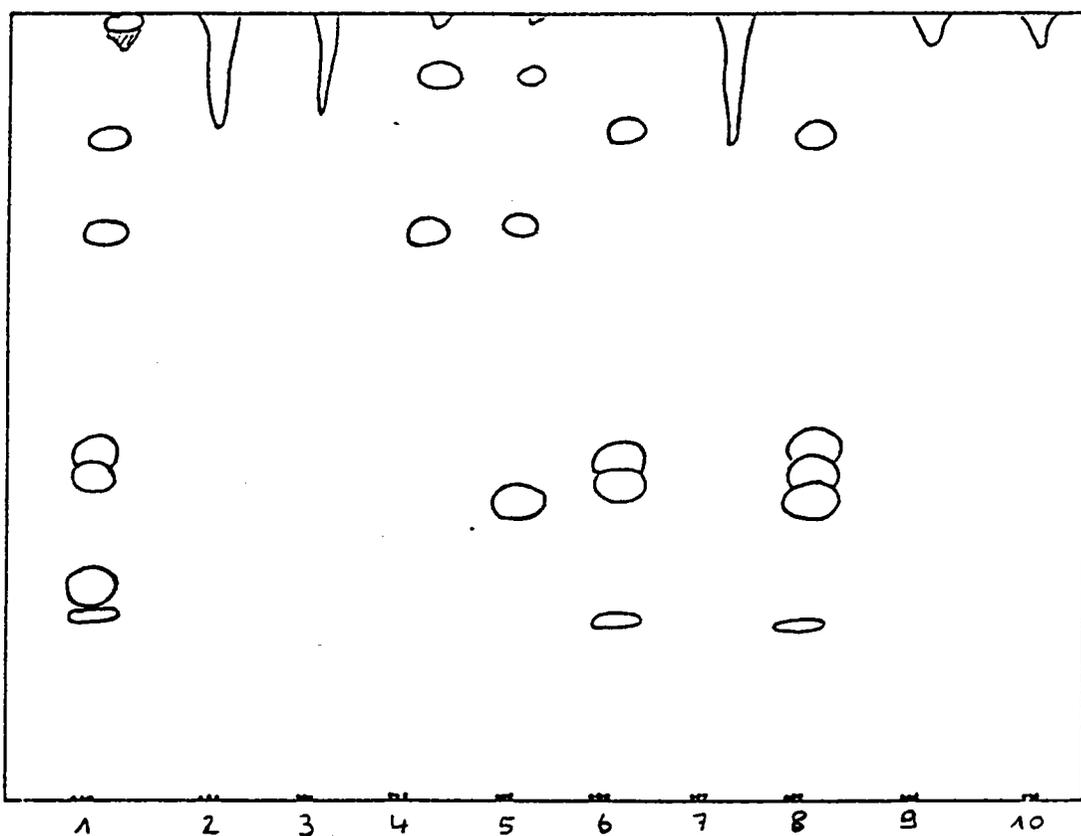
J4: Recherche de composés réducteurs : Soxhlet I et II

- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)

- solvant :

éthyl acétate	100
acide formique	11
acide acétique	11
eau	27

- révélateur : anisaldéhyde / acide phosphomolybdique



1. *R. officinalis* jeunes pousses infusion macération aqueuse
2. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (cire)
3. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (filtrat)
4. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthyl acétate
5. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthanol
6. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I eau
7. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II chloroforme
8. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II eau
9. α amyryne
10. β amyryne

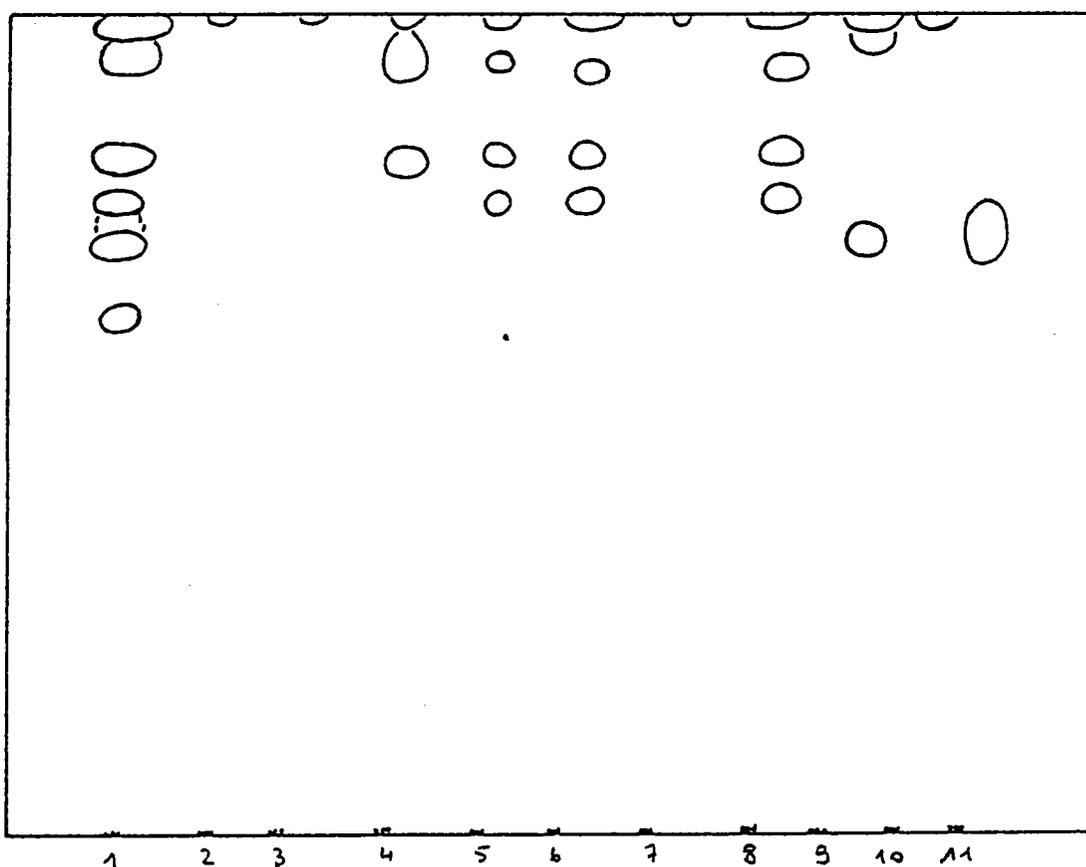
J5 : Recherche de flavonoïdes : Soxhlet I et II

- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)

- solvant :

éthyl acétate	100
acide formique	11
acide acétique	11
eau	27

- révélateur : réactif de Neu + PEG 4000



1. R. officinalis jeunes pousses infusion macération aqueuse
2. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (cire)
3. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (filtrat)
4. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet I éthyl acétate
5. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet I éthanol
6. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet I eau
7. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet II chloroforme
8. R. officinalis jeunes pousses Soxhlet II eau
9. rutine + quercétine + acide rosmarinique
10. acide caféique
11. acide chlorogénique

benzène/acide acétique dans les proportions 99/1 (v/v). La migration est stoppée lorsque le solvant arrive approximativement à 3 cm du bord supérieur de la plaque. Après séchage, on pulvérise une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine à 20 % (m/v). Les plaques sont placées à l'étuve à 120°C pendant 15' puis observées en lumière ultraviolette à 366 nm.

Les chromatogrammes obtenus sont reproduits figure J6. La numérotation des dépôts est identique à celle utilisée lors de la recherche de composés réducteurs. L'extrait obtenu à partir de l'infusion macération de jeunes pousses de romarin et les extraits obtenus par lixiviation aqueuse réalisée lors des deux extractions différentielles par soxhlet ne présentent aucun spot. Les divers extraits chloroformiques donnent le plus grand nombre de taches; celles ci sont d'ailleurs identiquement retrouvées dans ces extraits, en particulier la partie cireuse et le filtrat donnent des profils chromatographiques similaires. Les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol sont également identiques entre eux.

II-4 Soxhlet III

II-4 1 Mode opératoire

Devant ces résultats, une troisième extraction par soxhlet est réalisée (Soxhlet III) utilisant cette fois une séquence chloroforme puis méthanol. 100 g de plante fraîche décongelée sont utilisés, le mode de préparation des jeunes pousses de R.officinalis restant identique à ceux précédemment décrits. Les quantités de lyophilisats obtenues sont les suivants:

4.2 g pour l'extrait chloroformique

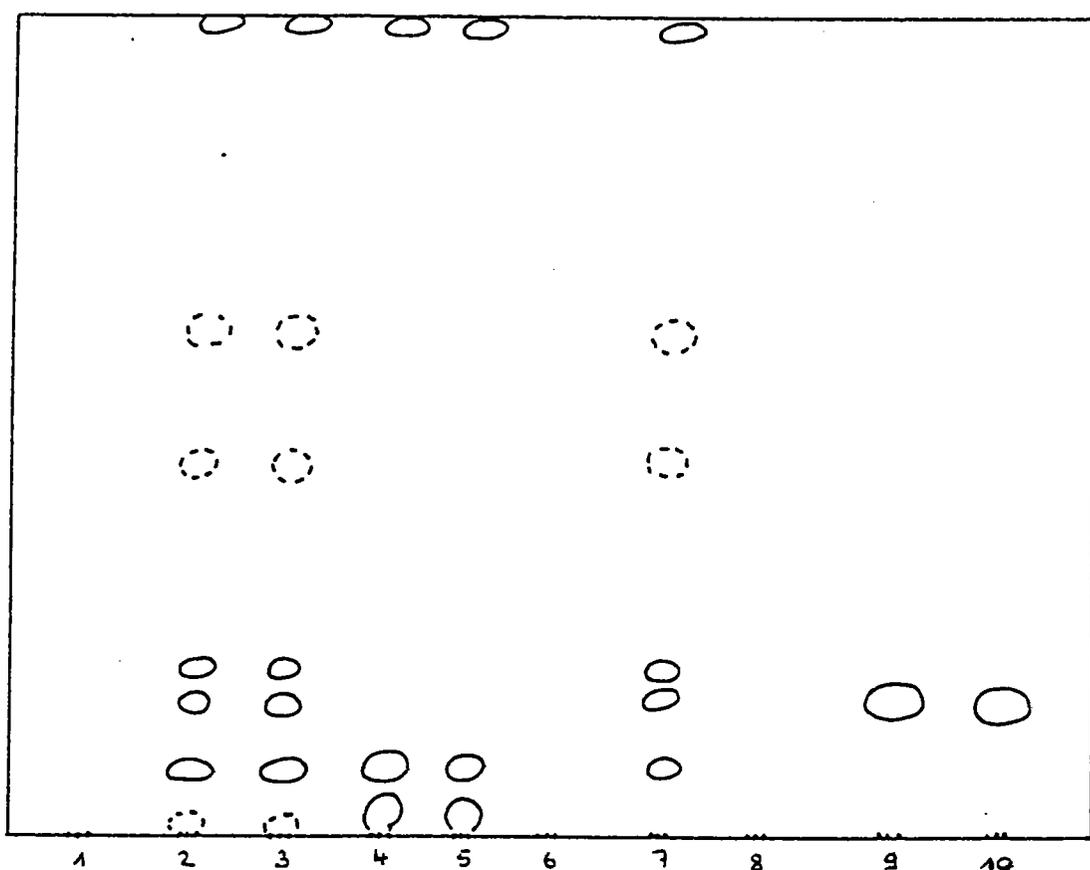
5.6 g pour l'extrait méthanolique

II-4 2 Contrôle pharmacologique

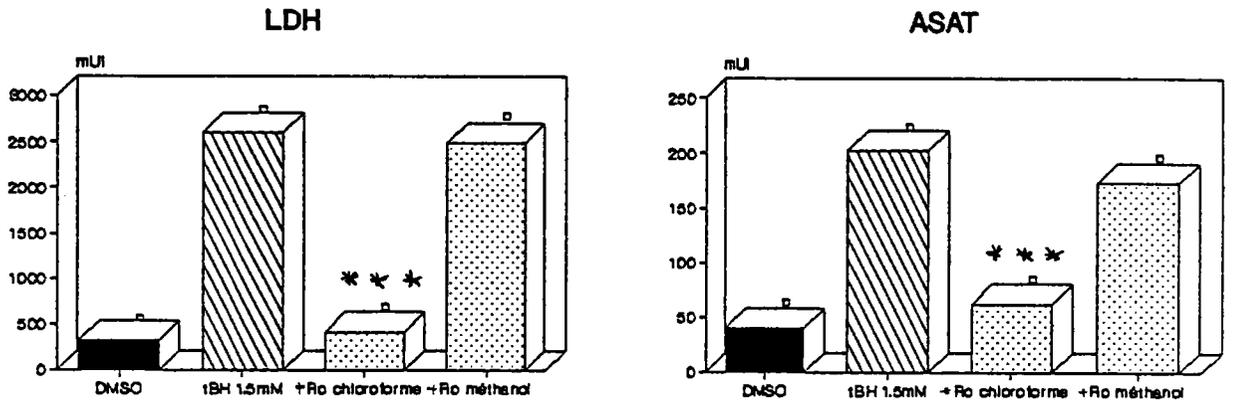
Les extraits obtenus sont testés sur le modèle in vitro, les résultats expérimentaux sont représentés figure J7. A nouveau l'extrait chloroformique montre une activité extrêmement intéressante, s'opposant presque complètement à l'action du *tert*-butyl hydroperoxyde. L'extrait méthanolique étant, quant à lui, peu actif sur le relargage enzymatique et la production de MAD.

J6 : Recherche de triterpènes : Soxhlet I et II

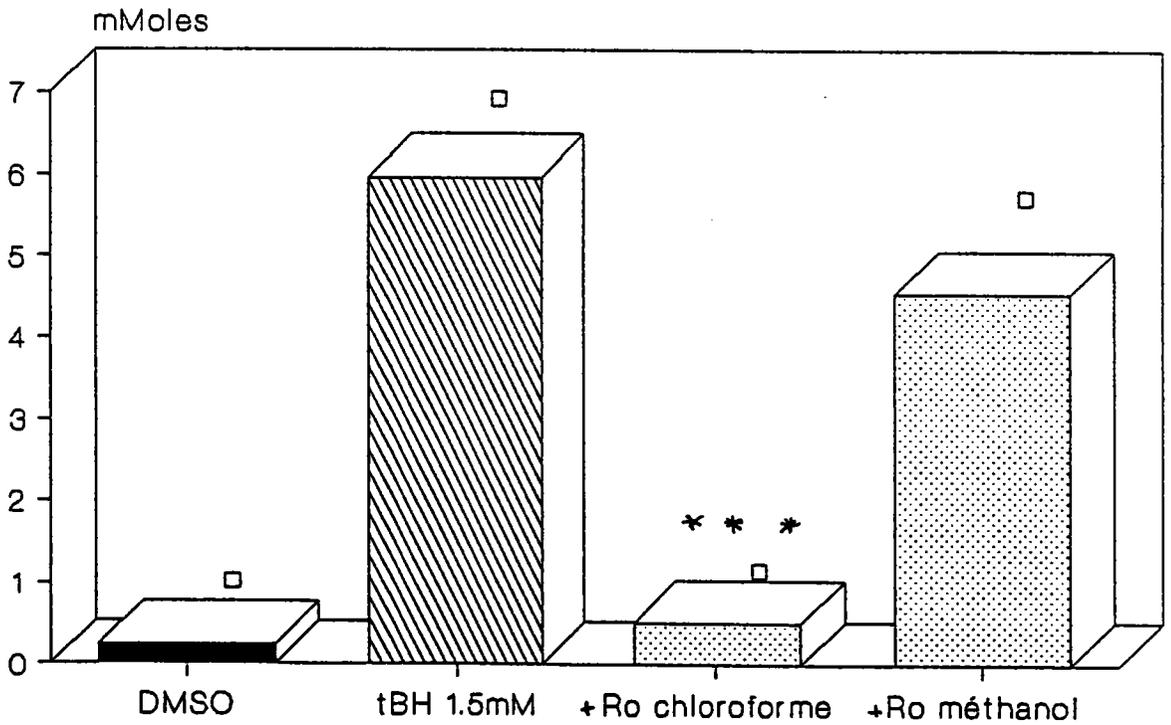
- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)
- solvant : benzène / ac. acétique (99/1)
- révélateur : $SbCl_3$ 20% dans chloroforme



1. *R. officinalis* jeunes pousses infusion macération aqueuse
2. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (cire)
3. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (filtrat)
4. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthyl acétate
5. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthanol
6. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I eau
7. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II chloroforme
8. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II eau
9. α amyryne
10. β amyryne



MAD



J7 : Effets pharmacologiques des différentes fractions soxhlet de *Rosmarinus officinalis* sur hépatocytes isolés, intoxiqués au tBH.

* p<0,05
 ** p<0,01
 *** p<0,001

II-5 Caractérisation chromatographique

II-5 1 Recherche des flavonoïdes

La méthodologie employée est celle décrite précédemment. Le révélateur utilisé est le réactif de NEU. Les extraits issus du Soxhlet I sont comparés à ceux du Soxhlet III (fig. J8).

Les extraits chloroformiques ne montrent aucune tache, on retrouve cependant une bande jaunâtre en front de solvant. L'extrait méthanolique (SIII) présente cinq spots qui sont retrouvés sur les chromatogrammes des extraits à l'éthyl acétate, à l'éthanol et aqueux (SI).

II-5 2 Recherche de triterpènes

Le protocole employé est celui précédemment décrit. Les extraits chloroformiques issus des deux extractions ont des profils chromatographiques identiques (fig. J9). L'extraction méthanolique fait apparaître 2 spots en bas de la plaque et 1 spot dans la partie supérieure; le même profil est obtenu avec les fractions à l'éthyl acétate et à l'éthanol.

II-6 Conclusions et vérifications

L'ensemble de ces résultats fait clairement apparaître :

* la supériorité des extraits chloroformiques par rapport à tous les autres extraits testés, tant sur la formation de malonaldéhyde consécutive à la peroxydation lipidique que sur le relargage enzymatique signant la nécrose cellulaire.

** l'absence apparente, sur les données de la chromatographie sur couche mince, de flavonoïdes dans les extraits chloroformiques et leur présence, dans les extraits sans effet pharmacologique. Cela donne à penser qu'ils n'interviennent pas en tant que support d'activité dans le modèle étudié. L'activité pharmacologique devrait donc en toute logique être portée par des composés révélés par le trichlorure d'antimoine c'est à dire des composés de nature terpénique, stéroïdienne ou caroténoïdienne.

Ces conclusions suscitent deux remarques

* Certains auteurs avaient suspecté que l'activité pharmacologique du romarin reposait sur la présence de certains acides phénols comme l'acide caféique, l'acide chlorogénique et surtout l'acide rosmarinique (Kimura et coll., 1985). Ces substances insolubles ou très peu solubles dans le chloroforme sont entraînées par des solvant tels que l'éthanol, le méthanol ou l'eau.

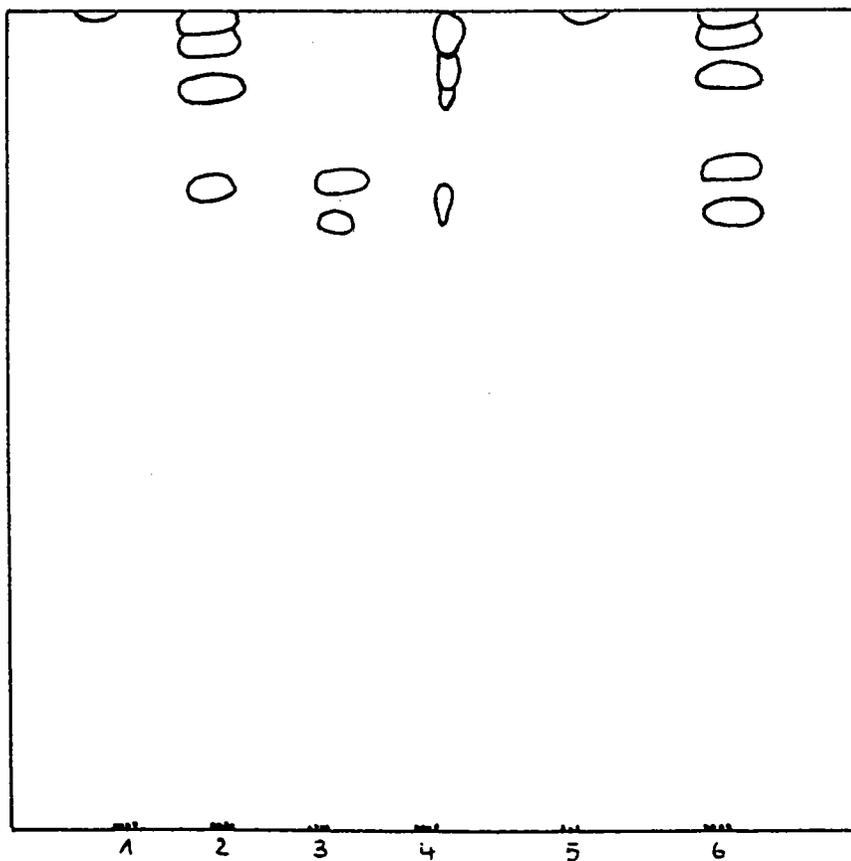
J8 : Recherche de flavonoïdes : Soxhlet III

- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)

- solvant :

éthyl acétate	100
acide formique	11
acide acétique	11
eau	27

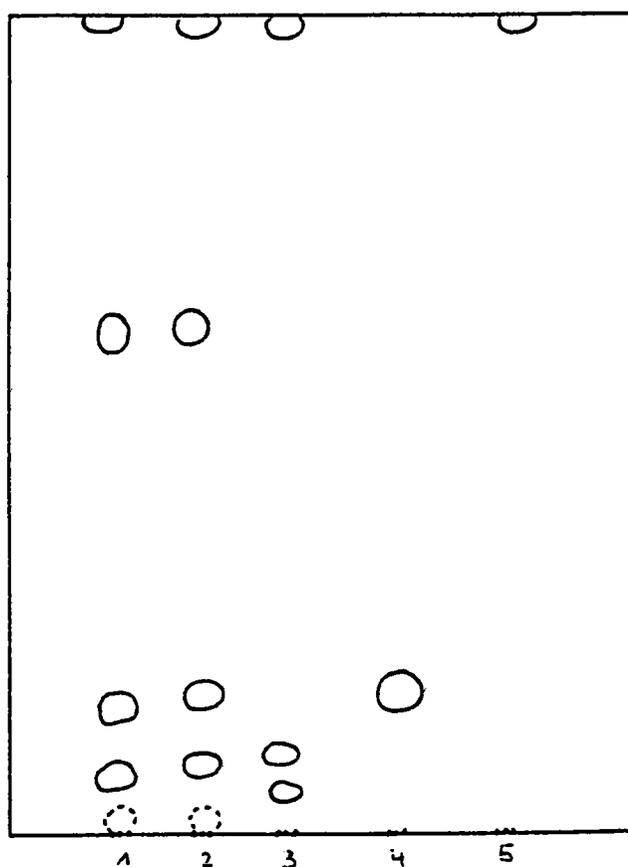
- révélateur : réactif de Neu + PEG 4000



1. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I chloroforme (filtrat)
2. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthyl acétate
3. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I éthanol
4. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet I eau
5. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet III chloroforme
6. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet III méthanol

J9 : Recherche de triterpènes : Soxhlet III

- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)
- solvant : benzène / ac. acétique (99/1)
- révélateur : $SbCl_3$ 20% dans chloroforme



1. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II chloroforme
2. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet III chloroforme
3. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet III méthanol
4. α amyrine
5. β carotène

sauf précision toutes les taches sont rose orange

L'absence d'activité pharmacologique des extraits correspondants nous a amené à tester ces substances pures sur le modèle d'hépatocytes isolés, intoxiqués au *tert*-butyl hydroperoxyde.

Ces composés sont solubilisés dans le DMSO et apportés sous un volume de 20 μ l à la suspension hépatocytaire (DMSO= 0.5% v/v) de sorte que leur concentration finale soit de 100 μ M (env. 15 μ g/ml). L'acide rosmarinique représente 1 à 3% de romarin (poid sec) donc 1 mg de plante sèche/ml correspond à un poids compris entre 10 et 30 μ g d'acide rosmarinique /ml de suspension.

Les résultats expérimentaux concernant l'acide caféique et l'acide chlorogénique sont représentés figure J10. Ni l'un, ni l'autre ne protègent la cellule hépatique intoxiqué par le *tert*-butyl hydroperoxyde. L'acide rosmarinique freine la formation de malonaldéhyde (fig J11) mais reste sans effet sur le relargage enzymatique. Ces substances ne semblent donc pas être responsables de l'activité protectrice apportée par un extrait obtenu par infusion macération.

****** Si l'on considère que des substances de nature terpéniques ou stéroïdiennes sont à l'origine de l'activité pharmacologique, il convient alors de vérifier deux hypothèses

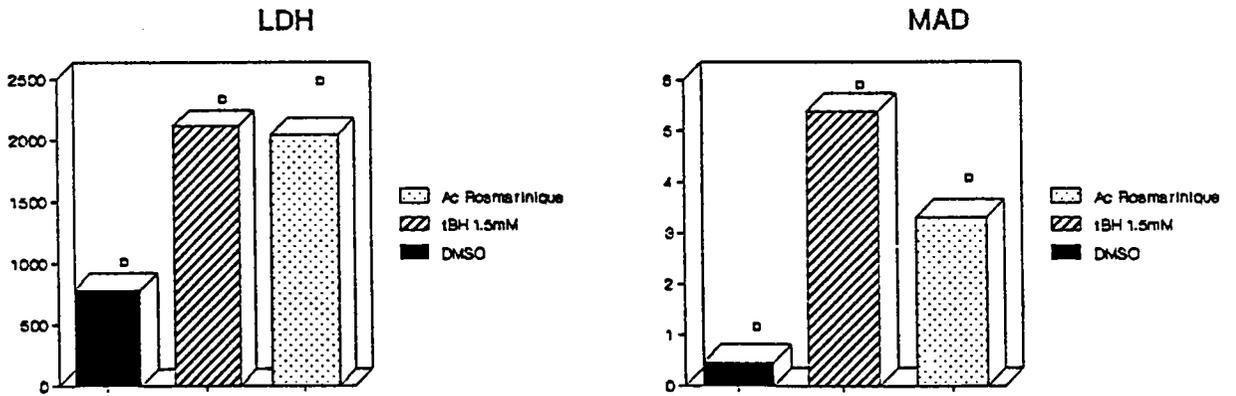
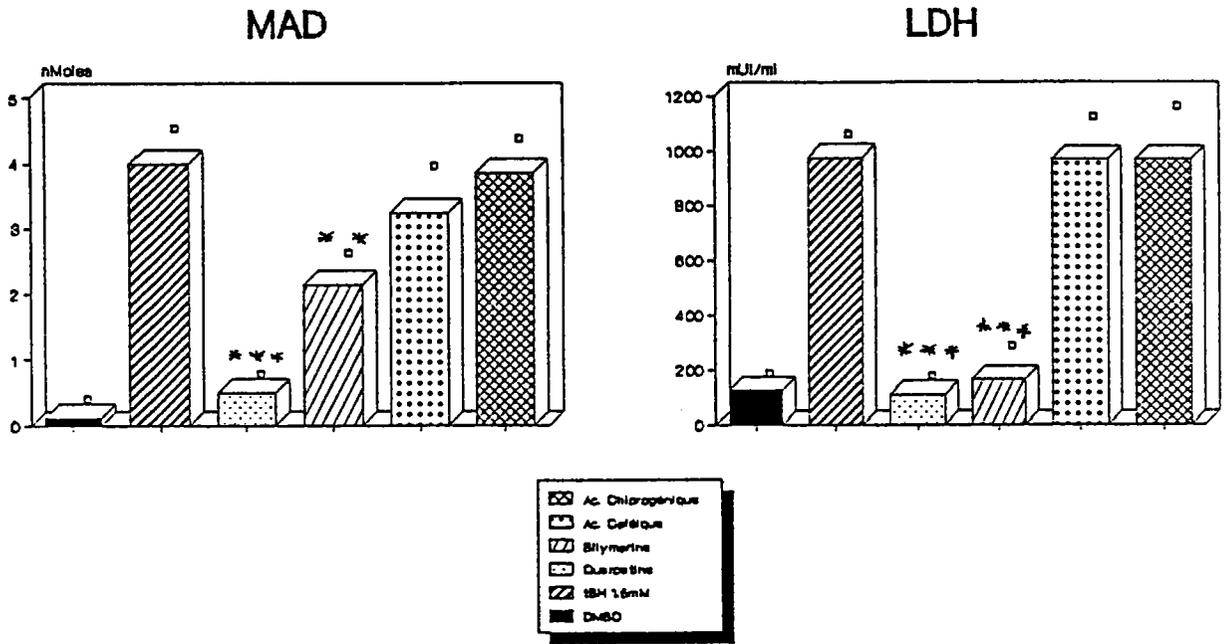
—> le passage de ce type de substance dans l'infusion macération, extrait pharmacologiquement actif car capable d'inhiber la production de MAD et le relargage enzymatique provoqué par le *tert*-butyl hydroperoxyde.

—> l'existence d'une différence d'activité entre l'infusion macération et l'extraction aqueuse au soxhlet après passage de chloroforme qui aura eu pour effet d'entraîner ces composés.

** Recherche de triterpènes dans les extraits aqueux et hydroalcooliques

Mode opératoire : 700 mg de lyophilisat obtenu par infusion macération de jeunes pousses de romarin, à 37°C pendant 4 heures, sont solubilisés dans de l'eau distillée. Une extraction liquide-liquide par du chloroforme est alors réalisée. L'agitation est maintenue pendant une heure. Après un temps de repos, les deux phases sont séparées, concentrées sous vide à 40°C puis lyophilisées. La fraction aqueuse ramène 563.4 mg; la fraction chloroformique ramène 92 mg.

Une extraction au chloroforme (100 ml) a également été réalisée sur 250 ml de teinture mère préparée de manière industrielle (TM Dolisos lot n°10769, TA=62°9, 21 jours de macération). Deux fractions sont séparées, après agitation pendant une heure et mise au repos, puis concentrées sous vide.



J10 (haut) et J11 (bas) : Effets de 100 µM d'acide chlorogénique, d'acide caféique, de silymarine ou de quercétine, sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire, induites par le tBH sur un modèle d'hépatocytes isolés,

* p<0,05
 ** p<0,01
 *** p<0,001

Caractérisation chromatographique : La recherche des triterpènes se fait sur chaque fraction obtenue selon la méthodologie précédemment décrite. Le solvant utilisé pour la migration est le chloroforme, le révélateur le trichlorure d'antimoine. Le dépôt correspondant au soxhlet chloroformique est 20 fois moins concentré que les autres dépôts.

L'extrait chloroformique obtenu par soxhlet (Soxhlet II) donne le nombre de spots le plus élevé (fig. J12). Les fractions aqueuses de l'infusion macération et de la teinture mère ne donnent aucun spot au trichlorure d'antimoine. Par contre pour les fractions chloroformiques, on met en évidence quatre taches en bas de plaque pour la fraction issues de l'infusion macération et un nombre de spots plus élevé pour la fraction issue de la teinture mère. L'infusion macération à 37°C, pendant 4 h, est donc un mode d'extraction qui permet le transfert de composés relativement peu polaires, facilement extraits par le chloroforme lors d'une séparation liquide-liquide secondaire. La présence de ces composés, susceptibles d'être porteurs de l'activité hépatoprotectrice pourrait par conséquent expliquer l'activité pharmacologique de l'extrait réalisé par infusion macération et leur concentration, inférieure à celle retrouvée dans un extrait chloroformique, le niveau de protection plus faible. La présence d'un nombre de taches plus important pour la fraction chloroformique de la teinture mère étant probablement en relation avec le temps d'extraction plus long (21 jours).

** Comparaison de l'activité d'extraits aqueux selon le type d'extraction.

Les figures J13 montrent les résultats obtenus lors de la comparaison de l'activité pharmacologique entre un extrait aqueux réalisé par infusion macération et l'extrait aqueux réalisé par soxhlet après lixiviation au chloroforme (Soxhlet II). Le protocole utilisé lors de l'expérimentation in vitro est celui précédemment décrit. Tous les extraits sont testés à la dose de 1mg plante sèche par ml de suspension. La concentration finale de DMSO est de 0.5% v/v.

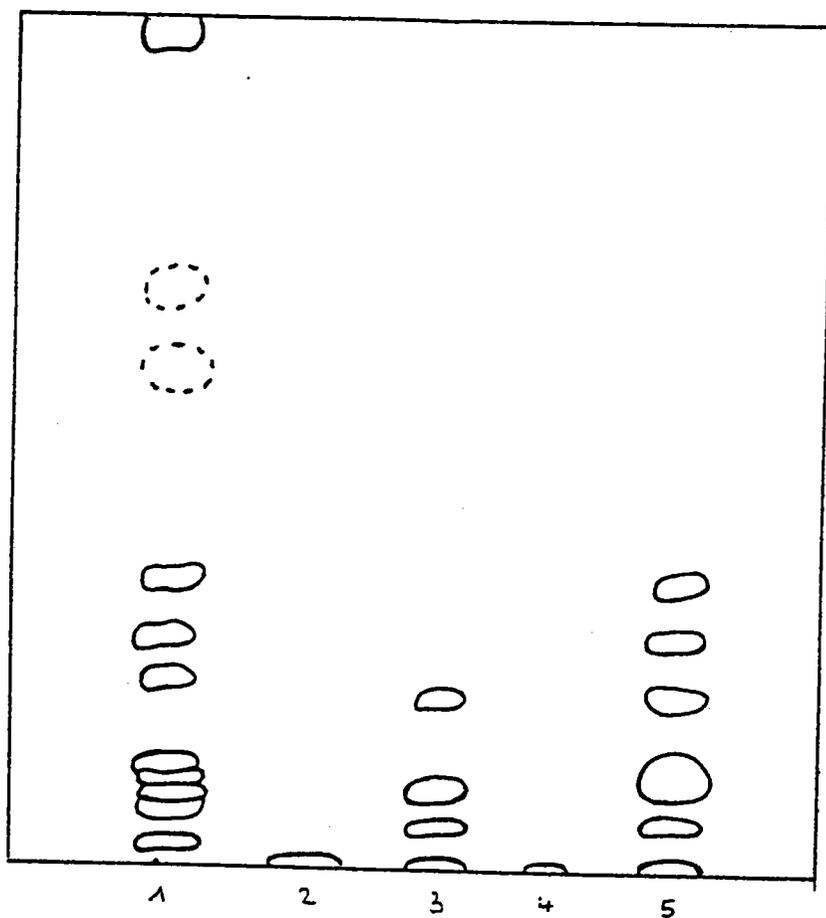
Les résultats montrent, de nouveau, une activité supérieure de l'extrait chloroformique par rapport aux extraits aqueux, tant dans l'inhibition des processus peroxydatifs que de l'atteinte nécrotique. L'effet de l'extrait aqueux issu de l'infusion macération est supérieur à celui de l'extrait obtenu par soxhlet.

Ces résultats accèdent la thèse selon laquelle l'activité hépatotrope du romarin semble être le fait de composés peu polaires.

Au terme de ces études, les extraits chloroformiques de Rosmarinus officinalis apparaissent, sans équivoque, comme les plus performants en terme d'hépatoprotection sur le modèle expérimental retenu. Un fractionnement par chromatographie préparative sur couche mince est alors effectué sur ces extraits dans le but d'obtenir la purification la plus complète possible des principes

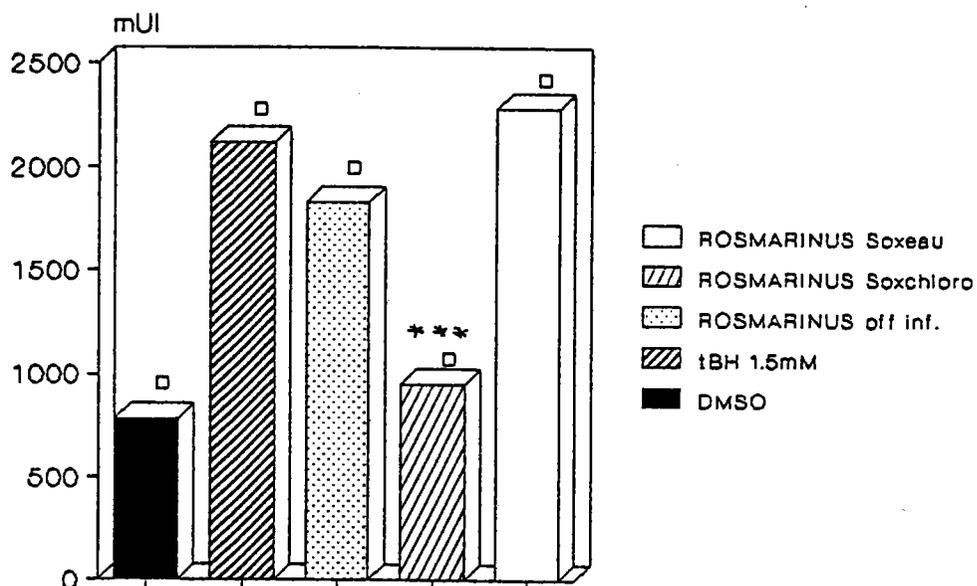
J12: Recherche des triterpènes :

- plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)
- solvant : chloroforme
- révélateur : $SbCl_3$ 20% dans chloroforme

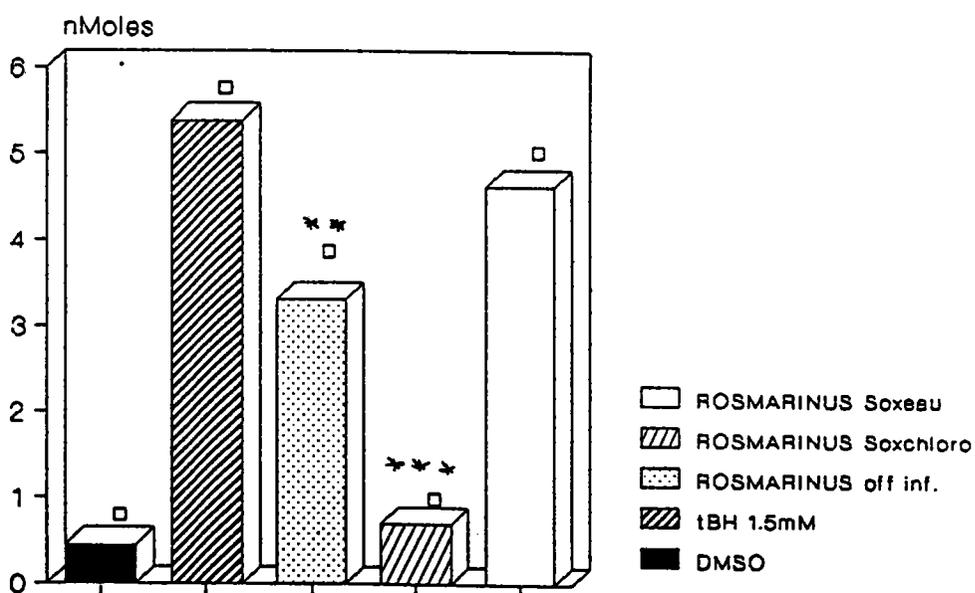


1. extrait chloroformique de Rosmarinus officinalis
2. fraction aqueuse d'une infusion macération aqueuse de R. officinalis
3. fraction chloroformique d'une infusion macération aqueuse de R. officinalis
4. fraction aqueuse d'une teinture mère de R. officinalis
5. fraction chloroformique d'une teinture mère de R. officinalis

LDH



MAD



J13 : Effets des extraits aqueux de Rosmarinus officinalis obtenus par infusion macération et par soxhlet, sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire, induites par le tBH.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

actifs. Il est réalisé à partir de l'extrait chloroformique Soxhlet II de jeunes pousses de Rosmarinus officinalis.

III Fractionnement de l'extrait chloroformique par chromatographie préparative

** Méthodologie générale

La veille des fractionnements, des plaques de verre (20x20), propres et dégraissées, sont recouvertes de 0.5 mm d'un mélange de gel de silice G60 Merck (45g) et d'eau distillée (90g), à l'aide d'un applicateur de Stahl. Les plaques sont séchées à l'air puis à l'étuve à 100°C pendant 2 heures. Les plaques sont passées à l'étuve pendant une heure, à 100°C, juste avant utilisation.

Le choix du solvant de migration est guidé à chaque nouvelle chromatographie préparative par les migrations précédentes; le premier solvant utilisé est le chloroforme. Après migration du solvant sur 15 cm, les plaques sont retirées puis séchées à l'air. Différentes zones de migration sont alors individualisées afin de réaliser un contrôle pharmacologique permettant d'orienter les fractionnements ultérieurs.

III-1 Fractionnement primaire

III-1 1 Mode opératoire

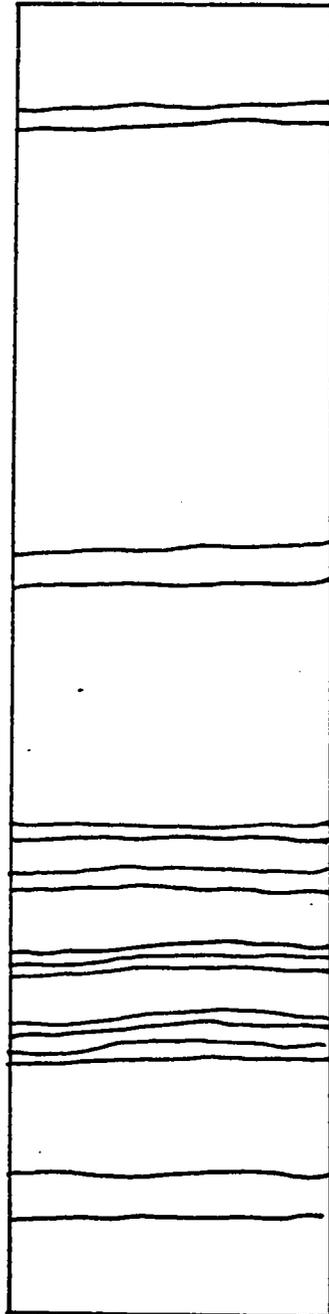
50 mg de lyophilisat de l'extrait chloroformique Soxhlet II sont solubilisés dans 1 ml de chloroforme puis déposés (0.1 ml/cm) sur la plaque de silice à l'aide d'un applicateur de Firmenicht. Le solvant utilisé est le chloroforme. Après migration, les plaques sont retirées de la cuve puis séchées à l'air. Une des plaques est utilisée pour la recherche des composés terpéniques à l'aide d'une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine à 20%. L'autre sert à la poursuite du fractionnement. Les figures J14 montrent les bandes obtenues en lumière naturelle d'une part et en UV, à 366 nm, après pulvérisation du révélateur et passage à l'étuve à 120°C d'autre part. Du fait de l'utilisation d'une quantité de drogue plus importante que lors de la réalisation des chromatogrammes précédents, le nombre de bandes visibles est beaucoup plus important, celles-ci sont regroupées de manière à individualiser six zones (Fig.J14)

- une zone dépôt, correspondant à l'endroit où le dépôt a été effectué
- 4 zones de migration numérotées de 1 à 4 de bas en haut de la plaque.
- une zone témoin située en dessous de la zone dépôt est également individualisée.

Chaque zone est délicatement grattée du support en verre et la silice est placée dans des erlenmeyers de 25 ml. Deux lavages successifs, avec 20 ml de

Visible

U.V. 360nm
révélateur SbCl₃



Front de solvant :

chloroforme

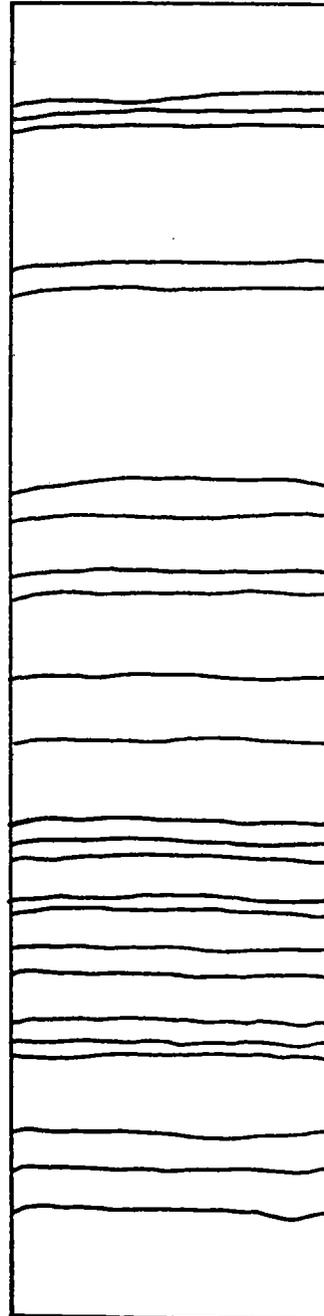
zone 4

zone 3

zone 2

zone 1

zone dépôt



chloroforme sous agitation magnétique, sont réalisés. Après chaque lavage une centrifugation est effectuée pour séparer le surnageant de la silice; un troisième lavage est effectué avec 20 ml de méthanol, plus polaire, et après centrifugation, le surnageant méthanolique est ajouté aux surnageants chloroformiques déjà obtenus. Chaque fraction est alors concentrée sous vide à 40°C jusqu'à un volume de 1 à 2 ml puis versée dans un tube à hémolyse en verre où elle sera conservée après évaporation à sec à température ambiante sous un courant d'azote.

III-1 2 Caractérisation chromatographique

Un contrôle chromatographique est alors effectué et comparé à celui de l'extrait chloroformique Soxhlet II de départ. Deux systèmes de solvants sont utilisés, le chloroforme d'une part et un solvant, d'éluion plus importante, constitué par un mélange chloroforme - méthanol dans les proportions de 95/5. Les figures J15 montrent les spots obtenus, en lumière UV, après pulvérisation du trichlorure d'antimoine et passage à l'étuve. Les différents spots de l'extrait chloroformique de départ sont retrouvés dans les zones 1 à 4. La zone de dépôt et la zone témoin ne présentent aucun spot avec ce système révélateur.

III-1 3 Contrôle pharmacologique

Les différentes fractions obtenues sont ensuite testées sur hépatocytes isolés, intoxiqués au tBH (1,5 mM), après avoir été solubilisées dans le DMSO de telle sorte que la concentration finale par ml de suspension hépatocytaire corresponde à la quantité de fraction contenue dans 1 mg de plante sèche. Le nombre de fractions individualisées par chromatographie a volontairement été restreint pour pouvoir apprécier l'action pharmacologique des différentes fractions simultanément et ainsi comparer leurs activités sur des populations cellulaires en tous points homogènes. Chaque expérimentation est effectuée au moins deux fois. L'effet protecteur sur la nécrose cellulaire est apprécié en terme de LDH relarguée, l'activité antilipoperoxydante par la diminution de la MAD formée.

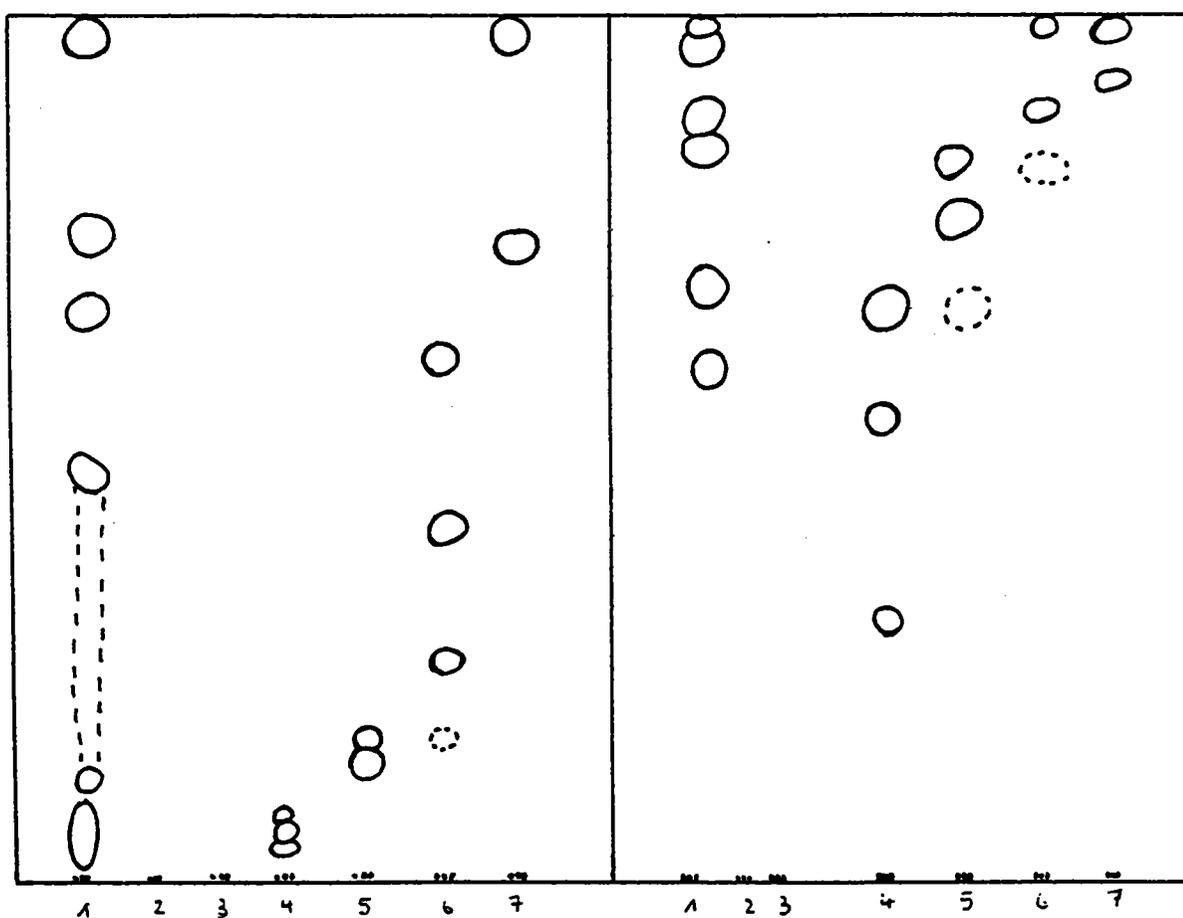
Les figures J16 résument l'activité des zones issus de ce premier fractionnement. La zone témoin sans effet pharmacologique, n'est pas représentée sur les graphes. L'extrait chloroformique de départ (Soxhlet II) utilisé à la dose de 1mg de plante sèche par ml de suspension sert de témoin. La fuite enzymatique est bien freinée par les fractions dépôt, 1, 2 et 3. La zone 4, la plus éluee, est inactive. La sensibilité de la MAD est plus grande, pour toutes les expérimentations les zones ayant le moins migrées (dépôt et zone 1) présentent l'activité la plus importante. Celle-ci est d'ailleurs comparable à celle de l'extrait chloroformique témoin. A la vue de ces résultats le fractionnement se poursuit à partir de la zone dépôt et de la zone 1.

J15 : Recherche de triterpènes

- plaque de silice Kieselgel G60 (Merck)
- révélateur : SbCl_3 20 % dans chloroforme
- solvant :

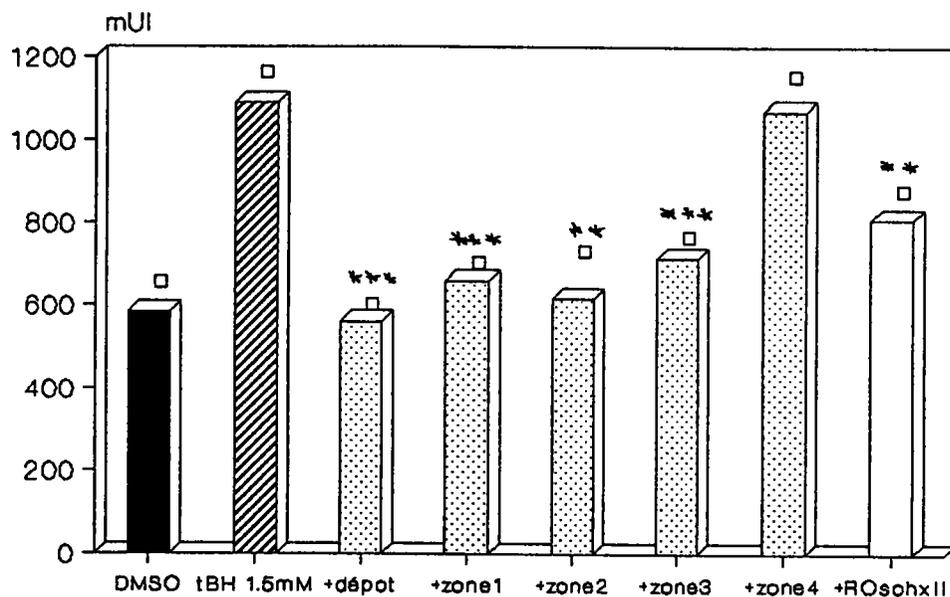
Chloroforme

Chloroforme / Méthanol (95/5)

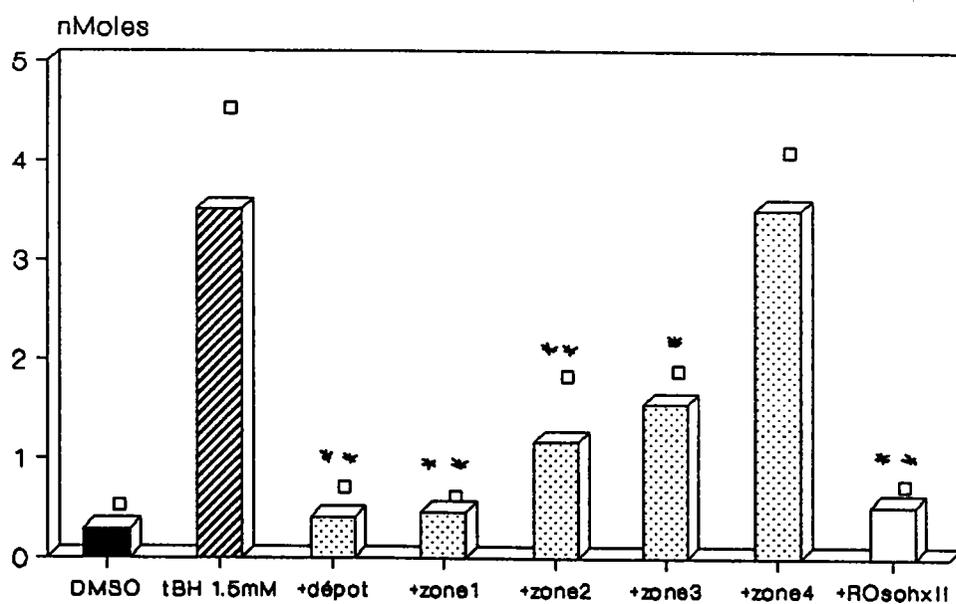


1. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II chloroformique de départ
2. Zone témoin
3. Zone dépôt
4. Zone 1
5. Zone 2
6. Zone 3
7. Zone 4

LDH



MAD



J16 : Contrôle pharmacologique du fractionnement primaire d'un extrait chloroformique de jeunes pousses de R. officinalis

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

III-2 Fractionnement de la zone dépôt

III-2 1 Mode opératoire

La fraction dépôt est solubilisée dans 1 ml de chloroforme puis déposée en bande à l'aide d'un applicateur manuel sur des plaques préparées selon le protocole précédemment décrit. Le solvant utilisé est un mélange chloroforme-méthanol dans les proportions 90/10 v/v afin d'augmenter la force d'élution par rapport à la séparation précédente. La migration est stoppée lorsque le front de solvant a parcouru 15 cm, la plaque est alors séchée et observée en lumière naturelle. Comme précédemment cinq zones sont individualisées, certaines zones regroupant plusieurs bandes comme l'indique la figure J17. Ces zones numérotées de D1 à D5, de bas en haut de la plaque, sont grattées de leur support en verre, placées dans des erlenmeyers et subissent deux lavages au chloroforme suivis d'un lavage au méthanol selon les conditions précédemment décrites. Concentrées sous vide, les fractions sont ensuite placées dans des tubes à hémolyse et évaporées à sec.

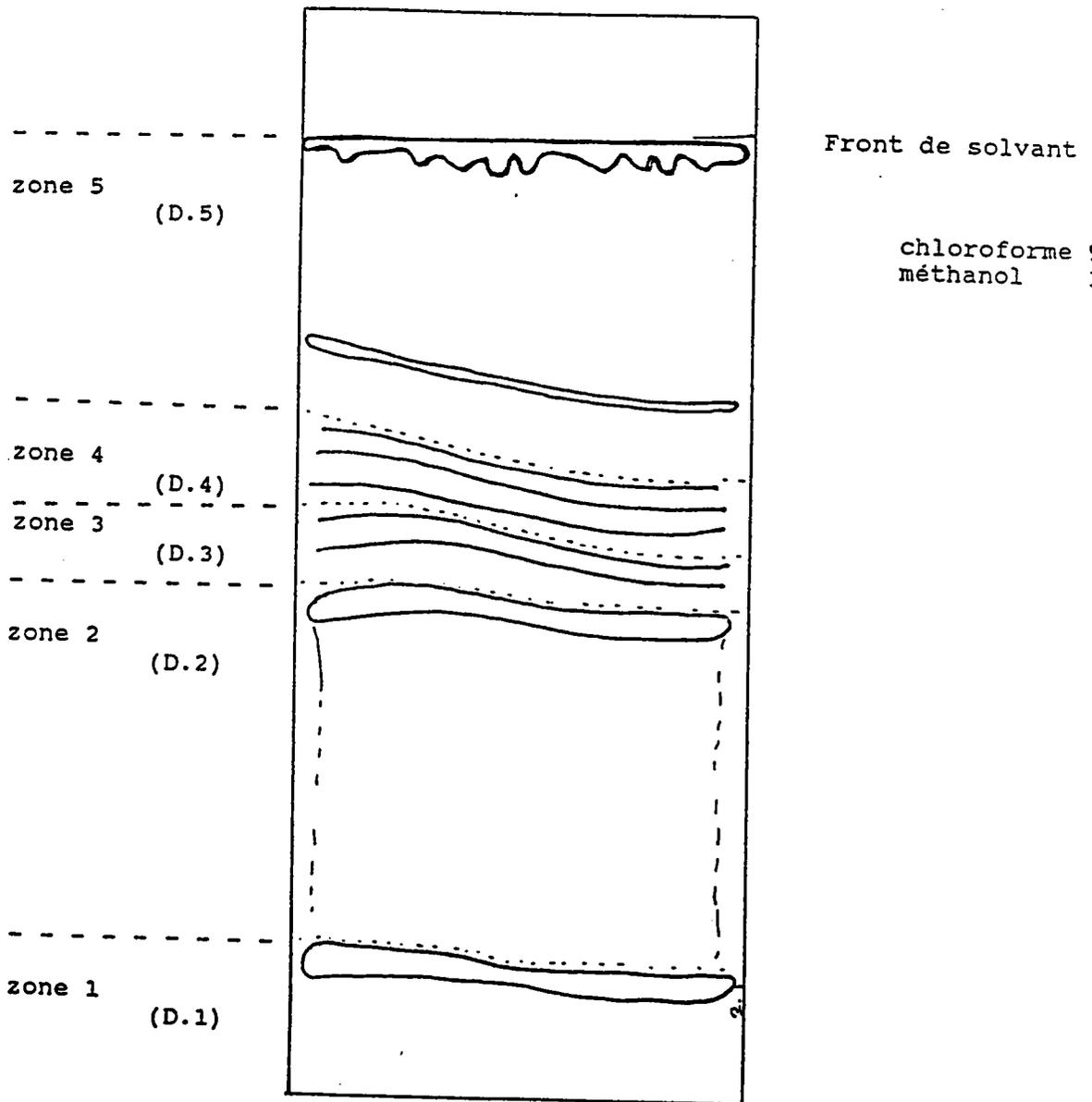
III-2 2 Contrôle pharmacologique

Les résultats expérimentaux sur hépatocytes isolés, intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde sont reproduits figures J18. L'extrait de départ (zone Dépôt) est testé simultanément pour servir de référence. L'activité sur les phénomènes peroxydatifs et les phénomènes nécrotiques est retrouvée pour le témoin dépôt. Par contre les différentes fractions ne présentent aucune activité pharmacologique. La tentative de purification de cette fraction est arrêtée à ce stade.

III-3 Fractionnement de la zone 1

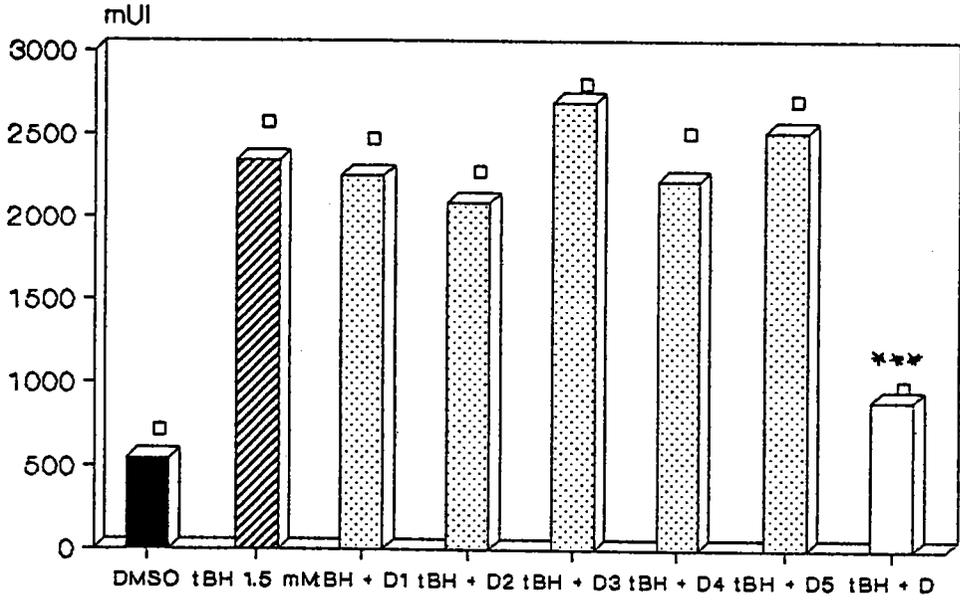
III-3 1 Mode opératoire

La fraction zone 1 est solubilisée dans 1 ml de chloroforme avant d'être déposée selon le protocole précédemment décrit. Le solvant utilisé est une solution chloroforme - méthanol (90/10). Comme pour la zone dépôt, cinq zones sont individualisées (fig. J19), certaines zones regroupant plusieurs bandes. Ces zones sont numérotées de 1.1 à 1.5 de bas en haut de la plaque, elles sont grattées, lavées deux fois au chloroforme puis une fois au méthanol. Les fractions sont concentrées sous vide, puis évaporées à sec dans des tubes à hémolyse.

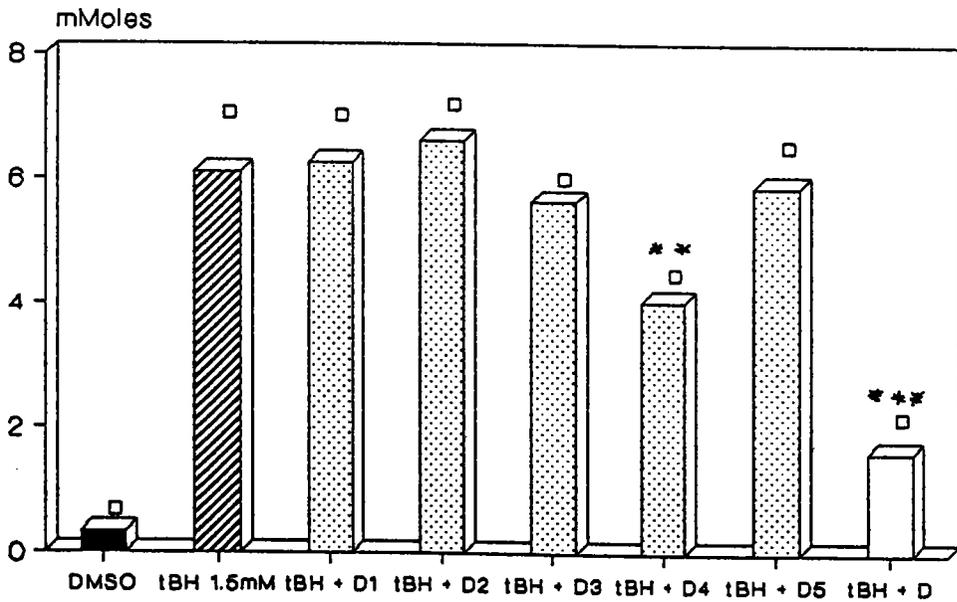


J17: FRACTIONNEMENT DE LA ZONE DEPOT

LDH



MAD

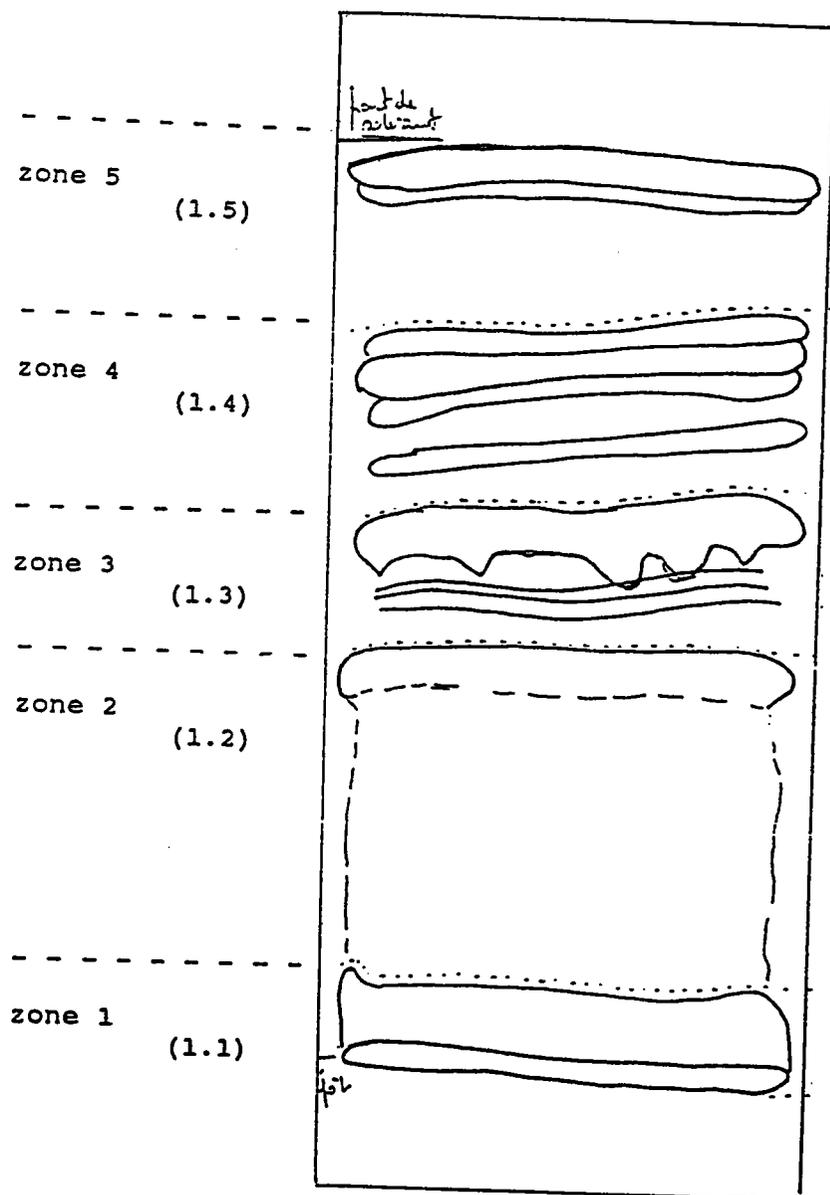


J18 : Contrôle pharmacologique du fractionnement de la zone dépôt de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de R. officinalis (Soxhlet II).

* p<0,05

** p<0,01

*** p<0,001



J19: FRACTIONNEMENT DE LA ZONE 1

III-3 2 Contrôle pharmacologique

Les test in vitro réalisés sur ces fractions sont résumés par les figures J20. La zone 1 de départ est utilisée comme témoin, elle inhibe l'intoxication franche apportée par le tert butyl hydroperoxyde. Les zones 1.1 et 1.5 sont totalement inactives, la zone 1.2 présente une activité moyenne tant sur le relargage enzymatique signant la nécrose cellulaire que sur la formation de MAD; Les zones 1.3 et 1.4 conservent une activité importante et sont, à leur tour, purifiées par chromatographie préparative en couche mince.

III-4 Fractionnement de la zone 1.3

III-4 1 Mode opératoire

Après solubilisation de la fraction 1.3, le protocole utilisé est identique a ceux précédemment décrits. Le solvant de migration contient 85% de chloroforme et 15% de méthanol afin d'augmenter le pouvoir éluant. Après migration et séchage, 9 zones sont individualisées, numérotées de 1.3.1. à 1.3.9 de bas en haut de la plaque (fig J21). Chaque zone est grattée puis lavée au chloroforme et au méthanol, les surnageants concentrés sous vide et évaporés à sec selon les conditions déjà citées.

III-4 2 Contrôle pharmacologique

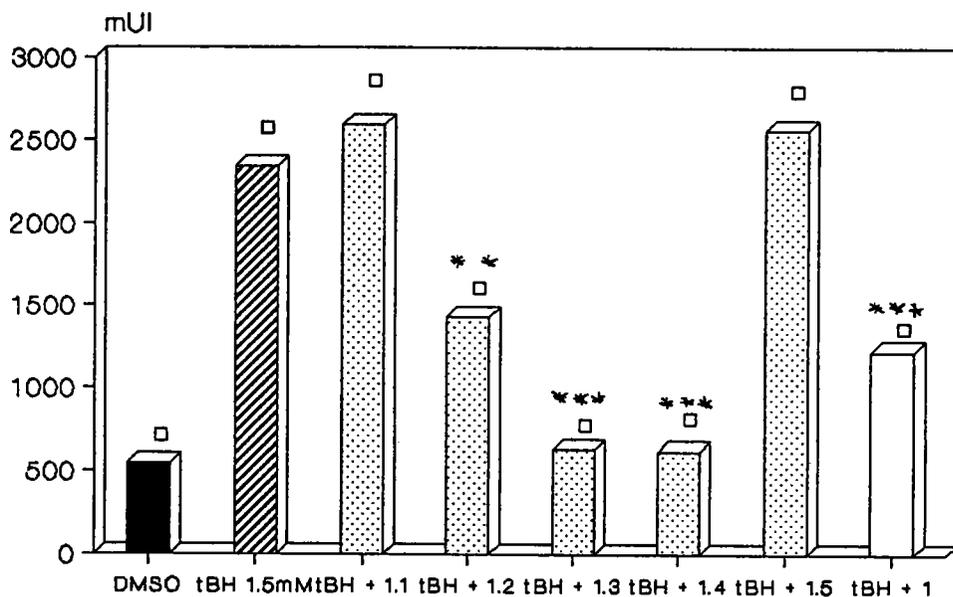
L'activité pharmacologique tant sur la MAD que sur la LDH (fig J22) est retrouvée sans discussion pour la fraction 1.3 de départ servant de référence. Par contre la purification a dilué l'activité de telle sorte qu'aucune fraction ne présente un effet pharmacologique notable. La tentative de purification pour ces fractions est naturellement arrêtée à ce stade.

III-5 Fractionnement de la zone 1.4

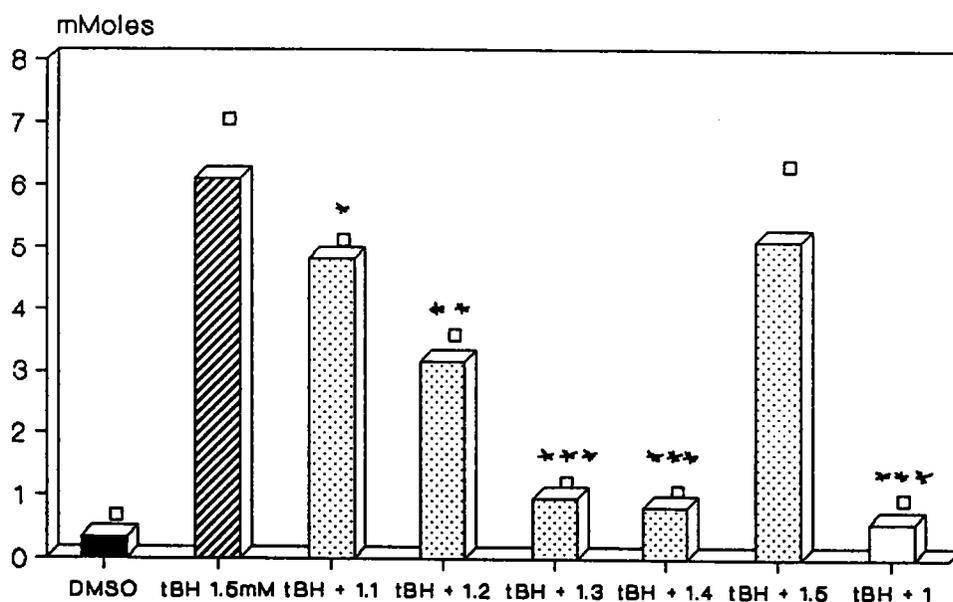
III-5 1 Mode opératoire

La fraction 1.4 est solubilisée dans 1 ml de chloroforme et déposée sur une plaque selon la procédure habituelle. Du fait de la position de la zone 1.4 lors de la séparation précédente, un solvant moins éluant, constitué d'un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle (85/15 v/v), est utilisé. Lorsque le solvant a parcouru 15 cm, la plaque est retirée et séchée. Après séchage on constate que la moitié inférieure de la zone de migration est de couleur ocre et qu'il n'y apparaît aucune bande clairement individualisée. On effectue alors une seconde migration jusqu'à la première bande visible lors de la première migration (fig.J23) à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol (90/10 v/v).

LDH



MAD

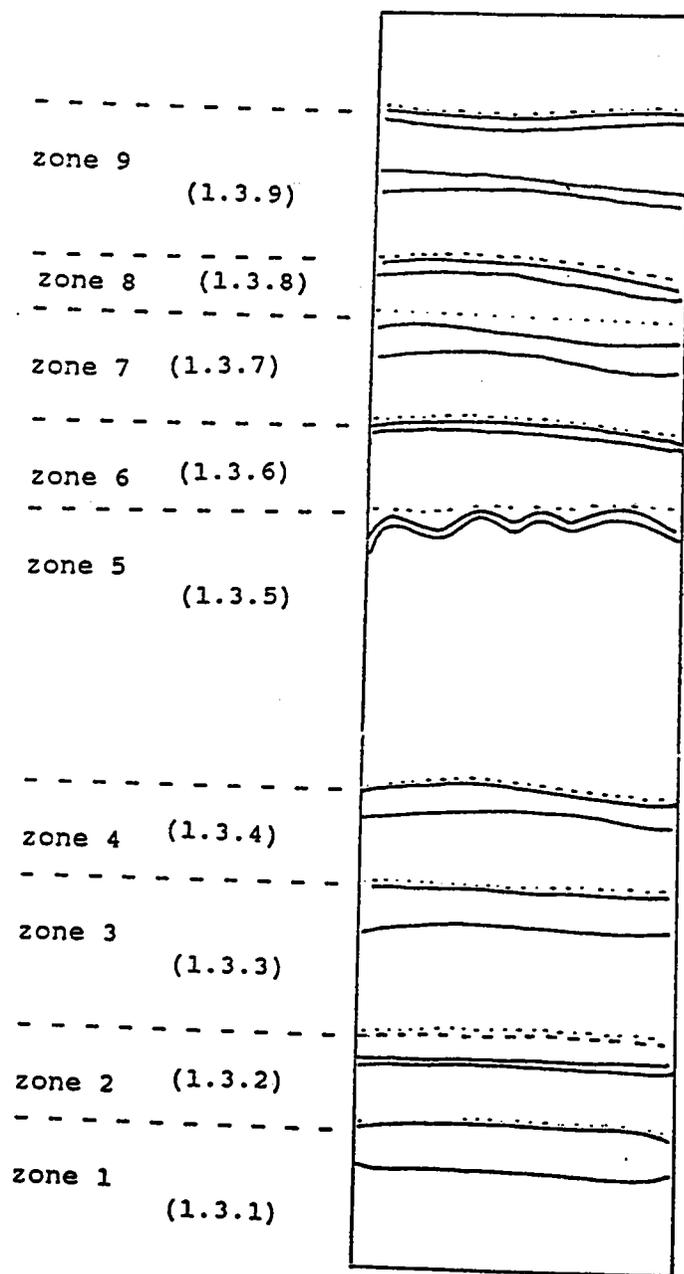


J20 : Contrôle pharmacologique du fractionnement de la zone 1 de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de *R. officinalis* (Soxhlet II).

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

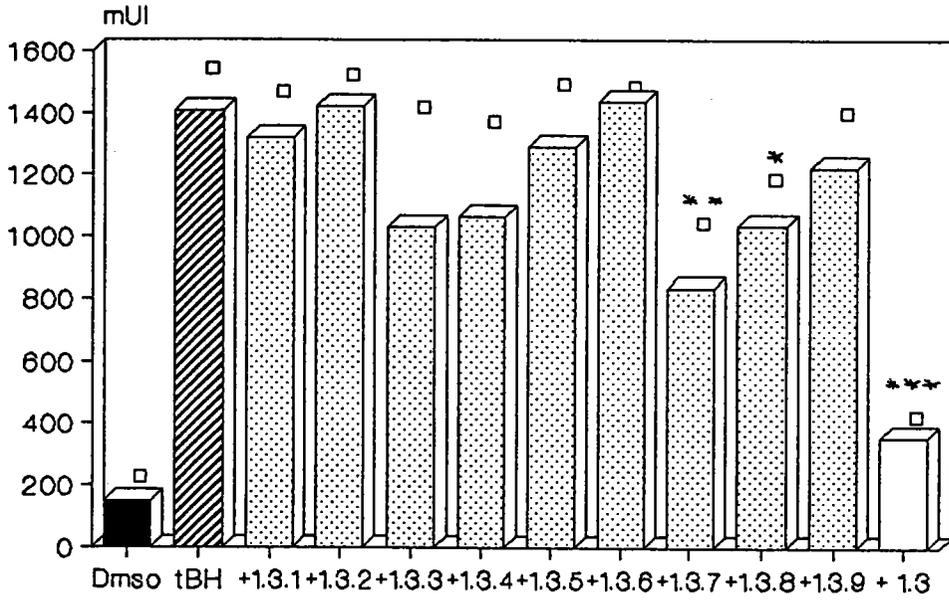
*** $p < 0,001$



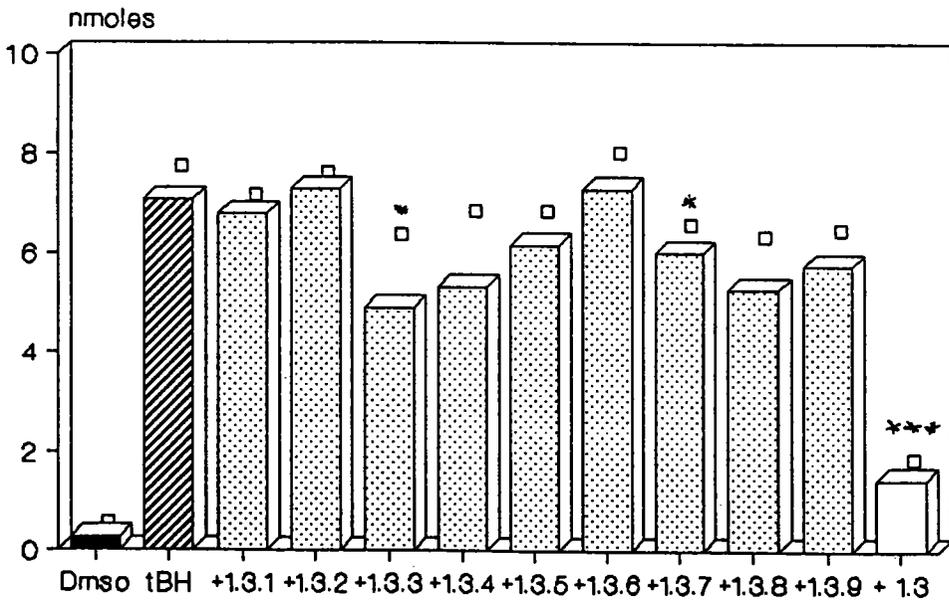
Front de solvant :

chloroforme 85
méthanol 15

LDH



MAD



J22 : Contrôle pharmacologique du fractionnement de la zone 1.3 de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de *R. officinalis* (Soxhlet II).

- * p<0,05
- ** p<0,01
- *** p<0,001

Après séchage, la plaque est divisée en six zones numérotées de 1.4.1 à 1.4.6 de bas en haut. On applique alors à chacune de ces zones la procédure de lavage et d'élimination des solvants déjà indiquée.

III-5 2 Contrôle pharmacologique

Afin d'être testée expérimentalement, chacune des zones est reprise par du DMSO de telle sorte que la quantité finale / ml de suspension hépatocytaire corresponde à 1 mg de plante sèche. La fraction 1.4 de départ sert de référence, elle inhibe les phénomènes peroxydatifs et nécrotiques induits par le tert-butyl hydroperoxyde de manière très significative (fig.J24). La fraction 1.4.2 reste très active, surtout sur le relargage enzymatique. La fraction 1.4.3 présente une activité moins importante, les quatre autres fractions sont inefficaces. Devant la faible quantité de fraction 1.4.2, la purification est arrêtée à ce stade et il est décidé de tenter d'identifier les composants de cette fraction.

IV Tentative d'identification de la fraction 1.4.2.

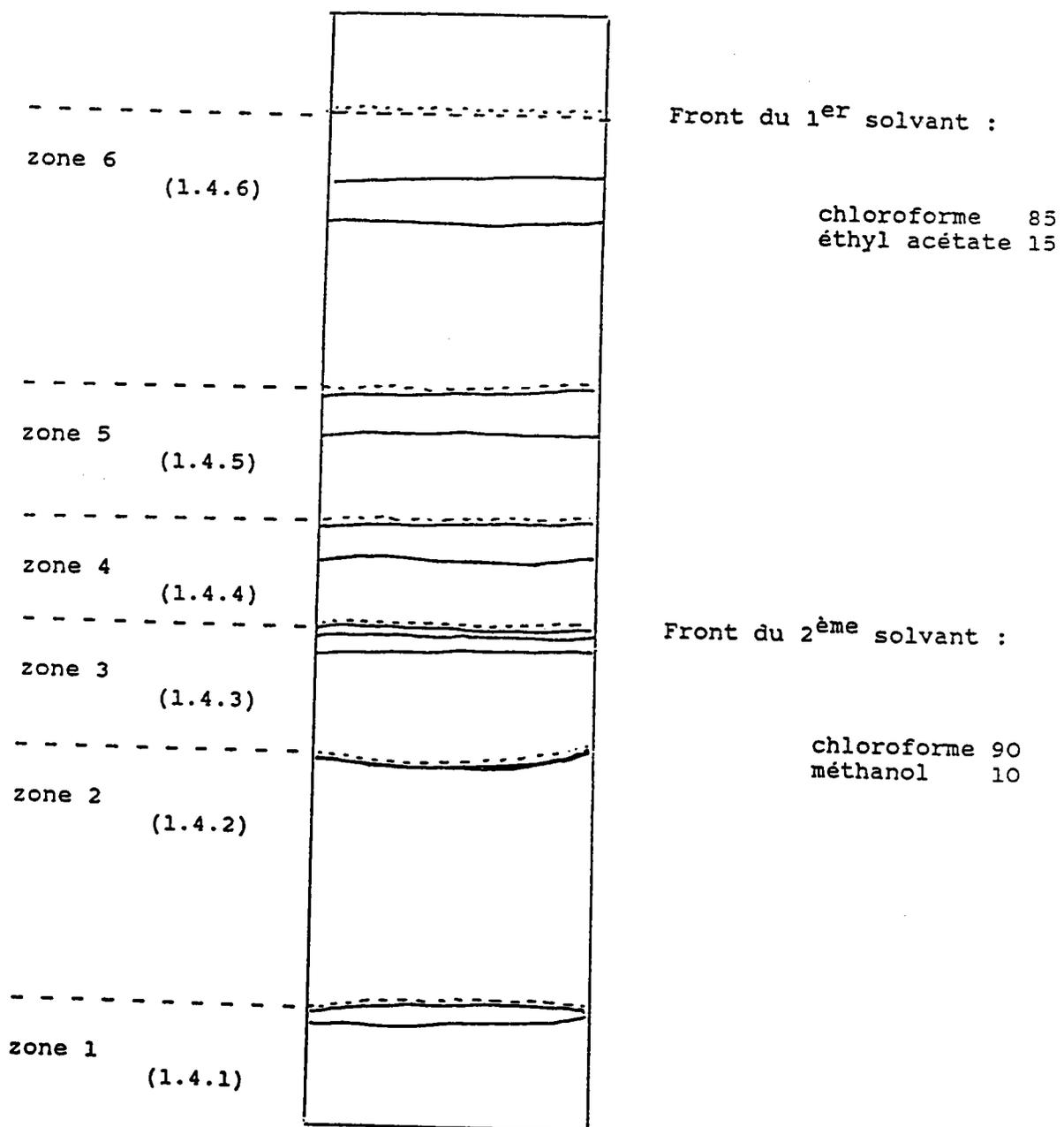
IV-1 Chromatographie en couche mince sur la fraction 1.4.2

IV-1 1 Identification de la fraction 1.4.2 par le trichlorure d'antimoine

Le dépôt de la fraction 1.4.2 est réalisé sur une plaque recouverte de silice Kieselgel G60 Merck. L'acide ursolique, l'acide oléanolique, l' α amyryne et la β amyryne sont utilisés comme témoins. Ces substances, déjà isolées dans les parties aériennes de R. officinalis (Brieskorn et coll.,1953; Sendra et coll.,1969), étant susceptibles d'être extraites par les systèmes de solvants utilisés. Le solvant de migration est un mélange chloroforme-méthanol dans des proportions de 90/10. Le révélateur est le trichlorure d'antimoine à 20% dans le chloroforme. La lecture se fait à 366 nm, après passage à l'étuve à 120°C pendant 10'. L'acide ursolique, l'acide oléanolique, l' α amyryne donnent des spots jaunâtres (fig.J25). Le spot de la β amyryne, situé au même niveau que celui de l' α amyryne est plus orangé. La fraction 1.4.2 donne un spot, situé au niveau de ceux des acides oléanolique et ursolique mais de coloration plus ocre.

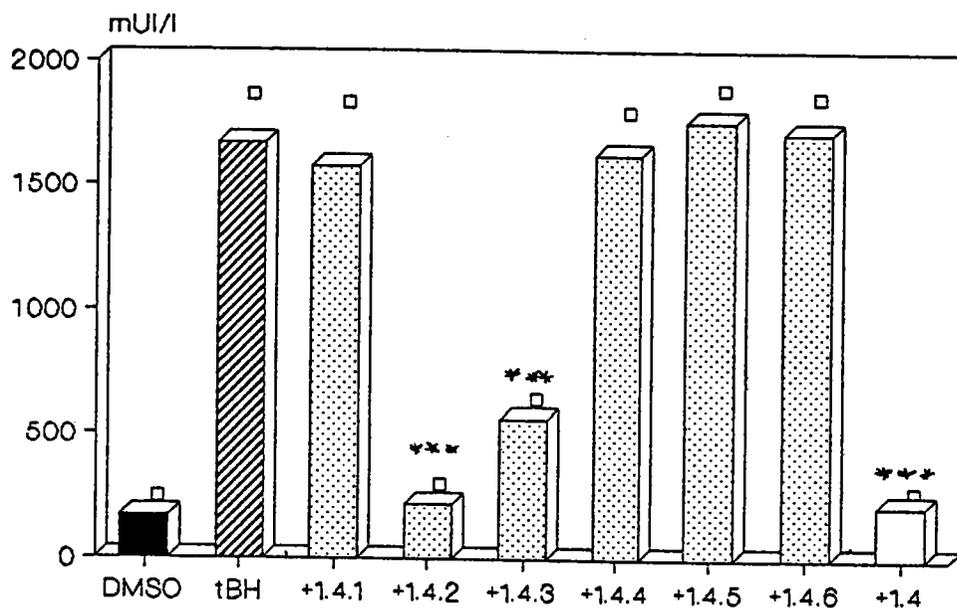
IV-1 2 Identification de la fraction 1.4.2 par le sulfate de cérium

Le support, les témoins et le solvant de migration sont identique à ceux décrit au paragraphe précédent. Le révélateur est un mélange sulfate de cérium - acide sulfurique (d=1,84) et recherche d'éventuels dérivés du tocophérol. On retrouve les mêmes spots de couleur orangée pour l'acide

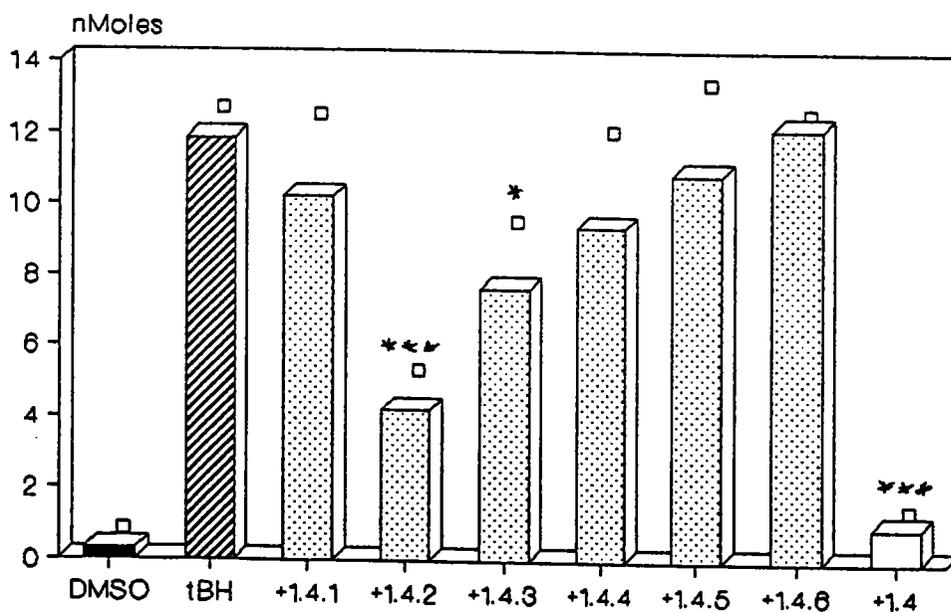


J23 : FRACTIONNEMENT DE LA ZONE 1.4

LDH



MAD



J24 : Contrôle pharmacologique du fractionnement de la zone 1.4 de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de *R. officinalis* (Soxhlet II).

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

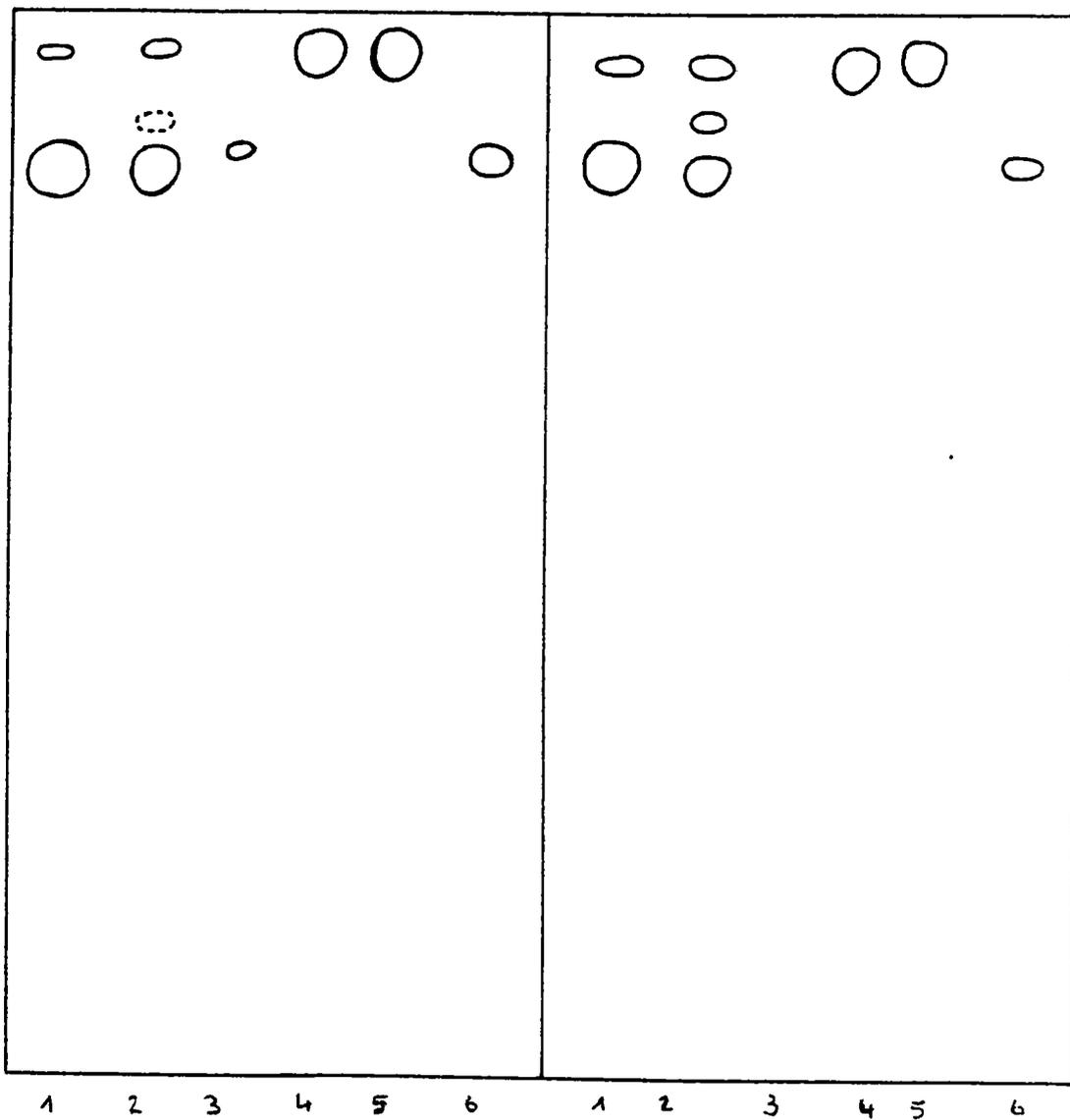
*** $p < 0,001$

J25 et J26 : Caractérisation de la fraction 1.4.2.

- plaque de silice Kieselgel G60 (Merck)
- solvant : chloroforme / méthanol (90/10)
- révélateurs :

$SbCl_3$ 20% dans chloroforme

Sulfate de Cérium



1. acide ursolique
2. acide oléanolique
3. β carotène
4. α amyrine
5. β amyrine
6. fraction 1.4.2

ursolique, oléanolique, l' α amyrine et la fraction 1.4.2, la β amyrine présente une coloration gris-vert (fig.J26) Aucun spot supplémentaire n'est mis en évidence par cette technique par rapport à ceux visualisés après pulvérisation de trichlorure d'antimoine.

IV-1 3 Identification de la fraction 1.4.2 par l'aldéhyde anisique

Les dépôts sont effectués sur une plaque recouverte de silice Kieselgel G60 Merck. L' α et la β amyrine, les acides ursolique et oléanolique et l'extrait chloroformique Soxhlet II sont utilisés comme témoins. Après migration, on pulvérise le révélateur suivant :

méthanol	85
acide acétique glacial	10
acide sulfurique à 95%	5
aldéhyde anisique	0.5

Deux systèmes de solvant sont utilisés pour les migrations

* un système chloroforme-méthanol (90/10) déjà utilisé auparavant permet de retrouver les spots précédemment décrits (fig.J27), l' α et la β amyrine proche du front de solvant de couleur ocre, un peu plus bas l'acide oléanolique (spot violet) et ursolique (spot gris). L'extrait chloroformique Soxhlet II donne naturellement le nombre de tache le plus élevé. La fraction 1.4.2 donne un seul spot visible de couleur gris-violet et de Rf voisin de celui des acides oléanolique et ursolique.

* un système toluène-acétate d'éthyle (95/5) est utilisé pour tenter de visualiser la présence éventuelle de composés plus apolaires dans la fraction 1.4.2. Les témoins restent les mêmes que précédemment, le profil obtenu est reproduit figure J27. Un grand nombre de spots, correspondant aux composés les plus apolaires de l'extrait chloroformique Soxhlet II, sont effectivement retrouvés. Les autres témoins se situent dans la moitié inférieure de la plaque, tout comme le spot de la fraction 1.4.2, ce solvant de migration ne permet donc pas de visualiser de nouvelles taches pour cette fraction.

A la vue de tous ces résultats il apparaît que la fraction 1.4.2, pharmacologiquement active, semble relativement bien purifiée. Un seul spot apparaît en CCM après pulvérisation de révélateurs susceptibles de mettre en évidence des composés retrouvés dans l'extrait chloroformique de départ, notamment des composés de nature terpéniques ou stéroïdes. Le seul spot mis en évidence se situe dans une zone voisine de celle des spots des acides ursolique et oléanolique, que l'on sait être présents dans le romarin et dont

J27 : caractérisation de la fraction 1.4.2

- plaque de silice Kieselgel G60 (Merck)

- révélateurs :

méthanol 85 vol.

acide acétique glacial 10 vol.

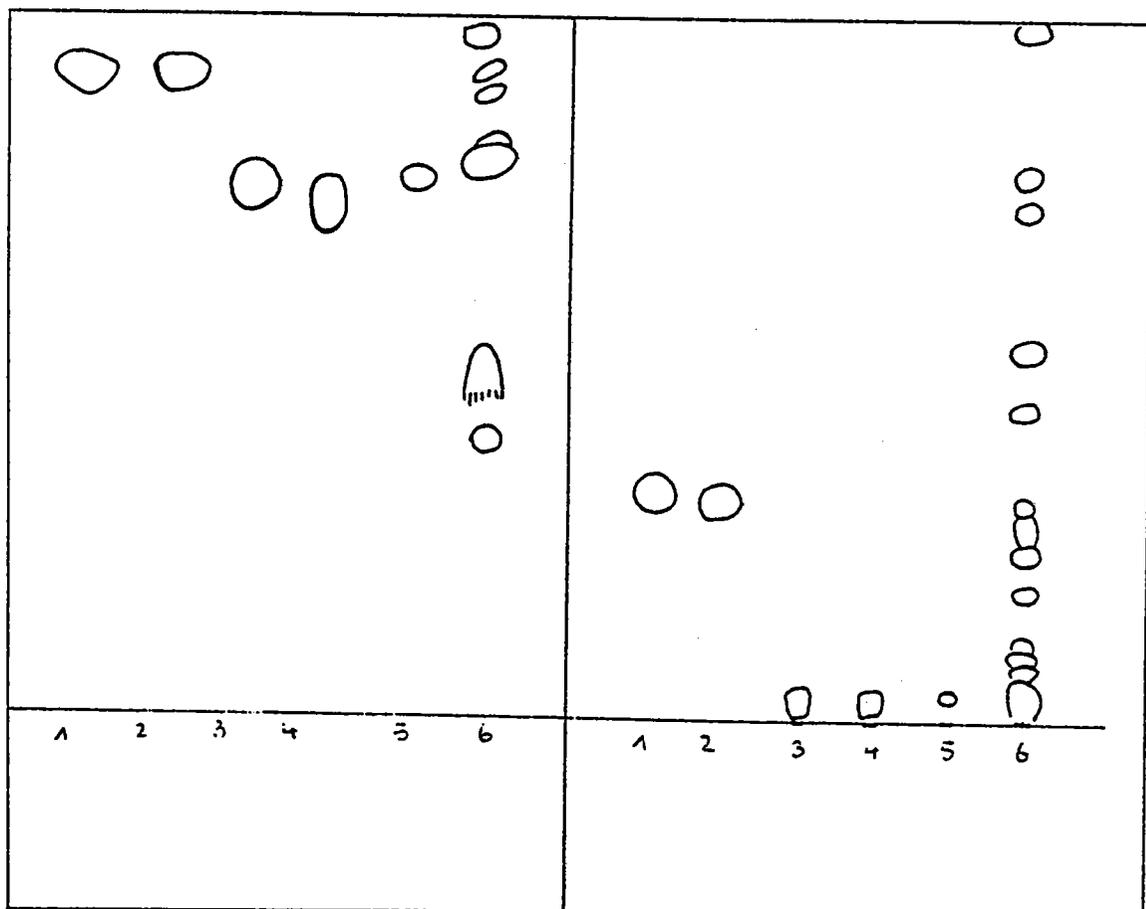
acide sulfurique à 95% 5 vol.

aldéhyde anisique 0.5 vol.

- solvant :

chloroforme / méthanol (90/10)

toluène / éthyl acétate (95/5)



1. acide ursolique
2. acide oléanolique
3. α amyrine
4. β amyrine
5. fraction 1.4.2
6. *R. officinalis* jeunes pousses Soxhlet II chloroformique de départ

certain auteurs avaient retenu la possible activité pharmacologique. Pour vérifier la présence de ces composés dans la fraction 1.4.2 et pour pallier aux possibilités d'investigation rapidement limitées des techniques de chromatographie sur couche mince sur des échantillons de faible quantité, une identification de la fraction 1.4.2 par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse est entreprise (D^r Siegler, CEIMED Nancy). Parallèlement, une purification sur plaque est effectuée après méthylation de la très faible quantité restante de la fraction 1.4.2 en collaboration avec le Dr Diallo (Université de Louvain).

V-2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Afin d'augmenter la volatilité des composants de la fraction 1.4.2, celle-ci est dérivée par silylation. L'addition de groupe triméthylsilyle permet d'augmenter la volatilité des composés avec une bonne stabilité chimique et thermique. Les agents de silylation utilisés ont une réactivité relativement large, pouvant notamment toucher des groupements R-OH, Ar-OH ou R-COOH.

Une chromatographie en phase gazeuse est alors effectuée. La température de l'injecteur est de 280°C, celle de la colonne de 220°C; après une phase isothermique de 5'. l'augmentation de la température est de 5°C par minute.

L' α et la β amyryne, l'acide oléanolique, l'acide ursolique sont utilisés comme témoins, leurs chromatogrammes et leurs spectres de masse sont représentés figure J29 à J35. Le chromatogramme de la fraction 1.4.2 est représenté figure J36. La purification de cette fraction est satisfaisante, moins de vingt composés étant retrouvés. Parmi ceux-ci, on peut distinguer deux groupes principaux.

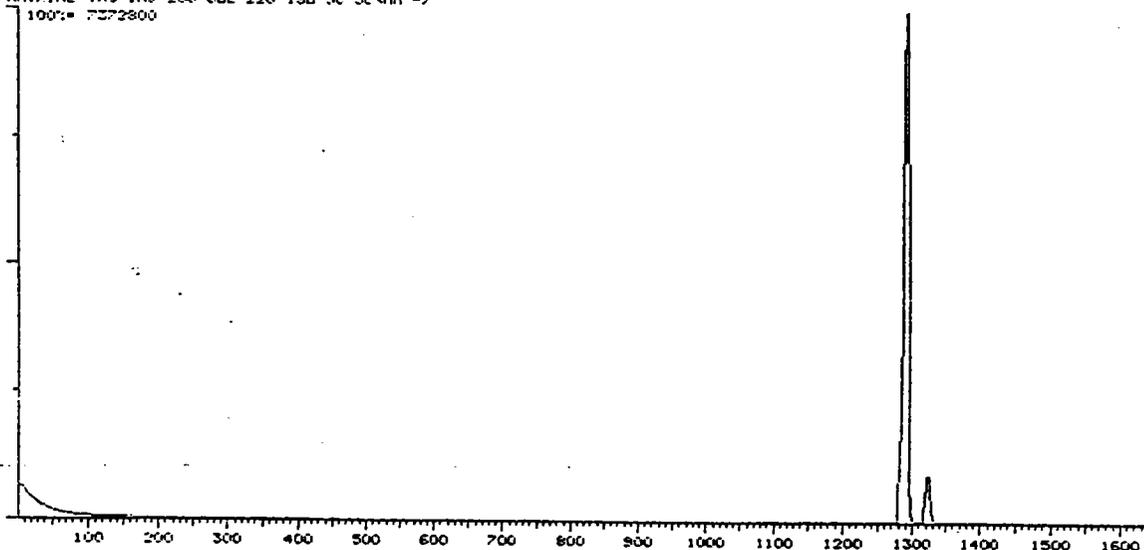
- un groupe de trois composés apparaissant entre 8 et 9 minutes (groupe 1).
- un groupe de quatre composés apparaissant plus tardivement entre 22 et 24 minutes après l'injection (groupe 2).

La comparaison avec les chromatogrammes des témoins et l'étude des spectres de masse permet d'établir :

- l'absence d' α et de β amyryne dans la fraction 1.4.2. Dans les conditions expérimentales utilisées, ces composés apparaissent à environ 18 minutes (fig.J29) or aucun pic n'est retrouvé dans cette zone pour la fraction 1.4.2.

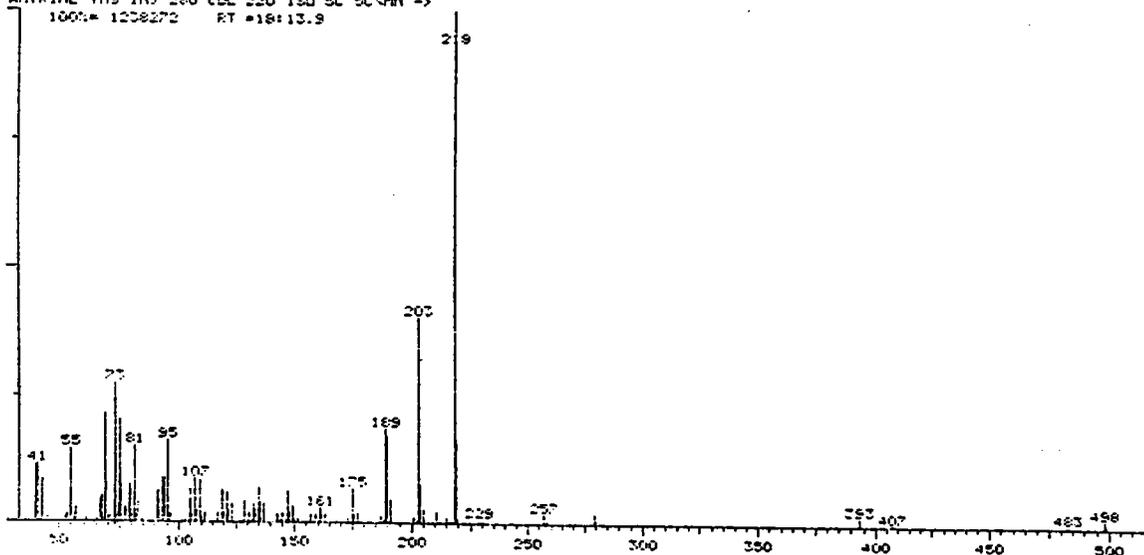
- la présence d'acide oléanolique dans la fraction 1.4.2. Il correspond au 1^{er} et plus important pic du groupe 2 (fig.J36). Sa sortie se fait à 23'31 contre

HERNAN/SIDAR U 3.1
 FILE A: BATHYRIS
 BETA AMPYRINE TRS INJ 280 COL 220 1SD 50 50/NM ->



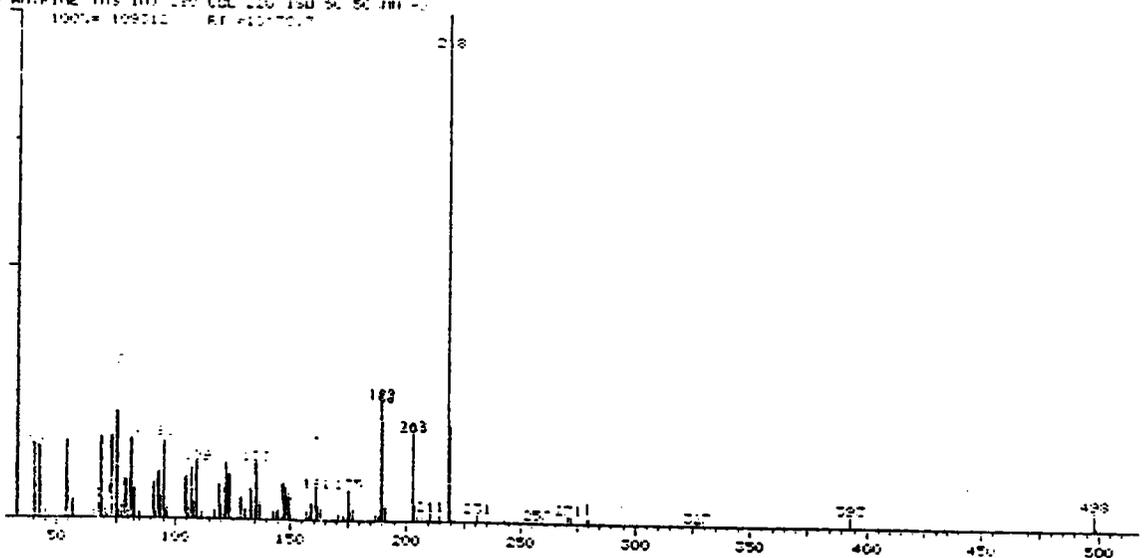
J29

HERNAN/SIDAR U 3.1
 FILE A: BATHYRIS
 BETA AMPYRINE TRS INJ 280 COL 220 1SD 50 50/NM ->



J30

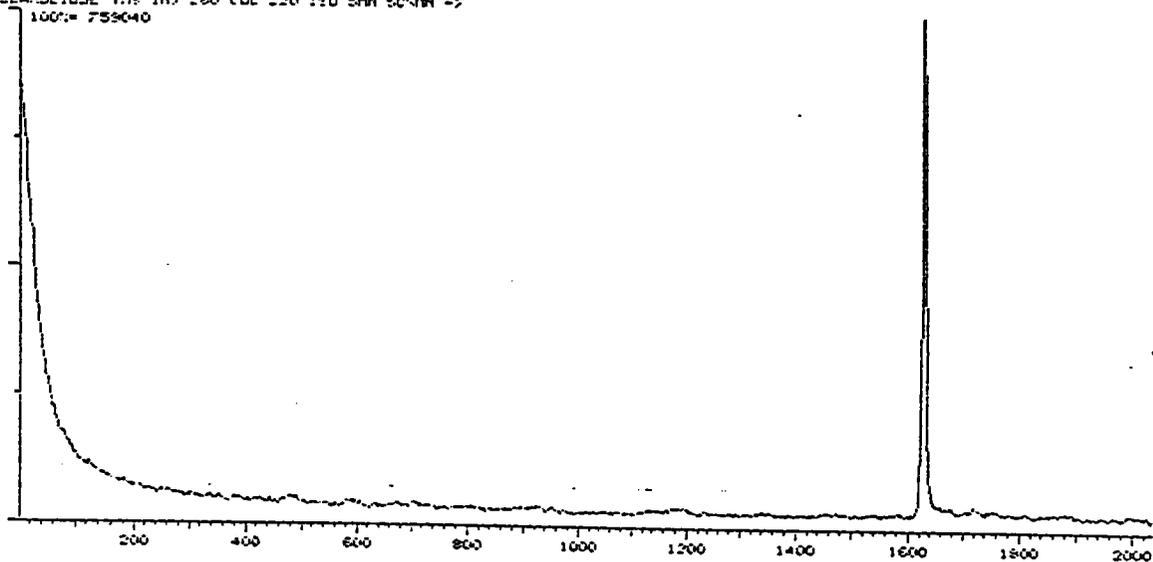
HERNAN/SIDAR U 3.1
 FILE A: BATHYRIS
 BETA AMPYRINE TRS INJ 280 COL 220 1SD 50 50/NM ->



J31

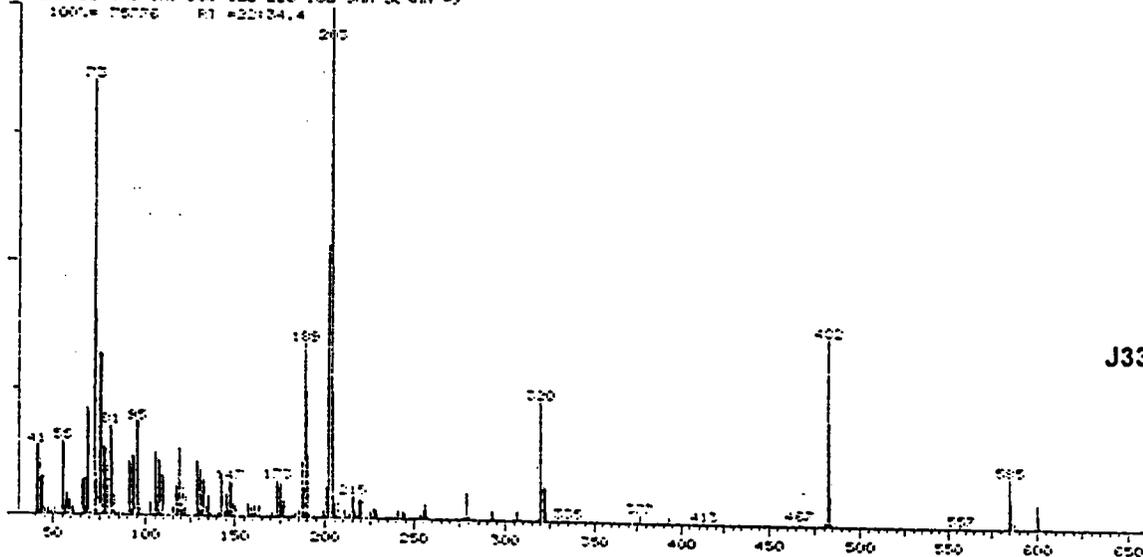
Chromatogramme et spectre de masse de l'α et β amyryne

NERVAO SIDAR 11 2.1
 FILE #1 DLEWITRE
 HC OLEANDRIQUE TRIS INJ 200 (DL 220 120 5MIN 50MIN ->
 100% = 753040



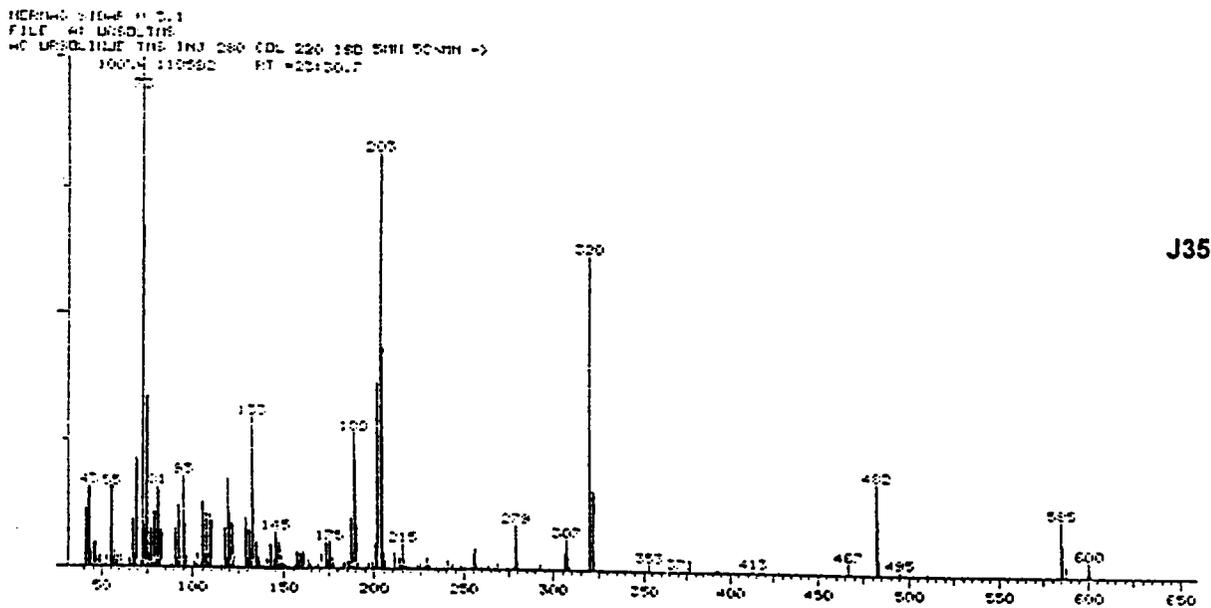
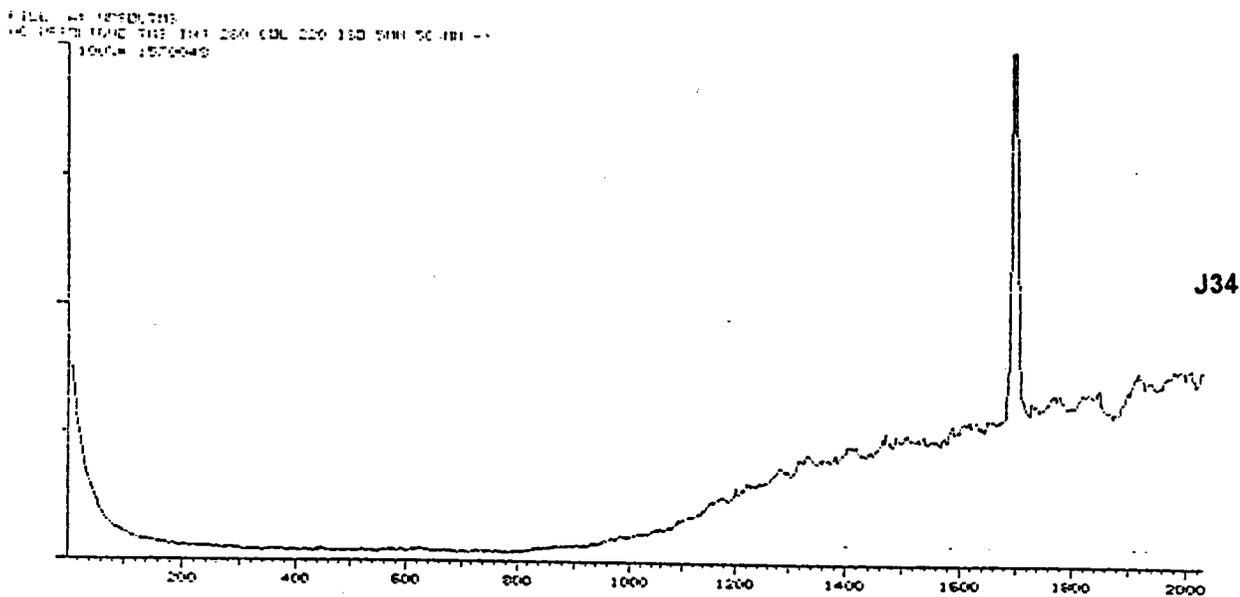
J32

NERVAO SIDAR 11 2.1
 FILE #1 DLEWITRE
 HC OLEANDRIQUE TRIS INJ 200 (DL 220 120 5MIN 50MIN ->
 100% = 75376 E1 = 22:24.4



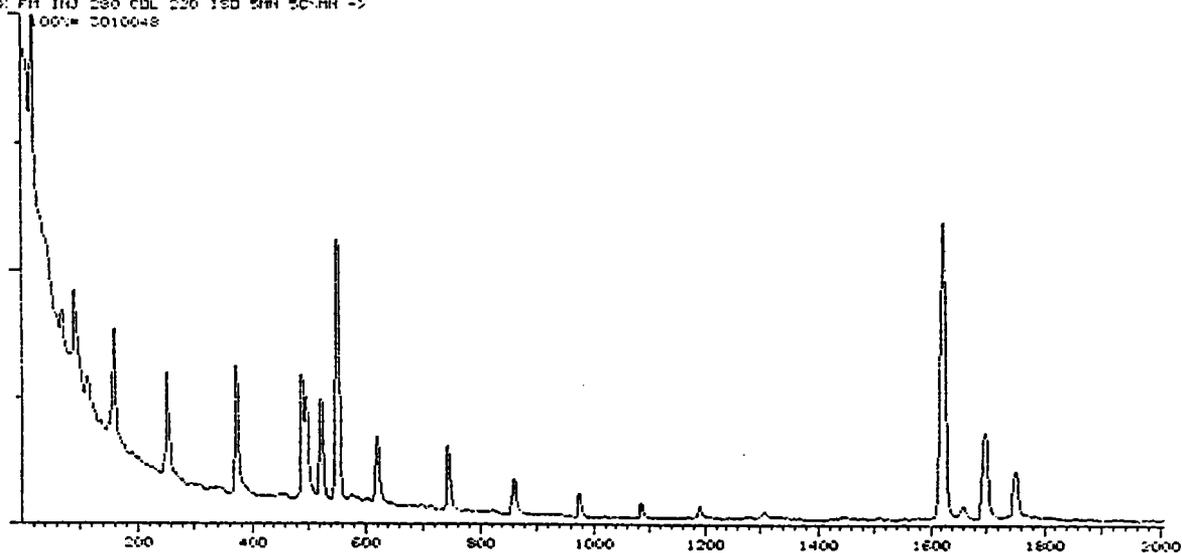
J33

Chromatogramme et spectre de masse de l'acide oléanolique



Chromatogramme et spectre de masse de l'acide ursolique

HERMAG/SIDAR V 2.1
FILE #1 FMS
ECH 2: F11 INJ 280 CBL 220 ISD 5MIN 50MIN ->
100% 0010048



J 36 : Chromatogramme de la fraction 1.4.2.

23'34 pour le témoin (fig.J32). Les spectres de masse, représentés figure J33 pour le témoin et figure J37 pour la fraction 1.4.2, étant parfaitement superposables.

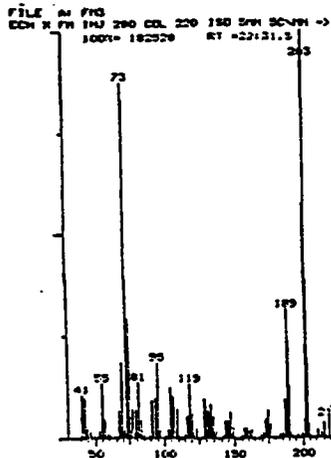
- la présence d'acide ursolique dans la fraction 1.4.2. Il correspond au 3^{ème} pic du groupe 2 et sort à 23'29 contre 23'30 pour le témoin(fig.J34). La comparaison des spectres de masse peut se faire en comparant les figures J35 (témoin) et J39 (fraction 1.4.2).

- le groupe apparaissant le plus tardivement renferme deux autres composés; un composé très minoritaire (sortie à 22'59) n'est pas identifié. Le dernier composés du groupe 2 (sortie 24'10) donne un spectre de masse (fig J40) qui peut faire penser à une structure très proche de celle de l'acide ursolique, à deux hydrogènes près, ce dernier composé possède donc probablement une double liaison supplémentaire.

- enfin le groupe 1, apparaissant entre 8 et 9 minutes, comprend trois composés dont les spectres de masse sont représentés figures J41 à J43. Ceux ci ne sont pas identifiés, la masse totale est comprise entre 504 et 562 mais le degré de syllation n'est pas exactement connu. Les deux premiers composés sont probablement des isomères, le troisième diffère des deux précédents d'une masse de 58.

IV-3 Purification de la fraction 1.4.2 après méthylation

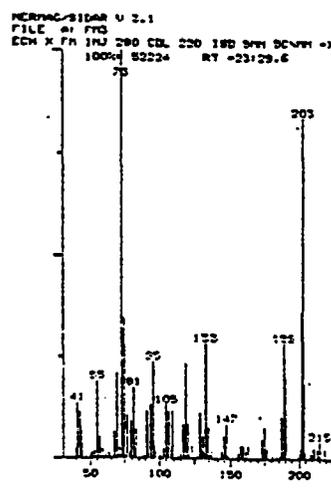
Une partie de la fraction 1.4.2 est alors méthylée au diazométhane (Dr Diallo, Université de Louvain), puis séparée par une nouvelle chromatographie préparative sur couche mince (gel de silice G60) à l'aide d'un solvant de migration chloroforme / éther de pétrole (75/25). Quatre fractions sont individualisées, les fractions supérieures (2,3,4) susceptibles de contenir des substances terpéniques déjà identifié par la CPG/SM précédente sont écartées. Seule la fraction 1, correspondant à la zone de dépôt, est à nouveau séparée sur gel de silice à l'aide d'un système éluant chloroforme / acétate d'éthyle (90/20 v/v). Deux spots sont alors obtenus (1a et 1b). La fraction 1a, obtenue en quantité infime, possède un spectre de masse qui n'apporte pas d'élément d'orientation particulier, par contre le spectre de masse réalisé en impact électronique à partir de la zone 1b montre un ion moléculaire à 342 pouvant correspondre à la lutéoline tétraméthylée (fig.J44). Des ions de fragmentation caractéristiques de ce composé étant également retrouvés.



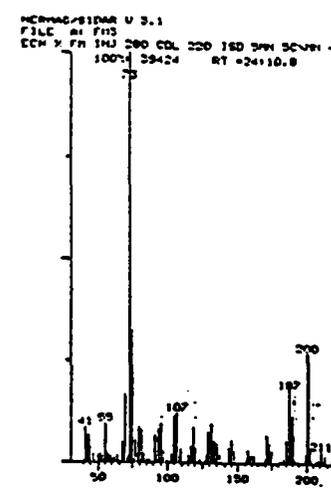
J37



J38



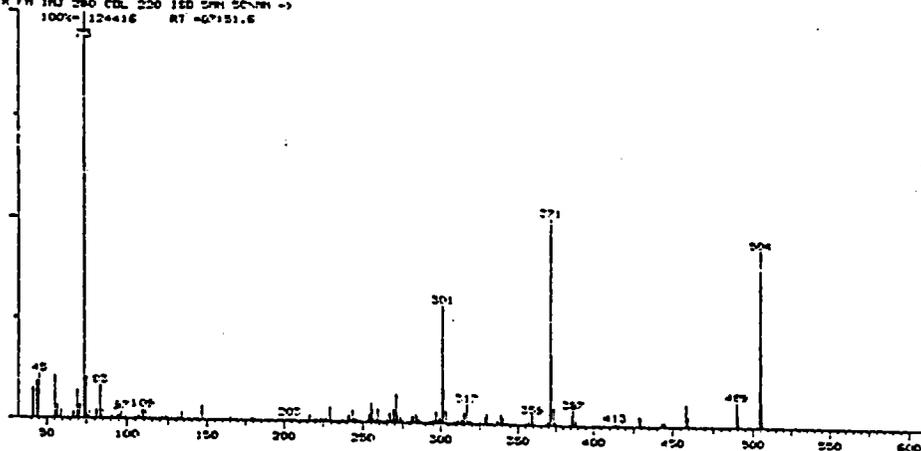
J39



J40

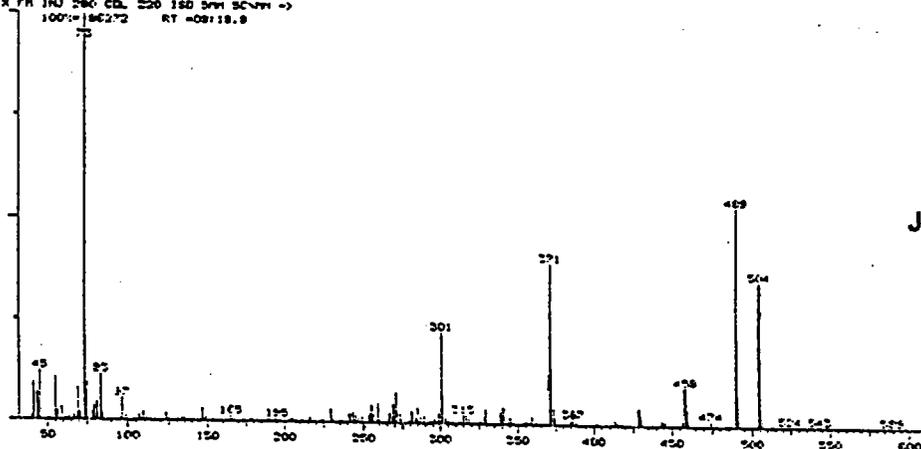
spectre de masse du groupe 2 de la fraction 1.4.2.

NEPTAC-21000 U.S.1
 FILE #1 D531753
 ECH X FR 100% 124416 RT =07151.6



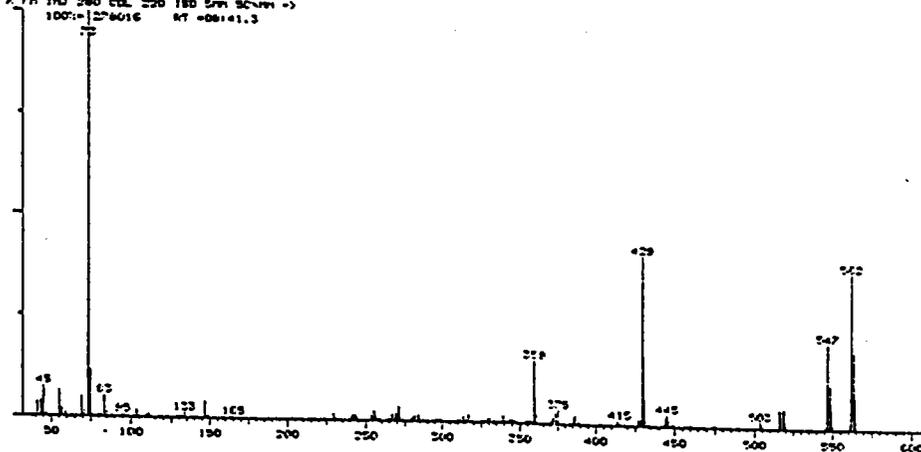
J41

NEPTAC-21000 U.S.1
 FILE #1 D531753
 ECH X FR 100% 180272 RT =08118.8



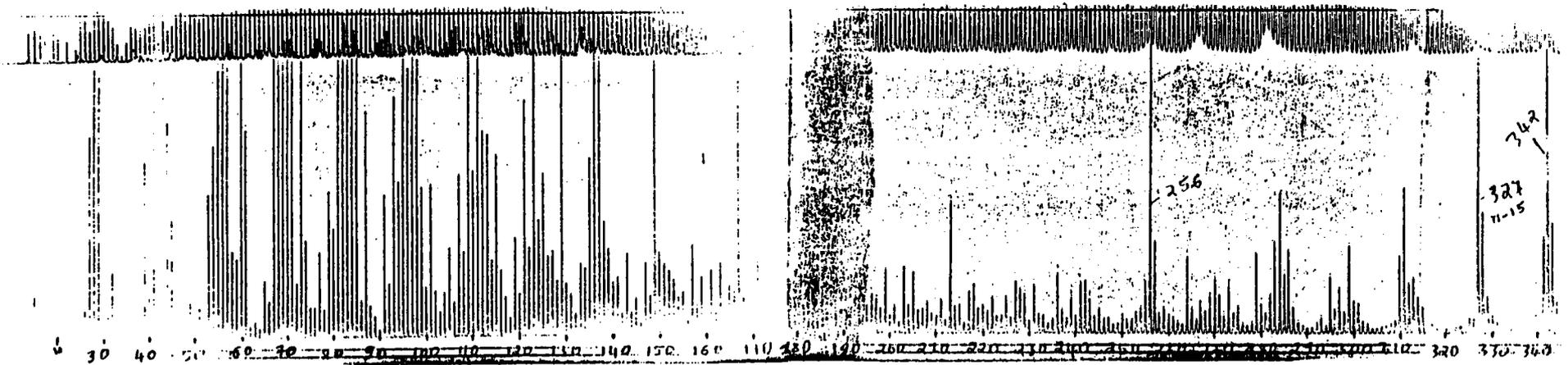
J42

NEPTAC-21000 U.S.1
 FILE #1 D531753
 ECH X FR 100% 276016 RT =08141.3



J43

spectre de masse du groupe 1 de la fraction 1.4.2.



J44 : Spectre de masse de la lutéoline (méthylée par action du diazométhane)

IV-4. Conclusions

Au terme de cette tentative de fractionnement, les seuls composés clairement identifiés comme étant présents dans la fraction 1.4.2 et par voie de conséquence porteurs potentiels de l'activité pharmacologique, sont des triterpènes, en particulier les acides oléanolique et ursolique et une flavone, la lutéoline. Certains travaux, réalisés in vivo après intoxication au tétrachlorure de carbone ont souligné l'éventuelle intervention de ces composés terpéniques dans l'activité pharmacologique du romarin. Par contre l'implication de la lutéoline semble à priori plus discutable, on peut, par exemple, noter que ce composé est présent dans de nombreuses espèces végétales, dont toutes ne possèdent pas des vertus hépatotropes traditionnellement reconnues. En outre la lutéoline fait partie du groupe des flavones qui, contrairement aux flavonoïdes ne sont pas réputées posséder une activité anti-oxydante notable. Cela peut s'expliquer par l'absence d'un hydroxyle en 3 sur l'hétérocycle, généralement considéré comme indispensable à l'expression de cette activité. Par contre la lutéoline possède deux caractéristiques structurales importantes, une méta hydroxylation sur le cycle A du benzopyrane et une ortho hydroxylation sur le cycle B, qui pourrait éventuellement compenser l'absence de l'hydroxyle en 3.

Une série d'expérimentations est donc mise en oeuvre sur hépatocytes isolés, intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde, pour apprécier l'impact des triterpènes identifiés sur les mécanismes hépatotoxiques. De même, afin d'approcher l'activité antiradicalaire et hépatoprotectrice de la lutéoline et de composés de structure voisine, une étude structure activité a été entreprise sur plusieurs substances de nature flavonique ou flavonoïque.

V Activité pharmacologique des composés identifiés de la fraction 1.4.2.

V-1 Recherche de l'activité pharmacologique des composés terpéniques

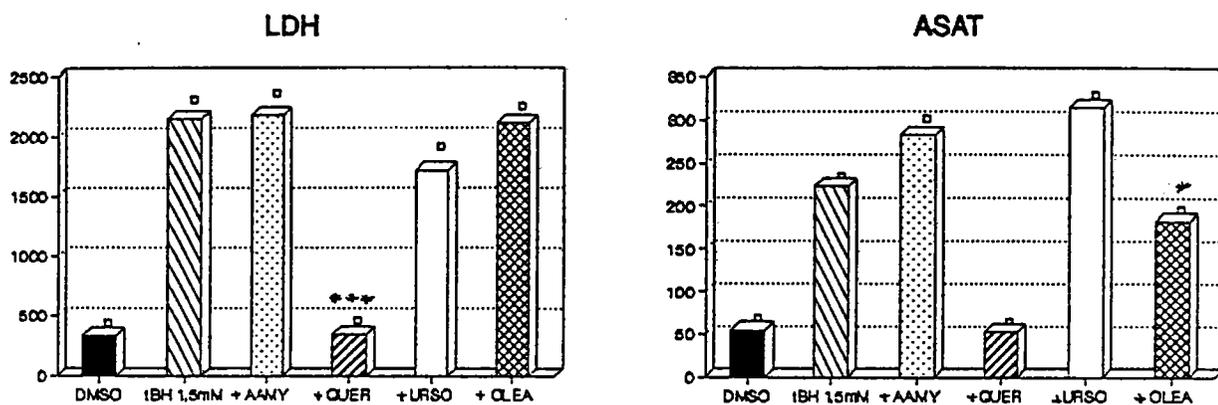
Au cours d'une première expérimentation, l'acide ursolique, l'acide oléanolique et l' α amyryne sont testés à la dose de 100 μ M. La quercétine, utilisée à la même dose, sert de substance de référence. Ces composés sont solubilisés dans du DMSO et sont apportés sous un volume de 20 μ l dans 4 ml de suspension hépatocytaire à 1 million de cellules/ml. La concentration finale en DMSO est donc de 0.5%. Le tert-butyl hydroperoxyde entraîne, après trente minutes d'intoxication, une formation intense de malonalaldéhyde ainsi qu'un relargage enzymatique très significatif tant pour la lactico deshydrogénase que pour l'aspartate aminotransférase (fig.J41). L'acide oléanolique ne freine que moyennement les phénomènes peroxydatifs, tandis que l'acide ursolique et l' α amyryne restent sans action sur la formation de MAD. Aucun des trois composés terpéniques testés ne s'oppose efficacement à la nécrose cellulaire. La quercétine, utilisée à la même dose, réduit quant à elle, très significativement les effets du tBH; LDH, ASAT, et MAD restent dans des zones proches des témoins non intoxiqués.

Dans un second temps, l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l' α et la β amyryne sont testés seuls et selon toutes les associations possibles. Chaque composé est testé à la dose de 100 μ M. Dans tous les cas la concentration finale en DMSO dans le milieu de survie est égale à 0.5%. Les résultats sont résumés dans le tableau J1. Les quatre composés testés, pas plus que leurs associations ne montrent une action biologiquement significative sur les paramètres étudiés (LDH, ASAT, MAD)

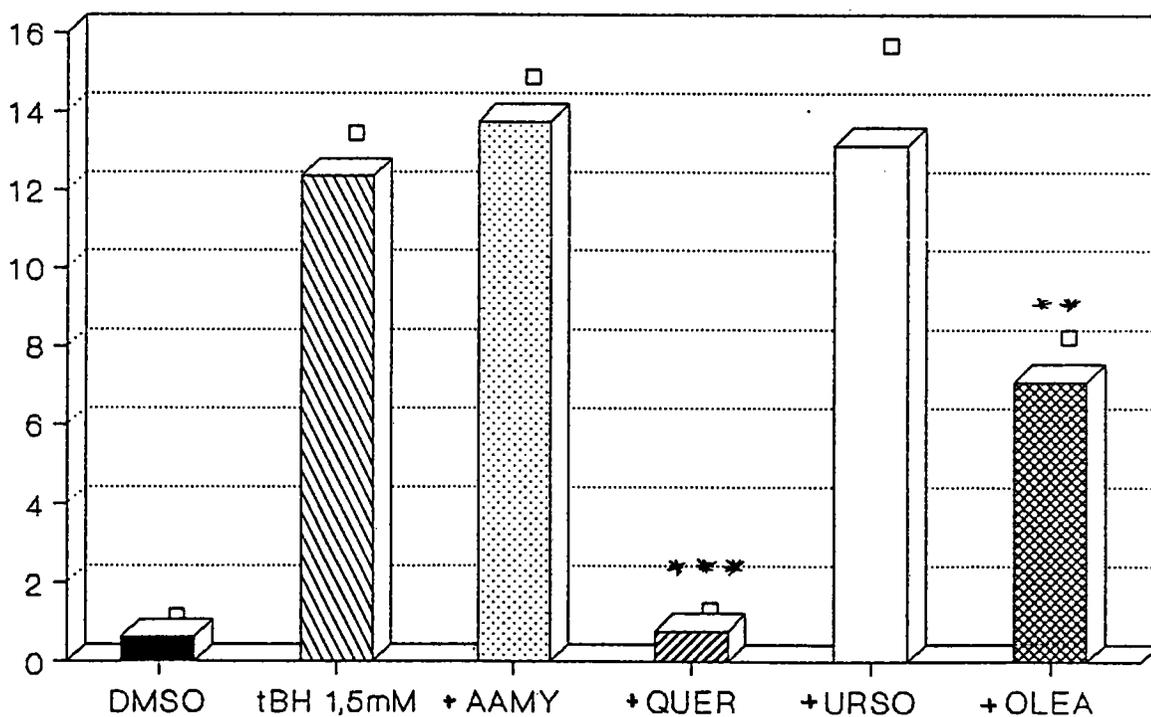
Aucune activité pharmacologique n'est retrouvée pour l'acide oléanolique et l'acide ursolique sur le modèle utilisé, ces composés ne sont donc pas responsable de l'activité de la fraction 1.4.2 issus d'un extrait chloroformique de jeunes pousses de R.officinalis dans le modèle expérimental utilisé.

V-2 Recherche de l'activité pharmacologique des flavones et flavonoïdes

Une éventuelle activité hépatotrope de la lutéoline est également recherchée, sur hépatocytes isolés, en raison de sa présence dans la fraction 1.4.2. D'autres composés, flavones ou flavonoïdes, sont testés dans les mêmes temps expérimentaux afin de pouvoir dégager de possibles relations structures - activités, le test du DPPH permet d'explorer l'activité strictement antiradicalaire de ces substances. La tableau J2 donne la structure de chacun de ces composés et les différences structurales existant entre-eux.



MAD

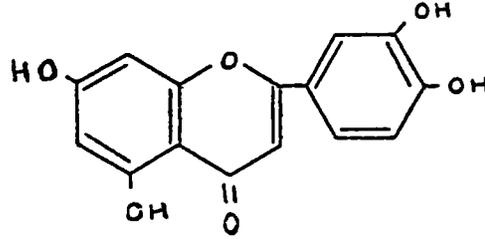
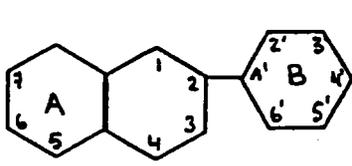


J41 : Effet de l' α amyryne, des acides ursolique et oléanolique et de la quercetine, à la dose de 100 μ M sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire dans un modèle d'hépatocytes isolés intoxiqués au tBH.

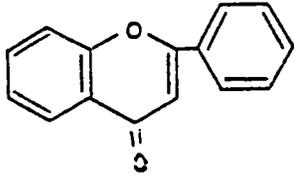
Tableau J1 : Activité de l' α amyryne, la β amyryne, l'acide ursolique, l'acide oléanolique et de leurs associations sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire d'hépatocytes isolés intoxiqué au tBH

	MAD	LDH	ASAT
DMSO	0.38 \pm 0.13	353 \pm 9	32 \pm 3
tBH 1.5mM	5.48 \pm 0.8	1123 \pm 202	94 \pm 8
α amyryne (1)	6.12 \pm 0.35	1006 \pm 74	86 \pm 4
β amyryne (2)	5.94 \pm 0.36	1115 \pm 44	91 \pm 4
ac. ursolique (3)	6.34 \pm 1.02	822 \pm 180	120 \pm 18
ac. oléanolique (4)	4.34 \pm 0.29	1274 \pm 59	115 \pm 8
1 + 2	6.57 \pm 0.82	1137 \pm 200	101 \pm 9
1 + 3	6.64 \pm 0.24	910 \pm 119	92 \pm 15
1 + 4	4.34 \pm 0.75	1520 \pm 142	97 \pm 6
2 + 3	7.25 \pm 0.20	1107 \pm 153	104 \pm 10
2 + 4	4.35 \pm 0.46	1083 \pm 75	108 \pm 9
3 + 4	7.07 \pm 0.53	1327 \pm 12	110 \pm 4
1 + 2 + 3	5.97 \pm 1.16	992 \pm 82	112 \pm 16
1 + 2 + 4	5.58 \pm 0.21	1013 \pm 27	95 \pm 5
1 + 3 + 4	7.17 \pm 0.15	1002 \pm 113	104 \pm 4
2 + 3 + 4	6.83 \pm 0.78	954 \pm 150	103 \pm 2
1 + 2 + 3 + 4	6.57 \pm 1.13	1018 \pm 99	113 \pm 9

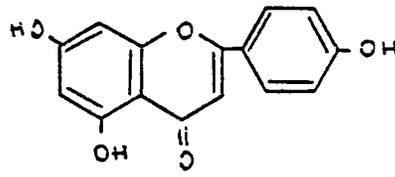
J2 : Structure des flavones et des flavonoïdes testés et tableau des comparaisons structurales possibles



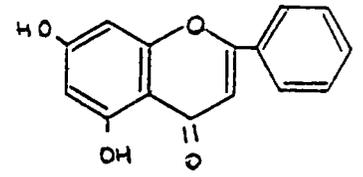
lutéoline



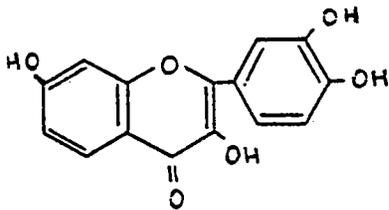
flavone



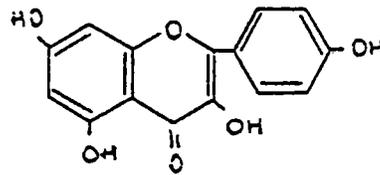
apigénine



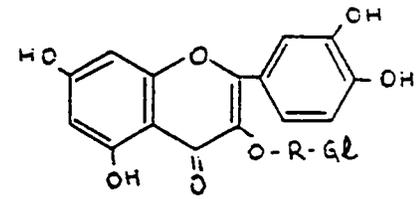
chrysin



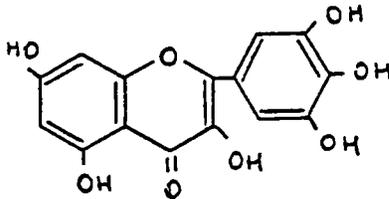
fisétine



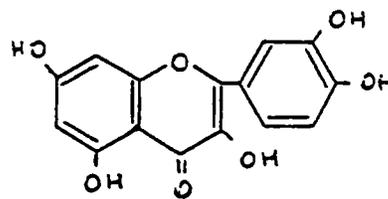
kaempférol



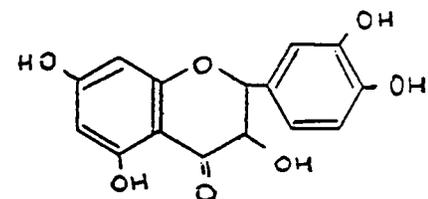
rutine



myricétine



quercétine



taxifoline

	A5	A7	3	B3'	B4'	B5'	// 2-3
flavone	H	H	H	H	H	H	oui
apigénine	OH	OH	H	H	OH	H	oui
chrysin	OH	OH	H	H	H	H	oui
rutine	OH	OH	O-R-Gl	OH	OH	H	oui
kaempférol	OH	OH	OH	H	OH	H	oui
lutéoline	OH	OH	H	OH	OH	H	oui
fisétine	H	OH	OH	OH	OH	H	oui
quercétine	OH	OH	OH	OH	OH	H	oui
myricétine	OH	OH	OH	OH	OH	OH	oui
taxifoline	OH	OH	OH	OH	OH	H	non

V-2 1 Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire est étudiée à l'aide du test de décoloration du radical diphényl picryl hydrazyl (DPPH).

* Mode opératoire

Une solution méthanolique de DPPH est préparée comme décrit précédemment, de façon à obtenir une densité optique voisine de 0.5 à 517 nm. Les différents composés étudiés sont solubilisés dans le méthanol, la concentration de chaque composé étant de 10^{-4} M. La lecture se fait exactement après 5' de contact, un blanc témoin permet d'établir le pourcentage de décoloration.

* Résultats

Le tableau J3 permet d'établir un classement concernant l'activité piègeur de radicaux libres. La flavone, la chrysin et l'apigénine ne montrent sur ce modèle aucune activité antiradicalaire (même à des doses dix fois plus importantes), les autres composés ont une activité antiradicalaire relativement voisine. La quercétine et la myricétine possèdent l'activité la plus importante. La disparition de l'hydroxyle sur le cycle A (fisétine) est moins préjudiciable que la disparition de l'un des deux ortho-phénols en 3' et 4' sur le cycle B (kaempférol). Par contre les performances très inférieures de la taxifoline montrent l'importance de la double liaison en 2-3.

Parmi tous ces composés, la lutéoline possède une bonne activité antiradicalaire, 59% à 10^{-4} M, ce qui tendrait à prouver que l'existence de la double liaison en 2-3 et l'ortho hydroxylation en 3'-4' sont les particularités structurales indispensables à l'expression antiradicalaire de ces composés et peuvent compenser l'absence de l'hydroxyle en 3.

tableau J3 : Pourcentage de décoloration du radical DPPH.

flavone	0 %
apigénine	0 %
chrysin	0 %
lutéoline	59 %
fisétine	44 %
kaempférol	32 %
rutine	41 %
quercétine	58 %
myricétine	63 %
taxifoline	17 %

V-2 2 Activité hépatotrope

Les mêmes composés sont testés sur le modèle d'hépatocytes isolés, intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde (1.5mM) afin d'apprécier leur action sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire. Les différents produits testés sont solubilisés dans le DMSO de tel sorte qu'un ajout de 20 μ l donne une concentration de 100 μ M ou de 50 μ M (DMSO = 0.5% v/v). Cinq composés ne montrent que peu d'activité sur les paramètres étudiés, l'apigénine, la flavone, la chrysine, la rutine et la taxifoline (tableau J4 et J5), les autres substances étant actives aussi bien sur la peroxydation lipidique que sur le relargage enzymatique. La quercétine et la myricétine présentent l'activité la plus importante; la lutéoline, freine très significativement la formation de MAD et la fuite enzymatique.

V-2 3 Relation structure activité et conclusions

Parmi les flavones testées, on peut très clairement séparer la lutéoline, portant deux hydroxyles sur le cycle B, des autres flavones, celle-ci étant la seule à présenter une activité hépatoprotectrice et antiradicalaire. De toute évidence les hydroxyles en 5 et en 7 participent peu à cette activité et l'existence d'un seul hydroxyle sur le cycle B s'avère également insuffisant. En cas d'absence d'OH sur le cycle B, la perte d'un hydroxyle sur le cycle A et notamment en 7 dans le cas de la flavone, fait perdre toute efficacité au niveau cellulaire. Par contre la présence d'OH sur le cycle A ne semble pas influencer directement le comportement antiradicalaire.

Parmi les flavonols testés, la rutine possède une position originale. Ce composé présente une activité antiradicalaire franche sur le test non biologique au DPPH mais reste sans effet sur les phénomènes peroxydatifs, apparaissant au niveau cellulaire, après intoxication par le tert butyl hydroperoxyde. Cela peut être mis en relation avec d'éventuels problèmes de biodisponibilité cellulaire liés à la présence de sucre en 3. En effet l'absence d'activité ne paraît pas être en relation avec l'absence d'un OH en 3, la lutéoline, manifestant une activité superposable à celle de la quercétine malgré cette différence structurale. L'étude du comportement des flavonols montre assez clairement l'importance des OH portés sur le cycle B. L'activité la plus importante se manifeste pour la myricétine portant 3 OH en 3',4' et 5'; la plus faible pour le kaempférol possédant un OH en 4' et de façon intermédiaire pour les autres composés qui possèdent deux OH sur le cycle B. La similitude des comportements de la fisétine et des autres flavonols actifs confirme le caractère secondaire d'une hydroxylation en 5 et en 7 sur le cycle A. Les résultats de la taxifoline montre l'importance de la double liaison en 2-3 tant sur l'activité antiradicalaire qu'en terme de protection hépatique.

La lutéoline, présent dans la fraction 1.4.2 pourrait donc, au terme de cette étude, être retenue comme possible porteur de l'activité hépatoprotectrice des

Tableau J4 : Effets antiradicalaire (radical DPPH) , antilipoperoxydant et anti nécrotique (hépatocytes isolésintoxiqués au tBH) de l'apigénine, de la flavone, de chrysine et de la lutéoline.

	MAD nMoles/ml	LDH mUI/ml	DPPHT %
DMSO	0.35 ± 0.07	393 ± 13	
tBH 1,5 mM	10.42 ± 0.33	1147 ± 71	
tBH + Apigénine 100µM	7.13 ± 0.48 ^{***}	802 ± 50 ^{**}	0
tBH + Flavone 100µM	11.11 ± 0.32	1101 ± 68	0
tBH + Chrysine 100µM	6.93 ± 1.79 ^{***}	544 ± 78 ^{***}	0
tBH + Lutéoline 100µM	0.70 ± 0.18 ^{***}	410 ± 33 ^{***}	59

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

Tableau J5 : Effets antiradicalaire (radical DPPH) , antilipoperoxydant et anti nécrotique (hépatocytes isolésintoxiqués au tBH) de différents flavonoïdes, de la lutéoline et de la taxifoline.

	MAD nMoles/ml	LDH mUI/ml	DPPH %
DMSO	0.35 ± 0.07	393 ± 13	
tBH 1,5 mM	10.42 ± 0.33	1147 ± 71	
tBH + Myricétine 100µM	0.80 ± 0.19 ^{***}	410 ± 31 ^{**}	63
tBH + Rutine 100µM	7.33 ± 1.91	1203 ± 113	41
DMSO	1.42 ± 0.31	387 ± 14	
tBH 1,5 mM	8.74 ± 0.86	2437 ± 24	
tBH + Myricétine 50µM	0.48 ± 0.06 ^{***}	549 ± 85 ^{**}	63
tBH + Quercétine 50µM	1.33 ± 0.07 ^{***}	416 ± 99 ^{***}	58
tBH + Lutéoline 50µM	3.54 ± 1.04 ^{**}	493 ± 17 ^{***}	59
tBH + Fisétine 50 µM	1.95 ± 0.10 ^{***}	550 ± 51 ^{***}	44
tBH + Kaempférol 50µM	1.12 ± 0.19 ^{***}	647 ± 153 ^{***}	32
tBH + Taxifoline 50µM	7.30 ± 0.16 [*]	2630 ± 45	17

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

jeunes pousses de R. officinalis. Il convenait donc d'apprécier la quantité de lutéoline présente dans l'extrait chloroformique et l'extrait 1.4.2 afin de vérifier si celle-ci était suffisante pour entraîner l'activité pharmacologique.

V-3 Dosage de la lutéoline

* Mode opératoire

Le dosage de la lutéoline est réalisé selon trois procédures différentes :

- 100 mg de lyophilisat de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de R. officinalis sont déposés sur une plaque recouverte de gel de silice sur laquelle on dépose également un témoin lutéoline. La plaque est placée dans une cuve contenant un mélange chloroforme - méthanol - acide acétique dans les proportions 95-4-1. Après migration, la bande de Rf correspondant à celui du spot témoin lutéoline est prélevée et lavée par un mélange chloroforme-méthanol, le surnageant est alors évaporé au rotovapor jusqu'à obtention d'un résidu A.

- 20 mg de lyophilisat de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de R.officinalis sont passés en CLHP sur une colonne de silice greffée C18. Le solvant d'élution est un mélange éthanol-eau (80/20 v/v). Un témoin lutéoline est passé dans des conditions identiques et la fraction de l'extrait chloroformique correspondant au temps d'élution de la lutéoline est isolée puis évaporée à sec au rotovapor pour donner le résidu B.

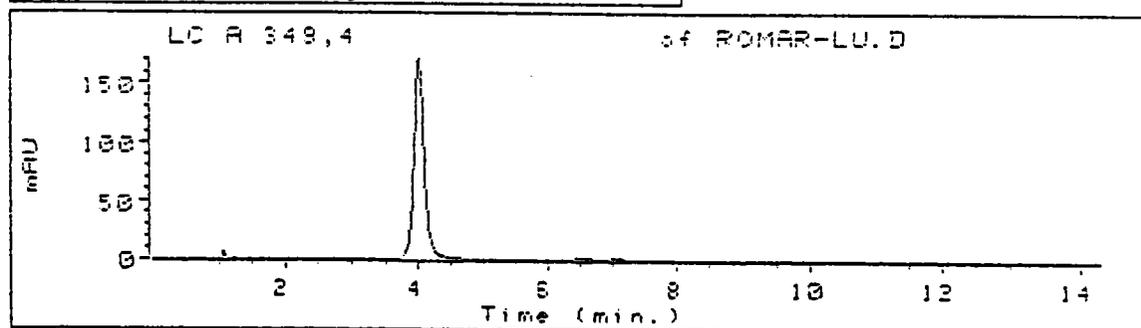
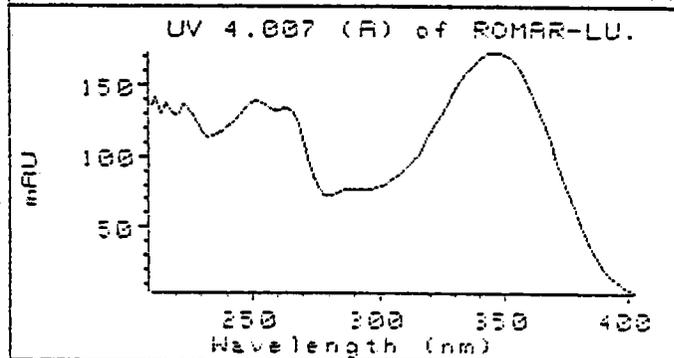
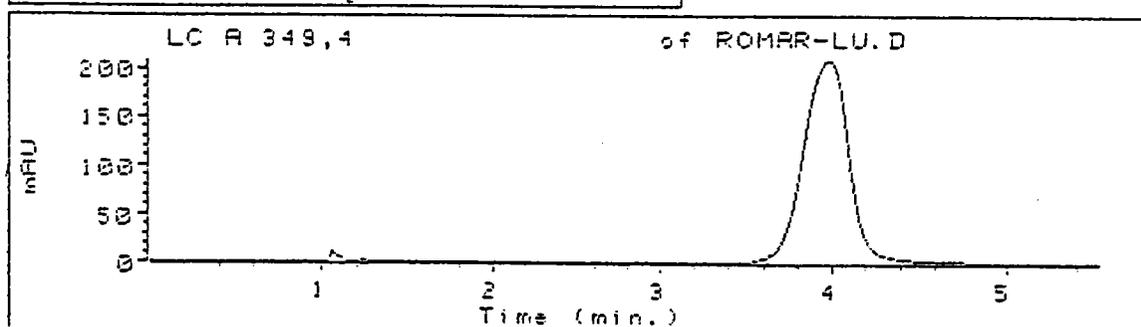
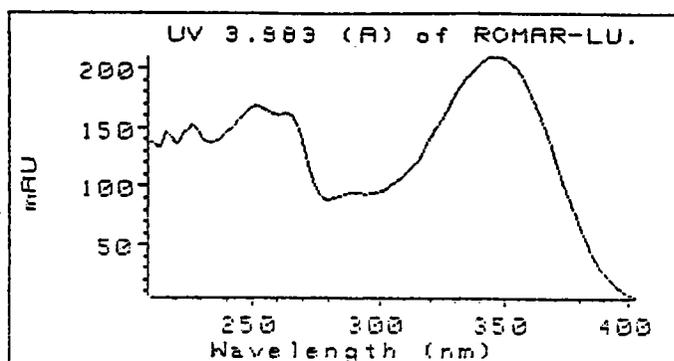
- la fraction 1.4.2 est utilisée tel quelle pour le dosage.

Le dosage de la lutéoline dans les résidus A, B et la fraction 1.4.2 est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (Waters associates) sur une colonne Waters NovaPak Phényl de 20 cm de long et de 4 mm de diamètre intérieur. En bout de colonne, un détecteur à réseaux de diodes (Hewlet-Packard) réglé sur 349 nm permet l'enregistrement des spectres UV en continu. Le solvant, dont le débit est de 1 ml par minute, est un mélange acétonitrile - eau - acide acétique (75-25-5 v/v). La solution lutéoline témoin est obtenue en solubilisant 0,1 mg de lutéoline dans 2,5 ml d'éthanol, son profil chromatographique et le spectre UV sont représentés figure J42. La lutéoline est retrouvée, à la fois dans la fraction obtenu par chromatographie sur colonne, dans celle obtenu par chromatographie préparative sur couche mince et dans la fraction 1.4.2 (fig.J43). Les teneurs en lutéoline de ces différentes fractions sont les suivantes :

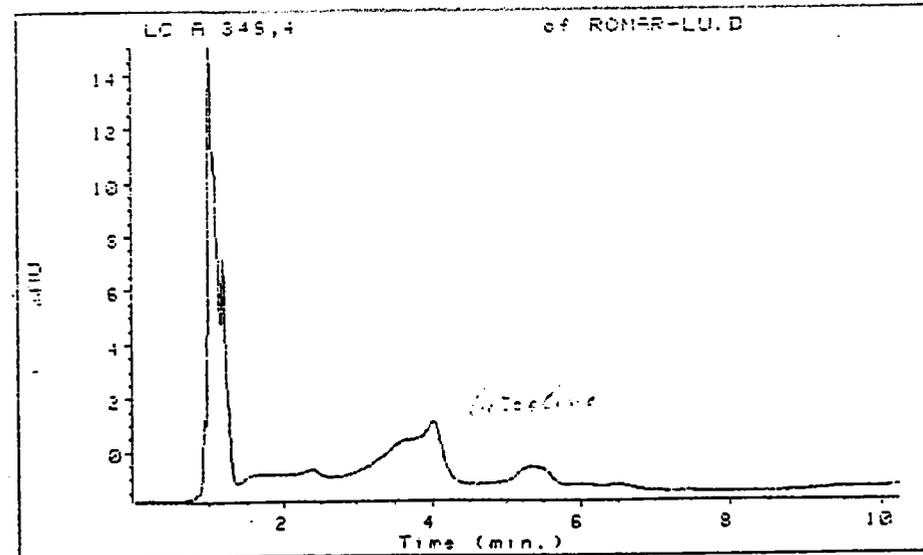
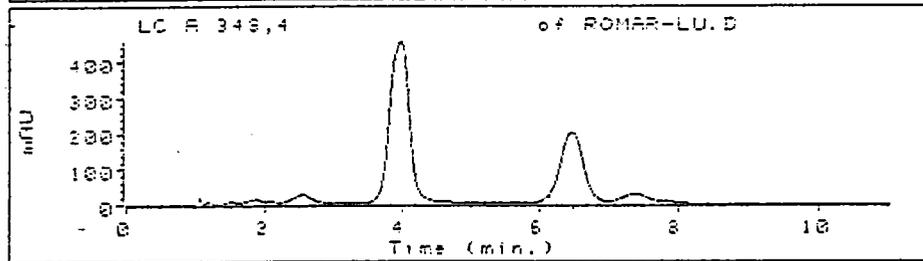
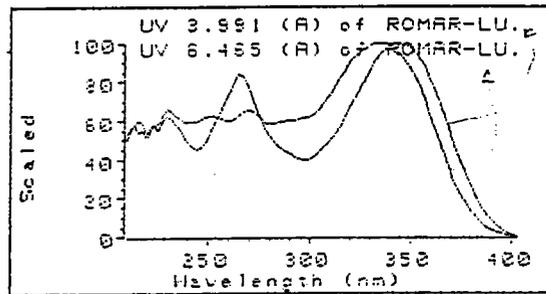
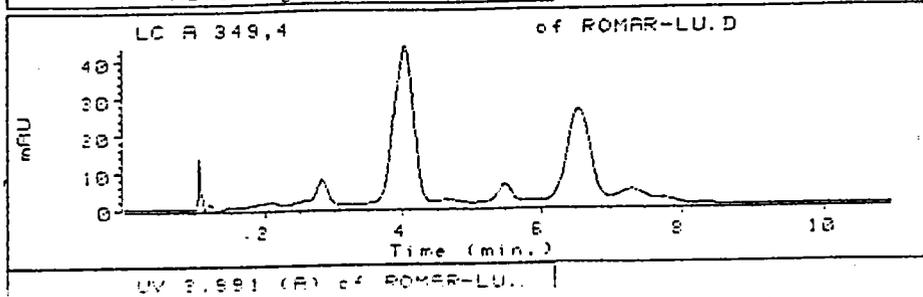
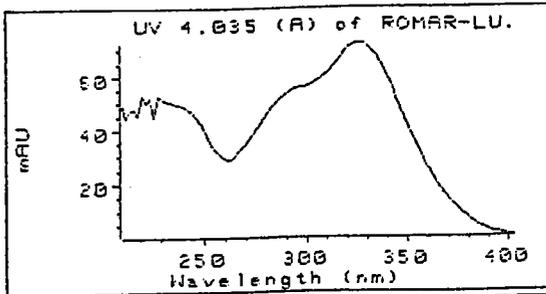
Résidu A = 0.09 mg / 100 mg de lyophilisat de départ (Soxhlet II)

Résidu B = 0.40 mg / 100 mg de lyophilisat de départ (Soxhlet II)

fraction 1.4.2 = 0.02 mg / 100 mg de lyophilisat de départ (Soxhlet II)



J42 : Recherche HPLC de la lutéoline (standard), éluant : acétonitrile/eau/acide acétique 25/75/5;
détection à 349 nm par diode array



Plaque de silice

Fraction 1.4.2

J43 : Recherche HPLC de la lutéoline dans la fraction 1.4.2. et dans l'extrait chloroformique de R. officinalis, après séparation sur plaque de silice ou colonne C18. (éluant : acétonitrile/eau/acide acétique 25/75/5 détection à 349 nm par diode array)

On peut noter que le fractionnement sur gel de silice entraîne une perte non négligeable de la lutéoline probablement par adsorption importante sur la silice ou par dégradation. Il apparaît donc que l'apport d'un extrait chloroformique de jeunes pousses de R. officinalis correspondant à 1 mg de plante sèche par ml de suspension soit 0.0867 mg de lyophilisat, correspond à une quantité inférieure à 0.018 ug de lutéoline par ml de suspension hépatocytaire. Cette quantité extrêmement faible ne peut expliquer, à elle seule, l'effet hépatoprotecteur de l'extrait chloroformique de romarin.

V-4 Conclusions

Après ces diverses expérimentations les investigations sur la fraction 1.4.2 sont arrêtées en raison des trop faibles quantités restant à notre disposition. Ce fractionnement nous a cependant apporté un certain nombre de renseignements :

- la présence dans la fraction pharmacologiquement active (fraction 1.4.2) de composés de nature terpénique, notamment d'acide oléanolique et d'acide ursolique. Ces composés utilisés seuls ou associés entre eux n'ont présenté aucune activité sur le modèle expérimental utilisé et sont donc considérés comme non porteur de l'activité hépatotrope de l'extrait chloroformique de départ

- la présence de lutéoline qui possède une activité antilipoperoxydante et antinécrotique incontestable sur le modèle expérimental mais qui est présente à des doses trop faibles pour expliquer, à elle seule, l'activité pharmacologique

- la présence sur les chromatographies en phase gazeuse réalisées à partir de la fraction 1.4.2, d'un groupe de trois composés dont le spectre de masse donne un m/z de 504, 504 et 562 et dont la nature n'a pu être déterminée.

Une nouvelle tentative de purification de l'extrait chloroformique Soxhlet II de jeunes pousses de R.officinalis est donc entreprise afin d'approcher de manière plus précise les composés responsables de l'activité pharmacologique. Cet essai utilise une technique de séparation différente de la précédente et est réalisée sur chromatotron.

VI Fractionnement de l'extrait chloroformique de R.officinalls par chromatotron

Le chromatotron (Harrison Research 7924T) permet une chromatographie séparative sur couche mince, accélérée par effet centrifuge. La solution à séparer est appliquée près du centre d'un disque recouvert d'une couche d'absorbant et tournant à grande vitesse; l'élution par les différents solvants utilisés se faisant du centre vers la périphérie. La migration des différentes bandes peut être suivie en illuminant le disque par une lumière UV (254 nm). Les plaques sont réalisées la veille de chaque manipulation. 45 grammes de Kieselgel 60 PF 254 Merck sont mélangés à 90 grammes d'eau distillée. Le mélange est réparti (1mm d'épaisseur), à l'aide d'un applicateur, sur un disque de verre, propre et dégraissé avec soin, de 20 cm de diamètre. Les disques sont séchés à l'air puis à l'étuve à 70°C pendant 5 heures. Le jour de la manipulation les disques sont réactivés par un passage à l'étuve pendant une heure.

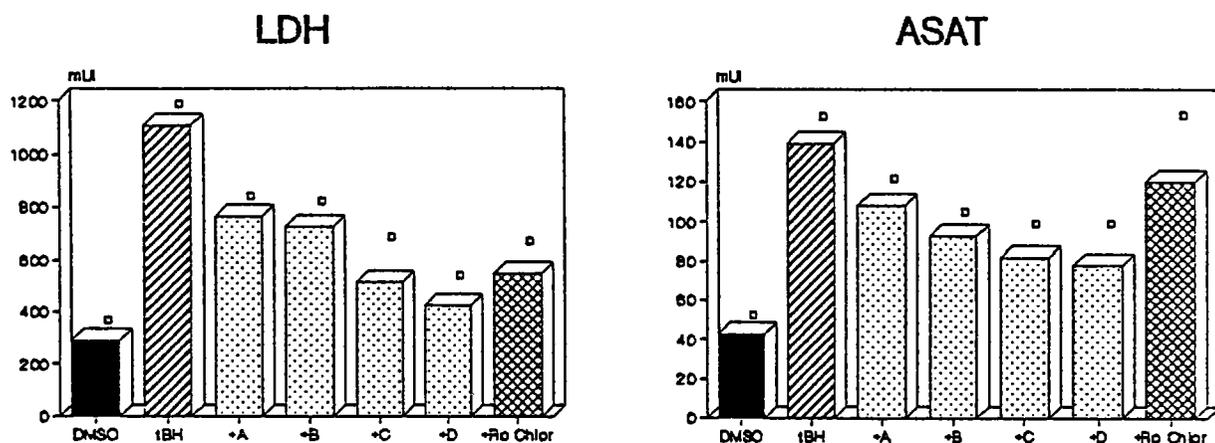
VI-1 Chromatotron I

VI-1 1 Mode opératoire

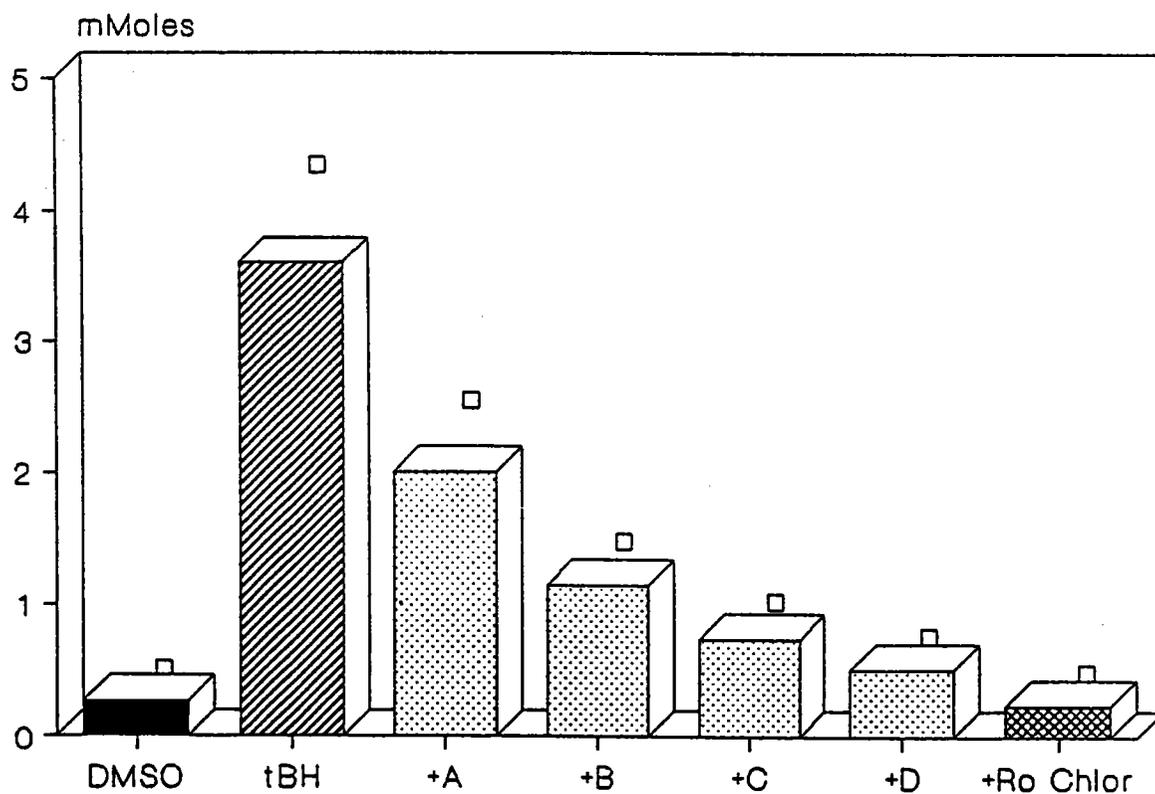
La première séparation est réalisée à partir de 100 mg de lyophilisat de l'extrait chloroformique Soxhlet II. Le chloroforme est le seul solvant d'élution utilisé. Le fractionnement est arrêté lorsque l'éluant est incolore et que les bandes n'évoluent plus. Les différentes fractions réalisées au cours du temps sont regroupées en quatre lots (A, B, C, D) correspondant à un volume d'éluant de 75 ml chacune. Les quatre fractions sont concentrées sous vide à 40°C, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

VI-1 2 Contrôle pharmacologique

Pour être testées pharmacologiquement les quatre fractions sont reprises par du DMSO de telle sorte que la concentration finale corresponde à 1 mg de plante sèche par ml de suspension d'hépatocytes. Les figures J44 montrent le comportement similaire sur la formation de malonaldéhyde et les libérations de lactate déshydrogénase et d'aspartate amino-transférase de ces quatre fractions. L'activité pharmacologique s'accroît au fur et à mesure du temps d'élution, la fraction obtenue la plus tardivement étant la plus active. Ces résultats font apparaître que les principes actifs de l'extrait chloroformique de jeunes pousses de romarin bien qu'extraient en totalité par le Soxhlet chloroformique (les extraits de polarité supérieure étant inactifs) montrent une affinité relativement peu importante pour les solvants très apolaires.



MAD



J44 : Comportement sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire des 4 fractions d'un extrait chloroformique de *R. officinalis*, obtenues par chromatotron (solvant = chloroforme)

Nous avons confirmé ce point en effectuant une extraction liquide - liquide utilisant un mélange hexane - chloroforme (1/1 v/v) à partir d'un lyophilisat d'extrait chloroformique Soxhlet II. Les fractions obtenues après une heure d'agitation sont évaporées à sec puis reprises par le DMSO pour être testées à une concentration correspondant à 1mg de plante sèche / ml de suspension hépatocytaire. Les résultats expérimentaux reproduits tableau J6 montrent clairement que la fraction hexanique contenant les composés les plus apolaires n'est pas pharmacologiquement active, le reste de l'extrait chloroformique étant très actif. Des profils chromatographiques réalisés sur la partie hexanique n'ont mis en évidence ni flavonoïdes par le réactif de NEU, ni composés terpéniques par le trichlorure d'antimoine.

VI-2 Chromatotron II

VI-2 1 Mode opératoire

Une deuxième séparation est réalisée à partir de 100 mg de lyophilisat de l'extrait chloroformique Soxhlet II. Trois solvants sont utilisés successivement, d'abord le méthanol puis l'éthyl acétate enfin le chloroforme jusqu'à nettoyage de la plaque. Les différentes fractions réalisées au cours du temps sont regroupées de façon à obtenir deux fractions méthanoliques (F1, F2) de 75 ml chacune, et deux fractions à l'éthyl acétate (F3, F4) de 75 ml chacune; toutes les fractions chloroformiques étant regroupées (F5).

VI-2 2 Caractérisations chromatographiques

* recherche des flavonoïdes

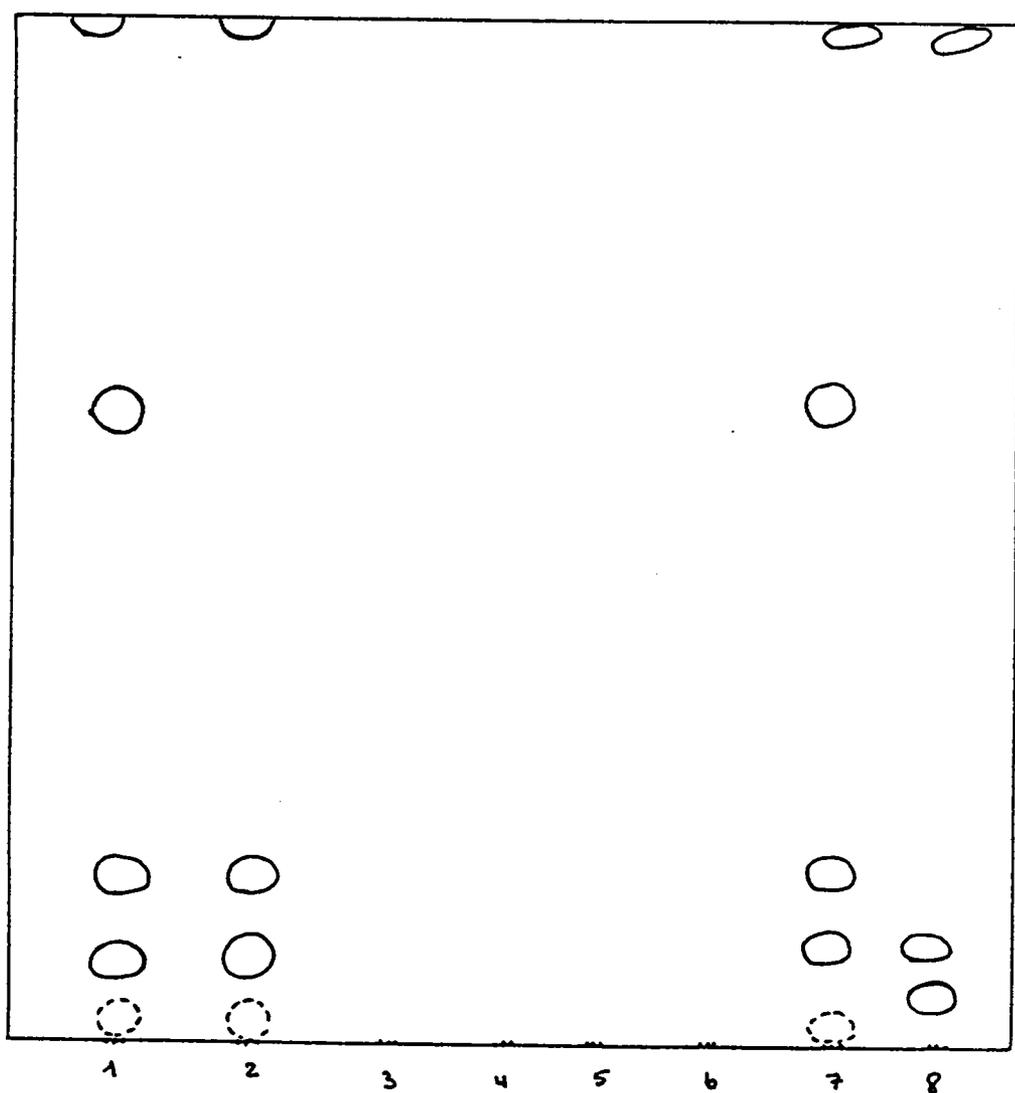
La méthodologie employée est celle précédemment décrite. Le révélateur utilisé est le réactif de NEU avec pulvérisation secondaire de PEG 4000. Les extraits chloroformiques et méthanoliques Soxhlet III sont utilisés comme témoins. Les différentes fractions F1 à F5 ne présentent aucun spot.

* recherche de composés terpéniques et stéroïdiens

Le protocole utilisé a été décrit précédemment, le solvant utilisé est un mélange benzène - acide acétique (99/1). Le révélateur est le trichlorure d'antimoine. Les témoins utilisés sont les extraits chloroformiques Soxhlet II et Soxhlet III et l'extrait méthanolique Soxhlet III (fig.45). La première fraction méthanolique (F1) issue de l'extrait chloroformique Soxhlet II présente quatre des cinq spots de l'extrait de départ, le cinquième spot situé en milieu de plaque n'apparaissant dans aucune des fractions. F1 présente deux spots non retrouvés sur l'extrait méthanolique Soxhlet III qui est sans action pharmacologique.

J45 : Recherche de triterpènes

plaque de silice Kieselgel G60 sans fluorescence (Merck)
 solvant de migration benzène 99 / acide acétique 1
 révélateur : $SbCl_3$ à 20% dans du chloroforme



1. R officinalis chloroforme Soxhlet II
2. Fraction méthanol (F1)
3. Fraction méthanol (F2)
4. Fraction éthyl acétate (F3)

5. Fraction éthyl acétate (F4)
6. Fraction chloroforme (F5)
7. R officinalis chloroforme Soxhlet III
8. R officinalis méthanol Soxhlet III

VI-2 3 Contrôle pharmacologique

Les différentes fractions (F1 à F5) sont reprises par le DMSO de sorte que la concentration finale corresponde à 1 mg de plante sèche/ml de suspension. L'activité pharmacologique de ces fractions sur les phénomènes peroxydatifs et le relargage enzymatique est représentée figure J46. L'intoxication est franche pour les trois paramètres considérés. La première fraction méthanolique entraîne une hépatoprotection manifeste, les autres extraits sont totalement inefficaces.

VI-3 Chromatotron III

VI-3 1 Mode opératoire

En fonction des résultats précédents, une troisième procédure de séparation est effectuée à partir de 100 mg de lyophilisat d'un extrait chloroformique (Soxhlet II) de jeunes pousses de *R. officinalis*. Dans un premier temps quatre fractions sont isolées selon la procédure suivante :

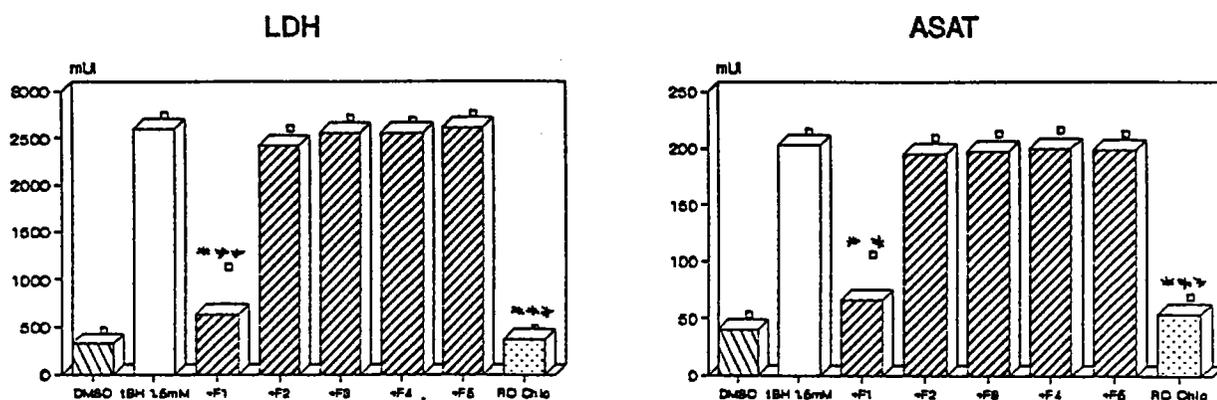
- * fraction 1 ← passage de 75 ml de chloroforme
- * fraction 2 ← passage de 75 ml supplémentaire de chloroforme
- * fraction 3 ← passage de 75 ml de méthanol
- * fraction 4 ← passage de 75 ml d'un mélange méthanol-acide acétique (95/5 v/v)

La fraction 3, après concentration au rotovapor, est reprise sur chromatotron selon la séquence suivante :

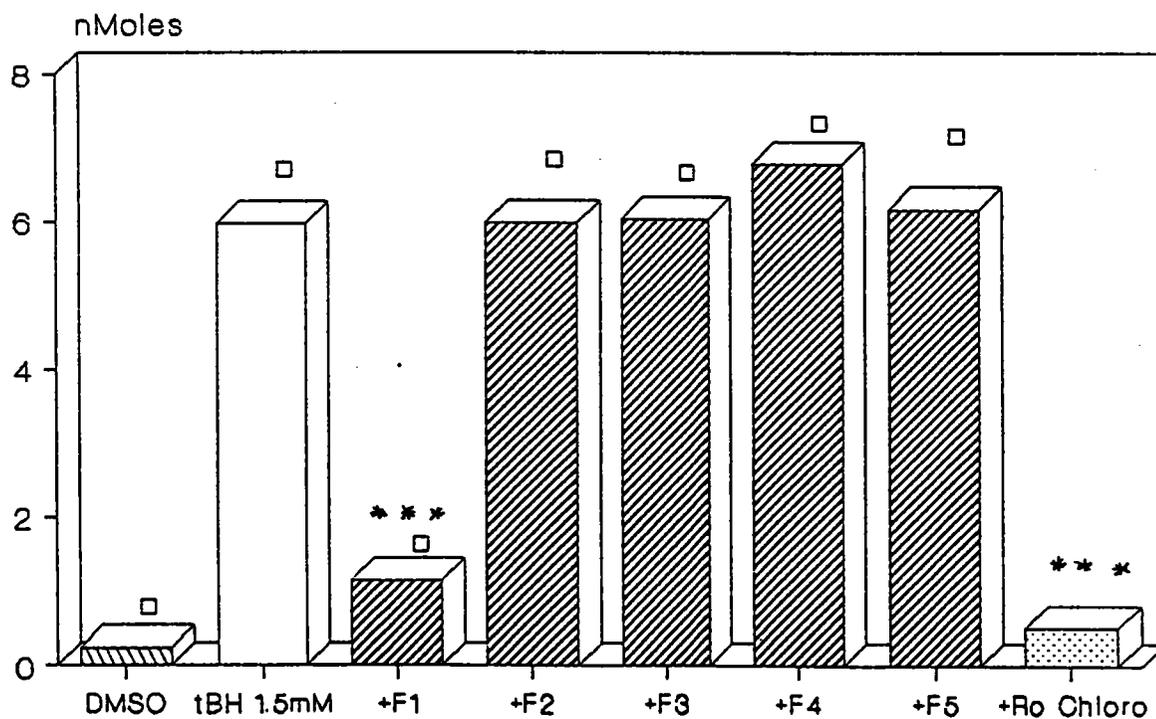
- * fraction 3.1 ← passage de 75 ml d'un mélange CHCl_3 + CH_3COOH (95/5 v/v)
- * fraction 3.2 ← passage de 75 ml supplémentaire d'un mélange CHCl_3 + CH_3COOH (95/5 v/v)
- * fraction 3.3 ← passage de 75 ml de méthanol

Après concentration, la fraction 3.3 est elle même repassée sur chromatotron

- * fraction 3.3.1 ← passage de 75 ml de CHCl_3
- * fraction 3.3.2 ← passage supplémentaire de 75 ml de CHCl_3
- * fraction 3.3.1 ← passage de 75 ml de CH_3COOH



MAD



J46 : Comportement sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire des 5 fractions d'un extrait chloroformique de *R. officinalis*, obtenues par chromatotron
 (solvant = méthanol pour F1 et F2)
 (solvant = éthyl acétate pour F3 et F4)
 (solvant = chloroforme pour F5)

VI-3 2 Caractérisation chromatographique

La recherche de composés de nature stéroïdes et terpéniques est réalisée, sur les différentes fractions obtenues, par CCM (gel de silice G60 Merck) en utilisant le chloroforme comme solvant de migration. La figure J47 présente les taches obtenues après révélation par une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine.

Les fractions 1 et 2 sont les plus riches en nombre de spots révélés; on y retrouve notamment l'acide ursolique utilisé comme standard pour vérifier la qualité de la migration et de la révélation. Une seconde plaque est mise à migrer dans les mêmes conditions en vue de la recherche de stéroïdes. Après séchage la plaque est pulvérisée par un mélange acide phosphorique/ eau (1/2) jusqu'à ce que celle-ci devienne translucide, elle est ensuite placée à l'étuve à 120° C pendant 10 minutes puis rapidement lue en lumière U.V. à 360 nm. Les stéroïdes et stérols insaturés sont alors recherchés en pulvérisant sur la plaque encore chaude une solution fraîchement préparée de 1,5 g d'acide phosphomolybique dans 100 ml d'éthanol. Il apparaît une coloration bleue des spots correspondant aux composés insaturés, coloration qui s'intensifie après un bref passage à l'étuve (2' à 3'). La figure J47 montre les résultats observés, quelques rares spots apparaissent ainsi secondairement bleutés, dans l'ensemble la distribution des taches est identique à celle obtenue après pulvérisation de trichlorure d'antimoine.

VI-3 3 Contrôle pharmacologique

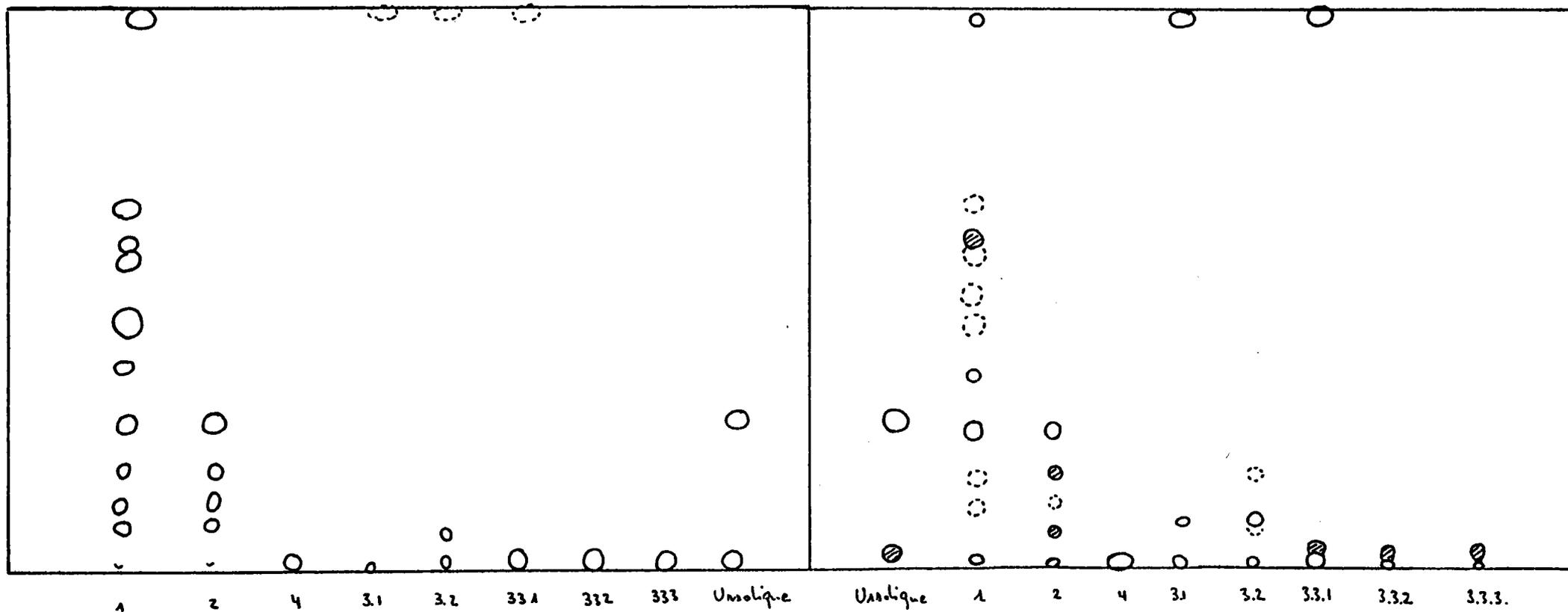
Les différentes fractions sont reprises par le DMSO afin d'étudier leur activité antilipoperoxydante et antinécrrotique. Les doses testées sont équivalentes à 1 mg de plantes sèches / ml de suspension hépatocytaire. La figure J48 montre clairement que la fraction 3.2 est la plus efficace tant sur les phénomènes peroxydatifs que sur les fuites enzymatiques signant la nécrose cellulaire.

Solvant : Chloroforme

Révélateur : Trichlorure d'antimoine

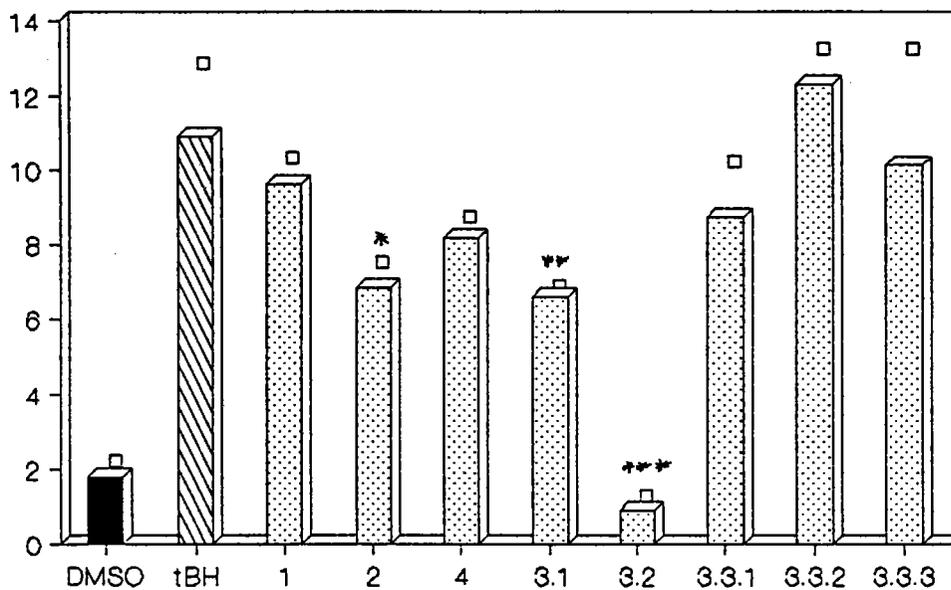
Solvant : Chloroforme

Révélateur 1 : acide phosphorique
Révélateur 2 : acide phosphomolybdique

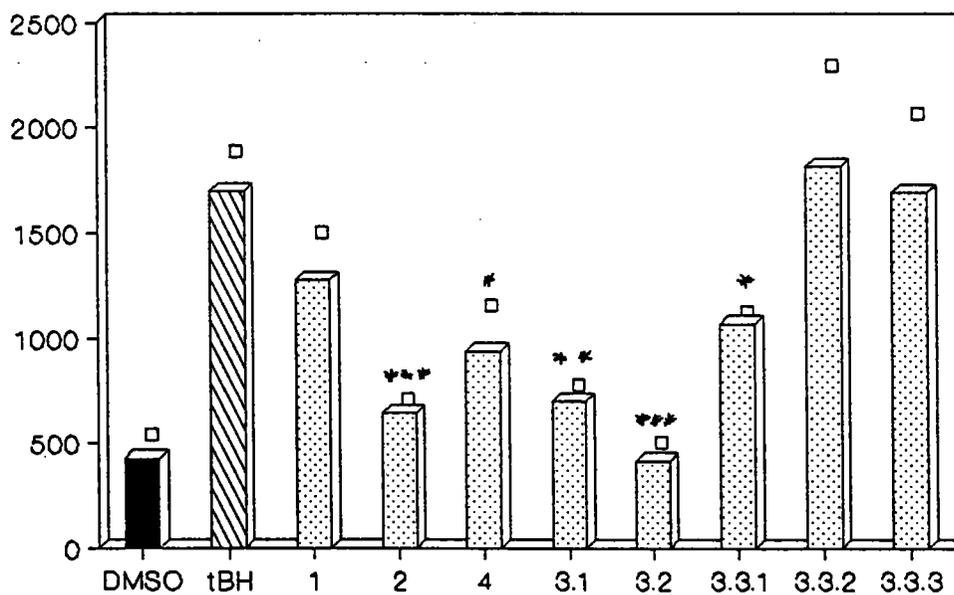


J47 : Chromatographie couche mince de la fraction 3.2.

MAD



LDH



J48 : Comportement sur la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire des fractions obtenues par chromatotron (chromatotron III)

VI-3-4 Identification de la fraction 3.2

La fraction 3.2 est analysée par chromatographie en phase gazeuse après silylation. La température de l'injecteur est de 180°C, le programme de température du four débute à 240°C, reste stable pendant 1 minute puis augmente de 10°C par minute jusqu'à 280°C.

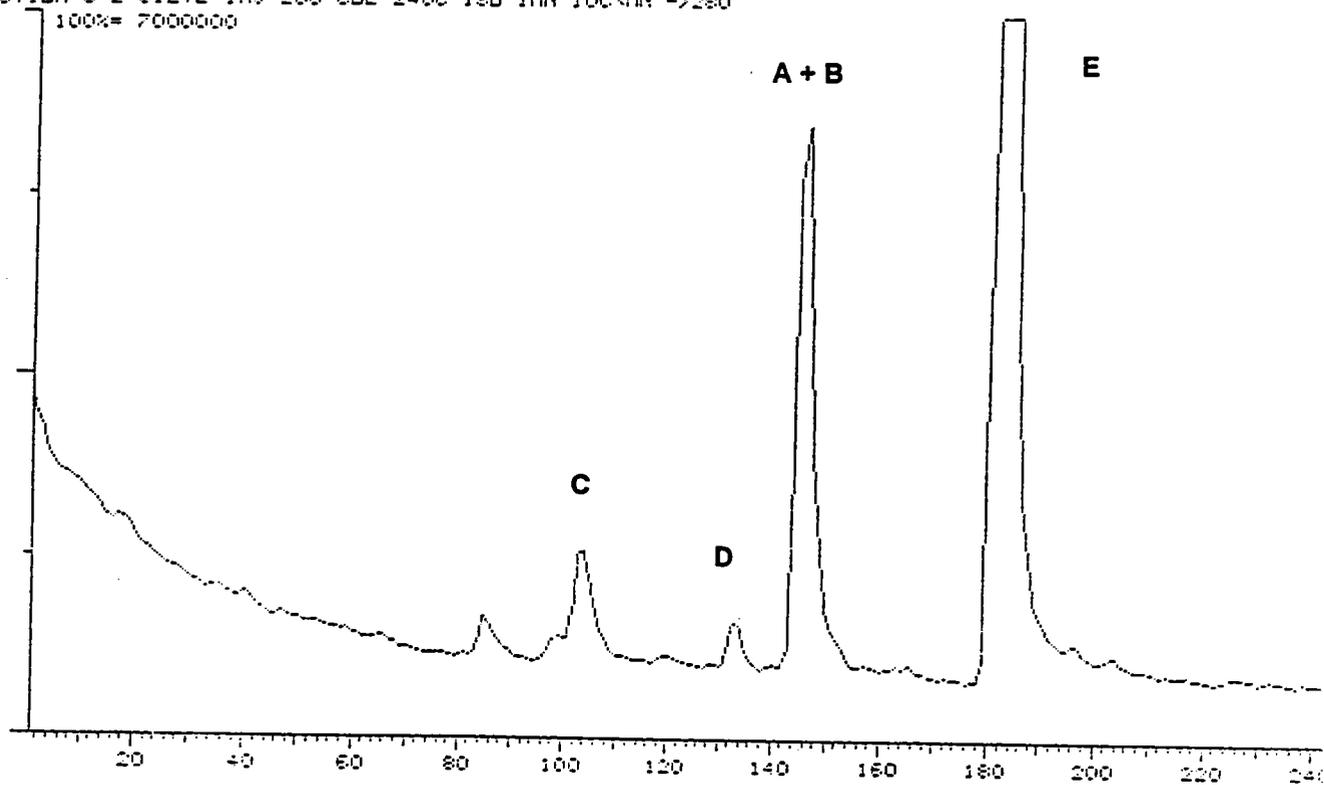
Cinq composés majoritaires sont retrouvés (fig J49). Leurs masses varient de 279 à 515 (fig J50 et J51). En comparant les spectres de masse de la fraction 3.2 avec ceux des composés issus de la fraction 1.4.2., on constate que l'on retrouve un et un seul composé commun à ces deux fractions. Le composé A de masse égale à 504 possède en effet un spectre de masse superposable à celui présenté figure J41. On peut donc conclure que les deux procédures de fractionnement retenues, qui utilisent des méthodologies différentes (chromatotron et C.C.M. préparative) permettent d'isoler un même composé dans les fractions pharmacologiques les plus actives. Ce composé peut donc être considéré, selon toute vraisemblance comme porteur principal de l'activité pharmacologique (antillipoperoxydante et antihépatotoxique) de Rosmarinus officinalis.

VI-3-5 identification du composé porteur de l'activité pharmacologique.

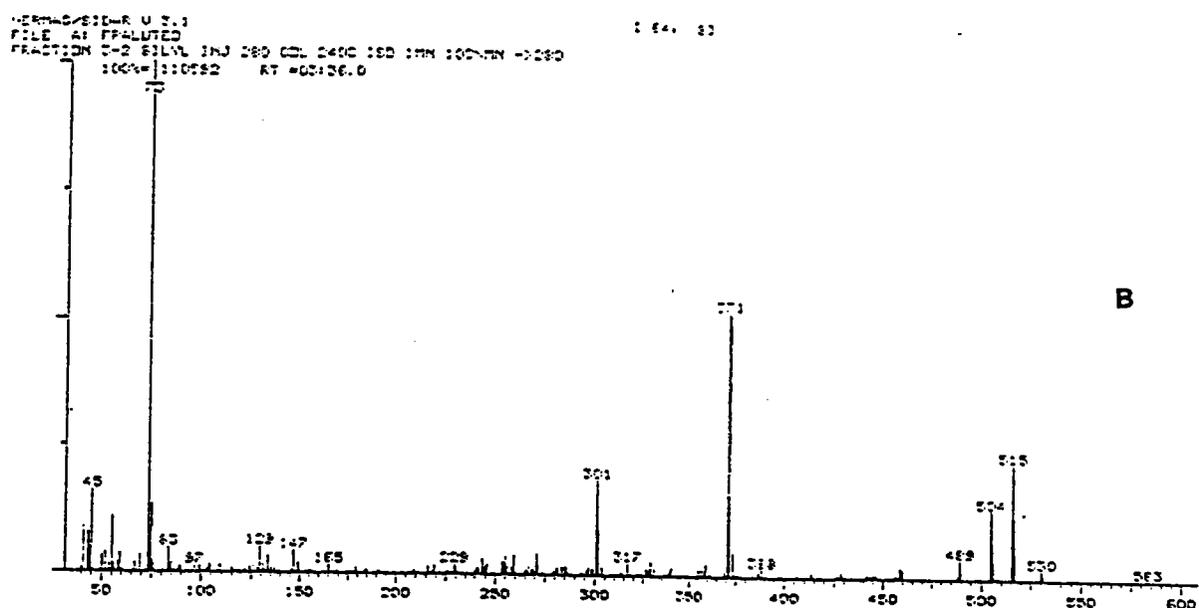
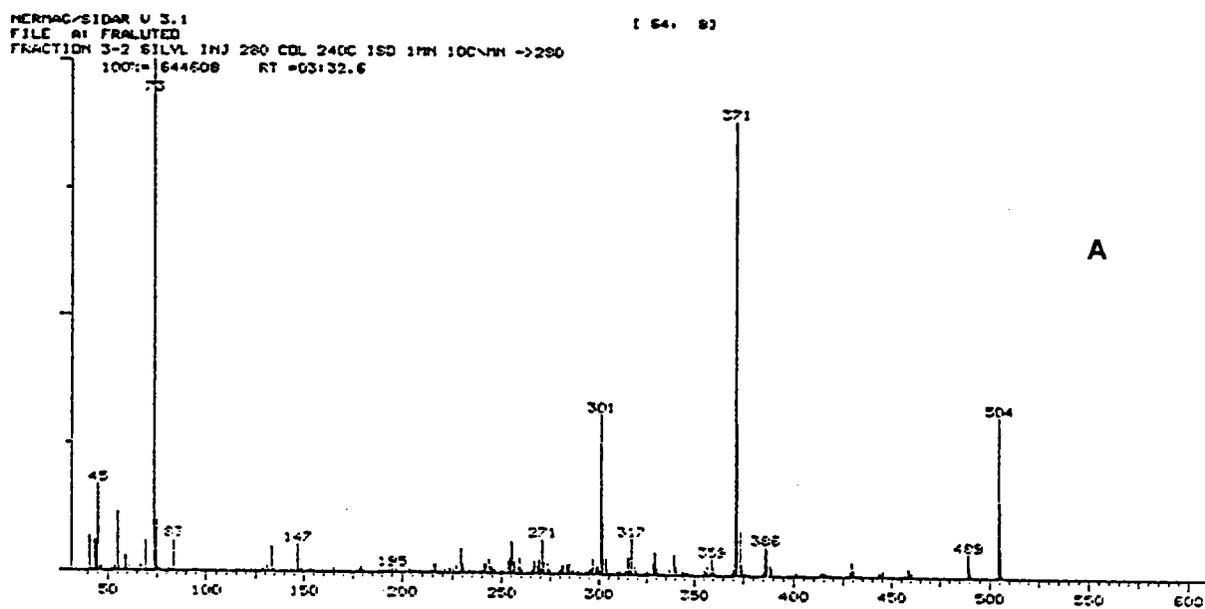
En raison des procédures utilisées au cours du fractionnement et des spectres de masse obtenus, nous avons émis l'hypothèse que le composé porteur de l'activité hépatotrope pourrait appartenir au groupe des lactones triterpéniques présents dans le romarin et dont les composés principaux ont été primitivement isolés de Salvia officinalis (Brieskorn, 1962). Ces composés, dont les chefs de file sont le carnosol et le rosmanol présentent d'ailleurs une remarquable activité antioxydante dans divers tests, non biologiques, utilisés en vue de la recherche d'antioxydants alimentaires (test de l'oxydation des "tranches de lard") (Inatani et coll., 1982). Le composé présentant un m/z à 562 de la fraction 1.4.2. pouvait en théorie correspondre au rosmanol. Le principe actif retenu de m/z à 504 devant correspondre à un méthyl-rosmanol, la présence du groupement méthyle empêchant la silylation du groupement hydroxyle correspondant ($562-73+15 = 504$).

La très faible quantité de fraction isolé n'a pas permis une identification correcte par RMN aussi avons nous cherché à confirmer cette hypothèse en nous procurant un échantillon de rosmanol auprès des rares équipes qui l'avait déjà isolé dans Salvia officinalis. Qu'il me soit permis de remercier le Docteur Berganza de l'université de Asuncion (Paraguay), le Docteur Ferro Esteban de l'université San Lorenzo (Paraguay), le Professeur Toshimizu Hayashi de la faculté de Pharmacie de Toyama (Japon) et surtout le Professeur Javier Gutierrez de l'université de Tenerife (Espagne) qui a pu nous fournir 5 mg de rosmanol. Le

HERMAG/SIDAR U 3.1
FILE A: FRALUTED
FRACTION 3-2 SILYL INJ 280 CCL 240C 180 111H 100N1H ->280
100% = 7000000

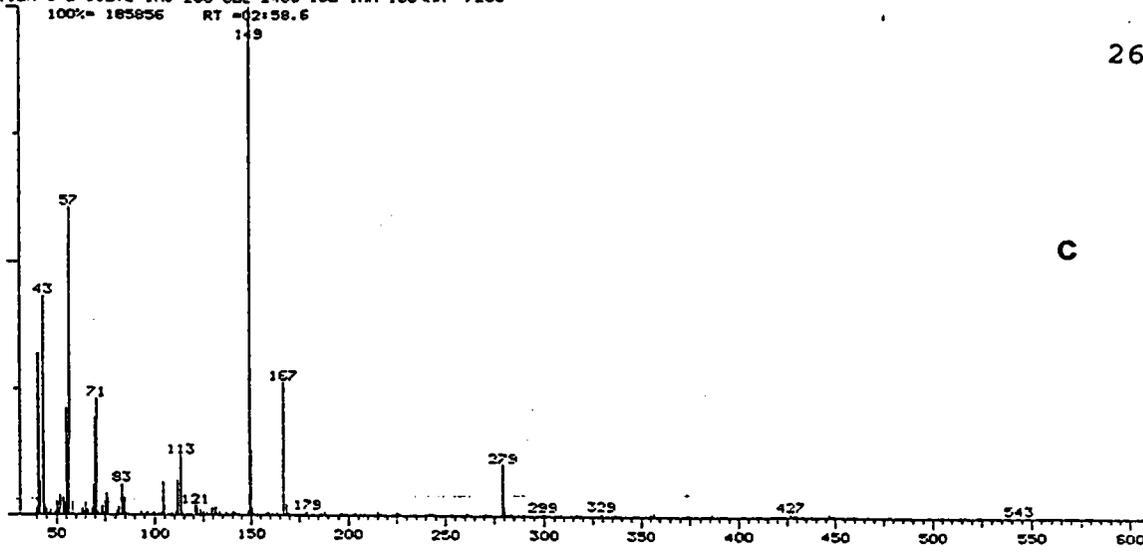


J49 : Chromatogramme de la fraction 3.2.



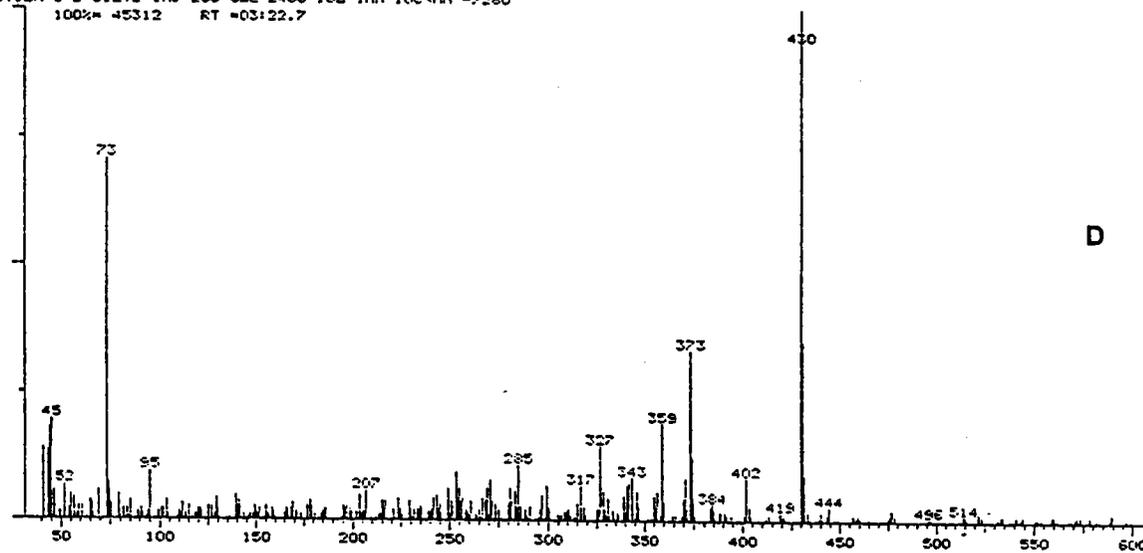
J50 : Spectres de masse des composés A et B de la fraction 3.2.

FILE A: FRALUTED
FRACTION 3-2 SILYL INJ 280 CDL 240C ISD 1MN 10C/MN ->280



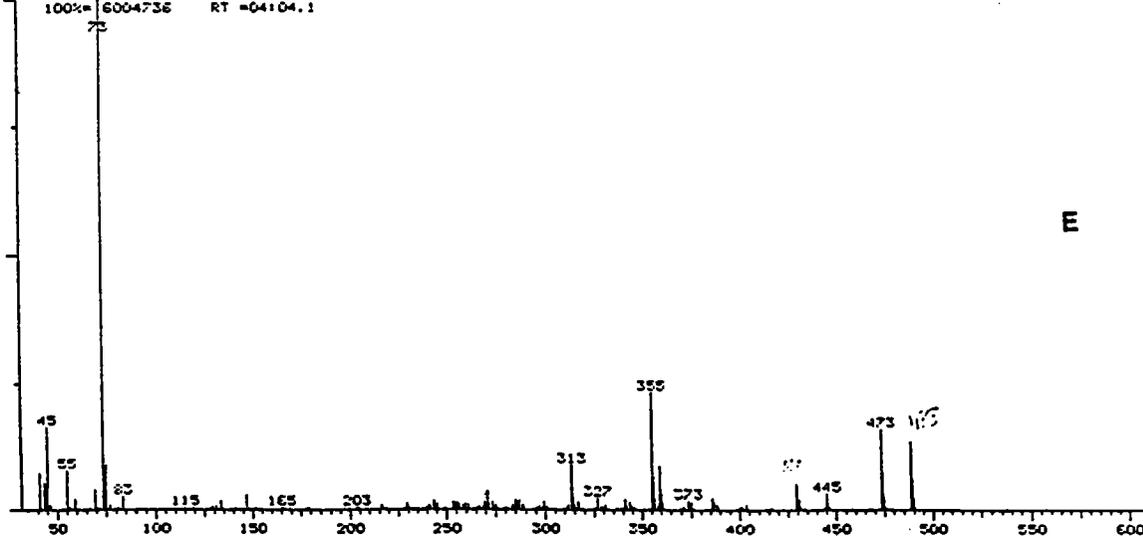
C

NERMAC/SIDAR U 3.1
FILE A: FRALUTED
FRACTION 3-2 SILYL INJ 280 CDL 240C ISD 1MN 10C/MN ->280



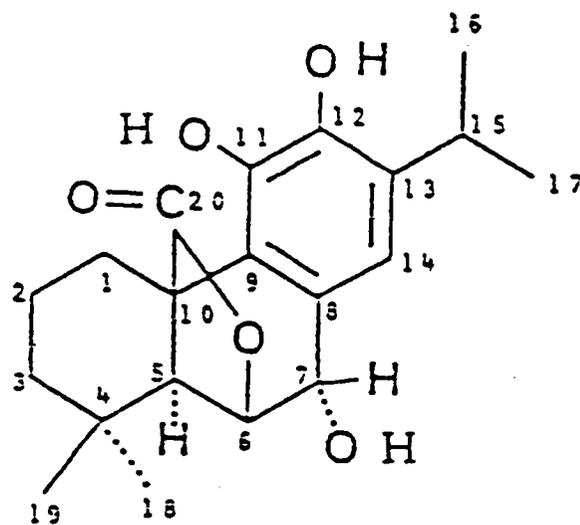
D

NERMAC/SIDAR U 3.1
FILE A: FRALUTED
FRACTION 3-2 SILYL INJ 280 CDL 240C ISD 1MN 10C/MN ->280



E

J51 : Spectres de masse des composés C, D et E de la fraction 3.2.



Structure chimique du rosmanol

spectre de masse correspondant à cet échantillon de rosmanol est reproduit figure J53 (après silylation) et J54 (sans silylation). Il est tout à fait superposable à celui du dernier composé du groupe 1 de la fraction 1.4.2. (fig J43). Ainsi en raison du comportement chromatographique et de son spectre de masse le composé présentant un pic à $m/z = 504$ semble bien correspondre à un dérivé méthoxylé du rosmanol. La fragmentation en spectrométrie de masse, du dérivé silylé paraît le confirmer :

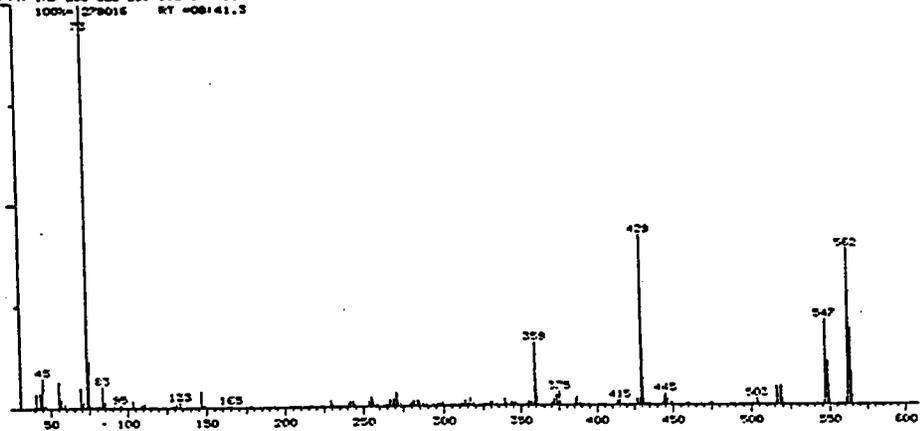
- le pic à m/z 489 correspond à la perte d'un CH_3 ($504-15=489$)
- le pic intense à m/z 371 correspond à la perte d'un groupement OSiCH_3 et de CO_2 provenant de la fonction lactonique ($504-89-44=371$)
- le pic à m/z 301 correspond à la perte d'un groupement $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ à partir de l'ion de fragmentation à m/z 371 ayant capté 3 hydrogène ($371+3-73=301$)
- le pic à un m/z 485 correspond à la perte d'un méthoxyle (OCH_3) à partir de l'ion de fragmentation à m/z 489.

En l'absence de RMN, il est difficile de savoir à quel niveau se situe la méthylation puisque 3 OH du rosmanol en position 7, 11 et 12, sont susceptibles d'être méthoxylés; les positions 11 et 12 semblent cependant plus probables. La fraction 1.4.2. possède d'ailleurs deux composés présentant un pic à un m/z à 504 mais dont le temps de rétention chromatographique et l'intensité du pic à 489 sont légèrement différents, il est probable que ces deux composés sont des isomères, le premier ayant son méthoxyle à un niveau donné et le second à un autre niveau.

L'activité pharmacologique du rosmanol est confirmée sur le modèle d'hépatocytes isolés intoxiqués au tert butyl hydroperoxyde. 25 mM de rosmanol inhibent totalement la formation de malonaldéhyde et réduisent très significativement les phénomènes nécrotiques.

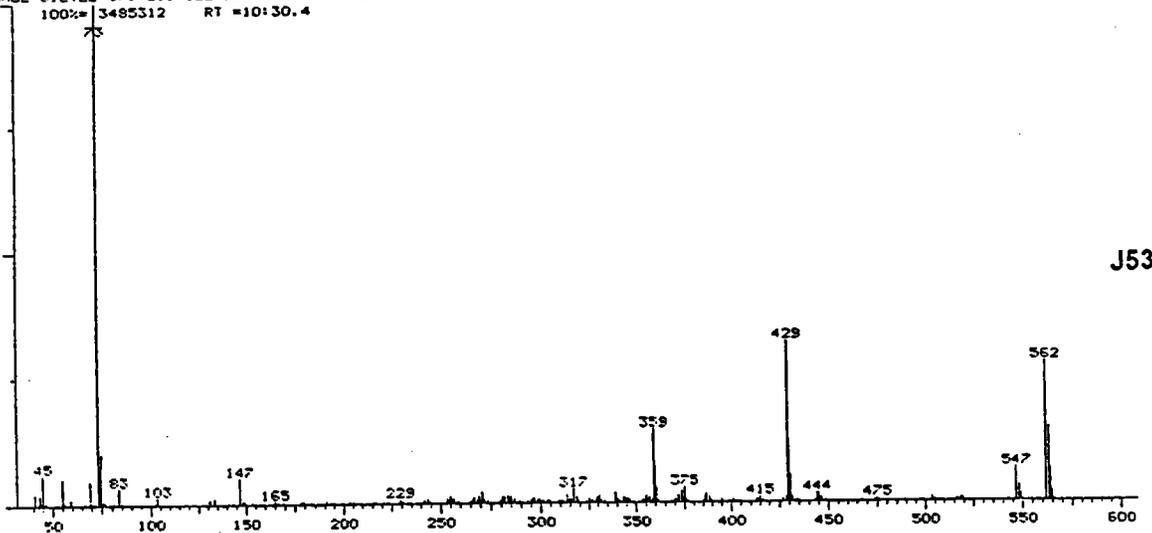
	MAD	LDH	ASAT
DMSO	0.31 ± 0.06	422 ± 72	29 ± 13
tBH 1,5 mM	6.82 ± 0.80	2428 ± 250	116 ± 15
tBH + rosmanol 100 mM	0.25 ± 0.05	268 ± 28	20 ± 1
tBH + rosmanol 50 mM	0.32 ± 0.06	350 ± 88	22 ± 2
tBH + rosmanol 25 mM	0.35 ± 0.08	434 ± 73	31 ± 2

NEPTAG/SIDAR U 3.1
FILE A: DSI475
EON X FT 1W 280 COL 220 180 9NH SCVH ->
100% 278016 RT =08:41.3



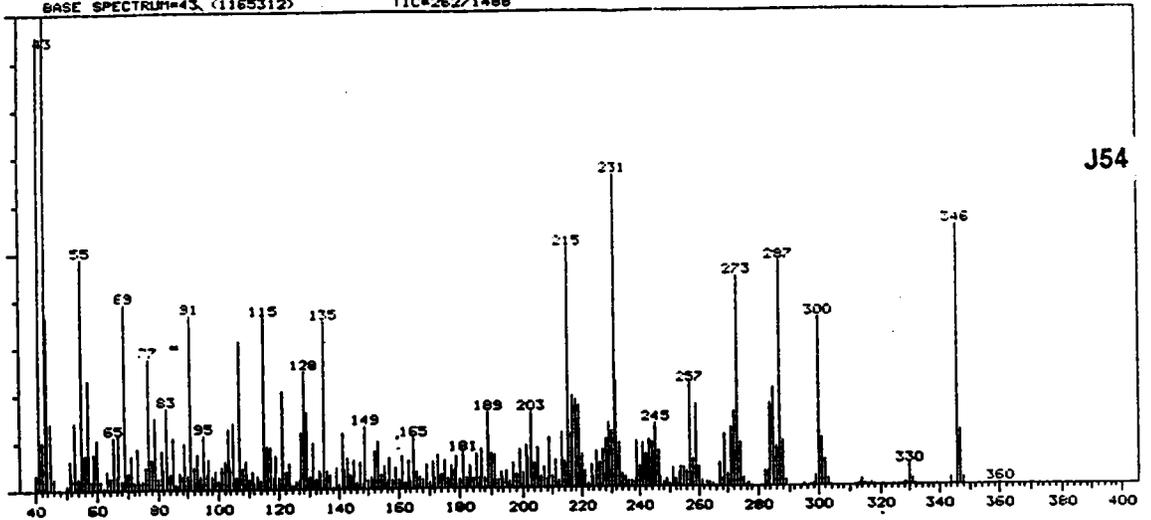
J43

NEPTAG/SIDAR U 3.1
FILE A: ROSMANTIL
ROSMANOL SILVLE INJ 260 COL 200C 1SD 27H SCVH ->
100% 3485312 RT =10:30.4



J53

NEPTAG/SIDAR U 3.1
FILE A: ROSMANTIL
ROSMANOL TENDIN DI EI+ 70EV
100% 1165312 RT =00:39.4
BASE SPECTRUM=43. (1165312) TIC=26271488



J54

K Conclusions générales

Qu'elles soient de tradition orale ou écrite, la plupart des cultures reconnaissent un rôle de première importance au foie; son activité pouvant être clairement individualisée ou perçue de manière globale, à côté de celle d'autres organes, dans une fonction dépurative ou de drainage. Il n'est donc pas surprenant de retrouver les médications "hépatoprotectrices" très largement représentées dans toutes les pharmacopées traditionnelles. Souvent utilisé, ce terme d'hépatoprotecteur suggère un mécanisme de protection recouvrant tous les aspects de la maladie, ce qui semble bien ambitieux. En effet, l'atteinte hépatique peut être extrêmement variable dans ses traductions morbides, allant de la simple surcharge graisseuse asymptomatique à la nécrose irréversible. Au mieux, ce terme ne pourra-t-il s'appliquer, dans un cadre largement plus restrictif, qu'à un mécanisme ou plus encore à une voie toxique bien déterminée. Parmi les pathologies hépatiques, les atteintes d'origine toxique sont précisément un champ d'exploration particulièrement intéressant. D'abord en raison de leur fréquence croissante, aussi bien pour les manifestations aiguës que les atteintes à plus long terme, ensuite pour leur plus grande facilité à être reproduites sur le plan expérimental.

Aussi ce travail est-il consacré à la recherche d'espèces végétales traditionnelles pouvant être utilisées avec bénéfice dans ce type d'étiologie. Cette recherche est réalisée à l'aide de techniques *in vitro* qui nous ont semblé les plus aptes à l'évaluation rapide des potentialités antihépatotoxiques de ces espèces. Malgré les nombreux avantages de l'approche expérimentale *in vitro*, que nous avons eu l'occasion de détailler, il convient de rappeler, une fois encore, le caractère restrictif que peut présenter une telle démarche. En effet, la toxicité d'une substance dépend de nombreux mécanismes séquentiels qui conditionnent son devenir et l'intensité de ses effets biologiques comme les phénomènes d'absorption, de distribution tissulaire, d'excrétion, de cinétique de concentration au niveau des sites d'action, qui sont autant de cibles étrangères à une approche expérimentale non globale. Notre propos n'était donc pas tant de confirmer la tradition que de rechercher, à partir de celle-ci, une médication directement active au niveau cellulaire.

Les pharmacopées traditionnelles permettent d'établir une première sélection parmi les espèces végétales potentiellement actives sur les désordres hépatiques au sens large. Encore faut-il que les modèles expérimentaux correspondent à un mécanisme toxique suffisamment général pour être représentatif des nombreuses voies d'activation pouvant être retrouvées dans l'organisme. Bien que les mécanismes de biotransformation soient extrêmement complexes et variés, l'expression de leur toxicité, au niveau hépatique, passe généralement par deux modalités essentielles, l'apparition de radicaux libres et celle de composés électrophiles. Les premiers, en induisant une peroxydation lipidique, provoquent une désorganisation à la fois structurale et fonctionnelle des endomembranes cellulaires. Les seconds, par leurs combinaisons aux macromolécules, perturbent l'économie cellulaire et réduisent de manière drastique les principaux

éléments des systèmes de protection cellulaire. Les investigations pharmacologiques doivent donc permettre de retrouver les différents protagonistes de l'action toxique. Le tétrachlorure de carbone, toxique classiquement utilisé dans les expérimentations *in vitro*, présente des inconvénients bien connus et nous avons cherché à développer un modèle reposant sur un toxique d'utilisation plus aisée. Les mécanismes toxiques mis en jeu devaient, en effet, être plus finement ciblés et permettre de retrouver à la fois les conséquences de l'atteinte radicalaire et celle de l'atteinte électrophile. Après avoir expérimenté un certain nombre de toxiques susceptibles de répondre à cette attente, le tert butyl hydroperoxyde a été retenu. Son métabolisme au niveau des hépatocytes est maintenant bien connu; son action repose sur l'apparition de radicaux libres induisant une peroxydation lipidique beaucoup plus intense que celle provoquée par le tétrachlorure de carbone et une déplétion marquée du glutathion qui signe l'activité thioloprive et entraîne la nécrose cellulaire. Ces deux mécanismes peuvent être facilement dissociés, les phénomènes peroxydatifs ne jouant pas un rôle prépondérant dans la toxicité à court terme de ce composé. En outre, en fonction de la dose utilisée, le tBH peut isoler des répercussions purement métaboliques, probablement plus proches de certains mécanismes d'agression *a minima*, ou explorer des perturbations de l'équilibre calcique intracellulaire. De ce fait, il permet non seulement un screening primaire mais également l'approche des niveaux d'impact des mécanismes de protection, ce qu'autorise plus difficilement l'usage du tétrachlorure de carbone.

Par rapport à d'autres systèmes d'intoxication, comme par exemple le système Ascorbate-Fer, le tert butyl hydroperoxyde présente l'avantage de nécessiter une métabolisation intracellulaire afin de développer son action toxique, de réunir très rapidement tous les facteurs développant la nécrose cellulaire et d'être à l'abri de phénomènes de complexation. Ce point est particulièrement important concernant l'étude *in vitro* d'extraits végétaux qui, contrairement à celle de molécules pures, apporte dans le milieu d'étude un très grand nombre de composés. En effet, les risques d'interaction au niveau extracellulaire entre le toxique et certains constituants de l'extrait ne doivent pas être négligés. En réduisant la quantité de toxique disponible, ces interactions entraînent une hépatoprotection qui n'est que fictive, ne reflétant qu'un degré d'intoxication moindre et non un véritable effet de protection au niveau cellulaire.

Parmi les 26 espèces végétales testées, 17 ont une indication hépatotrope traditionnelle et sont utilisées soit en monothérapie soit en association; 9 espèces ont des indications traditionnelles totalement étrangères à la sphère hépatobiliaire. Parmi les 17 espèces traditionnellement utilisées dans les affections hépatiques, 12 possèdent une activité plus ou moins importante au cours des tests *in vitro*. Dans cette étude, la tradition se confirme donc dans 71% des cas. Parmi les espèces végétales sans indication hépatique, une seule possède une activité sur hépatocytes isolés. Au total, la tradition est très largement confirmée puisque dans plus de 2/3 des cas, les données empiriques sont vérifiées sur le modèle expérimental. Ces résultats démontrent assez bien l'intérêt de l'approche ethnopharmacologique par rapport à un screening non sélectif, réalisé "à l'aveugle". Cependant, cette approche n'est pas dénuée d'un certain nombre de

difficultés sur lesquelles nous voudrions à nouveau insister.

* Le problème posé par l'identification botanique précise est une évidence pour chacun et il n'est guère besoin d'y insister.

* L'existence de convergence d'usage d'une espèce végétale entre divers tradipraticiens d'une même ethnie et plus encore d'ethnies différentes, renforce l'intérêt de cette espèce et doit être plus largement recherchée.

* La fréquence d'utilisation de telle ou telle plante et sa place dans l'arsenal thérapeutique du tradipraticien permettent au pharmacologue de pondérer des informations souvent recueillies en très grand nombre et de les hiérarchiser. Les recueils de pharmacopées traditionnelles gagneraient à préciser plus clairement les fréquences d'utilisation, pour permettre d'écartier des médications mineures.

* Il semble préférable de retenir en première intention les plantes utilisées en monothérapie par rapport à celles entrant uniquement dans le cadre d'association. Les remèdes associant plusieurs espèces végétales exposent au risque d'un résultat faussement négatif lorsque les différents constituants du remède sont testés séparément, ce qui se produit généralement au cours d'un screening primaire.

* Le cadre clinique de l'indication traditionnelle est généralement trop fragmentaire. Les données sémiologiques amenant l'usage de telles plantes plutôt que de telles autres sont très fréquemment absentes et laissent place à des indications généralement très larges qui appauvrissent considérablement le travail de terrain. Il est évident que les systèmes de décriptage de la maladie sont fort différents en médecine populaire, traditionnelle ou "moderne" et que les "signes" émis par le patient sont interprétés selon des échelles de valeur différentes. Cependant, dans tous les cas, la relation sémiologie-remède reste fondamentale. Cela nécessite un travail de transcription délicat pour l'ethnologie, travail qu'il est cependant seul en mesure d'effectuer.

Concernant la sphère hépatique, il est surprenant de retrouver l'indication d'ictère, de manière quasi systématique pour toutes les plantes hépatoprotectrices, sans que ne soient jamais précisés le mode d'installation de l'ictère, sa durée, ses signes d'accompagnement et qu'à aucun moment il ne soit fait référence à la palpation et l'observation du malade, à l'état des téguments ou encore à l'existence de douleur ou d'autres signes d'orientation. En un mot, les recueils de pharmacopée traditionnelle négligent généralement les éléments de diagnostic retenus par les tradipraticiens; bien que n'étant pas obligatoirement similaires aux nôtres, ils n'en sont, cependant, pas moins informatifs sur la nature de la maladie.

* Le mode de préparation (plante fraîche, solvant d'extraction) est bien évidemment un autre point de divergence éventuelle entre la tradition et l'expérimentation et peut expliquer un certain nombre de résultats pharmacologiques négatifs. Souvent, les propriétés décrites pour une plante, entité botanique, sont attribuées à des extraits qui ne représentent qu'une partie seulement de la composition chimique de cette plante et donc de ses potentialités thérapeutiques.

Après comparaison de l'activité des différents extraits végétaux testés, l'étude s'est poursuivie de manière plus approfondie sur deux espèces végétales, Euphorbia hirta et Rosmarinus officinalis.

La réalisation d'une série d'extractions par la technique du soxhlet, à l'aide de solvants de polarité croissante, a permis de mettre à jour une différence essentielle entre ces deux espèces. Pour Euphorbia hirta, seul l'extrait aqueux est actif sur le modèle expérimental alors que pour Rosmarinus officinalis c'est, au contraire, la fraction la plus apolaire, l'extrait chloroformique, qui renferme les principes actifs. L'extrait aqueux, obtenu par soxhlet après épuisement par le chloroforme, contrairement à l'extrait aqueux obtenu par infusion-macération de jeunes pousses de romarin, ne présente plus aucune activité pharmacologique. Une chromatographie en couche mince, à la recherche de composés apolaires dans l'extrait obtenu par infusion-macération a d'ailleurs permis de mettre en évidence la présence de triterpènes. L'infusion-macération aqueuse, à 37°C pendant 4 heures, est donc un mode de préparation qui permet le transfert de composés relativement peu polaires. La présence de ces composés, susceptibles d'être porteurs de l'activité hépatoprotectrice, peut par conséquent expliquer l'activité pharmacologique de l'extrait aqueux réalisée par infusion-macération; leur concentration, naturellement inférieure à celle retrouvée dans un extrait chloroformique, expliquant le plus faible niveau de protection obtenu.

Ce point nous semble particulièrement important dans la mesure où, pour s'approcher le plus possible de la tradition, les expérimentations sont souvent uniquement conduites à partir d'un extrait aqueux. Devant les résultats obtenus ici, il paraît donc judicieux, dès la phase de screening primaire, de "dépasser" la tradition en utilisant en plus un solvant très apolaire afin d'explorer de manière plus complète les potentialités pharmacologiques des espèces étudiées.

En raison de l'intensité de l'activité pharmacologique observée, les tentatives de fractionnement se sont rapidement focalisées sur Rosmarinus officinalis. Deux techniques de fractionnement ont été utilisées, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie centrifuge. L'intérêt essentiel de la démarche suivie réside dans le fait que chaque étape du fractionnement est déterminée en fonction des résultats obtenus sur le modèle expérimental.

Les deux procédures utilisées aboutissent chacune, après un certain nombre d'étapes, à l'isolement d'une fraction qui, à elle seule, conserve la part essentielle de l'activité de l'extrait de départ. L'analyse, en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, des deux fractions obtenues permet l'identification d'un composé commun, dérivé méthylié du rosmanol. Ce dernier paraît être le porteur principale de l'activité antiradicalaire, antilipoperoxydante et antinéocrotique de Rosmarinus officinalis dans la mesure où les autres constituants majoritaires de ces fractions se sont montrés inactifs (acide ursolique et acide oléanolique) ou présents en une trop faible quantité pour être efficaces (lutéoline). La présence de rosmanol a pu

être retrouvée dans l'un de ces extraits et ses activités antilipoperoxydante et antihépatotoxique vérifiées expérimentalement.

Le rosmanol et ses dérivés, en particulier les dérivés méthoxylés peuvent donc être considérés comme les principes actifs de Rosmarinus officinalis à l'encontre des phénomènes peroxydatifs qui représentent une des voies toxiques majeures dans la pathogénèse de nombreuses lésions hépatiques, mais également d'atteintes non hépatiques en relation avec une agression radicalaire. L'intensité des effets obtenus in vitro justifie la recherche de leur confirmation sur des modèles in vivo mais surtout l'exploration expérimentale d'autres conséquences de l'atteinte radicalaire pour lesquelles le Romarin, ou une partie de ses constituants, pourrait être utilisé avec bénéfice.

- AHR H.J., KING L.J., NASTAINCZYK W., ULLRICH V., 1980, The mechanism of chloroform and carbon monoxide formation from carbon tetrachloride by microsomal cytochrome P450, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2855-2861.
- AHR H.J., KING L.J., NASTAINCZYK W., ULLRICH V., 1982, The mechanism of reductive dehalogenation of halothane by liver cytochrome P450, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 383-390.
- ALLEN J.R., CARSTENS L.A., 1971, Monocrotaline-induced Budd-Chiari syndrome in monkeys, *Ann. J. Dig. Dis.*, 16, 111-121.
- ARMSTRONG J.B., MANLEY P.N., BRIEN J.F., ARMSTRONG P.W., 1984, Amiodarone hepatotoxicity simulating alcoholic liver disease, *N. Engl. J. Med.*, 311, 167-172.
- ARVIS P.Y., 1989, Utilisation des hépatocytes en culture pour le criblage toxicopharmacologique de substances naturelles hépatotropes, 236 p., Doctorat de Sciences de l'Université de METZ, METZ.
- BARKER E.A., SMUKLER E.A., 1972, Altered microsome function during acute thioacetamide poisoning, *Mol. Pharmacol.*, 8, 318-326.
- BARNES J.M., MAGEE P.N., 1954, Some toxic properties of dimethylnitrosamine, *Br. J. Ind. Med.*, 11, 167-174.
- BELLOMO G., JEWELL S.A., THOR M., ORRENIUS S., 1982, Regulation of intracellular calcium compartmentation : Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 6842-6846.
- BELLOMO G., THOR H., ORRENIUS S., 1984, Increase in cytosolic Ca²⁺ concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca²⁺ stores, *FEBS Lett.*, 168(1), 38-42.
- BENHAMOU J.P., 1986, Drug-induced hepatitis : clinical aspects, 23-30, *Hepatotoxicité médicamenteuse*, FILLASTRE J.P., INSERM, ROUEN.
- BERGER M.L., BHATT H., COMBES B., ESTABROOK R.W., 1986, CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes: The importance of direct solvent injury, *Hepatology*, 6, 36-45.
- BERGER M.L., SOZERI T., 1987, Rapid halogenated hydrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effects, *Toxicology*, 45, 319-330.
- BERNHEIM F., BERNHEIM M.L.C., WILBUR K.M., 1948, The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids, *J. Biol. Chem.*, 174, 257-264.
- BOYD M.R., 1980, Biochemical mechanisms in chemical-induced lung injury: Roles of metabolic activation, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 7, 103-176.
- BUS J.S., GIBSON J.E., 1976, Paraquat toxicity: Proposed mechanisms of toxicity involving lipid peroxidation, *Environ. Health Perspect.*, 16, 139-146.
- BUTLER T.C., 1961, Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 134, 311-319.
- BRIESKORN C.H., FUCHS A., 1962, *Chem. Ber.*, 95, 3034.

- CADENAS E., SIES H., 1982, Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by t-butylhydroperoxide : relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependance and lipid peroxidation, *Eur. J. Biochem.*, 124, 349-356.
- CASHMAN J.R., HANZLIK R.P., 1981, Microsomal oxidation of thiobenzamide. Aphotometric assay for the flavin containing monooxygenase, *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 98, 147-153.
- CHAN K.F.J., GRAVES D.J., 1984, Molecular properties of phosphorylase kinase, 1-31, Calcium and cell fonction, CHEUNG W.Y. (ed.), Academic press, New YORK.
- CHASSEAUD L.F., 1973, The nature and the distribution of enzymes catalysing the conjugaison of glutathione with foreign compounds, *Drug Metabol. Rev.*, 2, 185-220.
- DEBY C., MAGOTTEAUX G., 1970, Relation entre les acides gras essentiels et le taux des antioxydants tissulaires chez la souris, *C.R. Soc. Biol.*, 164, 2675-2681.
- DEMOPOULOS H., FLAMM E., SELIGMAN M., POSER R. PIETRONIGRO D., RANSOHOFF J., 1976, 491-503, Oxygen and physiological functions, JÖBSIS F.D. (Ed), Professional Information Library, Dallas.
- DIALLO B., VANHAELEN M., KISO Y., HIKINO H., 1987, Antihepatotoxic actions of *Cochlospermum tinctorium* rhizomes, *J. Ethnopharmacol.*, 20, 239-243.
- DIANZIANI M.U., 1982, Biochemical effects of saturated and unsaturated aldehydes,, 129-158, Free radicals, lipid peroxidation and cancer, Mc BRIEN D.C.H., SLATER T.F. (Eds), Academic press.
- DOGTEROM P., NAGELKERKE J.F., VAN STEVENINCK J., MULDER G.J., 1988, Inhibition of lipid peroxidation by disulfiram and diethyldithiocarbamate does not prevent hepatotoxin-induced cell death in isolated rat hepatocytes., *Chem. Biol. Interactions*, 66, 251-265.
- DRILL V.A., 1952, Hepatotoxic agents : Mechanism of action and dietary interrelationship, *Pharmacol.Rev.*, 4, 1-42.
- FARISS M.W., REED D.J., 1985, Mechanism of chemical-induced toxicity: II.Role of extracellular calcium., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 79, 296-306..
- FEE J.A., VALENTINE J.S, 1977, Chemical and physical properties of superoxide, 19-60, *in* : Superoxide and superoxide-dismutase, MICHAELSON A.M., Mc CORD, FRIDOVICH I. (Eds), Academic Press, London.
- FITZHUGH O.A., NELSON A.A., 1948, Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide, *Science*, 108, 626-628.
- FRAGA C.G., MARTINO V.S., FERRARO G.E., COUSSIO J.D., BOVERIS A., 1987, Flavonoïds as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 717-720.
- GOETHALS F, KRACK G., DEBOYER D., ROBERFROID M., 1983, Effects of diethyl maleate on protein synthesis in isolated hepatocytes, *Toxicol.*, 26, 47-54.
- GOETHALS F., KRACK G., DEBOYSER D., VOSSEN P., ROBERFROID M., 1984, Critical biochemical functions of isolated hepatocytes as sensitive indicators of chemical toxicity, *Fund. Appl. Toxicol.*, 4, 441-450.
- GOLDFARB G., PESSAYRE D., BOISSEAU C., DEGOTT C., BERAUD C.,BENHAMOU J.P., 1979, Hépatite à la clométacine, *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 3, 537-540.

HABER F., WEISS J., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proc. R. Soc. Lond.*, 147, 332-351.

HIKINO H., KISO Y., AMAGAYA S., OGIHARA Y., 1984, Antihepatotoxic actions of papyrogenins and papyrosides, triterpenoids of *Tetrapanax papyrifera* leaves, *J. Ethnopharmacol.*, 12, 231-235.

HIKINO H., KISO Y., TAGUCHI H., IKENYA Y., 1984, Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits, *Planta Medica*, 50, 213-218.

HIKINO H., KISO Y., WAGNER H., FIEBIG M., 1984, Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits, *Planta Medica*, 50, 248-250.

HIKINO H., OHSAWA T., KISO Y., OSHIMA Y., 1984, Analgesic and antihepatotoxic actions of dianosides, triterpenoid saponins of *DIANTHUS superbus* var. *longicalycinus* herbs, *Planta Medica*, 353-355.

HIKINO H., SUGAI T., KONNO C., HACHIMOTO I., TERASAKI S., HIRONO I., 1979, Liver-protective principles of *Thujopsis dolabrata* leaves, *Planta Medica*, 36, 156-163.

HINE J., PEEK R.C., OAKES B.D., 1954, The kinetics of the base-catalyzed deuterium exchange of chloroform in aqueous solution, *J. Am. Chem.Soc.*, 76, 827-829.

HOMBERG J.C., ABUAF N., HELMY KHALIL S., BIUOR M., POUPON R., BENHAMOU J.P., 1985, Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic organelle autoantibodies, *Hepatology*, 5, 722-727.

INATANI R., NAKATANI N., FUWA H., SETO H., 1982, Structure of the new antioxydative phenolic diterpene isolated from Rosemary, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1661-166.

JONES D.P., THOR H., SMITH M.T., JEWELL S.A., ORRENIUS S., 1983, Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca²⁺ sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione, *J. Biol. Chem.*, 258(10), 6390-6393.

JOSEPH S.K., COLL K.E., COOPER R.H., MARKES J.S., WILLIAMSON J.P., 1983, Mechanism underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, 258, 731-741.

JOYEUX M., ROLLAND A., FLEURENTIN J., MORTIER F., DORFMANN P., 1990, Tert butyl hydroperoxyde induced injury in isolated rat hepatocytes : A model for studying antihepatotoxic crude drugs, *Planta Med.*, 56, 171-174.

KADLUBAR F.F., MILLER J.A., MILLER E.C., 1976, Hepatic metabolism of N-hydroxy-N-methyl-4-aminoazobenzene and other N-hydroxy aryl amines to reactive sulfuric acid esters, *Cancer Res.*, 36, 2350-2359.

KALYANARAMAN B., MOTTLEY C., MASSON R.P., 1983, A direct electron spin resonance and spin trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin / hydroperoxide systems, *J. Biol. Chem.*, 258, 3855-3858.

KAPPUS H., SIES H., 1981, Toxic drug effects associated with oxygen metabolism : redox cycling and lipid peroxidation, *Experientia*, 37, 1233-1241.

KEMENY N., DALY J., REICHMAN B., GELLER N., BOTET J., ODERMAN P., 1987, Intra-hepatic or systemic infusion of fluoro-deoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial, *Ann. Intern. Med.*, 107, 459-465.

KISO Y., WATANABE N., OSHIMA Y., HIKINO H., 1983, Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes, *Planta Med.*, 49, 185-187.

KISO Y., TOHKIN M., HIKINO H., 1983, Antihepatotoxic principles of *Atractylodes* rhizomes, *J. Nat. Prod.*, 46, 651-654.

KISO Y., OGASAWARA S., HIROTA K., WATANABE N., OSHIMA Y., KONNO C., 1984, Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds, *Planta Med.*, 50, 81-85.

KISO Y., TOHKIN M., HIKINO H., HATTORI M., SAKAMOTO T., NAMBA T., 1984, Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, *Planta Medica*, 51, 298-302.

KISO Y., TOHKIN M., HIKINO H., IKEYA Y., TAGUCHI H., 1985, Mechanism of antihepatotoxic activity of wuweizisu C and gomisin A, *Planta Medica*, 331-334.

KISO Y., TOHKIN M., HIKINO H., 1985, Mechanism of antihepatotoxic activity of atractylon, *Planta Medica*, 97-100.

KLAASSEN C.D., STACEY M.H., 1982, 147-180, Toxicology of the liver, PLAA G.L. & HEWITT W.R., Raven Press, New York.

KRACK G., GOETHALS F., DEBOYSER D., ROBERFROID M., 1983, Metabolic competence of isolated hepatocytes in suspension. A new tool for in vitro toxicological evaluation,,, 391-398, Isolation, characterisation and use of hepatocytes,, HARRIS R.A. & CORNELL N.W. (eds).

KUBIC V.L., ANDERS M.W., 1980, Mechanism of the microsomal reduction of carbon tetrachloride and halothane, *Chem. Biol. Interact.*, 34, 201-207.

LARREY D., HADENGUE A., PASSAYRE D., CHOUDAT L., DEGOTT C., BENHAMOU J.P., 1987, Carbamazepine-induced acute cholangitis, *Dig. Dis. Sci.*, 32, 554-557.

LARREY D., ERLINGER S., 1988, Drug-induced cholestasis, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 2, 423-452.

LEHNINGER A.L., VERCESI A., BARBABUNMI E.A., 1978, Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxydation-reduction state of pyridine nucleotides, *Proct. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 1690-1694.

LEMAL D.M., MENGER F., COATA E., 1973, The diazine-hydrazone rearrangement, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 2395-2401.

LÜLLMANN H., LÜLLMANN6RAUCH R., WASSERMANN O., 1975, Drug-induced phospholipidoses, *Crit. Rev. Toxicol.*, 4, 185-218.

McCORD J.M., FRIDOVICH I., 1969, Superoxide dismutase: an enzymic function of erythrocyprein, *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.

MAIORINO R.M., SIPES I.G., GANDOLFI A.J., BROWN B.R., 1979, Quantitative analysis of volatile halothane metabolites in biological tissues by gas chromatography, *J. Chromatogr.*, 164, 63-72.

MAGEE P.N., BARNES J.M., 1956, The production of malignant primary tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine, *Br. J. Cancer*, 10, 114-122.

MANSUY D., FONTECAVE M., CHOTTARD J.C., , 1980, A heme model study of carbon tetrachloride metabolism: Mechanisms of phosgene and carbon dioxide formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1536-1542.

- MASON R.P., HOLTZMAN J.L., 1975, Role of catalytic superoxide formation in the oxygen inhibition of nitroreductase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 1267-1274.
- MITCHELL J.R., JOLLOWS D.J., 1975, Metabolic activation of drugsto toxic substances, *Gastroenterology*, 68, 392-410.
- MITCHELL J.R., ZIMMERMAN H.J., ISHAK K.G., 1976, Isoniazid liver injury: clinical spestrum, pathology, and probable pathgenesis, *Ann. Intern Med.*, 84, 181-192.
- MUKAI S., MORIO M., FUJII K., HANAKI C., 1977, Volatile metabolites of halothane in the rabbit, *Anesthesiology*, 47, 248-251.
- MULLER R., 1911, *Z. Exp. Pathol. Ther.*, 9, 103-125.
- MULLICK F.G., ISHAK K.G., 1980, Hepatic injury associated with diphenylhydantoin therapy. A clinicopathologic study of 20 cases, *Am. J. Clin. Pathol.*, 74, 442-452.
- MURPHY E., COLL K., RICH T.L., WILLIAMSON J.R., 1980, Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, 255, 6600-6608.
- MYUNG-NYU K., 1990, Etude d'une plante médicinale d'utilisation traditionnelle en Corée : *Carthamus tinctorium* L.; aspects phytochimiques, analytiques et pharmacologiques, 192 p., Doctorat de l'Université de Paris-sud, Chatenay-Malabry.
- NADELL J., KOSEK J., 1977, Peliosis hepatis. Twelve cases associated with oral androgen therapy, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 101, 405-410.
- PACKER J.E., SLATER T.F., WILLSON R.L., 1978, Reaction of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical with aminoacids: Pulse radiolysis evidences, *Life Sci.*, 23, 2617-2620.
- PERRISSOUD D., WEIBEL I., 1980, Protective effect of (+) Cyanidanol-3 in acute liver injury induced by galactosamine or carbon tetrachloride in the rat, *Arc. Pharmacol.*, 312, 285-291.
- PERRISSOUD D., 1981, Mise au point d'une méthode biologique pour la sélection de molécules hépatotropes du groupe des flavonoïdes, 234 p., Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lausanne,
- PESSAYRE D., BICHARA M., FELDMANN G., DEGOTT C., POTET F., BENHAMOU J.P., 1979, Perhexiline maleate-induced cirrhosis, *Gastroenterology*, 76, 170-177.
- PINCEMAIL J., DEBY C., LION Y., BRAQUET P., HANS P., DRIEU K., GOUTIER R., Role of flavonoids in lipoperoxidation and radicalar reactions, 7th Hungaria bioflavonoid symposium, Szeged, May 1985
- POLI G., CHEESEMAN K., SLATER T.F., DIANZIANI M.U., 1981, The role of lipid peroxidation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes : comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells, *Chem. Biol. Interactions*, 37, 13-24.
- POPPER H., SCHAFFNER F., 1959, Drug-induced hepatic injury, *Ann. Intern. Med.*, 51, 1230-1252.
- POYER J.L., McCAY P.B., LAI E.K., JANZEN E.G., DAVIS E.R., 1980, Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94, 1154-1160.

- POYER J.L., McCAY P.B., WEDDLE C.C., DOWNS P.E., 1981, In vivo spin trapping of radicals formed from halothane, *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1517-1519.
- RAPPAPORT A.M., 1969, Anatomic considerations, 1-49, *Diseases of the liver*, SCHIFF L. (ed), LIPPINCOTT J.B., Philadelphia.
- REES K.R., TARLOW M.J., 1967, The hepatotoxic action of allyl formate, *Biochem. J.*, 104, 757-761.
- REID W.D., CHRISTIE B., KRISHNA G., MITCHELL J.R., MOSKOWITZ J., BRODIE B.B., 1971, Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis, *Pharmacology*, 6, 41-55.
- REINERT O., ATHANASSOPOULOS S., HELLMER K.H., MURRAY R.E., UEHLEKE H., 1972, Bildung von chloroform aus tetrachlorkohlenstoff in leber mikrosomen, lipidperoxydation und zerstörung von cytochrom P450, *Arch. Toxicol.*, 29, 219-233.
- RODMAN J.S., DEUTSCH D.J., GUTMAN S.I., 1976, Methyldopa hepatitis: a report of six cases and review of the literature, *Am. J. Med.*, 60, 941-948.
- RUSH G.F., GORSKI J.R., RIPPLE M.G., SOWINSKI J., BUGELSKI P., HEWITT W.R., 1985, Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 473-483.
- RUSH G.F., ALBERTS D., 1986, T-butylhydroperoxide induced metabolism and stimulation of the pentose phosphate pathway in isolated rat hepatocytes, *Toxicologist*, 6, 13-.
- RUSH G.F., YODIS L.A., ALBERTS D., 1986, Protection of rat hepatocytes from tert-Butyl Hydroperoxide-induced injury by catechol., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 84, 607-616..
- SCHNELLMANN R.G., 1988, Mechanisms of t-butyl hydroperoxide-induced toxicity to rabbit renal proximal tubules., *Am. Physiological Society*, C28-C33.
- SHARP J.H., TRUDELL J.R., COHEN E.N., 1979, Volatile metabolites and decomposition products of halothane in man, *Anesthesiology*, 50, 2-8.
- SHUPMAN I., ROSEN J.D., CASIDA J.F., 1979, Novel activation mechanisms for the promutagenic herbicide Diallylate, *Science*, 205, 1013-1015.
- SIES H., WAHLÄNDER A., WAYDAS C., SOBOLL S., HÄBERLE D., 1972, Functions of intracellular glutathione in hepatic hydroperoxide and drug metabolism and the role of extracellular glutathione, 303-320, in : *Advances in enzyme regulation*, vol 18, WEBER G. (Ed), Pergamon Press, Oxford.
- SLATER T.F., 1966, Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat : A speculative mechanism based on activation, *Nature*, 209, 36-40.
- SLATER T.F., SAWYER B.C., 1971, The stimulatory effect of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Interaction sites in the endoplasmic reticulum, *Biochem. J.*, 123, 815-821.
- SLATER T.F., EAKINS M.N., 1975, Interactions of (+)-cyanidol-3 with radical generating systems, 84-89, in : *New trends in the therapy of liver diseases*, BERTOLI A. (Ed), Karger Verlag, Basel.
- SLATER T.F., 1982, Activation of carbon tetrachloride chemical principles and biological significance, 243-274, *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*, Mc BRIEN D.C.H., SLATER T.F. (Eds), Academic press.

SMITH P., HEATH D., 1976, Paraquat, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 4, 411-445.

STRICKER B.H.C.H., SPOELSTRA P., 1985, Drug-induced hepatic injury. A comprehensive survey of the literature on adverse drug reactions up to January 1985., Elsevier(ed), Amsterdam.

SUAREZ K.A., BHONSLE P., 1976, The relationship of cobaltous chloride-induced alterations of hepatic microsomal enzymes to altered carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37, 23-27.

TAMAI M., WATANABE N., SOMEYA M., KONDOH H., OMURA S., LING Z., CHANG R., MING C., 1989, New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*, *Planta Medica*, 55, 44-47.

THOMAS C.E., REED D.J., 1988, Effect of extracellular Ca²⁺ omission in isolated hepatocytes.: I. Induction of oxidative stress and cell injury., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245, 493-500..

THOR H., HARTZELL P., ORRENIUS S., 1984, Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated Ca²⁺, *J. Biol. Chem.*, 259, 6612-6615.

TRIBBLE D.L., JONES D.P., EDMONSON D.E., 1988, Effect of hypoxia on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative injury in hepatocytes, *Mol. Pharmacol.*, 34, 413-420.

TUCHWEBER B., KOVACS K., KHANDEKAR J.D., GORG B.D., 1973, Peliosis like changes induced by phalloidin in rat liver. A light and electron microscopic study, *J. Med.*, 4, 327-345.

VALLA D., BENHAMOU J.P., 1988, Drug-induced vascular and sinusoidal lesions of the liver, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 2, 481-500.

WAGNER H., GEYER B., FIEBIG M., KISO Y., HIKINO H., 1986, Isobutrin and butrin, the antohepatotoxic principles of *Butea monosperma* flowers, *Planta Medica*, 77-79.

WELLS H.G., 1908., *Arch. Intern. Med.*, 1, 589-601.

WENIGER B., 1984, La médecine populaire dans le plateaux central d'Haïti, Doctorat de Sciences de l'Université de Metz, METZ

WHIPPLE G.H., SPERRY J.A., 1909, Liver necrosis and repair, *Bulletin of Jhons Hopkins Hospital*, 222, 278-289.

WHITE R.E., COON M.J., 1980, Oxygen activation by cytochrome P450, *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 315-356.

WOLF C.R., HARRELSON W.G., NASTAINCZYK W.M., PHILPOT R.M., KALYANARAMAN B., MASON R.P., 1980, Metabolism of carbon tetrachloride in hepatic microsomes and reconstituted monooxygenase systems and its relationship to lipid peroxidation, *Mol. Pharmacol.*, 18, 553-558.

WOLFF C.R., MANSUY D., NASTAINCZYK W., DEUTCHMANN G., ULLRICH V., 1977, The reduction of polyhalogenated methanes in liver microsomal cytochrome P450, *Mol. Pharmacol.*, 13, 698-705.

ZAFRANI E.S., 1983, Medicaments, toxiques et veines sus-hepatiques, *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 7, 894-897.

ZAFRANI E.S., PINAUDEAU Y., DHUMEAUX D., 1983, Drug-Induced vascular lesions of the liver, Arch. Intern. Med., 143, 495-502.

ZIEGLER D.M., 1980, Microsomal flavin -containing monooxygenase: oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds, 201-227, in: Enzymatic basis of detoxication, JAKOBY W.B. (Ed), Academic Press, New York.

ZIMMERMAN H.J., 1978, The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver., Appleton-Century-Crofts (ed), New-York.

ZIMMERMAN H.J., 1982, Chemical hepatic injury and its detection, 1-45, in : Toxicology of the liver, PLAA G.L., HEWITT W.R. (Eds), Raven Press, New York

ZIMMERMAN H.J., ISHAK K.G., 1982, Valproate-induced hepatic injury: analysis of 23 fatal cases, Hepatology, 2, 591-597.

ZIMMERMAN H.J., LEWIS J.H., 1987, Drug-induced cholestasis, Med. Toxicolo., 2, 112-160.