



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude ethnopharmacologique et étude pharmacologique d'Euphorbia hirta L. : propriétés psychotropes, analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires

Marie-Claire Lanhers

## ► To cite this version:

Marie-Claire Lanhers. Contribution à l'étude ethnopharmacologique et étude pharmacologique d'Euphorbia hirta L. : propriétés psychotropes, analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1988. Français. NNT : 1988METZ020S . tel-01775566

**HAL Id: tel-01775566**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775566>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

MENTION PHARMACOGNOSIE

PAR

MARIE CLAIRE LANHERS

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	19880405
Cote	S/M3 88/20
Loc	Magasin

CONTRIBUTION A L'ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE

ET

ETUDE PHARMACOLOGIQUE D' EUPHORBIA HIRTA L.

PROPRIETES PSYCHOTROPES, ANALGESIQUES  
ANTI-PYRETIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES

Soutenue le 21 Novembre 1988

PARTIE I



EXAMINATEURS:

- M. P. CABALION, Pharmacien responsable unité ORSTOM
- M. P. DORFMAN, Directeur de la Recherche des Laboratoires DOLISOS
- M. J. FLEURENTIN, Maître de Conférence (Directeur de thèse)
- M. R. MISSLIN, Maître de Conférence
- M. F. MORTIER, Professeur (Rapporteur)
- M. J.M. PELT, Professeur (Président du jury)
- M. J.J. SERRANO, Professeur (Rapporteur)

## **A MESSIEURS LES MEMBRES DU JURY**

A Monsieur le Professeur J.M. PELT, Président de ce jury, qui m'a accueilli au sein de son équipe et qui a pu suivre et diriger l'évolution de ce travail, malgré les très nombreuses obligations auxquelles il doit faire face, je voudrais lui exprimer toute mon estime et ma profonde gratitude.

A Monsieur J. FLEURENTIN, Maître de Conférence à l'Université de Metz et assistant de Monsieur le Professeur PELT, qui a dirigé pas à pas l'ensemble de cette recherche, avec la compétence et la rigueur scientifique que nous lui connaissons tous, mais aussi avec une extrême patience envers la débutante que je suis. Qu'il soit assuré de toute mon estime et de toute ma reconnaissance.

J'ai rencontré auprès de Monsieur R. MISLIN une attention bienveillante et une aide efficace, notamment au cours de la réalisation et de l'interprétation des études comportementales. Pour ses nombreux conseils judicieux, son enthousiasme communicatif, mais aussi son soutien moral si tonifiant qu'il n'a pas manqué de me manifester à chacune de nos rencontres, qu'il me soit permis de lui exprimer toute mon admiration et toute ma gratitude.

Que Monsieur le Professeur F. MORTIER veuille bien accepter ma profonde reconnaissance et toute mon estime, pour les nombreux conseils, les critiques et l'aide qu'il m'a toujours prodigué durant ses années de recherche, faisant preuve d'une très grande disponibilité et d'un intérêt constant à l'égard de ce travail.

Je voudrais également remercier Monsieur le Professeur J.J. SERRANO, qui a accepté spontanément de faire partie de ce jury et d'être l'un des rapporteurs. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Monsieur P. DORFMAN, Directeur de la Recherche des Laboratoires DOLISOS, avec lesquels a pu être établie une collaboration étroite devant aboutir au développement d'E. hirta L. dans le secteur pharmaceutique, m'a fait l'honneur de s'intéresser et de juger ce travail. Je l'en remercie vivement.

Je suis tout particulièrement heureuse de pouvoir compter, parmi les membres de ce jury, Monsieur P. CABALION, Pharmacien responsable de l'unité "Recherche des substances d'intérêt biologique" à l'ORSTOM, véritable instigateur de l'étude pharmacologique entreprise sur E. hirta, qui a eut l'idée judicieuse de communiquer à Monsieur le Professeur PELT ses observations personnelles quant aux effets de cette plante, me permettant ainsi d'entreprendre cette recherche et d'aboutir à la présentation de ce mémoire.

Qu'il me soit également permis d'assurer de toute ma reconnaissance les différentes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Ma pensée va tout particulièrement vers Isabelle BERTRAND, collaboratrice et amie, dont j'ai pu apprécier toutes les qualités tant professionnelles qu'humaines, tout au long de ces années de recherche, et qui a su m'insuffler énergie et volonté, parfois défaillantes. Qu'elle soit assurée de toute mon estime et de mon amitié.

Je voudrais également exprimer ma profonde reconnaissance à Alain ROLLAND, pour sa disponibilité de chaque instant, sa patience sans limite à mon égard et le soutien si précieux qu'il m'a toujours apporté.

Je tiens aussi à remercier Michel JOYEUX pour l'aide qu'il a pu me prodiguer, notamment dans l'utilisation de l'ordinateur, lors de la mise en forme de ce mémoire ; ainsi que Joséphine BERNABE, pour la mise au point de la technique in vitro utilisée lors de l'étude de l'affinité des extraits de plante pour les récepteurs aux benzodiazépines et Rachid SOULIMANI qui a réalisé les tests anti-histaminiques dans le cadre de son DEA.

Il m'est très agréable d'adresser tous mes remerciements à Monsieur J. GUILLEMAIN, Directeur technique de l'Institut Médicamenteux de Tours, avec qui avait été initialement entrepris ce travail, lorsqu'il était Directeur de la Recherche des Laboratoires DOLISOS, ainsi qu'à toute l'équipe de l'Institut Médicamenteux de Tours, et en particulier à Annie ROUSSEAU, pour leur accueil chaleureux et leur collaboration à la réalisation des tests anti-inflammatoires. Je garderai un excellent souvenir des quelques jours passés en leur compagnie.

Je voudrais également remercier Chafique YOUNOS, Professeur de Botanique afghan, pour son aide dans la mise en forme de la partie botanique de ce travail.

Je ne saurais oublier Martine CERV, Monsieur JENOT, Madame LANHERS, Pascal LANHERS et Dominique THOMAS, pour leur contribution si précieuse et secourable à la correction de ce manuscrit, à sa dactylographie et à sa mise en forme. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance et de toute mon affection

La participation spontanée d'Isabelle DRUM et de Francine KLEIN à la dactylographie de certaines parties de ce mémoire ne saurait me laisser indifférente. Je ne peux que leur exprimer toute ma gratitude.

Que Messieurs Paul LEHR et Jean-Marie KELLER du laboratoire de Biologie Moléculaire du Développement de la Faculté des Sciences de Nancy reçoivent tous mes remerciements pour la réalisation de la microscopie électronique, ainsi que Monsieur Cabalion et Monsieur le Professeur Pousset qui ont accepté de me prêter les photographies d'E. hirta.

# S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
GENERALITES SUR LE GENRE EUPHORBIA	
I <u>LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE</u>	5
II <u>LE GENRE EUPHORBIA</u>	7
III <u>EUPHORBIA HIRTA L.</u>	9
PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE	
I <u>CHOROLOGIE</u>	13
II <u>DENOMINATIONS</u>	14
III <u>DESCRIPTION BOTANIQUE</u>	
III - 1   LES TIGES	22
III - 2   LES FEUILLES	23
III - 3   LES INFLORESCENCES	
III - 4   LES FRUITS	24
III - 5   LES GRAINES	
III - 6   DIAGRAMME FLORAL	25
IV <u>ESSAIS BOTANIQUES</u>	26

DEUXIEME PARTIE : INDICATIONS TRADITIONNELLES ET USAGES THERAPEUTIQUES

SECTION A : INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES

I	<u>LA PLANTE ENTIERE ET LES PARTIES AERIENNES</u>	30
I - 1	USAGE INTERNE	
I - 2	USAGE EXTERNE	38
I - 3	USAGE MAGIQUE	39
II	<u>LES FEUILLES</u>	40
II - 1	USAGE INTERNE	
II - 2	USAGE EXTERNE	41
III	<u>LE LATEX</u>	43
III - 1	USAGE INTERNE	
III - 2	USAGE EXTERNE	
IV	<u>LES RACINES</u>	46
 <u>SECTION B</u> : USAGES THERAPEUTIQUES (préparations - mode d'emploi - posologie)		
I	<u>USAGES THERAPEUTIQUES ACTUELS</u>	58
I - 1	AFFECTIONS INTESTINALES	
I - 2	AFFECTIONS RESPIRATOIRES	59
I - 3	UTILISATIONS HOMEOPATHIQUES	61
II	<u>USAGES THERAPEUTIQUES TRADITIONNELS</u>	62
II - 1	AFFECTIONS GASTRO-INTESTINALES	
II - 2	AFFECTIONS HEPATIQUES (ictères)	68
II - 3	AFFECTIONS CARDIAQUES (crise cardiaque)	

II - 4	AFFECTIONS RESPIRATOIRES	69
II - 5	PROPRIETES ANTALGIQUES	71
II - 6	PROPRIETES FEBRIFUGES	72
II - 7	AFFECTIONS DE L'APPAREIL GENITAL FEMININ	
II - 8	AFFECTIONS DE L'APPAREIL GENITAL MASCULIN	74
II - 9	PROPRIETES CICATRISANTES	75
II -10	UTILISATION CONTRE LES MORSURES DE SCORPIONS	
II -11	UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DU RETARD A LA MARCHE DE L'ENFANT	

### TROISIEME PARTIE : ETUDE TOXICOLOGIQUE

#### SECTION A : ETUDES TOXICOLOGIQUES ANTERIEURES

I	<u>TOXICITE AIGUE</u>	78
I - 1	ACTION ICHTHYOTOXIQUE	
I - 2	ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VEGETAL PAR VOIE INTRA-VEINEUSE (I.V.)	
I - 3	ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VEGETAL PAR VOIE INTRA-PERITONEALE (I.P)	79
I - 4	ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VEGETAL PAR VOIE ORALE (PER OS)	80
II	<u>TOXICITE CHRONIQUE</u>	82
II - 1	EXPERIMENTATION SUR LE RAT ALBINOS MALE	
II - 2	EXPERIMENTATION SUR LE COBAYE	83
III	<u>EFFETS CONSECUTIFS A L'ADMINISTRATION D'E. HIRTA</u>	85
IV	<u>TOLERANCE HUMAINE</u>	87
IV - 1	REFERENCE A LA MEDECINE TRADITIONNELLE	
IV - 2	ETUDES CLINIQUES	

SECTION B : TRAVAUX PERSONNELS

I	<u>EVALUATION DE LA DOSE LETHALE 50</u>	90
I - 1	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
I - 2	ESSAIS PRELIMINAIRES	
I - 3	ESTIMATION DE LA DL50	91
II	<u>ETUDE SYMPTOMATOLOGIQUE APRES ADMINISTRATION DE DOSES INFERIEURES OU EGALES A LA DL50</u>	93
II - 1	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
II - 2	RESULTATS	
III	<u>DISCUSSION</u>	100
QUATRIEME PARTIE : ETUDE CHIMIQUE		
<u>SECTION A : ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES</u>		
I	<u>POLYPHENOLS</u>	104
I - 1	TANINS	
I - 2	ACIDES PHENOLS	
I - 3	COMPOSES FLAVONIQUES	
I - 4	LEUCOANTHOCYANES - ANTHOCYANES	106
I - 5	DERIVES DE LA BENZO $\alpha$ PYRONE	
II	<u>DERIVES TERPENIQUES</u>	107
II - 1	MONOTERPENES	
II - 2	DITERPENES	
II - 3	TRITERPENES	109
II - 4	POLYTERPENES	111
II - 5	STEROLS	

III	<u>ACIDES ORGANIQUES</u>	114
IV	<u>ACIDES ET ALCOOLS ALIPHATIQUES</u>	
IV - 1	ACIDES ALIPHATIQUES SATURES	
IV - 2	ACIDES ALIPHATIQUES INSATURES	
IV - 3	ALCOOLS ALIPHATIQUES	
V	<u>CARBURES ALIPHATIQUES SATURES</u>	115
VI	<u>ACIDES AMINES ET DERIVES AMINES</u>	
VI - 1	ACIDES AMINES	
VI - 2	ALCOOLS AMINES	117
VII	<u>GLUCIDES</u>	
VII - 1	SUCRES SIMPLES	
VII - 2	ITOLS	
VII - 3	OSIDES	
VIII	<u>COMPOSES MINERAUX</u>	118
IX	<u>DERIVES CYANOGENETIQUES</u>	
X	<u>ALCALOIDES</u>	
 <u>SECTION B : TRAVAUX PERSONNELS</u>		
I	<u>RECHERCHE DES POLYPHENOLS</u>	119
I - 1	TANINS	
I - 2	ACIDES PHENOLS ET COMPOSES FLAVONIQUES	121
I - 3	ANTHOCYANOSIDES	124
I - 4	DERIVES DE LA BENZO $\alpha$ PYRONE	
II	<u>RECHERCHE DES COMPOSES REDUCTEURS</u>	125

III	<u>RECHERCHE DES ACIDES ORGANIQUES</u>	128
IV	<u>RECHERCHE DES ACIDES AMINES</u>	131
V	<u>RECHERCHE DES GLUCIDES</u>	136
VI	<u>RECHERCHE DES SELS MINERAUX</u>	139
VII	<u>RECHERCHE DES DERIVES CYANOGENETIQUES</u>	141
VIII	<u>RECHERCHE DES ALCALOIDES</u>	142
IX	<u>RECHERCHE DES SAPONOSIDES</u>	143
X	<u>DISCUSSION</u>	144

CINQUIEME PARTIE - ETUDE PHARMACOLOGIQUE

SECTION A : ETUDES PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURES

I	<u>PROPRIETES ANTI-DYSENTERIQUES</u>	148
I - 1	EXPERIMENTATIONS PHARMACOLOGIQUES <u>IN VIVO</u> (SUR L'ANIMAL) ET <u>IN VITRO</u>	
I - 2	EXPERIMENTATIONS CLINIQUES	150
II	<u>ACTION SUR LES SYSTEMES RESPIRATOIRE ET CARDIO-VASCULAIRE</u>	155
III	<u>PROPRIETES SPASMOLYTIQUES</u>	158
IV	<u>PROPRIETES GALACTOGENES</u>	165

V	<u>RECHERCHE D'EFFETS IRRITANTS, ANTI-CANCEREUX OU CO-CARCINOGENES</u>	167
V - 1	PROPRIETES IRRITANTES	
V - 2	PROPRIETES ANTI-CANCEREUSES OU CO-CARCINOGENES	
VI	<u>PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DIVERSES</u>	169
VI - 1	ACTION PREVENTIVE VIS-A-VIS DU CHOC ANAPHYLACTIQUE	
VI - 2	ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE	
VI - 3	ACTIVITE ANTI-FONGIQUE	170
VI - 4	ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE	171
VI - 5	ACTIVITE ANTI-VIRALE	
VI - 6	ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE	172
VI - 7	ACTIVITE SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET ACTIVITE ANALGESIQUE	
VI - 8	PROPRIETES INSECTICIDES	
VI - 9	RESISTANCE AUX HERBICIDES	173
 <u>SECTION B : TRAVAUX PERSONNELS</u>		
 CHAPITRE A : EXTRAITS ET ANIMAUX UTILISES		
I	<u>PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES</u>	179
I - 1	EXTRAITS D' <u>E. HIRTA</u>	
I - 2	EXTRAIT DE <u>POA SPECIES</u>	180
II	<u>LES ANIMAUX : CARACTERISTIQUES ET CONDITIONS D'ELEVAGE</u>	182
II - 1	ESPECES UTILISEES	
II - 2	CONDITIONS D'ELEVAGE	183

CHAPITRE B	: RECHERCHE DE PROPRIETES PSYCHOTROPES	185
I	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES SEDATIVES</u>	188
I - 1	INTRODUCTION	189
I - 2	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE</u>	193
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	195
	expérimentations en situation contraignante et en milieu familial	
I - 3	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER</u>	204
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	205
I - 4	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS SOLLICITEE POUR L'EXPLORATION NON FORCEE D'UN MILIEU NOUVEAU</u>	210
4.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
4.2	<u>Résultats</u>	211
I - 5	DISCUSSION	215
II	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANXIOLYTIQUES</u>	221
II - 1	INTRODUCTION	222
II - 2	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER</u>	227
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	228
II - 3	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS CONFRONTEE A UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE</u>	233
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	234
II - 4	DISCUSSION	237

III	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES HYPNOTIQUES</u>	243
III - 1	INTRODUCTION	244
III - 2	RECHERCHE DE PROPRIETES HYPNOTIQUES	251
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	251
III - 3	INFLUENCE D' <u>E. HIRTA</u> SUR LA NARCOSE BARBITURIQUE	253
3.1	<u>Influence d'E. hirta sur la narcose induite par le pentobarbital</u>	
3.1.1	procédure expérimentale	
3.1.2	résultats	255
	potentialisation et induction du sommeil narcotique	
3.2	<u>Influence d'E. hirta sur la narcose induite par le barbital</u>	263
3.2.1	procédure expérimentale	
3.2.2	résultats	264
III - 4	DISCUSSION	267
IV	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES NEUROLEPTIQUES</u>	271
IV - 1	INTRODUCTION	272
IV - 2	INFLUENCE D' <u>E. HIRTA</u> SUR LA TOXICITE INDUITE PAR UN DERIVE AMPHETAMINIQUE, LA DEXAMPHETAMINE, CHEZ LES SOURIS GROUPEES	276
2.1	<u>Quelques généralités sur les dérivés amphétaminiques</u>	
2.2	<u>Procédure expérimentale</u>	277
2.3	<u>Résultats</u>	278
IV - 3	INFLUENCE D' <u>E. HIRTA</u> SUR LES STEREOTYPIES INDUITES PAR UN DERIVE AMPHETAMINIQUE, LA DEXAMPHETAMINE	280
3.1	<u>Rappels sur le phénomène des stéréotypies induites par l'amphétamine ou l'apomorphine</u>	
3.2	<u>Procédure expérimentale</u>	281
3.3	<u>Résultats</u>	282

IV - 4	RECHERCHE D'UNE ACTIVITE CATALEPTIGENE ET HYPOTHERMIQUE D' <u>E. HIRTA</u>	286
4.1	<u>Rappel sur l'activité cataleptique</u>	
4.2	<u>Procédure expérimentale</u>	287
4.3	<u>Résultats</u>	289
IV - 5	DISCUSSION	294
V	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-DEPRESSIVES</u>	298
V - 1	INTRODUCTION	299
V - 2	INFLUENCE D' <u>E. HIRTA</u> SUR LES EFFETS DE LA RESERPINE	304
2.1	<u>Rappels sur les effets réserpiniques</u>	
2.2	<u>Procédure expérimentale</u>	305
2.3	<u>Résultats</u>	308
	observation des animaux non manipulés	
	observation des animaux avant et après saisie par la queue	
V - 3	INFLUENCE D' <u>E. HIRTA</u> SUR LES EFFETS DE L'OXOTREMORINE	315
3.1	<u>Rappels sur les effets cholinergiques induits par l'oxotrémorine</u>	
3.2	<u>Procédure expérimentale</u>	316
3.3	<u>Résultats</u>	318
V - 4	DISCUSSION	323
VI	<u>CONCLUSIONS</u>	331
CHAPITRE C : RECHERCHE D'UN PROFIL D'ACTIVITE DE TYPE BENZODIAZEPINIQUE		339
I	<u>INTRODUCTION</u>	340
II	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-CONVULSIVANTES</u>	353
II - 1	L'EPILEPSIE ET LES ANTI-CONVULSIVANTS	354
II - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	358

II - 3	RESULTATS	359
3.1	<u>Effets convulsivants du pentétrazol</u>	
3.2	<u>Recherche d'effets anti-convulsivants pour E. hirta</u>	361
3.3	<u>Influence du clorazépate dipotassique vis-à-vis des effets du pentétrazol</u>	363
II - 4	DISCUSSION	364
III	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES MYORELAXANTES</u>	366
III - 1	LES CONTRACTURES MUSCULAIRES ET LES MYORELAXANTS	367
III - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	370
III - 3	RESULTATS	372
	tests de la traction et de la tige tournante	
III - 4	DISCUSSION	374
IV	<u>INFLUENCE D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES VIS-A-VIS DES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA</u>	376
IV - 1	QUELQUES GENERALITES SUR LE RO 15-1788	377
IV - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	379
IV - 3	RESULTATS	382
3.1	<u>Test de l'open-field modifié</u>	
3.2	<u>Test d'exploration d'un milieu nouveau</u>	385
IV - 4	DISCUSSION	388
V	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES</u>	391
V - 1	INTRODUCTION	392
V - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	394
2.1	<u>Animaux</u>	
2.2	<u>Méthodes</u>	
2.2.1	préparation de l'homogénat d'encéphale	
2.2.2	fractionnement sub-cellulaire de l'homogénat	
2.2.3	contrôle de la pureté des fractions A et B par microscopie électronique	397

2.2.4	contrôle de l'activité ATP asique des fractions A et B	39
2.2.5	détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale	40
2.2.6	étude <u>in vitro</u> de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques	40
V - 3	RESULTATS	413
3.1	<u>Contrôle de la pureté des fractions A et B par microscopie électronique</u>	
3.2	<u>Contrôle de l'activité ATP asique des fractions A et B</u>	414
3.3	<u>Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale B</u>	416
3.4	<u>Etude in vitro de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques</u>	419
3.4.1	évaluation de la <u>liaison totale</u> du flunitrazépam tritié au niveau de sites récepteurs benzodiazépiniques, ainsi que des <u>liaisons spécifique et non spécifique</u>	
3.4.2	étude du déplacement du flunitrazépam tritié par le diazépam froid	421
3.4.3	évaluation de l'affinité d' <u>E. hirta</u> pour les sites benzodiazépiniques	423
3.4.4	évaluation de l'affinité de <u>Poa sp.</u> pour les sites benzodiazépiniques	426
V - 4	DISCUSSION	428
VI	<u>CONCLUSIONS</u>	432
		*
CHAPITRE D	RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-HISTAMINIQUES, ANALGESIQUES, ANTI-PYRETIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES	436
I	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-HISTAMINIQUES</u>	439
I - 1	INTRODUCTION	440
I - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	444
I - 3	RESULTATS	449
3.1	<u>Etude de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye</u>	

3.2	<u>Etude de l'action antagoniste exercée par la dexchlorphéniramine vis-à-vis des contractions histaminiques</u>	451
3.3	<u>Influence d'E. hirta vis-à-vis de la contraction histaminique</u>	
I - 4	DISCUSSION	454
II	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANALGESIQUES</u>	456
II - 1	INTRODUCTION	457
II - 2	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE</u>	465
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	466
II - 3	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE LA CHALEUR</u>	470
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	472
II - 4	DISCUSSION	479
III	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-PYRETIQUES</u>	485
III - 1	INTRODUCTION	486
III - 2	PROCEDURE EXPERIMENTALE	489
III - 3	RESULTATS	491
III - 4	DISCUSSION	494
IV	<u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES</u>	496
IV - 1	INTRODUCTION	497
IV - 2	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE</u>	510
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	512
IV - 3	<u>INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR L'ADJUVANT DE FREUND</u>	519
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	

3.2	<u>Résultats</u>	51
3.2.1	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine sur le poids corporel du rat polyarthritique	
3.2.2	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine vis-à-vis de l'oedème induit par l'adjuvant de Freund	52
3.2.3	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine vis-à-vis de la douleur polyarthritique	52
IV - 4	DISCUSSION	52
V	<u>RECHERCHE D'UNE TOLERANCE A L'EGARD DES EFFETS PHARMACOLOGIQUES D'E. HIRTA</u>	53
V - 1	INTRODUCTION	53
V - 2	INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS SEDATIFS D' <u>E. HIRTA</u> , MIS EN EVIDENCE DANS LE TEST DE L'ACTIVIMETRE	542
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	543
V - 3	INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL BARBITURIQUE D' <u>E. HIRTA</u>	544
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	545
V - 4	INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES D' <u>E. HIRTA</u>	546
4.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
4.2	<u>Résultats</u>	547
V - 5	INFLUENCE D'ADMINISTRATIONS JOURNALIERES D' <u>E. HIRTA</u> DURANT SIX OU NEUF JOURS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES	552
5.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
5.2	<u>Résultats</u>	
V - 6	DISCUSSION	559
VI	<u>CONCLUSIONS</u>	567

CHAPITRE E : ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D' <u>E. HIRTA</u> ADMINISTREE PAR VOIE ORALE	576
I <u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES ACTIVITES LOCOMOTRICE ET MANIPULATOIRE DU RAT PLACE EN BOITE A SKINNER</u>	577
I - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE	
I - 2 RESULTATS	578
II <u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER</u>	580
II - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE	
II - 2 RESULTATS	581
III <u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL DU PENTOBARBITAL ADMINISTRE A UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE (25 mg/kg)</u>	582
III - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE	
III - 2 RESULTATS	
IV <u>INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE LA DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE</u>	584
IV - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE	
IV - 2 RESULTATS	585
V <u>CONCLUSIONS</u>	586
CONCLUSIONS	588
TRAVAUX CITES	I-XXXI



PHOTO 1 : E. HIRTA L. DANS UN SOL SABLONNEUX.

# *INTRODUCTION*

---

Depuis sa création, le laboratoire de Biologie végétale et de Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement, dans lequel ce travail a pu être mené à bien, a toujours eu pour ligne directrice l'inventaire et la sélection des plantes médicinales et produits naturels utilisés dans les pharmacopées traditionnelles, afin de vérifier expérimentalement certaines des indications thérapeutiques qui pourraient présenter un intérêt, non seulement pour les populations autochtones, mais également pour la médecine moderne toujours demandeuse en substances actives nouvelles et de plus en plus attirée par la pratique des médecines dites "douces".

Cette démarche, originale dans la volonté manifeste de respecter la tradition, en réalisant des études pharmacologiques sur des préparations similaires à celles prescrites par les tradipraticiens, devrait permettre de valoriser l'immense patrimoine culturel traditionnel, beaucoup trop longtemps dédaigné par la médecine moderne, et par là-même de sauvegarder un certain nombre de pratiques susceptibles de tomber tôt ou tard dans l'oubli, en raison de la progression rapide des prescriptions modernes au détriment de la médecine transmise par les tradipraticiens.

Cette objectivation des actions pharmacologiques d'une plante donnée constitue une étape primordiale. Par ailleurs, une étude chimique pourra, dans un second temps, tenter d'isoler des substances chimiques pures, ou plus vraisemblablement des groupes chimiques définis, qui devront être corrélés à l'activité pharmacologique.

Loin de constituer une première tentative dans ce mode d'approche original des plantes médicinales, notre travail s'inscrit en fait dans la continuité de différentes études précédemment menées sur d'autres espèces végétales, dans le domaine des psychotropes, mais également dans celui des hépatotropes et des diurétiques (Fleurentin et coll., 1986 - Lanhers et coll., 1986 - Hoefler et coll., 1987).

L'ensemble de cette étude est consacrée à une Euphorbiaceae, Euphorbia hirta L., sélectionnée parmi diverses autres espèces, à la suite d'un premier screening pharmacologique. Cette espèce pantropicale, très largement prescrite en médecines traditionnelles et pour de nombreuses indications, a également connu son heure de gloire en Europe et aux Etats-Unis, notamment pour ses propriétés amoebicides et anti-asthmatiques. Si elle fut pratiquement oubliée des pharmacopées européennes et américaines, ainsi qu'en thérapeutique, à partir de 1914, elle n'a cessé de susciter l'intérêt de nombreux chercheurs, tant au niveau de sa toxicité et de sa composition chimique, qu'au niveau de certaines propriétés pharmacologiques.

Notre démarche a donc consisté, d'une part à tenter de rassembler et de synthétiser l'ensemble des données botaniques, ethnopharmacologiques, toxicologiques, chimiques et pharmacologiques tirées de l'étude bibliographique et, d'autre part, à confirmer ou infirmer les propriétés psychotropes de nature sédative d'E. hirta L., de rechercher son profil pharmacologique et de définir le profil chimique et la toxicité aiguë de l'extrait végétal employé.

Après le repositionnement succinct de cette espèce, au sein de la taxinomie générale, la première partie de ce travail a été consacrée à l'étude botanique d'E. hirta L., incluant sa répartition géographique et ses diverses dénominations (noms communs et vernaculaires).

Les données ethnopharmacologiques (deuxième partie) comprennent les indications thérapeutiques traditionnelles conférées aux différentes parties de la plante, dans les divers pays et ethnies l'utilisant, les modes de préparation et les posologies prescrites, aussi bien en médecines traditionnelles qu'en thérapeutique moderne.

Bien que très communément employée en médecines traditionnelles, E. hirta L. a fait l'objet de diverses études toxicologiques sur l'animal de laboratoire, mais aussi en clinique humaine permettant ainsi l'estimation de sa tolérance (troisième partie).

Nous avons complété ces précédents travaux par l'étude de la toxicité aiguë, sur la souris, d'un extrait aqueux d'E. hirta L. préparé par nos soins.

Dans une quatrième partie, après avoir recensé les différents composés chimiques d'E. hirta L. (Lanhers et coll., 1987), notre contribution s'est limitée à rechercher leur présence dans l'extrait végétal employé, par des techniques analytiques classiques (réactions d'identification, chromatographies sur couche mince), permettant d'établir un profil chimique nécessaire à la caractérisation de cet extrait végétal.

Parmi les indications pharmacologiques mentionnées dans l'étude bibliographique, nous avons orienté notre travail vers la recherche de propriétés psychotropes, en raison de l'importance en médecine contemporaine, des substances dotées de telles propriétés et de l'orientation initiale de notre laboratoire.

Dans un premier temps, l'effet neurosédatif de type tranquillisant, récemment rapporté par P. Cabalion (communication personnelle, 1983), a été recherché, par voie intra-péritonéale (I.P.), au moyen de tests comportementaux.

Cette première investigation nous a tout naturellement conduit à préciser le profil pharmacologique d'E. hirta L. par la recherche de diverses autres activités très fréquemment associées aux propriétés sédatives et notamment l'existence d'effets hypnotiques, neuroleptiques et anti-dépresseurs.

Nous avons ensuite approfondi le domaine des anxiolytiques et plus précisément celui des benzodiazépines, par la recherche d'activités pharmacologiques secondaires caractéristiques, telles que les effets anti-convulsivants et myorelaxants (étude

in vivo, sur la souris), mais également en abordant les mécanismes d'action de ces tranquillisants mineurs.

Cette dernière approche a pu être entreprise, d'une part grâce à l'étude in vivo de l'influence d'un antagoniste spécifique des sites récepteurs aux benzodiazépines, vis-à-vis des effets sédatifs d'E. hirta, et d'autre part, grâce à des études in vitro permettant de rechercher une éventuelle affinité de l'extrait végétal pour ces sites récepteurs.

Cependant, des substances autres que les psychotropes peuvent également exercer des effets sédatifs (anti-histaminiques, analgésiques...). C'est pourquoi nous avons entrepris de rechercher l'existence de propriétés anti-histaminiques et analgésiques, pour E. hirta L., propriétés par ailleurs mentionnées dans les indications pharmacologiques.

Découlant de ces dernières investigations, la recherche d'effets thérapeutiques fébrifuges et anti-inflammatoires, également connus des tradipraticiens et coexistant très fréquemment avec une activité analgésique, s'est inscrit très logiquement dans le plan expérimental initialement établi.

Des études complémentaires ont pu être entreprises, quant au devenir des effets pharmacologiques d'E. hirta L., à la suite d'administrations I.P. répétées, permettant ainsi d'aborder le problème de la tolérance, connue notamment pour les analgésiques centraux morphiniques. Cette recherche a pu être menée sur les effets sédatifs, inducteurs du sommeil barbiturique et analgésiques précédemment décelés chez la souris, à la suite d'un traitement I.P. unique.

Pour conclure cette étude pharmacologique, nous avons tenté de retrouver certaines des activités précédemment obtenues après injection I.P. de l'extrait végétal (propriétés sédatives, inductrices du sommeil barbiturique et analgésiques), en utilisant la voie orale comme voie d'administration.

*GENERALITES*

*SUR LE GENRE*

*EUPHORBIA*

## I LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE

(Anton, 1974)

La famille des Euphorbiaceae (ordre des Tricoccales) comprend entre 8000 et 10000 espèces, herbacées, cactiformes ou arbus-tives, réparties en 300 genres présents dans toutes les flores du globe. Les Euphorbiaceae sont notamment très bien représentées dans les régions tropicales et subtropicales.

Cette famille hétérogène comprend de nombreuses espèces médicinales ou toxiques, dont les propriétés pharmacologiques sont liées à la présence de phytotoxines, de résines vésicantes (Ricin, Croton, Purgère...) ou d'alcaloïdes (Phyllanthus, Securinega). Certaines espèces ont un usage alimentaire (Manioc); d'autres sont employées dans l'industrie, telles que l'Hevea qui produit le caoutchouc, d'autres plantes fournissant des matières oléagineuses, des huiles utilisées dans diverses industries (savonnerie, industries des lubrifiants, des peintures et vernis...).

A cette diversité dans les utilisations pratiques de ces espèces, s'ajoute une très grande richesse en types morphologiques différents, qui est à l'origine de la multiplicité des classifications établies.

\* Ainsi, certains auteurs (Pax et Hoffmann, 1931) ont divisé la famille des Euphorbiaceae en quatre sous-familles, d'après la présence ou l'absence de laticifères, le nombre d'ovules dans chaque loge du fruit et la morphologie de l'inflorescence: Phyllanthoïdeae, Crotonoïdeae, Porantheroïdeae, Ricinocarpoïdeae. Les Crotonoïdeae sont divisées en deux tribus: Crotoneae et Euphorbieae.

\* Hurasawa (1954), quant à lui, divisa l'ordre des Euphorbiales en deux familles renfermant chacune trois sous-familles: Euphorbiaceae (Acalyphoïdeae, Sapioïdeae, Crotonoïdeae) et Phyllantaceae (Phyllanthoïdeae, Antidesmatoïdeae, Brideloïdeae)

\* Dans la flore d'Afrique de l'ouest, Hutchinson et Dalziel (1958) scindent la famille des Euphorbiaceae en quatre tribus : Phyllanthaeae, Galearieae, Crotonaeae, Euphorbieae.

En raison de cette grande hétérogénéité, une origine polyphylétique a pu être proposée pour cette famille.

## II LE GENRE EUPHORBIA

(Anton, 1974)

Ces divergences s'affirment pour le genre *Euphorbia*, l'un des plus important, qui rassemble environ 1600 espèces cosmopolites, arbustives ou arborescentes (espèces tropicales), herbacées annuelles ou vivaces (espèces européennes), coralli-formes (espèces de Madagascar), cactiformes épineuses et charnues (espèces de Madagascar).

Ce genre a été remanié de nombreuses fois et divisé en genres distincts, en sous-genres et sections.

\* Ainsi, Necker en 1790, puis Haworth en 1819, scindèrent l'ancien genre *Euphorbia* de Linné en plusieurs genres.

\* Baillon (1858) et Klotzsch (1860) classèrent ces genres en quinze sections.

\* Boissier (1862) inclut onze nouvelles sections aux quinze précédentes et établit une monographie basée sur la distribution mondiale de 700 espèces.

\* Bentham (1878) et Hooker (1880) divisèrent le genre *Euphorbia* en six sections et y incorporèrent comme sous-sections certaines des sections de Boissier.

\* En 1931, Pax et Hoffmann classèrent 1600 espèces dans neuf sections et cinquante sous-sections.

\* Webster (1967) et Croizat (1972) établirent une classification d'ensemble basée sur des arguments panbiogéographiques.

Au sein de cette diversité morphologique, l'unité botanique est assurée essentiellement par la présence constante d'un cyathium (inflorescence hermaphrodite). L'unité histologique est caractérisée par la présence constante de laticifères vrais, renfermant un latex dont l'unité chimique est constituée par la

présence constante de terpènes (essentiellement des triterpènes).

Ces substances terpéniques ont été utilisées pour des études chimiotaxonomiques, en raison de leur distribution relativement stable chez les Euphorbes et généralement spécifique de l'espèce donnée.

### III EUPHORBIA HIRTA L.

#### Synonymie avec Euphorbia pilulifera

En ce qui concerne Euphorbia hirta, les confusions au niveau de la synonymie se sont perpétuées au fil des années et de la littérature.

\* Ainsi, en 1889, Maiden décrit dans son ouvrage "The Useful Native Plants of Australia" Euphorbia pilulifera L. (synonymes Euphorbia hirta L., Euphorbia capitata Lam., Euphorbia globulifera Kunth, Euphorbia verticillata Vellox).

Par la suite, cette synonymie entre Euphorbia hirta L. et Euphorbia pilulifera L. a été adoptée par de nombreux auteurs, parmi lesquels nous pouvons mentionner Chevalier A (cité par Kerharo et Adams, 1974) qui détermina Euphorbia hirta L. d'Afrique tropicale comme étant Euphorbia pilulifera L., mais également Quisumbing (1951), Benigni et coll. (1962), Steinmetz (1964), De Saqui-Sannes (1971), Berhaut (1975)...

\* Toutefois, cette synonymie est rejetée par Oliver (1913) (auteur mentionné par Schnell en 1953).

\* De même, Hutchinson et Dalziel (1936) soulignent les confusions faites entre ces deux espèces, confusions pouvant expliquer les propriétés médicinales contradictoires. Les auteurs incluent Euphorbia pilulifera Jacq. dans la synonymie d'Euphorbia hirta L., tandis qu'Euphorbia pilulifera L. correspondrait à Euphorbia hypericifolia L..

\* Brown, dans son ouvrage "Flora of Tropical Africa" (mentionné par Holmes en 1923), note également la confusion faite entre Euphorbia hirta L. et Euphorbia pilulifera L.. Par référence aux spécimens originaux de l'herbier de Linné, Euphorbia pilulifera L. serait identique à Euphorbia hypericifolia L. et la plante appelée Euphorbia pilulifera L. serait en réalité Euphorbia hirta L..

\* Cette dernière correction a été adoptée par Fawcett et Rendle dans leur ouvrage "Flora of Jamaica" (mentionnés par Holmes en 1923).

\* En 1956, Chopra et ses collaborateurs écrivent à propos d'Euphorbia hirta L. utilisée en Inde : "Euphorbia hirta L. = Euphorbia pilulifera auct. non L.". Ainsi, Euphorbia hirta L. serait l'Euphorbia pilulifera de différents auteurs, mais pas celle de Linné.

\* Signalons enfin l'ouvrage de Cufodontis ("Enumeratio Plantarum Aethiopiae Spermatophyta", 1953-1972), dans lequel sont mentionnées Euphorbia hirta L. et Euphorbia hypericifolia L., deux espèces appartenant à la même section de Boissier (Anisophyllum, Hypericifoliae). L'auteur attribue à Euphorbia hirta L. et à Euphorbia hypericifolia L. divers synonymes dont Euphorbia pilulifera L. p.p. (prob. Euphorbia pilulifera L. p.p., pour Euphorbia hypericifolia L.). Ainsi, une partie de l'échantillon correspondrait à Euphorbia pilulifera L., tandis que l'autre partie correspondrait à Euphorbia hirta L. ou à Euphorbia hypericifolia L..

#### Synonymie avec le genre Chamaesyce

Aux incertitudes concernant la synonymie entre Euphorbia hirta L. et Euphorbia pilulifera L., d'une part entre Euphorbia hypericifolia L. et Euphorbia pilulifera L., d'autre part aux confusions perpétuées au fil des années et de la littérature, vient s'ajouter la question de l'emploi de Chamaesyce à la place d'Euphorbia.

\* Ainsi, dans son ouvrage "A dictionary of the flowering plants and ferns" (1973), Willis cite Chamaesyce S.F.Gray comme une alternative pour Euphorbia, parfois inclu dans, ou réduit à Euphorbia.

\* Weniger (1985), quant à lui, décrit Euphorbia hirta L. comme étant synonyme de Chamaesyce hirta Millsp., synonymie également admise dans la flore de Taiwan (Chang-Fu, 1977).

\* En 1974, Anton mentionne une espèce herbacée originaire d'Amérique tropicale et subtropicale, à tendance cosmopolite : Euphorbia pilulifera (= Chamaesyce pilulifera). L'auteur distingue le genre Chamaesyce du genre Euphorbia, le premier étant composé d'un nombre suffisant d'espèces (environ 250) à caractères morphologiques suffisamment tranchés au sein du genre Euphorbia ; il est également bien délimité géographiquement, en Amérique tropicale principalement. Anton divise le genre Chamaesyce en trois sections, correspondant aux sous-sections de Boissier (1862) : Hypericifolia Boiss., Chamaesyce Boiss., Elegantes Boiss.. L'auteur penche en faveur d'une origine polynésienne ; divers archétypes se seraient disséminés très tôt, à partir de ce centre de dispersion pacifique, principalement en Amérique du nord, mais également en Inde et en Afrique (groupes ponctuels).

\* Lors de leur étude chimiotaxonomique des Euphorbiaceae, basée sur la répartition des triterpènes tétracycliques dans le latex, Ponsinet et Ourisson (1968) reprennent la classification de Boissier, modifiée par Pax et Hoffmann (1931) et basée sur des données morphologiques. Les auteurs placent Euphorbia hirta dans la section Anisophyllum (sous-section Hypericifoliae) et lui confèrent l'Amérique, comme habitat naturel.

\* Cette classification est mentionnée par Evans et Taylor (1983) : sous-section et série Hypericifoliae Boiss., section Anisophyllum (Haw.) Roeper, genre Euphorbia L., sous-tribu Euphorbiinae, tribu Euphorbieae, sous-famille Crotonoideae, famille Euphorbiaceae.

Actuellement, ces problèmes de synonymie sont loin d'être totalement élucidés ; il faudrait notamment relever les références de tous les échantillons ayant servi aux descriptions et

aux mises en synonymie, comparer ces échantillons entre eux et établir la correspondance avec les articles concernés. Cet énorme travail dépasse largement notre domaine et nécessiterait l'intervention de spécialistes.

Certains auteurs (Kerharo et Adams, 1974...) penchent en faveur de l'existence de différentes races géographiques et biologiques, regroupées sous le vocable Euphorbia hirta L.. Ainsi, Rousselet et Paris (1971) décrivent Euphorbia hirta et Euphorbia pilulifera comme étant de petites plantes herbacées d'origines exotiques (Afrique équatoriale, Inde) très voisines, qui ne seraient même que des variétés pour certains auteurs.

*PREMIERE PARTIE*

*ETUDE BOTANIQUE*

## I CHOROLOGIE

(Maiden, 1889 - Caius, 1938 - Quisumbing, 1951 - Schnell, 1953  
Chopra et coll., 1956 - Cufodontis, 1958 - Benigni et coll.,  
1962 - Blanc et coll., 1963 - Steinmetz, 1964 - Kerharo, 1969,  
1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971 - Poulet, 1972 - Kerharo et  
Adam, 1974 - Berhaut, 1975 - Zipcy, 1975 - Chang-Fu, 1977 -  
Adjanohoun et coll., 1980, 1981, 1983, 1986 - Ake Assi et  
coll., 1981 - Fleurentin, 1983 - Pousset, 1984 - Sofowora, 1984  
Weniger, 1985 - Anonyme, 1986 - (de la) Pradilla).

Originaire d'Australie tropicale, E. hirta est largement  
répandue dans tous les pays tropicaux et subtropicaux. On la  
rencontre ainsi en Afrique tropicale, à Madagascar, au Yémen,  
en Inde occidentale, en Chine (dans la province de Kwangtung),  
au Japon, à Taïwan et dans les îles avoisinantes (Kioukiou),  
ainsi que dans les îles du Pacifique austral.

La plante croît également en Amérique tropicale continentale  
(de la Floride et du Mexique au Brésil et au Pérou), à Hawaï,  
aux Antilles (des Bahamas à Trinidad et notamment à la  
Guadeloupe, la Martinique, la Jamaïque, Haiti...).

Plante rudérale et messicole, E. hirta pousse dans les milieux  
les plus divers, tels que le pourtour des agglomérations, les  
bas-côtés des routes et des pistes, les jachères, les terrains  
vagues.

Plante de lumière, elle affectionne les sols sablonneux et  
humides, dénudés par l'érosion, mais elle peut s'adapter aux  
sols argileux ou plus ou moins riches en humus.

Elle peut croître jusqu'à une altitude d'environ 1400 mètres.

## II DENOMINATIONS

### EUPHORBIA HIRTA L. (Euphorbiaceae)

#### Synonymes

(Maiden, 1889 - Holmes, 1923 - Irvine, 1930 - Hutchinson et Dalziel, 1936, 1958 - Bally, 1938 - Caius, 1938 - Quisumbing, 1951 - Schnell, 1953 - Cufodontis, 1958 - Benigni et coll., 1962 - Blanc et coll., 1963 - Steinmetz, 1964 - Kerharo et Adam, 1974 - Zipcy, 1975 - Anton, 1975 - Berhaut, 1975 - Chang-Fu, 1977 - Penso, 1978 - Sofowora, 1984 - Weniger, 1985 - Anonyme, 1986).

\* E. hirta var. procumbens (Boiss. N.E. Br), E. pilulifera var. procumbens (Boiss. in D.C.), E. pilulifera L. - E. pilulifera A. Chev. - E. pilulifera Urb. - E. procumbens D.C. non Mill. - E. capitata Lam. - E. capitata Wall. - E. gemella Lag. - E. globulifera H.B.K. - E. globulifera Kunth. - E. nodiflora Steud. nom. nud. - E. obliterated Jacq. - E. ophthalmica Pers. - E. verticillata Vell.

\* Anesula americana Plum. - Anesula esculenta Rumph.

\* Tithymalus dulcis Sloane

\* Chamaesyce hirta (L.) Millsp. - Chamaesyce pilulifera

#### Noms communs

##### \* Allemand

Indisches wolfsmilchkraut, pillenwolfsmilchkraut, schlangenkraut (Steinmetz, 1964).

##### \* Anglais

Australian asthma herb, queensland asthma herb, hairy spurge, pill bearing spurge, snakeweek herb, cat's hair, indian wolf's milk (Maiden, 1889 - Caius, 1938 - Benigni et coll., 1962 -

Steinmetz, 1964 - Hartwell, 1969 - Ayensu, 1978 - Sofowora, 1984).

**\* Espagnol**

Euforbio (Steinmetz, 1964).

**\* Français**

Euphorbe indienne, euphorbe à globules, euphorbe pilulifère, herbe à Jean Renaud, herbe à serpents, madelone plat, mal famée, pilulier, poil de chat (Caius, 1938 - Steinmetz, 1964).

**\* Néerlandais**

Indisch wolfsmelkkruid (Steinmetz, 1964).

**Noms vernaculaires**

En raison de sa large distribution géographique, E. hirta est très utilisée en médecine traditionnelle, dans de nombreux pays et par de nombreuses ethnies; ceci explique le nombre impressionnant de noms vernaculaires, parfois très voisins, dont nous n'avons pu consigner que quelques exemples dans le tableau 1, faute de précisions suffisantes sur certaines régions et certaines ethnies référencées par les auteurs.

TABLEAU 1 : NOMS VERNACULAIRES ATTRIBUES A E. HIRTA L.

PAYS REGIONS	ETHNIES DIALECTES	APPELLATIONS	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Grandes Antilles (Jamaïque)		mapempe, pempe, milk-tea, milk-weed	Hartwell, 1969
Petites Antilles (Dominique, Guadeloupe, Martinique)		malnommée vraie, malnommée, ti-lait, herbe à pilules, pilulier, lechillo, payenté, pailleté	Cabre, 1939 - (de) Saqui- Sannes, 1971 - Anonyme, 1986
Argentine		lechera de la golondrina, yerba de la golondrina	Hieronymus, 1882 - Hartwell, 1969
Bengale		barakerui, burakeru, burokeruee, baro-kheruie	Caius, 1938 - Chopra et coll., 1956
Bénin	Adja Dendi Fon et Goun Yoruba	hounman, ayéwé paringawa akponyon, nonsiwé nyahounayira	Anonyme, 1986
Bornéo	Brunéi kedayan Malay Malaya  Suluk Tenggara	kamantikan patak-patak patik-patik, patiktik ambin jantan, ara tanah, gelang susu, kelusum patik-patik darat-darat	Keith, 1952

Brésil		erva dos cobres, caaçica, caicacia	Steinmetz, 1964
Cameroun	Ewondo	okul bifeg	Zipcy, 1975
Ceylan		madduppachcharichippillu, palavi	Caius, 1938
Chine		fei-yang-ts'ao	Steinmetz, 1964
Comores	Anjouan Moroni	shileledzia hidoindzia	Anonyme, 1986
Congo	Kôta Laadi Lari Mbaamba Songo Tié	kasahe laganzu claoanzou oyabi empoou ikonde wola moyebe	Bouquet, 1969 - Anonyme, 1986
Côte d'Ivoire	Abouré Agni  Ashanti Attié Baoulé  Bété Dioula Ebrié Cagou Gouro Guéré	orofa aboko, dodo, karagnawa (karaguawa) akuododou, akololo, awaha ako-lôlô adododo, akodoudou, akolulu kumagési diableg waré (dibleg waré) tuanésingé (tuanéningé) douantapouin tao moa sablé uyé gorobuo, snongbu (suongbu)	Bouquet, 1969 - Kerharo, 1969 Bouquet et Debray, 1974 Ayensu, 1978 - Anonyme, 1986

	Malinké	suaourézi, suassingué, suaulingé, deni-ba-singui	
	Shien	sabrè ouyé	
Iles Fidji		deniosi, dilo, do ni osi, ovuka, ovoku, vuka	Rougier, 1907 - Caius, 1938 Parham, 1943
Ghana	Awuna Ewe Nzima	ahinkodze, notsigbè notsigbee akubaa	Irvine, 1930 - Hutchinson et Dalziel, 1936 - Caius, 1938 Ayensu, 1978
Guam (îles Mariannes)		golondrina	Caius, 1938
Haiti		malonnen	Weniger, 1985
Haute-Volta	Bambara Bissa Haoussa Môoré Mossi	daba da blé, tugani ba singi gazingéré binné (gazingéré lè da) nono kurkia wal-bîissum (wal-bîis- yâaga), kul-waogo, kul-waka ouallé bissoun (walébisum)	Debaille et Petard, 1953 Kerharo, 1969 - Poulet, 1972 Ayensu, 1978 (de la) Pradilla
Hawai		kokakahiki, akoko	Bushnell et coll., 1950
Indes	inconnues Bangali	dadakiriga, dudheli, kiritala, lal dudhi, moti dudhi, nagarjuni, nanabala, nayeh, baro-kheruie	Caius, 1938 - Chopra et coll., 1956 - Steinmetz, 1964 - Ayensu, 1978

	Hindi Malayalam Sanskrit Tamil	dudhi nelapalai pusitua, raktavinduchada amampatchaiarisi, patchaiyarissi nayeti	
état de Mahârâshtra			
Indochine (en général)		co sua lon la, ka ta, phi duong thao, vu sua	Caius, 1938
Indonésie (en général)		daun patikan, daun kebo, daun bidji kachang	Steinmetz, 1964
Kenya	Digo	chiziyaziya, muziyaziya	Kokwaro, 1976
Liberia	Mano	tõ a gbondo	Hutchinson et Dalziel, 1936 Caius, 1938 - Harley, 1970 Ayensu, 1978
Madagascar		ahidinono, aidinono	Caius, 1938 - Boiteau, 1986
Malaisie		ara tanah, daun patiyang, ambin jantan, gelang susu, kurumak susu	Caius, 1938 - Steinmetz, 1964
Mali	Bambara Molinké	dabadable demba sindji	Adjanooun et coll., 1981 Anonyme, 1986
Ile Maurice		jean robert	Caius, 1938 - Wong-Ting-Fook, 1980 - Adjanooun et coll., 1983

Mexique		xauay, xanabmucuy	Steinmetz, 1964
Niger	Tamacheck	iloesantass	Adjanohoun et coll., 1980
Nigeria	Hausa (nord) Benin (sud) Efik (sud) Ibo (sud) Yoruba (sud)	nonan kurchiya asen-uloکو ětinkěni-ěkpo udani ěgělě, ěgě-ilě, ěmi-ilě	Hutchinson et Dalziel, 1936 Caius, 1938 - Anonyme, 1986
Nouvelle Calédonie		grande rougette	Guillaumin, 1951
Ouganda	Acholi Lango Luganda Lutoro (Lunyoro) Padhola Runyankore	acak-acak acak akasandasanda akajwa amata  achaki mbabazi za ntaama	Lind et Tallantire, 1962 Kokwaro, 1976
Philippines		gatas-gátas, batabotonis, botobotónis, golandrina	Caius, 1938 - Quisumbing, 1951 - Steinmetz, 1964
République Centrafricaine	Banda  Gbaya Gbaya-kara Sango	ngonderamengo, ngondoromaongo libele zonga gbǎ zù bêm lime	Caius, 1938 - Hartwell, 1969 Haxaire, 1969 - Vergiat, 1970
Réunion		jean robert	Caius, 1938

Iles Rodrigues		jean robert	Adjanohoun et coll., 1983
Sénégal	Bambara Sévère  Toucouleur Wolof	dabadablé dad ondis, mbel fooy (mbelfoo) takâpolé (takanpolé) homgölem (homgoelem, homguelem), mbal, mbalmbal	Hutchinson et Dalziel, 1936 Caius, 1938 - Kerharo, 1969, 1971 - Kerharo et Adam, 1974 Pousset, 1984 - Anonyme, 1986
Seychelles	Créole	jean robert	Anonyme, 1986
Sierra Leone	Timne Susu	ebit, yankara-ebit boxeforotai, nyayafoke, nyalefoxe	Hutchinson et Dalziel, 1936 Caius, 1938
Tanzanie	Suaheli Sukuma	mziwaziwa, mwache kiawane	Bally, 1937, 1938 - Kokwaro, 1976 - Anonyme, 1986
Togo	Akassélem Anufo Ewé Fè Kabiyè Mina Nawdem (Losso) Tem	mélandjébé bolimbuku notsigbé, glido ignonkolialukuku tchikpaltchindi anotsigbé, anonsika tawrurumogo kovoyo	Adjanohoun et coll., 1986 Anonyme, 1986
Vietnam		cây co síra, cây mú	Steinmetz, 1964
Yémen		rubaišât	Fleurentin, 1983

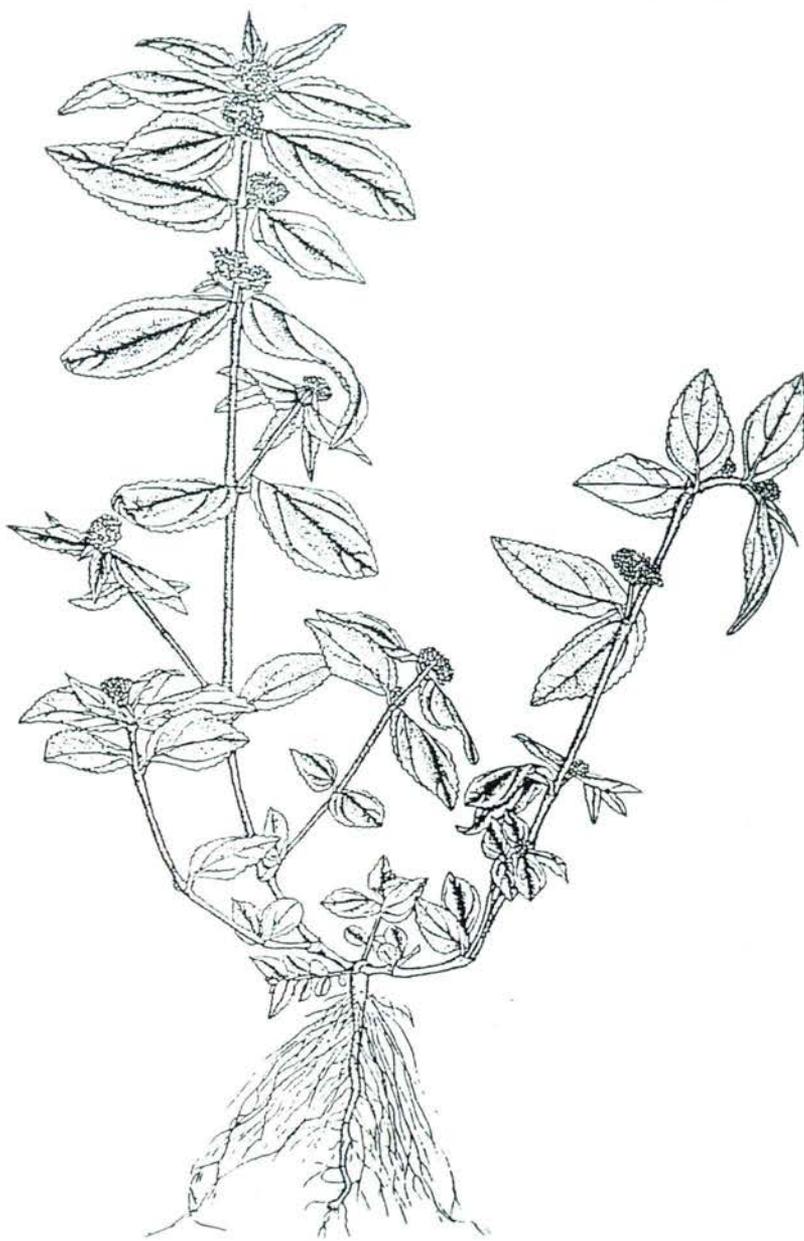


FIG. 1 : E. HIRTA L. : ASPECT GENERAL.



PHOTO 2 : E. HIRTA L. : PARTIES AERIENNES.

### III DESCRIPTION BOTANIQUE

(Holmes, 1923 - Irvine, 1930 - Caius, 1938 - Quisumbing, 1951 - Schnell, 1953 - Hutchinson et Dalziel, 1958 - Lind et Tallantire, 1962 - Blanc et coll., 1963 - Steinmetz, 1964 - Kerharo, 1969 - (de) Saqui-Sannes, 1971 - Poulet, 1972 - Kerharo et Adam, 1974 - Berhaut, 1975 - Zipcy, 1975 - Chang-Fu, 1977 - Adjanohoun et coll., 1980, 1981, 1983, 1986 - Ake Assi et coll., 1981 - Pousset, 1984 - Sofowora, 1984 - Weniger, 1985 Anonyme, 1986 - (de la) Pradilla).

E. hirta est une plante herbacée (figure 1), vivace lorsqu'elle croît dans des endroits humides et faiblement éclairés, annuelle lorsque le milieu est très sec et très ensoleillé.

#### III - 1 LES TIGES

Selon le milieu où la plante croît, elle peut présenter un port dressé (endroit faiblement éclairé, humide et non fréquenté par l'homme) ou rampant (endroit très ensoleillé, sol dur et piétiné).

Les tiges (figure 2, photo 2), grossièrement pubescentes, non lignifiées, sveltes et cylindriques, peuvent atteindre 40 cm de haut. Simples ou ramifiées, généralement de façon dichotomique à la base, elles sont d'un vert tendre teinté de rouge. Leur extrémité supérieure est recouverte de poils jaunâtres étalés, pluricellulaires et recouvrant eux-mêmes une pubescence fine de courts poils recourbés (photo 2).

La tige principale est courte, les tiges secondaires présentent des renflements au niveau des noeuds, ces derniers étant parfois espacés de 4 à 5 cm (figure 2).

La structure est typique des Euphorbiaceae : présence de nombreux laticifères situés dans le parenchyme cortical (production d'un latex blanc), de fibres molles péricycliques formant un anneau assez épais dans lequel on rencontre des cellules à tanins.



- I : inflorescence axillaire ou cyathium  
 S : style bifide (3)  
 G : glande pétaloïde (5)  
 L : lobe deltoïde (5)  
 E : étamine = fleur mâle (5)  
 O : ovaire  
 F : fruit (capsule bicoque et pubescente)

**FIG. 2 : *E. HIRTA* L. (Schnell, 1953)**

- 1 : parties aériennes  
 2-6 : maturation du fruit

### III - 2 LES FEUILLES (figure 2)

Les feuilles sont opposées, obliquement ovées à lancéolées et finement denticulées (5 à 10 dents/cm).

Elles sont orientées de façon à recevoir le maximum d'inso-  
lation sur le dessus du limbe.

Le pétiole est court (1 à 3 mm). Le limbe peut atteindre 1 à 5  
cm de long sur 0,5 à 2 cm de large; il est asymétrique et  
présente une base arrondie d'un côté et cunéiforme de l'autre,  
le sommet étant aigu.

Le limbe est pubescent sur ses deux faces, mais surtout sur sa  
face inférieure gris-verdâtre (courts poils incolores,  
incurvés, plus épais à la base et comportant peu de cellules).  
Les nervures inférieures, larges et saillantes, sont recou-  
vertes de poils longs jaunâtres, effilés et pluricellulaires.  
Sa face supérieure vert-sombre est parsemée de taches pourpres,  
rugueuses.

Les nervures secondaires s'embranchent presque à angle droit  
sur la nervure principale, sauf à la partie supérieure où elles  
s'incurvent autour et à l'intérieur du réseau formé par les  
nervures tertiaires, donnant ainsi à la feuille un aspect  
plissé très serré, surtout chez la plante jeune. La présence de  
très nombreuses veinules tertiaires donne à la feuille un  
glacis de taches translucides par transparence.

Deux stipules aristées sont généralement présentes, mais peu  
visibles car minuscules.

### III - 3 LES INFLORESCENCES (figure 2)

Les fleurs mâles et femelles sont distinctes (fleurs uni-  
sexuées), très petites, blanches, jaunâtres ou verdâtres,  
parfois teintées de rouge.

Elles sont groupées en petites cymes globuleuses, axillaires,  
de 0,5 à 1 cm, pouvant être divisées dichotomiquement en deux  
ou trois glomérules globuleux.

Chaque inflorescence, encore appelée cyathium, est portée par  
un court pédoncule (2 à 10 mm), à l'aisselle des feuilles,

alternativement à droite et à gauche du rameau. Chaque cyathium est constitué d'une fleur femelle et de cinq fleurs mâles. Les involucre sont petits, condensés, courtement pédicellés, cupuliformes. Ils présentent cinq lobes deltoïdes et cinq petites glandes blanchâtres pétaloïdes les dépassant légèrement.

**\* La fleur femelle**

L'ovaire trigone et pédicellé émerge au centre de l'involucre. Les styles sont au nombre de trois; ils sont courts et profondément divisés en deux branches grêles, un peu renflées au sommet.

**\* La fleur mâle**

Chaque fleur mâle est réduite à une étamine.

**III - 4 LES FRUITS (figure 2)**

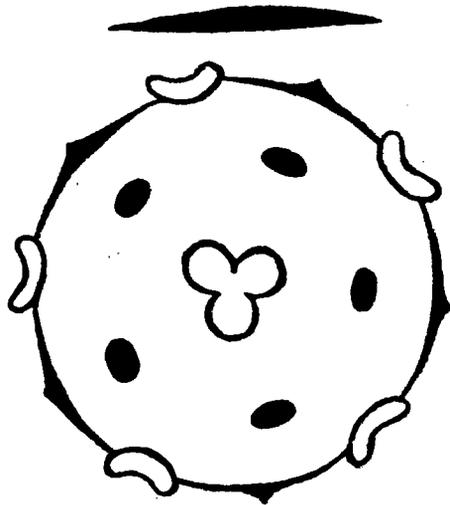
Les fruits, d'abord rouges, puis verts et brunâtres sur la plante sèche, sont des capsules globuleuses pouvant atteindre 1,5 mm de large. Elles sont composées de trois coques comprimées, carénées, couvertes de poils fauves et renfermant chacune une petite graine.

**III - 5 LES GRAINES**

Les graines, de teinte rouge-brique, sont oblongues, quadrangulaires et présentent de fines rugosités transversales. Elles peuvent atteindre 0,7 mm de long.

**III - 6 DIAGRAMME FLORAL**

Le diagramme floral est représenté sur le schéma suivant :



#### **IV ESSAIS BOTANIQUES**

Une étude histologique succincte a été entreprise, grâce à la réalisation de coupes transversales des parties aériennes de la plante (tiges et feuilles).

##### **Préparation de la plante**

La plante sèche est préalablement immergée dans de l'éthanol à 60°, pendant 12 heures.

##### **Réalisation des coupes**

Des coupes transversales suffisamment fines sont obtenues à partir des différents fragments de la plante, insérés dans un morceau de moelle de sureau.

Elles sont ensuite immergées pendant 15 minutes, dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10%, afin d'éliminer les constituants intra-cellulaires, puis rincées à l'eau distillée. On réalise ensuite un mordantage à l'acide acétique à 3 %.

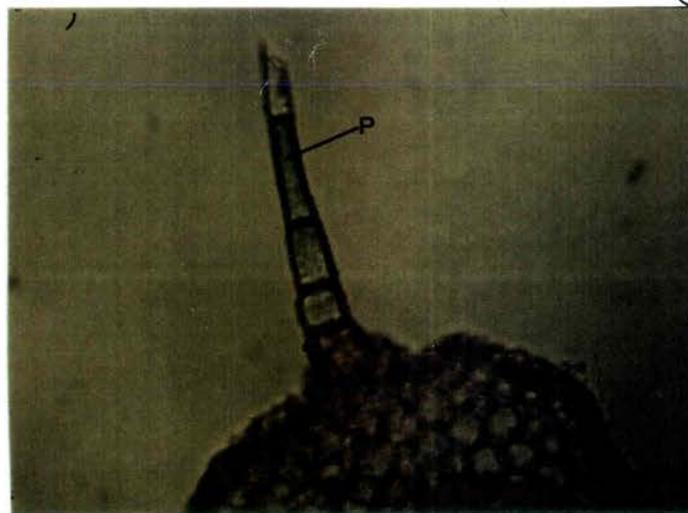
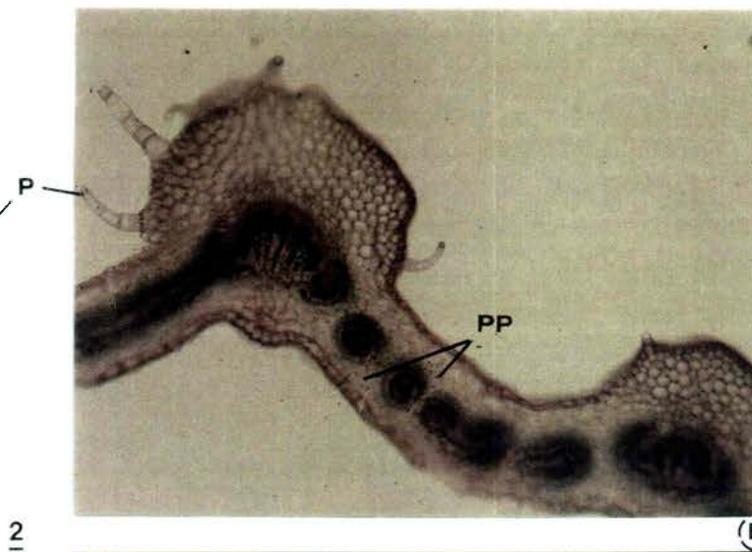
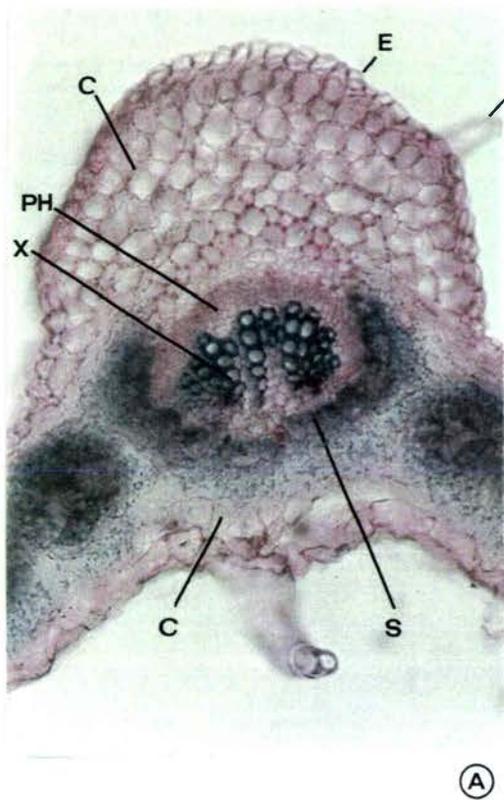
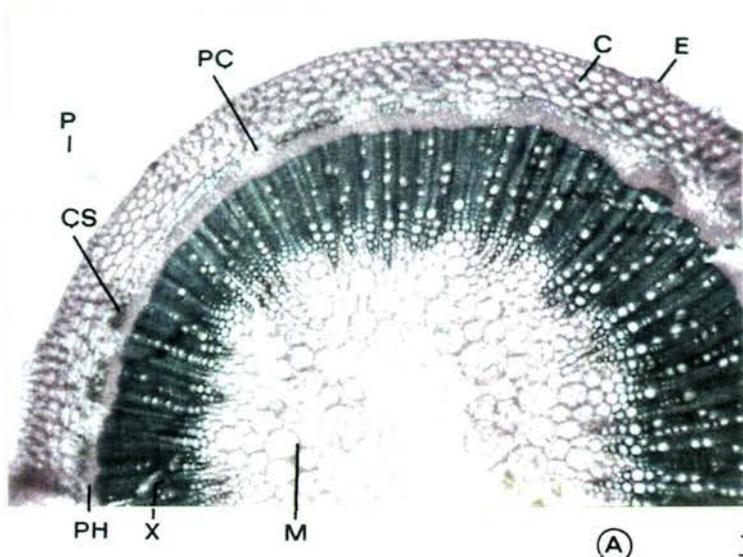
##### **Coloration des coupes**

Les coupes sont immergées dans du vert d'iode, pendant trois minutes.

Après rinçage à l'eau distillée, elles sont colorées au carmin aluné (immersion pendant trois minutes), puis à nouveau rincées.

Finalement, elles sont plongées dans de l'éthanol à 70°, à 96°, puis dans de l'éthanol absolu.

Les préparations ainsi obtenues sont alors prêtes pour une observation microscopique (photo 3).



C = COLLENCHYME ; CS = CELLULES SCLERIFIÉES ; E = EPIDERME ;  
M = MOELLE ; P = POILS TECTEURS PLURICELLULAIRES ET UNISERIES ;  
PC = PARENCHYME CORTICAL ; PH = PHLOÈME ; PP = PARENCHYME  
PALISSADIQUE BILATÉRAL ; S = SCLERENCHYME ; X = XYLÈME

A = 30 x ; B = 75 x ; C = 300 x

PHOTO 3 : COUPES TRANSVERSALES DE LA TIGE (1) ET D'UNE FEUILLE (2) D'E. HIRTA L.

*DEUXIEME PARTIE*

*INDICATIONS*

*TRADITIONNELLES*

*ET USAGES*

*THERAPEUTIQUES*

Espèce largement distribuée dans tous les pays tropicaux et subtropicaux, E. hirta occupe une place privilégiée dans diverses pharmacopées traditionnelles d'Asie orientale et d'Afrique tropicale, notamment en Côte d'Ivoire (Steinmetz, 1964).

Parmi les nombreux pays mettant à profit diverses propriétés de cette plante, quelques exemples peuvent être mentionnés : Chine, Japon, îles Fidji, îles Sandwich (Hawaï), Ceylan, Queensland, Guam, Inde, Indonésie, République Démocratique du Laos, Pakistan, Philippines, Vietnam, Nouvelle-Calédonie, Mexique, Brésil, Pérou, Etats-Unis, Mozambique, Nigéria, Congo, Guinée-Bissau, Guinée, Côte d'Ivoire, Papouasie, Nouvelle-Guinée, Sénégal, Afrique du sud et du sud-ouest, République Unie de Tanzanie, Madagascar, Yémen (Maiden, 1889 - Penso, 1978-  
Fleurentin, 1983).

Cette grande notoriété transparait également dans le nombre considérable d'ethnies utilisant cette plante et de noms vernaculaires qui lui sont attribués (première partie : Etude botanique).

Selon les pays et les ethnies, les indications thérapeutiques traditionnelles les plus variées lui sont conférées. Ainsi, E. hirta entre dans le traitement de diverses affections gastro-intestinales et notamment de la dysentérie, d'affections hépatiques, cardiaques, respiratoires (asthme...) et génitales (blennorrhagie, stérilité...). Diverses autres propriétés lui sont également conférées, telles que des propriétés antalgiques, fébrifuges, anti-inflammatoires et cicatrisantes, pour ne mentionner que ces quelques exemples.

A cette diversité dans les indications thérapeutiques traditionnelles, vient s'adjoindre une certaine disparité dans les préparations, les parties de la plante employées, les modes d'utilisation et les posologies préconisées.

La grande popularité d'E. hirta peut expliquer, en partie, l'intérêt qui lui a été porté, notamment en Europe et aux Etats-

Unis, non seulement en médecine allopathique, mais également en homéopathie (Cabre, 1939 - Clarke, 1962), les principales indications étant le traitement de la dysentérie et de diverses affections respiratoires telles que l'asthme.

Effectivement, E. hirta fut introduite en Europe comme médicament anti-asthmatique et d'importantes quantités furent exportées de l'ancienne Inde portugaise (en Inde, les livres sacrés la mentionnent comme médicament de l'asthme et des maladies pulmonaires (Kerharo, 1969)). Toutefois, elle fut presque oubliée après 1914.

Au cours de cette deuxième partie, nous nous sommes attachés à rassembler les nombreuses indications thérapeutiques traditionnelles d'E. hirta, en fonction des parties de la plantes utilisées (plante entière, parties aériennes, jeunes pousses, sommités fleuries, feuilles, latex, racines), du mode d'emploi (usage interne ou externe) et des affections traitées (section A).

Dans un second temps, nous avons tenté de présenter les différentes prescriptions et posologies employées en médecine allopathique et homéopathique, ainsi que celles préconisées par les tradipraticiens (section B).

*SECTION A*

*INDICATIONS THERAPEUTIQUES*

*TRADITIONNELLES*

## **I LA PLANTE ENTIÈRE (PE) ET LES PARTIES AÉRIENNES (PA)**

**Remarque** : Quelquefois, les auteurs mentionnent les utilisations traditionnelles de la plante, sans préciser si la plante entière ou seulement les parties aériennes sont employées. Ces usages sont répertoriés dans le tableau récapitulatif 2, avec l'abréviation ND (non déterminé) pour la rubrique "parties de la plante".

### **I - 1 USAGE INTERNE**

La plante (généralement les sommités fleuries, mais quelquefois toute la partie aérienne) est consommée fraîche ou bouillie, par les indigènes d'Ambon (île d'Indonésie); mais prise en trop grande quantité, elle occasionne des douleurs abdominales, du fait de sa légère toxicité (Steinmetz, 1964).

Ce médicament populaire serait acide et astringent (Holmes, 1923 - Rousselet et Paris, 1971), mais inodore (Steinmetz, 1964).

#### **\* Traitement de diverses affections gastro-intestinales**

Des propriétés anti-entéralgiques lui sont conférées par les guérisseurs Wolof (Sénégal), qui prescrivent un macéré de plante entière, pour traiter les diarrhées des adultes, les coliques et les diarrhées des nourrissons (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974 - Ndir et Pousset, 1982 - Sofowora, 1984).

Le décocté de plante entière est également utilisé pour ses propriétés anti-diarrhéiques, au Sénégal (Dalil, 1984) et notamment par les guérisseurs Toucouleur (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974 - Ndir et Pousset, 1982), en Haute-Volta (Poulet, 1972), au Togo (Adjanooun et coll., 1986), au Mali (Adjanooun et coll., 1981), au Congo (Bouquet, 1969), aux îles Maurice et Rodrigues (Wong-Ting-Fook, 1980 - Adjanooun et coll., 1983), et aux Seychelles (Anonyme, 1986).

En Afrique équatoriale et en Inde, les parties aériennes sont employées pour le même usage (Rousselet et Paris, 1971).

Au Bénin, les diarrhées cholériformes sont traitées par une poudre à base de plante entière d'E. hirta, de Paullinia pinnata et de grains de Zea mays, ajoutée à la nourriture (Anonyme, 1986).

De telles propriétés anti-diarrhéiques sont également mises à profit en Angola (Sofowora, 1984).

Très souvent, ces diarrhées sont liées à la dysentérie amibienne; par ailleurs, les propriétés amoebicides d'E. hirta sont connues en médecine traditionnelle (Poulet, 1972 - Ndir et Pousset, 1982 - Dalil, 1984), la plante entière étant généralement consommée sous forme de décoction, seule ou additionnée de jus de citron (Congo (Zipcy, 1975)), ou encore bouillie dans de l'eau salée, l'efficacité du traitement allant de pair avec la durée de l'ébullition (îles Fidji (Parham, 1943)).

Le décocté est ainsi utilisé au Sénégal (Dalil, 1984 - Anonyme, 1986), en Côte d'Ivoire (Debaille et Pétard, 1953 - Martin et coll., 1964 - Ridet et Chartol, 1964 - Zipcy, 1975 - Anonyme, 1986), au Mali (Adjanooun et coll., 1981), en Haute-Volta (Debaille et Pétard, 1953 - Martin et coll., 1964 - Ridet et Chartol, 1964 - Poulet, 1972 - (de la) Pradilla), aux îles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983).

Ces propriétés anti-dysentériques sont également connues au Nigéria (Oliver-Bever, 1981), en Angola (Sofowora, 1984), en Inde (utilisation du jus de la plante (Caius, 1938)).

En Nouvelle Calédonie (Guillaumin, 1951) et en Afrique portugaise (Watt et Breyer-brandwijk, 1962), la plante est prise en infusion.

Au Togo, ces propriétés anti-dysentériques sont conférées au macérat de tiges feuillées, le décocté de tiges feuillées d'E. hirta et de Phyllanthus amarus étant réputé anti-amibien (Adjanooun et coll., 1986).

Dans certains cas, seules les jeunes pousses sont employées, en décocté, pour traiter les cas de dysentéries et de diarrhées (Madagascar, île Maurice (Wong-Ting-Fook, 1980)).

Parfois, E. hirta entre dans la composition d'un mélange à base de plantes, dont la décoction calme les douleurs intestinales liées à la dysentérie (Madagascar (Boiteau, 1986)).

A la Réunion, ses propriétés astringentes sont mises à profit dans les cas de diarrhées et de dysentéries chroniques (Caius, 1938). Par ailleurs, aux Philippines, E. hirta est couramment employée comme astringent (Caius, 1938 - Quisumbing, 1951).

E. hirta entre également dans la composition d'un mélange, prescrit sous forme d'un décocté, pour supprimer les spasmes du pylore (Madagascar (Boiteau, 1986)).

Au Bénin, le décocté de plante entière est utilisé dans les cas d'ulcères gastriques (Anonyme, 1986).

En Asie orientale, la plante (sommités fleuries ou parfois toute la partie aérienne) intervient dans le traitement de diverses affections intestinales, telles que l'entérite chronique, les ulcères et la proctite (Steinmetz, 1964).

Aux précédentes atteintes intestinales traitées par E. hirta, viennent s'ajouter diverses infections parasitaires. Ainsi, dans le bassin caraïbe (Bahamas), les parties aériennes sont employées pour leurs propriétés anthelminthiques (Weninger, 1985).

En République Centrafricaine, celles-ci sont consommées, pour le même usage, mâchées avec des noix de palme (Ake Assi et coll., 1981).

En Tanzanie, les ethnies Sukuma et Swahili utilisent la plante entière comme anthelminthique et notamment contre les oxyures (Raymond, 1936 - Bally, 1937).

Diverses affections des muqueuses sont également traitées par E. hirta.

Ainsi, en Afrique portugaise, la plante est utilisée en infusion, dans le traitement des stomatites (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962).

Au Bénin, les candidoses sont traitées par un décocté de plante entière (Anonyme, 1986).

Le macérat de tiges feuillées, quant à lui, est employé au Togo, dans les cas d'ankylostomiase (Adjanooun et coll., 1986).

E. hirta est également utilisée comme laxatif, associée à du jus de citron (Liberia (Hutchinson et Dalziel, 1936 - Caius, 1938)) ou pulvérisée et ajoutée à de l'eau (Côte d'Ivoire (Hutchinson et Dalziel, 1936)).

Cet usage est connu au Nigéria (Oliver-Bever, 1981), à Hawaï (Bushnell et coll., 1950), au Ghana (en lavement (Sofowora, 1984)), ainsi qu'à Madagascar (Boiteau, 1986) où la plante entre dans la composition d'un mélange dont la décoction est employée en lavement émollient.

En Tanzanie, des effets purgatifs légers sont conférés à E. hirta (Bally, 1938).

#### \* Traitement de diverses affections rénales

La plante entière est réputée pour ses propriétés diurétiques (Dalil, 1984).

Ainsi, les guérisseurs Toucouleur (Sénégal) prescrivent un décocté de plante entière (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974), les ethnies tanzaniennes Swahili et Sukuma utilisent la plante entière pour ces mêmes propriétés (Bally, 1937, 1938).

Un tel usage est pratiqué avec les parties aériennes seules, en Asie orientale (Steinmetz, 1964), aux Antilles françaises et au Mexique (Weniger, 1985).

Ces propriétés diurétiques sont également connues au Mali (Adjanooun et coll., 1981), en Inde (Caius, 1938), en Argentine (Hieronymus, 1882).

Par ailleurs, au Mexique, les parties aériennes entrent dans le traitement des lithiases rénales (Weniger, 1985), tandis qu'au Mali, la plante est employée pour traiter diverses maladies des voies urinaires (Adjanooun et coll., 1981).

#### \* Traitement de diverses affections hépatiques

Certaines affections hépatiques peuvent être soignées par E. hirta. C'est le cas des ictères, pour lesquels un décocté peut être prescrit : décocté de plante entière (Togo

(Adjanohoun et coll., 1986)) ou décocté de tiges de Ficus thonningii et des parties aériennes d'E. hirta (Niger (Adjanohoun et coll., 1980)).

#### \* Traitement de diverses affections respiratoires

E. hirta est également largement utilisée dans le traitement de diverses affections respiratoires (asthme, bronchite, rhume des foins, pneumopathies...), notamment en Asie orientale (Steinmetz, 1964), en Afrique de l'est et de l'ouest (Sofowora, 1984) et en Australie, où elle est encore appelée "herbe anti-asthmatique de Queensland" (Maiden, 1889 - Caius, 1938 - Webb, 1948 - Quisumbing, 1951 - Le Strange, 1977).

En effet, la plante agirait sur les centres respiratoires et cardiaques (Maiden, 1889 - Holmes, 1923 - Hutchinson et Dalziel, 1936 - Steinmetz, 1964 - (de) Saqui-Sannes, 1971), mais aussi sur la muqueuse de la trachée, dans le cas de l'asthme paroxystique (Caius, 1938 - Steinmetz, 1964).

Le décocté de plante entière est souvent mentionné pour le traitement de l'asthme, de la bronchite, de la toux ; c'est le cas au Sénégal (Dalil, 1984), aux îles Maurice et Rodrigues (Adjanohoun et coll., 1983), aux Seychelles (Poulet, 1972 - Anonyme, 1986) et aux îles Fidji (Parham, 1943).

En Inde, la plante sèche est réputée **expectorante** (Caius, 1938).

Les parties aériennes seules sont également utilisées ; ainsi, dans le bassin caraïbe, elles sont reconnues comme **anti-spasmodiques** (Antilles françaises, Trinidad, République Dominicaine) et pour leurs **propriétés pectorales** (Mexique, Guatemala) (Weniger, 1985).

Ce pouvoir **anti-spasmodique** est connu en Afrique équatoriale et en Inde (Rousselet et Paris, 1971).

Parfois, ce sont les jeunes pousses qui, prises en décoction, traitent la toux et l'asthme (Madagascar (Wong-Ting-Fook, 1980)).

Ces propriétés **anti-tussives** sont parfois mises à profit dans les cas de phtisie (Queensland (Maiden, 1889)).

A Madagascar, la plante entre dans la composition d'un mélange,

dont la décoction est employée comme **anti-asthmatique** (Boiteau, 1986).

Parmi les diverses affections respiratoires traitées par E. hirta, citons encore la **coqueluche** et l'**hémoptysie**, la plante entrant dans la composition de mélanges utilisés sous forme de décoction (Madagascar (Boiteau, 1986)).

En Australie (Queensland), E. hirta est réputée pour ses **effets sédatifs vis-à-vis de l'appareil respiratoire** (Caius, 1938 - Webb, 1948). La plante est d'ailleurs parfois associée à des sédatifs bronchiques tels que Grindelia robusta, dans des préparations pour inhalation (Hutchinson et Dalziel, 1936 - Sofowora, 1984).

#### \* Propriétés sédatives

Une action légèrement sédatif est conférée à E. hirta, en Asie orientale (Steinmetz, 1964). Bien plus encore, la plante entière serait dotée de **propriétés sédatives et soporifiques**, mises à profit notamment aux Philippines (Caius, 1938 - Quisumbing, 1951).

#### \* Propriétés toniques

A Madagascar, E. hirta entre dans la composition d'un mélange, dont la décoction est employée comme **tonique**, en cas de crise cardiaque (Boiteau, 1986). De tels effets stimulants sont également connus en Inde et à la Réunion (Caius, 1938), mais aussi aux Bahamas où les parties aériennes sont utilisées comme tonique (Weniger, 1985).

#### \* Propriétés hypotensives

Dans le bassin caraïbe (Trinidad), les parties aériennes sont employées pour leur effet hypotenseur (Weniger, 1985).

\* **Propriétés hypoglycémiantes**

La plante entière serait dotée de propriétés hypoglycémiantes, mises à profit au Sénégal (Dalil, 1984).

\* **Propriétés fébrifuges**

La plante entière peut être prescrite comme fébrifuge (Sénégal (Dalil, 1984)), parfois sous forme de décocté (îles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983)).

Dans le bassin caraïbe (Antilles françaises, Trinidad, République Dominicaine), ce sont les parties aériennes qui sont utilisées (Weniger, 1985).

Parfois, des effets fébrifuges sont conférés à la fumée obtenue à partir de la plante brûlée (Afrique de l'Est (Kokwaro, 1976)).

De tels effets sont également connus en Guyane (Caius, 1938).

\* **Affections des appareils génitaux féminin et masculin**

La plante entière est souvent employée comme galactagogue (Dalil, 1984); ainsi, les guérisseurs Toucouleur (Sénégal) la prescrivent en décocté (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974). Au Togo, elle est ajoutée à quelques noix de palme et la sauce obtenue est consommée ; parfois, c'est le macérat des tiges feuillées écrasées dans l'eau de maïs qui est employé (Adjanooun et coll., 1986).

Ce pouvoir galactogène est également très estimé en Côte d'Ivoire (Bouquet et Debray, 1974), au Mali (Adjanooun et coll., 1981), au Cameroun où les indigènes préparent une décoction hydro-alcoolique de diverses plantes dont E. hirta (Blanc et coll., 1963).

En Oubangui, les jeunes pousses sont consommées avec du sel indigène, pour faciliter les couches (Vergiat, 1970).

Divers troubles gynécologiques sont traités par E. hirta tels que la **dysménorrhée**, la plante entière entrant dans la composition d'un mélange à base de plantes broyées et additionnées d'eau (Togo (Adjanooun et coll., 1986)).

Aux îles Maurice et Rodrigues, le décocté de plante entière est employé dans les cas d'**oligoménorrhée** (Adjanooun et coll., 1983).

Au Bénin, le macérat de plante entière est prescrit pour soigner les **métrorragies** (Anonyme, 1986).

Au Togo, la **stérilité masculine** est traitée par un macérat de tiges feuillées dans du jus de citron (Adjanooun et coll., 1986).

E. hirta est également très estimée pour ses **propriétés anti-blennorragiques**, notamment en Côte d'Ivoire (Bouquet et Debray, 1974).

Les guérisseurs sénégalais Toucouleur prescrivent un décocté de plante entière (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974), ce qui est également le cas aux îles Comores (Anonyme, 1986), ainsi qu'au Brésil (Quisumbing, 1951).

La plante aurait une **action lénitive**, dans les cas de gonorrhée (Holmes, 1923 - (de) Saqui-Sannes, 1971).

Les ethnies tanzaniennes Swahili et Sukuma utilisent aussi la plante entière pour ces mêmes propriétés (Raymond, 1936 - Bally, 1937, 1938).

Au Mexique et au Guatemala, les parties aériennes seules sont employées pour leurs propriétés anti-vénériennes (Weniger, 1985), tandis qu'en Oubangui, ce sont les tiges feuillées prises en décoction (Vergiat, 1970).

#### \* Propriétés aphrodisiaques

Signalons enfin les propriétés aphrodisiaques rapportées pour les parties aériennes mâchées avec des noix de palme, en République Centrafricaine (Ake Assi et coll., 1981 - Sofowora, 1984).

## I - 2 USAGE EXTERNE

Les propriétés galactagogues d'E. hirta sont largement mises à profit, en usage externe. Ainsi, au Congo, la plante pilée est appliquée sur les seins (Bouquet, 1969 - Zipcy, 1975). Ce même usage est également connu au Togo, pour les tiges feuillées (Adjanooun et coll., 1986).

Au Bénin, dans les cas de **métrorragie**, le macérat de plante entière est utilisé pour la toilette intime (Anonyme, 1986).

E. hirta est très souvent utilisée, en usage externe, comme **antiseptique** et **cicatrisant** ; ainsi, en Haute-Volta, le décocté refroidi est utilisé pour laver les plaies récentes, la plante pulvérisée est ensuite saupoudrée sur la plaie (Poulet, 1972).

Ces propriétés sont connues en Indonésie, pour la plante écrasée (Hartwell, 1969), ainsi qu'au Sénégal, où le décocté de plante entière est recommandé en bain, pour soigner les fissurations anales occasionnées par les diarrhées, ce traitement permettant également la sédation des douleurs (Dalil, 1984).

Au Mexique et au Guatemala, des propriétés vulnéraires sont conférées aux parties aériennes seules (Weniger, 1985).

Des propriétés **hémostatiques** sont également reconnues à la plante entière, aux Philippines (Quisumbing, 1951).

A la Réunion, la plante entre dans le **traitement des ulcères, des oedèmes et des phlegmons** (Caius, 1938).

En cataplasme, elle est appliquée sur les **glandes enflammées, les abcès** (Guyane (Caius, 1938)).

La plante écrasée est parfois mentionnée dans le **traitement de tumeurs** (Indonésie (Hartwell, 1969)).

Les **furuncles** et les **clous** peuvent être soignés, à l'aide de cataplasmes (îles Fidji (Parham, 1943)).

En Inde, les parties aériennes sont utilisées sous forme d'onguent, comme irritant contre la trichophytie (Steinmetz, 1964).

A Hawaï, la plante entière est employée en gargarismes ou cataplasmes, pour le traitement du muguet (Bushnell et coll., 1950 - Lewis, 1977).

L'ethnie congolaise Laadi utilise un mélange à base d'E. hirta, en décoction, pour baigner les enfants fiévreux (Bouquet, 1969).

Au Bénin, les céphalées sont traitées par application des cendres pulvérisées, obtenues à partir de la plante entière calcinée (Anonyme, 1986).

En République Centrafricaine, la plante entière pilée et additionnée d'huile est utilisée en massage, en cas de douleurs articulaires et musculaires (Haxaire, 1979). Les varices douloureuses sont soignées de la même manière, à l'aide d'une préparation à base d'E. hirta (Madagascar (Boiteau, 1986)).

Signalons enfin l'utilisation des tiges feuillées d'E. hirta et de Cymbopogon schrenanthus, en cas de piqûres de scorpions (Togo (Adjanohoun et coll., 1986)).

### I - 3 USAGE MAGIQUE

Au Niger, la plante brûlée rappelle dans la famille une personne aimée éloignée par le mauvais sort (Adjanohoun et coll., 1980).

## II LES FEUILLES (F)

### II - 1 USAGE INTERNE

Parmi les indications traditionnelles mentionnées pour la plante entière et/ou pour les parties aériennes, beaucoup intéressent également les feuilles seules.

Ainsi, les **propriétés anti-dysentériques** des feuilles sont mises à profit au Soudan (Zipcy, 1975), au Nigéria (Ajao et coll., 1984), au Togo (Adjanhoun et coll., 1986), en Haïti (Weniger, 1985).

Les **propriétés anti-diarrhéiques** de l'extrait de feuilles malaxées dans l'eau froide sont connues en République Centrafricaine (Haxaire, 1979).

En Afrique de l'est, elles sont mâchées et le jus obtenu avalé, pour soigner les **brûlures d'estomac** (Kokwaro, 1976).

Des **propriétés diurétiques** leur sont conférées, en Haïti. Par ailleurs, elles entrent dans le **traitement des lithiases rénales** (Weniger, 1985).

Le décocté de feuilles est utilisé, en Afrique de l'est, pour ses **propriétés anti-asthmiques** (Kokwaro, 1976). En Haïti, les feuilles entrent dans le traitement de l'asthme et de diverses pneumopathies (Weniger, 1985). Parfois, ces propriétés sont mises à profit par préparation de cigarettes à base de feuilles d'E. pilulifera et de feuilles et de fleurs de Datura metel (Philippines (Quisumbing, 1951)).

En Afrique de l'est, l'infusion de feuilles est donnée au bétail, pour accroître la lactation, le même usage étant pratiqué par les femmes ghanaéennes (Kokwaro, 1976 - Sofowora, 1984).

Ces **propriétés galactagogues** sont également connues au Gabon,

où les feuilles sont consommées après cuisson à l'étuvée avec des arachides (Zipcy, 1975), ainsi qu'au Togo, où les feuilles pilées et séchées d'E. hirta et de Ficus thonningii sont absorbées avec du lait (Adjanooun et coll., 1986).

En République Centrafricaine, l'extrait de feuilles malaxées dans l'eau froide est employé pour faciliter l'accouchement (Haxaire, 1979).

Au Nigéria, les feuilles entrent dans le traitement des gonorrhées (Ajao et coll., 1984).

Un mélange à base de feuilles d'E. hirta est consommé après fermentation, dans les cas de filarioses (Cameroun (Kwomegne-Moyo, 1986)).

En Côte d'Ivoire, les feuilles d'E. hirta et de Dissotis rotundifolia, triturées puis délayées dans de l'eau, sont utilisées en lavement, pour traiter le retard à la marche de l'enfant (Anonyme, 1986).

## II - 2 USAGE EXTERNE

Les propriétés galactagogues des feuilles sont également mises à profit, par lavage des seins à l'aide d'un décocté de feuilles d'E. hirta et de Ficus thonningii (Togo (Adjanooun et coll., 1986)).

Des cataplasmes sont préparés pour soigner les plaies, à partir des feuilles fraîches (Afrique de l'est (Kokwaro, 1976)), ou des feuilles ramollies au feu (Cameroun (Zipcy, 1975)), ou encore à partir de la poudre de feuilles sèches (Soudan (Zipcy, 1975)).

Ce pouvoir cicatrisant est aussi connu en Afrique de l'ouest (Caius, 1938) et en particulier en Côte d'Ivoire (Irvine, 1930 Hutchinson et Dalziel, 1936), au Nigéria (Ajao et coll., 1984), ainsi qu'au Ghana (Sofowora, 1984).

Les clous, les furoncles peuvent être soignés par le "jus" des feuilles (Afrique de l'est (Kokwaro, 1976 - Sofowora, 1984)).

Ce "jus" est également employé pour traiter certaines formes de tuméfactions de la gorge ou des bras (Afrique de l'est (Kokwaro, 1976)).

Divers troubles oculaires sont traités par instillation dans l'oeil de ce même "jus" (Afrique de l'est (Irvine, 1930 - Kokwaro, 1976), Afrique de l'ouest (Caius, 1938) - Liberia (Harley, 1970)).

En République Centrafricaine, des bains sont pratiqués, en cas de fièvre, avec un extrait de feuilles malaxées dans l'eau (Haxaire, 1979).

Au Cameroun, le mélange à base d'E. hirta, obtenu après fermentation et utilisé par voie orale pour traiter les filarioses, est également utilisé en collyre, pour les mêmes propriétés (Kwomegne-Moyo, 1986).

Signalons, enfin, l'utilisation des feuilles et des racines pilées, contre le paludisme du jeune enfant (à manifestations essentiellement digestives), par massage de l'abdomen (République Centrafricaine (Haxaire, 1979)).

### **III LE LATEX (L)**

#### **III - 1 USAGE INTERNE**

Des **propriétés anti-dysentériques** sont également rapportées pour le latex ; celui-ci est ainsi utilisé en lavement, au Congo (Bouquet, 1969 - Zipcy, 1975).

Au Cameroun, les Ewondo se servent de cette substance délayée dans de l'eau, comme **purgatif** (Zipcy, 1975).

Ses **propriétés galactagogues** sont reconnues au Cameroun et en Côte d'Ivoire (Zipcy, 1975).

#### **III - 2 USAGE EXTERNE**

En Côte d'Ivoire, le latex est employé en massage, pour ses **propriétés galactagogues** (Zipcy, 1975).

En Oubangui, il est appliqué en lotion, sur les seins, en cas d'**engorgement** (Vergiat, 1970).

Les jeunes filles de la République de Malawi (région de Balaka) l'utilisent pour **accroître le développement de leur poitrine** (Sofowora, 1984).

Très souvent, le latex entre dans le traitement de divers **troubles oculaires**. Il peut ainsi être appliqué en compresse sur les yeux (Côte d'Ivoire (Hutchinson et Dalziel, 1936), Nigéria (Ajao et coll., 1984 - Oliver-Bever, 1981), Afrique tropicale et de l'est (Greenway, 1941 - Watt et Breyer-Brandwijk, 1962 - Kokwaro, 1976)).

Les **conjonctivites**, les **ulcères de la cornée** sont traités par instillation de cette substance dans les yeux (Malaisie (Steinmetz, 1964 - Sofowora, 1984), Libéria (Hutchinson et Dalziel, 1936 - Caius, 1938 - Sofowora, 1984), Inde (Quisumbing, 1951)).

Cet usage ne causerait pas de douleur ; néanmoins, il reste discutable, en raison de son caractère irritant (Steinmetz, 1964).

Ce processus d'instillation permettrait d'éliminer les poussières (Oubangui (Vergiat, 1970)), de faire disparaître les taies de la cornée (Petites Antilles ((de) Saqui-Sannes, 1971)), de brûler la cataracte (République Centrafricaine (Haxaire, 1979)).

D'autres propriétés sont très largement mises à profit en médecine traditionnelle, il s'agit des **effets antiseptiques et cicatrisants**, notamment vis-à-vis des plaies occasionnées par la circoncision (îles Sunda d'Indonésie (Steinmetz, 1964)), mais aussi vis-à-vis des plaies contenant des corps étrangers tels que des épines. Ce dernier usage est pratiqué par les Ewondo du Cameroun (Zipcy, 1975), les guérisseurs sénégalais Wolof et Toucouleur (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adams, 1974), en Côte d'Ivoire (Zipcy, 1975), en Libéria (Hutchinson et Dalziel, 1936 - Caius, 1938 - Harley, 1970), au Nigéria (Ajao et coll., 1984), en Haute-Volta (Poulet, 1972) et au Togo (Adjanohoun et coll., 1986).

Au Cameroun, le latex est utilisé pour soigner la gale (Zipcy, 1975).

En Haute-Volta, certains affirment que l'application du latex, sur la plaie occasionnée par le **ver de Guinée** et dès l'apparition de l'extrémité céphalique, provoque la sortie du parasite (Poulet, 1972).

Cette substance peut traiter diverses autres affections cutanées, telles que les **furoncles** (Afrique de l'est (Kokwaro, 1976)), les **cors** (Argentine (Hartwell, 1969)), les **verrues** (Jamaïque, République Centrafricaine, Inde, Argentine (Caius, 1938 - Hartwell, 1969), Yémen (Fleurentin, 1983)).

En Afrique de l'est, le latex est réputé efficace dans le **traitement de certaines formes de tuméfactions**, notamment au niveau de la gorge ou des bras (Kokwaro, 1976).

En Inde et à Ceylan, les **aphtes** peuvent être soignés par application du latex (Hieronymus, 1882 - Maiden, 1889 - Holmes, 1923 - (de) Saqui-Sannes, 1971), ce qui est également le cas à la Réunion (Caius, 1938).

Son pouvoir **antidote** est reconnu, vis-à-vis du poison des flèches, en Libéria (Hutchinson et Dalziel, 1936 - Caius, 1938 - Harley, 1970), ainsi qu'en République de Malawi (Sofowora, 1984).

En Haute-Volta (sud-est de Tenkodogo), le latex est utilisé comme "**talisman**" contre les **scorpions** : le suc blanc est répandu sur les mains, après avoir froissé la plante et permettrait de saisir sans danger un scorpion (Poulet, 1972).

#### IV LES RACINES (R)

Consommées avec du jus de citron, elles sont réputées **purgatives** (Libéria (Harley, 1970)).

En Inde, elles sont utilisées contre les **morsures de serpents** (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962).

En République Centrafricaine, pilées avec les feuilles, elles sont employées pour traiter le **paludisme du jeune enfant**, par massage de l'abdomen (Haxaire, 1979).

L'eau de macération des racines pilées est consommées par les femmes d'Oubangui, pour **faciliter les couches** (Vergiat, 1970).

L'écorce de racines est utilisée, en Oubangui, pour soigner les **verrues** (Vergiat, 1970).

Devant le nombre considérable d'indications traditionnelles conférées à E. hirta et de pays et ethnies utilisant cette plante, devant la grande diversité dans les préparations prescrites, nous avons jugé utile de présenter l'essentiel de ces usages thérapeutiques, en fonction des parties de la plante utilisées, des préparations préconisées et des pays concernés, dans un tableau récapitulatif (tableau 2).

TABLEAU 2 : INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES D'E.HIRTA L.

INDICATIONS THERAPEUTIQUES	PARTIES DE LA PLANTE	PREPARATIONS - USAGES	PAYS	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<b>ANTI-DYSENTERIQUES</b> Propriétés amoebicides connues en médecine traditionnelle afri- caine	PE	décocté seul ou additionné de jus de citron	Congo, Côte d'Ivoire, Haute-Volta, Mali, îles Maurice et Rodrigues, Sénégal	DEBAILLE et PETARD, 1953-MARTIN et coll., 1964- RIDET et CHARTOL, 1964-POULET, 1972-ZIPCY, 1975- (de la) PRADILLA-ADJANOHOON et coll., 1981, 1983-DALIL, 1984-ANONYME, 1986
	PE	bouillie dans de l'eau salée	îles Fidji	PARHAM, 1943
	PA	décocté de jeunes pousses	Madagascar, île Maurice	WONG-TING-FOOK, 1980
	PA	décocté d' <u>E.hirta</u> et de <u>Phyllanthus amarus</u>	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986
	PA	macérat		
	ND	infusion	Nouvelle Calédonie, Afrique portugaise	GUILLAUMIN, 1951-WATT et BREYER-BRANDWIJK, 1962
	ND	usage interne	Angola, Inde, Nigéria	CAIUS, 1938-OLIVIER-BEVER, 1981-SOFOWORA, 1984
	F	usage interne	Haïti, Nigeria, Soudan, Togo	ZYPCY, 1975-AJAO et coll, 1984-WENIGER, 1985- ADJANOHOON, 1986
L	lavement	Congo	BOUQUET, 1969-ZIPCY, 1975	
<b>ANTI-DIARRHEIQUE</b>	PE	macéré	Sénégal	KERHARO, 1971-KERHARO et ADAM, 1974-NDIR et POUSSET, 1982-SOFOWORA, 1984
	PE	décocté	Congo, Haute-Volta, Mali, îles Maurice et Rodri- gues, Sénégal, Seychelles Togo	BOUQUET, 1969-KERHARO, 1971-POULET, 1972-KERHARO et ADAM, 1974-WONG TING FOOK, 1980-ADJANOHOON et coll., 1981-NDIR et POUSSET, 1982-ADJANOHOON et coll., 1983-DALIL, 1984-ADJANOHOON et coll., 1986- ANONYME, 1986-
	PE	Poudre à base d' <u>E.hirta</u> de <u>Paullinia pinnata</u> et de <u>Zea mays</u>	Bénin	ANONYME, 1986

	PA	usage interne décocté de jeunes pousses	Afrique équatoriale, Inde, Madagascar, île Maurice	ROUSSELET et PARIS, 1971- WONG TING FOOR, 1980
	ND	usage interne	Angola	SOFOWORA, 1984
	F	malaxées dans l'eau froide (usage interne)	République Centrafricaine	HAXAIRE, 1979
TRAITEMENT DES ULCERES, DE LA PROCTITE, DE L'ENTERITE CHRONIQUE	PA	usage interne	Asie orientale	STEINMETZ, 1964
TRAITEMENT DES SPASMES DU PYLORE	ND	décocté d'un mélange de diverses plantes, dont <u>E.hirta</u>	Madagascar	BOITEAU, 1986
TRAITEMENT DES ULCERES GASTRIQUES, DES BRU- LURES D'ESTOMAC	PE F	décocté mâchées	Bénin Afrique de l'est	ANONYME, 1986 KOKWARO, 1976
ANTI-PALUDEEN (contre le paludisme du jeune enfant, à ma- nifestation essentiel- lement digestive)	F R	massage de l'abdomen avec un mélange de feuilles et de racines pilées	République Centrafricaine	HAXAIRE, 1979
ANTHELMINTHIQUE (vermifuge)	PE PA PA	usage interne usage interne mâchées avec des noix de palme	Tanzanie Bahamas République Centrafricaine	RAYMOND, 1936-BALLY, 1937 WENIGER, 1983 AKE ASSI et coll., 1981

LAXATIF-PURGATIF	PE	associée à du jus de citron	Libéria	HUTCHINSON et DALZIEL, 1936-CAIUS, 1938	
	PE	pulvérisée et mélangée à de l'eau	Côte d'Ivoire	HUTCHINSON et DALZIEL, 1936	
	PE	usage interne (non précisé)	Ghana, Hawaï, Madagascar, Nigeria, Tanzanie	BALLY, 1938-BUSCHNELLEt coll., 1950-OLIVER-BEVER, 1981-SOFOWORA, 1984-BOITEAU, 1986	
	L	délayé dans l'eau (usage interne)	Cameroun	ZIPCY, 1975	
	R	consommées avec du jus de citron	Libéria	HARLEY, 1970	
AFFECTIIONS RENALES <u>diurétique</u>	PE	décocté	Sénégal	KERHARO, 1971-KERHARO et ADAM, 1974-NDIR et POUSSET, 1982-DALILÏ, 1984	
	PE	usage interne (non précisé)	Tanzanie	BALLY, 1937, 1938	
	PA	usage interne	Asie orientale, Antilles françaises, Mexique	STEINMETZ, 1964-WENIGER, 1985	
	ND	usage interne	Argentine, Inde, Mali	HIERONYMUS, 1882-CAIUS, 1938-ADJANOHOON et coll., 1981	
	F	usage interne	Haïti	WENIGER, 1985	
	<u>lithiases rénales</u>	PA	usage interne	Mexique	WENIGER, 1985
	<u>atteintes rénales diverses</u>	ND	usage interne	Mali	ADJANOHOON et coll., 1981
	F	usage interne	Haïti	WENIGER, 1985	
AFFECTIIONS HEPATIQUES (ictères)	PE	décocté	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986	
	PA	décocté d' <u>E.hirta</u> et de tiges de <u>Ficus thonningii</u>	Niger	ADJANOHOON et coll., 1980	

<b>AFFECTIONS RESPIRATOIRES</b>  (traitement de l'asthme, de la bronchite, de l'emphysème pulmonaire, du rhume des foins, de la toux, de la phtisie, de la coqueluche, de l'hémoptysie)	PE	décocté	Iles Fidji, îles Maurice et Rodrigues, Sénégal, Seychelles	PARHAM, 1943-POULET, 1972-ADJANOHOOUN et coll., 1983-DALIL, 1984-ANONYME, 1986
	PA	usage interne	Antilles françaises, Guatemala, Mexique, République Dominicaine, Trinidad	WENIGER, 1985
	PA	décocté de jeunes pousses	Madagascar	WONG TING FOOK, 1980
	ND	décoction d'un mélange de plantes dont <u>E.hirta</u>	Madagascar	BOITEAU, 1986
	ND	usage interne	Afrique équatoriale, Asie orientale, Australie, Inde	MAIDEN, 1889-CAIUS, 1938-WEBB, 1948-QUISUMBING, 1951-STEINMETZ, 1964-ROUSSELET et PARIS, 1971-LE STRANGE, 1977-SOFOWORA, 1984
	F	décocté	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976
	F	usage interne	Haïti	WENIGER, 1985
	F	préparation de cigarettes à base d' <u>E.hirta</u> et de feuilles et fleurs de <u>Datura metel</u>	Philippines	QUISUMBING, 1951
	L	usage interne	Afrique tropicale et de l'est	WATT et BREYER-BRANDWIJK, 1962
<b>SEDATIF SOPORIFIQUE</b>	PE	usage interne	Philippines	CAIUS, 1938-QUISUMBING, 1951
	ND	usage interne (parfois en association avec des sédatifs bronchiques, dans des préparations pour inhalation)	Asie orientale, Australie	CAIUS, 1938-HUTCHINSON et DALZIEL, 1936- WEBB, 1948-STEINMETZ, 1964-SOFOWORA, 1984
<b>TONIQUE</b>  <u>-en cas de crise cardiaque</u>	PA	usage interne	Bahamas	WENIGER, 1985
	ND	décoction d'un mélange de plantes, dont <u>E.hirta</u>	Madagascar	BOITEAU, 1986

-remède "coup de fouet" excitant du coeur, reconstituant des forces vitales abaissées par le poison, tonique pour les enfants sous-alimentés....	ND ND	usage interne	ND Inde, Réunion	MAIDEN, 1889-HOLMES, 1923-HARLEY, 1970-(de) SAQUI-SANNES, 1971 CAIUS, 1936
HYPOTENSEUR	PA	usage interne	Trinidad	WENIGER, 1985
HYPOGLYCEMIANT	PE	usage interne	Sénégal	DALIL, 1984
ASTRINGENT	ND	usage interne	Philippines, Réunion	CAIUS, 1938-QUISUMBING, 1951
FEBRIFUGE	PE	décocté	îles Maurice et Rodrigues, Sénégal	ADJANOHOUN et coll., 1983- DALIL, 1984
	PA	usage interne	Antilles françaises, République Dominicaine, Trinidad	WENIGER, 1985
	ND	inhalation de la fumée par brûlage de la plante	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976
	ND	usage interne	Guyane	CAIUS, 1938
	F	extrait de feuilles malaxées dans de l'eau, utilisé en bain	République Centrafricaine	HAXAIRE, 1979
TRAITEMENT DE DIVERSES DOULEURS -céphalées	PE	application des cendres pulvérisées	Bénin	ANONYME, 1986

<u>-apaisement des douleurs intestinales liées à la dysenté- rie</u>	ND	décoction d'un mélange à base de plantes, dont <u>E.hirta</u>	Madagascar	BOITEAU, 1986
<u>-douleurs articulai- res et musculaires</u>	PE	en massage à l'aide de la plante pilée, additionnée d'huile	République Centrafri- caine	HAXAIRE, 1979
<u>-varices douloureu- ses</u>	ND	en massage à l'aide d'une préparation à base d' <u>E.hirta</u>	Madagascar	BOITEAU, 1986
<b>GALACTAGOGUE</b>	PE	décocté	Sénégal	KERHARO, 1971-KERHARO ET ADAM, 1974-DALIL, 1984
	PA	consommation d'un macérat de tiges feuillées dans l'eau de maïs ou applica- tion sur les seins	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986
	ND	consommation de la sauce obtenue après mélange de la plante avec des noix de palme	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986
	ND	consommation d'une décoction hydro-alcoolique de plusieurs plantes dont <u>E.hirta</u>	Cameroun	BLANC et coll., 1963
	ND	usage interne	Côte d'Ivoire, Mali	BOUQUET et DEBRAY, 1974-ADJANOHOON et coll., 1981
	ND	plante pilée appliquée sur les seins	Congo	BOUQUET, 1969-ZIPCY, 1975
	F	infusion	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976-SOFOWORA, 1984
	F	consommation des feuilles cuites à l'étuvée, avec des arachides	Gabon	ZIPCY, 1975
	F	consommation des feuilles séchées, pilées d' <u>E.hirta</u> et de <u>Ficus thonningii</u> avec du lait ou lavage des seins avec un décocté de ces deux plantes	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986

<u>-en cas d'engorgement</u>	L	usage interne	Cameroun, Côte d'Ivoire	ZIPCY, 1975
	L	en massage	Côte d'Ivoire, Oubangui	VERGIAT, 1970-ZIPCY, 1975
	L	application sur les seins	Oubangui	VERGIAT, 1970
<b>AFFECTIONS DES APPAREILS GENITAUX FEMININ ET MASCULIN</b>				
<u>-accouchement (facilitation)</u>	PA	consommation des jeunes pousses avec du sel indigène	Oubangui	VERGIAT, 1970
	F	consommation des feuilles malaxées dans l'eau froide	République Centrafricaine	HAXAIRE, 1979
	R	consommation de l'eau de macération des racines pilées	Oubangui	VERGIAT, 1970
<u>-Oligoménorrhée</u>	PE	décocté	Iles Maurice et Rodrigues	ADJANOHOOUN et coll., 1983
<u>-dysménorrhée</u>	PE	consommation d'un mélange de plantes broyées additionné d'eau	Togo	ADJANOHOOUN et coll., 1986
<u>-métrorragie</u>	PE	macérat consommé ou utilisé pour la toilette intime	Bénin	ANONYME, 1986
<u>-stérilité masculine</u>	PA	consommation d'un macérat de tiges feuillées dans du jus de citron	Togo	ADJANOHOOUN et coll., 1986
<u>-gonorrhées (action lénitive)</u>	PE	décocté	Iles Comores, Brésil, Sénégal	HOLMES, 1923-QUISUMBING, 1951-KERHARO, 1971-(de) SAQUI ŞANNES, 1971-KERHARO et ADAM, 1974-ANONYME, 1986
	PE	usage interne	Tanzanie	RAYMOND, 1936-BALLY, 1937, 1938

	PA	usage interne	Guatemala, Mexique	WENIGER, 1985
	PA	décocté des tiges feuillées	Oubangui	VERGIAT, 1970
	F	usage interne	Nigeria	AJAO et coll., 1984
TROUBLES OCULAIRES (conjonctivites- ulcères de la cornée)	F	instillation du jus des feuilles	Afrique de l'est et de l'ouest, Libéria	IRVINE, 1930-CAIUS, 1938-HARLEY, 1970-KOKWARO, 1976
	L	en compresses, par instil- lation	Afrique tropicale et de l'est, Petites Antilles Côte d'Ivoire, Inde, Libé- ria, Malaisie, Nigéria, Oubangui, République Centrafricaine	HUTCHINSON et DALZIEL, 1936-CAIUS, 1938-GREENWAY, 1941-QUISUMBING, 1951-WATT et BREYER-BRANDWIJK, 1962-STEINMETZ, 1964-VERGIAT, 1970-(de) SAQUI- SANNES, 1971-KOKWARO, 1976-HAXAIRE, 1979-OLIVER- BEVER, 1981-AJAO et coll., 1984-SOFOWORA, 1984
AFFECTIONS DE LA PEAU ET DES MUQUEU- SES  <u>-antiseptique</u> <u>cicatrisant</u>	PE	lavage de la plaie avec une décoction puis saupou- drage avec la plante sèche pulvérisée	Haute-Volta	POULET, 1972
	PE	décocté utilisé en bain	Sénégal	DALIL, 1984
	PE	usage externe (propriétés hémostatiques)	Philippines	QUISUMBING, 1951
	PA	usage externe	Guatemala, Mexique	WENIGER, 1985
	ND	usage externe (plante écrasée)	Indonésie	HARTWELL, 1969
	F	cataplasmes de feuilles fraîches ou ramollies au feu ou de feuilles sèches pulvérisées	Afrique de l'est et de l'ouest, Côte d'Ivoire Ghana, Nigéria, Soudan	IRVINE, 1930-HUTCHINSON et DALZIEL, 1936-ZIPCY, 1975-KOKWARO, 1976-AJAO et coll., 1984-SOFOWORA, 1984

	L	usage externe	Cameroun, Côte d'Ivoire Haute-Volta, Libéria, Nigéria, Sénégal, îles Sunda, Togo	HUTCHINSON et DALZIEL, 1936-CAIUS, 1938- STEINMETZ, 1964-HARLEY, 1970-KERHARO, 1971- POULET, 1972-KERHARO et ADAM, 1974-ZIPCY, 1975-AJAO et coll., 1984-ADJANOHOON et coll., 1986
<u>Affections cutanées</u>				
. <u>furuncles-cors</u>	ND	en cataplasmes	Iles Fidji	PARHAM, 1943
	F	jus de feuilles utilisé en application externe	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976-SOFOWORA, 1984
	L	application externe	Afrique de l'est, Argentine	HARTWELL, 1969-KOKWARO, 1976
. <u>filarioses</u> (traitement du ver de Guinée)	F	mélange fermenté à base de feuilles d' <u>E.hirta</u> consom- mé ou utilisé en collyre	Cameroun	KWOMEGNE-MOYO, 1986
. <u>gale</u>	L	en application externe	Haute-Volta	POULET, 1972
	L	en application externe	Cameroun	ZIPCY, 1975
. <u>trichophytie</u> (comme irritant)	PA	application d'un onguent	Inde	STEINMETZ, 1964
<u>Affection des muqueu- ses</u>				
. <u>aphtes</u>	L	application externe	Ceylan, Inde, Réunion	HIERONYMUS, 1882-MAIDEN, 1889-HOLMES, 1923- CAIUS, 1938-(de) SAQUI SANNES, 1971
. <u>candidoses</u> (traitement du muguet)	PE	en cataplasmes ou en gar- garisme	Hawaï	BUSCHNELL et coll., 1950-LEWIS, 1977
	PE	décocté consommé	Bénin	ANONYME, 1986
. <u>stomatites</u>	ND	usage interne	Afrique portugaise	WATT et BREYER-BRANDWIJK, 1962
. <u>ankylostomiasés</u>	PA	macérat de tiges feuillées	Togo	ADJANOHOON et coll., 1986

<u>Autres affections de type inflammatoires-tumeurs</u>	<u>.oedèmes-phlegmons</u>	ND	usage externe	Réunion	CAIUS, 1938
	<u>.verrues</u>	L	usage externe	Argentine, Inde, Jamaïque République centrafricaine, Yémen	CAIUS, 1938-HARTWELL, 1969
		R	écorce de racine en application externe	Oubangui	VERGIAT, 1970
	<u>.glandes enflammées abcès</u>	ND	en cataplasmes	Guyane	CAIUS, 1938
	<u>.tuméfactions de la gorge ou des bras</u>	F	jus des feuilles en application externe	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976
		L	usage externe	Afrique de l'est	KOKWARO, 1976
<u>.tumeurs</u>	ND	application externe de la plante écrasée	Indonésie	HARTWELL, 1969	
<b>ANTIDOTE</b> (vis-à-vis du poison des flèches, des morsures de serpents et de scorpions)	PA	application des tiges feuillées d' <u>E.hirta</u> et de <u>Cymbopogon schrenanthus</u>	Togo	ADJANOHOUN et coll., 1986	
	L	usage externe	Libéria, Haute-Volta, République de Malawi	HUTCHINSON et DALZIEL, 1936-CAIUS, 1938-HARLEY, 1970-POULET, 1972-SOFOWORA, 1984	
	R	usage externe	Inde	WATT et BREYER-BRANDWIJK, 1962	
<b>APHRODISIAQUE</b>	PA	mâchées avec des noix de palmes	République Centrafricaine	AKE ASSI et coll., 1951-SOFOWORA, 1984	

<b>USAGE MAGIQUE</b> (pour rappeler une personne aimée, éloi- gnée par le mauvais sort)	ND	plante brûlée	Niger	ADJANOHOUN et coll., 1980
<b>RETARD A LA MARCHE</b>	F	lavement à l'aide d'un mélange de feuilles d' <u>E.hirta</u> et de <u>Dissotis</u> <u>rotundifolia</u> délayées dans de l'eau	Côte d'Ivoire	ANONYME, 1986

*SECTION B*

*USAGES THERAPEUTIQUES*

## I USAGES THERAPEUTIQUES ACTUELS

Utilisée non seulement en médecine traditionnelle, E. hirta fut également commercialisée en Europe et aux Etats-Unis. Ainsi, en France, les laboratoires Soca de Monaco spécialisèrent la plante comme anti-dysentérique, sous le nom de "Socamibe" ; toutefois, E. hirta ne figure plus dans le Dictionnaire des Spécialités. Aux Etats-Unis, une préparation associant E. pilulifera et l'acide para aminobenzoïque fut commercialisée pour ses propriétés anti-spasmodiques (United States Patent Office, 1964). L'extrait fluide fut également spécialisé sous le nom de "Hare's Anti-Asthmatic Elixir", préparation officialisée dans le "National Formulary" (7ème édition, 1942) (Hazleton et Hellerman, 1948).

Diverses préparations galéniques ont été élaborées et utilisées en thérapeutique, notamment pour le traitement d'affections intestinales telles que la dysentérie, la diarrhée, ainsi que pour le traitement d'affections respiratoires (asthme, bronchite, rhume des foins, coryza...).

### I - 1 AFFECTIONS INTESTINALES

\* Adjanohoun et ses collaborateurs (1981) mentionnent l'élaboration de deux préparations galéniques à base d'E. hirta (plante entière fraîche), par l'Institut National de Recherche sur la pharmacopée et la médecine traditionnelle du Mali :

- Dysentéral N°1, à base d'E. hirta
- Dysentéral N°2, à base de Vernonia pumila, Cassia sieberiana et E. hirta.

Dans le cas du Dysentéral N°1, on recommande de faire bouillir, dans un récipient couvert, un sachet unidose (environ 10 g) dans un demi litre d'eau et de boire le décocté trois fois par jour, jusqu'à disparition des signes cliniques.

La seconde préparation consiste en un décocté aqueux de plante fraîche associée, à partie égale, avec des feuilles de Cassia sieberiana DC et de Vernonia pumila Kotschy et Peyr.. Le décocté est consommé trois fois par jour.

## I - 2 AFFECTIONS RESPIRATOIRES

\* Dès 1889, Maiden mentionne l'utilisation de la plante sous deux formes différentes, dans le traitement des maladies respiratoires telles que l'asthme, la bronchite :

- Une **décoction**, obtenue par frémissement d'une once (soit 31,1035 g) de plante sèche dans deux quarts d'eau et par réduction du liquide de moitié.

Posologie : un verre à vin, trois fois par jour.

- Utilisation de la plante, en place du tabac, dans une pipe; ou inhalation par brûlage de la plante sur une table.

\* Ces préparations sont également citées par Holmes (1923), l'auteur y ajoutant deux nouvelles formes :

- Un **extrait aqueux**

posologie : 0,065 à 0,0975 g.

- Une **teinture**, à raison d'une partie de plante pour cinq parties d'alcool à 60 %

posologie : 10 à 30 gouttes.

\* Dans son ouvrage "Notes de phytothérapie allopathique et homéopathique comparées", le Docteur Cabre (1939) considère E..hirta L. comme le remède spécifique de l'asthme et propose les posologies suivantes :

10 à 30 gouttes d'**extrait fluide**

un demi verre d'une **décoction**, obtenue par ébullition de 30 g de plante dans deux litres d'eau, jusqu'à réduction de moitié, et ceci trois fois par jour.

\* En 1944, Decaux (mentionné par Steinmetz, 1964) indique quatre types de préparations utilisées dans le traitement des affections respiratoires :

- Une **infusion**, à raison de 6 g de plante entière dans 500 g d'eau

posologie : prendre l'infusion par cuillerées, pendant la journée.

- Un **extrait hydro-alcoolique (sec)**

posologie : 0,05 à 0,10 g, pris en prises fractionnées de 50 à 200 mg, pendant la journée.

- Un **extrait fluide**

posologie : 0,5 à 1,5 g, en prises fractionnées de 2 à 5 gouttes, dans la journée.

- Une **teinture à 20 %**

posologie : 1 à 3 g, en prises fractionnées de 10 à 30 gouttes, dans la journée.

Dans le traitement du coryza, Decaux recommande la potion suivante :

extrait fluide des sommités d'E. pilulifera (0,5 g)

teinture de Pulsatilla vulgaris (30 gouttes)

teinture d'Euphrasia officinalis (40 gouttes)

sirop des feuilles de Mentha piperita (50 g)

eau, pour amener le volume final à 150 ml

posologie : une cuillerée, toutes les deux heures.

\* En 1962, Benigni et ses collaborateurs indiquent trois formes galéniques utilisables dans le traitement des affections respiratoires :

- Un **extrait fluide**, dont 1 g correspond à 37 gouttes

posologie : 0,5 g ou plus par dose.

- Une **teinture**, composée de 20 g d'extrait fluide et de 80 g d'alcool à 60°

posologie : 2,5 g ou plus par dose.

- Un **elixir**, composé du mélange "extrait fluide d'E. pilulifera (60 g) - teinture de Lobelia (35 g) - iodure de sodium (4 g) - bromure de sodium (4 g) - solution de nitroglycérine (0,2 g) - elixir aromatique (1200 g)".

Les iodure et bromure de sodium doivent être mélangés en premier, les autres composés étant ajoutés à la suite ; le mélange est laissé à reposer, puis il est filtré, si cela est nécessaire.

Posologie : une cuillerée.

\* En 1964, Steinmetz indique l'utilisation occasionnelle d'E. pilulifera, en thérapeutique moderne, sous forme d'extrait fluide ou de teinture, dans un mélange composé généralement de Lobelia (herbe), de Scilla alba (bulbe) et de Polygala senega (racines). Cette préparation provoquerait la relaxation des bronchioles, mais également une certaine dépression sur le coeur et une action sédatrice sur le système cardio-vasculaire.

\* Aux Etats-Unis, le "United States Patent Office", proposa, en 1964, différentes médications associant E. pilulifera (poudre, extrait fluide ou teinture) et l'acide para aminobenzoïque, avec divers composés sédatifs (sulfate de codéine, phénobarbital, Passiflora incarnata...), analgésiques (aspirine, salicylamide...) et/ou anti-histaminiques (hydrochlorure de méthapyrilène...).

L'acide para aminobenzoïque permettrait de potentialiser les effets anti-spasmodiques d'E. pilulifera, ainsi que les actions des autres substances, et donc de réduire la posologie (réduction au 1/10 de la dose normale pour E. pilulifera sans perte d'efficacité) et d'éviter les effets indésirables fréquemment observés (possibilité d'irritations stomacales par E. pilulifera).

Cet organisme proposait en particulier la combinaison suivante, pour traiter les insomnies :

poudre de Passiflora incarnata (3/4 grains, soit 0,049 g)

salicylamide (3 grains, soit 0,195 g)

poudre d'E. pilulifera (3/4 grains, soit 0,049 g)

acide para aminobenzoïque (1 grain, soit 0,065 g).

### I - 3 UTILISATIONS HOMEOPATHIQUES

E. pilulifera fut également employée en homéopathie, où ses principales indications étaient l'asthme à forme catarrhale, la bronchite, la dyspnée d'origine cardiaque, les rhumes des foies, les hémorragies consécutives à une isolation ou à un traumatisme, la leucorrhée acide aggravée par le mouvement et l'urétrite (Cabre, 1939 - Clarke, 1962).

## **II USAGES THERAPEUTIQUES TRADITIONNELS**

### **II - 1 AFFECTIONS GASTRO-INTESTINALES**

#### **1.1 Diarrhées**

**\* Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : décocté, à raison d'une poignée de plante dans un litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un à deux verres (200 à 400 ml) par jour.

Dans les cas graves et persistants, calciner la plante, réduire en poudre et ajouter à un repas sans huile.

**Source** : Togo (Adjanohoun et coll., 1986).

**\* Drogue** : la plante entière.

**Préparation** (pour toutes les formes de diarrhées, même sanglantes) : décocté de la plante entière (une poignée pour l'enfant, deux poignées pour l'adulte, dans un ou deux litres d'eau).

**Mode d'emploi - posologie** : boire la décoction dans la journée.

La durée du traitement varie selon les symptômes, mais ne dépasse guère trois jours.

**Source** : Sénégal (Dalil, 1984).

**\* Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : couper la plante en menus morceaux ; préparer un décocté, à raison de 100 g de plante fraîche mis à bouillir dans un litre d'eau pendant 20 minutes, dans le cas d'un adulte, ou à raison de 50 g de plante fraîche mis à bouillir dans un litre d'eau pendant une heure, dans le cas d'un enfant, de personnes cardiaques ou hypotendues.

**Mode d'emploi - posologie** : dans le cas d'un adulte, boire en moyenne deux à trois litres de décocté par jour, pendant deux jours. Dans le cas d'enfants, de sujets cardiaques ou hypotendus, boire un demi litre de décocté le premier jour,

puis un quart de litre le deuxième jour, puis un quart de litre le troisième jour. En cas d'échec, le traitement doit être repris pendant trois jours.

**Source** : Haute-Volta (Poulet, 1972).

\* **Drogue** : la plante sèche.

**Préparation** : décoction de 30 g de plante sèche par litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire deux à trois litres de décocté par jour.

**Source** : Sénégal (Pousset, 1984).

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : mélanger une poignée de "liane sans fin" (Cassytha filiformis L.) avec une poignée de plante entière d'E. hirta ; porter à ébullition dans un litre d'eau ; filtrer ; sucrer avec du miel.

**Mode d'emploi - posologie** (pour un enfant) : boire une tasse à thé (30 ml), deux à trois fois par jour.

**Source** : Seychelles (Anonyme, 1986).

### Diarrhée cholériforme

\* **Drogue** : la plante entière sèche.

**Préparation** : réduire en poudre 60 g environ de liane sèche de Paullinia pinnata L., 60 g de plante entière sèche d'E. hirta L. et une poignée de grains de Zea mays L.

**Mode d'emploi - posologie** (pour un adulte) : ajouter une cuillerée à soupe de poudre à la bouillie, toutes les trois heures et pendant une journée.

**Source** : Bénin (Anonyme, 1986).

### Diarrhée du nourrisson

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : triturer une poignée de plante dans un demi litre de lait ; laisser macérer jusqu'à ce que le lait prenne

une teinte verte (environ trois heures).

**Mode d'emploi - posologie** : donner au nourrisson une cuillère à café, trois fois par jour.

**Source** : Sénégal (Kerharo, 1971 - Kerharo et Adam, 1974 - Anonyme, 1986).

## 1.2 Dysentérie

\* **Drogue** : les tiges feuillées.

**Préparation** : faire macérer pendant quatre heures, 50 g de poudre de tiges feuillées, dans un litre d'eau ; filtrer.

**Mode d'emploi - posologie** : dans le cas d'un adulte, prendre trois cuillerées à soupe (50 ml) matin et soir, aux repas, pendant trois jours. Pour les enfants d'au moins deux ans, prendre le quart de la dose prescrite à l'adulte.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

\* **Drogue** : les feuilles.

**Préparation** : faire calciner le crâne d'un chien (Canis domesticus) et la tête d'un serpent (espèce indéterminée), avec les feuilles de Spilanthes uliginosa, Trichilia prieuriana, Dicoma tomentosa et E. hirta ; réduire en poudre.

**Mode d'emploi - posologie** : absorber en une seule fois, une cuillerée à soupe en suspension dans de l'eau.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : faire bouillir deux ou trois plantes dans deux litres d'eau, pendant 15 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire plusieurs tasses dans la journée.

**Source** : Iles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983).

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : couper la plante en menus morceaux ; préparer un décocté, à raison de 100 g de plante fraîche mis à bouillir pendant 20 minutes dans un litre d'eau, pour un adulte, ou à raison de 50 g de plante fraîche mis à bouillir pendant une heure dans un litre d'eau, pour les enfants, les sujets cardiaques ou hypotendus.

**Mode d'emploi - posologie** : l'adulte doit boire, en moyenne, deux à trois litres de décocté par jour, pendant deux jours. L'enfant, le malade cardiaque ou hypotendu doivent consommer un demi litre de décocté le premier jour, un quart de litre le deuxième jour et un quart de litre le troisième jour. En cas d'échec, le traitement doit être recommencé pendant trois jours.

**Source** : Haute-Volta (Poulet, 1972).

\* **Drogue** : la plante fraîche.

**Préparation** : décoction de 10 g environ de plante entière fraîche dans un demi litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire le décocté au 1/5, trois fois par jour, jusqu'à disparition des signes cliniques.

**Source** : Côte d'Ivoire, Sénégal (Anonyme, 1986).

### 1.3 Amibiase

\* **Drogue** : les tiges feuillées.

**Préparation** : décocté aqueux de tiges feuillées de Phyllanthus amarus et d'E. hirta.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un verre (200 ml), trois fois par jour, pendant trois jours.

Faire deux nouvelles cures, après une semaine et un mois.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

\* **Drogue** : la plante sèche.

**Préparation** : décoction de 30 g de plante sèche par litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire trois à quatre litres de décocté par jour.

**Source** : Sénégal (Pousset, 1984).

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : faire bouillir pendant 20 minutes, 10 à 20 g de plante sèche (ou 50 à 75 g de plante fraîche), dans un litre et demi d'eau ; laisser infuser.

**Mode d'emploi - posologie** : le premier jour, boire un demi litre de la préparation ; les deuxième et troisième jours, boire un quart de litre, à plusieurs reprises dans la journée. Renouveler le traitement, au bout de 15 jours.

**Source** : Haute-Volta ((de la) Pradilla).

#### 1.4 Spasmes du pylore

\* **Drogue** : la plante.

**Préparation** : décoction du mélange "Mollugo nudicaulis (plante) 20 g - Evodia fatraina (feuilles) 20 g - E. hirta (plante) 20 g", à raison d'une cuillerée à soupe du mélange par tasse ; faire bouillir 10 minutes et infuser 5 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire par cuillerées, tous les quarts d'heure, jusqu'à cessation du spasme.

**Source** : Madagascar (Boiteau, 1986).

#### 1.5 Constipation

\* **Drogue** : la plante.

**Préparation** : décoction du mélange "E. hirta (plante) 10 g - Zingiber zerumbet (rhizome) 20 g - Althea officinalis (racines) 20 g - Abrus precatorius (racines) 20 g - algues rouges de Tuléar 40 g" dans un litre d'eau ; faire bouillir 15 minutes ; filtrer avec expression ; laisser refroidir à 35°C.

**Mode d'emploi** : utiliser la préparation en lavement émollient

**Source** : Madagascar (Boiteau, 1986).

### 1.6 Ulcères gastriques

\* **Drogue** : la plante entière fraîche ou sèche.

**Préparation** : faire bouillir trois ou quatre bottes de plante fraîche ou sèche, dans deux litres d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire environ 150 ml de décocté, matin, midi et soir, pendant trois semaines.

**Source** : Bénin (Anonyme, 1986).

### 1.7 Ankylostomiase

\* **Drogue** : la tige feuillée.

**Préparation** : faire macérer pendant quatre heures, 50 g de tiges feuillées, dans un litre d'eau ; filtrer.

**Mode d'emploi - posologie** : dans le cas d'un adulte, boire trois cuillerées à soupe (50 ml), matin et soir, aux repas, pendant trois jours. Pour les enfants d'au moins deux ans, prendre le quart de la dose prescrite à l'adulte.

**Contre-indication** : enfants de moins de deux ans.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

### 1.8 Candidose

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : décoction de 100 g environ de plante entière fraîche dans un litre et demi d'eau; filtrer à travers un linge.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un verre à bière (150 ml) de décocté, trois fois par jour, jusqu'à guérison.

**Source** : Bénin (Anonyme, 1986).

### 1.9 Filariose

\* **Drogue** : les feuilles.

**Préparation** : fermentation pendant 12 heures des feuilles d'E. hirta, de graines d'Aframomum longiligulatum et de

feuilles de "machequem".

**Mode d'emploi** : utilisation de la solution obtenue per os et/ou en collyre.

**Source** : Cameroun (Kwomegne-Moyo, 1986).

## II - 2 AFFECTIONS HEPATIQUES (ictères)

\* **Droque** : les parties aériennes.

**Préparation** : décoction de tiges de Ficus thonningii et des parties aériennes d'E. hirta.

**Mode d'emploi - posologie** : boire la décoction, le matin, à jeun, pendant trois jours. Cette utilisation provoque des vomissements.

En cas de non guérison, reprendre le traitement.

Cet emploi est particulièrement indiqué, lorsque l'ictère succède à une émotion.

**Source** : Niger (Adjanhoun et coll., 1980).

\* **Droque** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : décocté aqueux réalisé avec 6 poignées de plante.

**Mode d'emploi - posologie** : boire le décocté à volonté, plusieurs fois par jour, pendant six jours.

**Source** : Togo (Adjanhoun et coll., 1986).

## II - 3 AFFECTIONS CARDIAQUES (crise cardiaque)

\* **Droque** : la plante.

**Préparation** : décoction du mélange "E. hirta (plante) 10 g - Gomphocarpus fruticosus (sommités fleuries) 20 g - stigmate de maïs 20 g - Mollugo nudicaulis (plante) 10 g - Asparagus vaginellatus (rhizome) 10 g - Malleastrum gracile (feuilles) 10

g", à raison d'une cuillerée à soupe du mélange par tasse d'eau faire bouillir 10 minutes et infuser 5 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire une cuillerée de décoction tous les quarts d'heure, puis trois à quatre demi-tasses par jour.

**Source** : Madagascar (Boiteau, 1986).

## II - 4 AFFECTIONS RESPIRATOIRES

### 4.1 Asthme

\* **Drogue** : la plante.

**Préparation** : décoction du mélange "E. hirta (plante) 20 g - Lobelia hartlaubii (plante) 20 g - Drosera ramentacea (plante) 20 g - Sida rhombifolia (racine) 20 g - Nicandra physaloïdes (feuilles) 20 g", à raison d'une cuillerée à soupe du mélange par tasse ; faire bouillir 10 minutes et infuser 5 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire une demi-tasse toutes les demi-heures, avec un maximum de trois tasses par jour.

**Source** : Madagascar (Boiteau, 1986).

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : faire bouillir deux ou trois plantes entières dans deux litres d'eau, pendant 15 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire plusieurs tasses dans la journée.

**Source** : Iles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983).

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : faire bouillir une poignée de plante entière dans un litre et demi d'eau ; ramener le volume à un litre par ébullition ; laisser refroidir ; filtrer ; ajouter au filtrat un égal volume de rhum.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un verre à bière (150 ml),

trois fois par jour.

Source : Seychelles (Poulet, 1972 - Anonyme, 1986).

### Bronchodilatateur

\* Drogue : la plante sèche.

Préparation : décoction de 30 g de plante sèche par litre d'eau.

Mode d'emploi - posologie : boire deux à trois litres de décoction par jour.

Source : Sénégal (Pousset, 1984).

### 4.2 Bronchite - toux

\* Drogue : la plante entière.

Préparation : faire bouillir deux ou trois plantes entières dans deux litres d'eau, pendant 15 minutes.

Mode d'emploi - posologie : boire plusieurs tasses dans la journée.

Source : Iles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983).

### 4.3 Coqueluche

\* Drogue : la plante.

Préparation : décoction du mélange "E. hirta (plante) 20 g - Mollugo nudicaulis (plante) 20 g - Obelia radula (feuilles) 20 g - feuilles d'oranger 20 g", à raison d'une cuillerée à soupe du mélange par tasse ; faire bouillir 10 minutes et infuser 5 minutes.

Mode d'emploi - posologie : boire une demi-tasse avant le repas, pour éviter les vomissements alimentaires.

Source : Madagascar (Boiteau, 1986).

#### 4.4 Hémoptysie

\* Drogue : la plante.

Préparation : décoction du mélange "Ochrocarpus orthocladus (feuilles) 20 g - Argemone mexicana (feuilles) 10 g - Trema orientalis (écorce) 20 g - Urera oligoloba (feuilles) 20 g - E. hirta (plante) 20 g - Dichrocephala lyrata (plante) 20 g", à raison d'une cuillerée à soupe du mélange par tasse ; faire bouillir 10 minutes et infuser 10 minutes.

Mode d'emploi - posologie : boire une demi-tasse, trois fois par jour.

Source : Madagascar (Boiteau, 1986).

## II - 5 PROPRIETES ANTALGIQUES

### 5.1 Douleur liée à la dysentérie chronique

\* Drogue : la plante.

Préparations : - décoction du mélange "E. hirta (plante) 20 g - Cynodon dactylon (rhizome) 20 g - Cassytha filiformis (plante) 20 g - Psidium guayava (sommités) 20 g - Samadera indica (écorce) 20 g", dans un litre d'eau.

- décoction du mélange "E. hirta (plante) 20 g - Phyllanthus casticum (racines) 20 g - Anthocleista rhizophoroides (écorce) 20 g - Trema orientalis (écorce) 20 g - Eriosema procumbens (plante) 20 g", dans un litre d'eau.

Faire bouillir jusqu'à réduction à environ 750 g ; filtrer.

Mode d'emploi - posologie : boire une tasse, en cas de douleurs intestinales. Ne pas dépasser quatre tasses par jour.

Source : Madagascar (Boiteau, 1986).

### 5.2 Céphalées

\* Drogue : la plante entière sèche.

Préparation : calciner une plante entière sèche ; réduire les cendres en poudre fine.

**Mode d'emploi** : scarifier la région bregmatique en sept points et y appliquer la poudre.

**Source** : Bénin (Anonyme, 1986).

### 5.3 Varices douloureuses

\* **Drogue** : la plante fraîche ou sèche.

**Préparation** : couper la plante en morceaux ; humecter avec un peu d'eau ; faire cuire à l'étouffé en ajoutant de l'huile de coco par petites quantités ; laisser tiédir.

**Mode d'emploi** : appliquer la préparation sur les varices.

**Source** : Madagascar (Boiteau, 1986).

## II - 6 PROPRIETES FEBRIFUGES

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : faire bouillir deux ou trois plantes entières dans deux litres d'eau, pendant 15 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire plusieurs tasses dans la journée.

**Source** : Iles Maurice et Rodrigues (Adjanooun et coll., 1983).

## II - 7 AFFECTIONS DE L'APPAREIL GENITAL FEMININ

### 7.1 Agalactie - hypogalactie

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : préparer une sauce avec une poignée de plante entière et quelques noix de palme.

**Mode d'emploi - posologie** : consommer la sauce trois fois par jour, jusqu'à guérison.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

\* **Drogue** : la tige feuillée.

**Préparations** : - macération de la tige feuillée écrasée dans l'eau de maïs (à consommer)  
- écraser la tige feuillée et appliquer la pâte sur les seins.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

\* **Drogue** : feuilles.

**Préparation** : piler les feuilles de Ficus thonningii avec les feuilles d'E. hirta ; faire sécher ; tamiser.

**Mode d'emploi - posologie** : mettre une pincée à cinq doigts dans du lait et l'absorber deux fois par jour, pendant six jours.

**Autre préparation** : décocté des feuilles des deux plantes, utilisé pour laver les seins, matin et soir, pendant six jours.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

### 7.2 Dysménorrhée

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparations** : écraser à partie égale et faire sécher les plantes entières suivantes : Portulaca quadrifida - Evolvulus alsinoides - E. hirta.

Mettre une pincée à cinq doigts, dans un verre d'eau et y ajouter des graines d'Aframomum melegueta.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un demi verre (100 ml), le matin, à jeun, pendant huit jours.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

### 7.3 Oligoménorrhée

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : faire bouillir deux ou trois plantes entières dans deux litres d'eau, pendant 15 minutes.

**Mode d'emploi - posologie** : boire plusieurs tasses dans la journée.

**Source** : Iles Maurice et Rodrigues (Adjanohoun et coll., 1983).

#### **7.4 Métrorragie**

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : triturer une poignée de plante entière fraîche dans un demi litre d'eau ; laisser macérer.

**Mode d'emploi - posologie** : boire un verre à bière (150 ml) du macéré, une fois par jour ; utiliser le reste pour la toilette intime. La préparation doit être renouvelée chaque jour. La durée du traitement est d'une semaine.

**Source** : Bénin (Anonyme, 1986).

## **II - 8 AFFECTIONS DE L'APPAREIL GENITAL MASCULIN**

### **8.1 Stérilité**

\* **drogue** : les tiges feuillées.

**Préparation** : macération de 50 g de poudre de tiges feuillées dans un litre de jus de citron, pendant quatre heures ; filtrer.

**Mode d'emploi - posologie** : boire trois cuillerées à soupe (50 ml), matin, midi et soir, en dehors des repas, pendant deux semaines.

Continuer le traitement, si cela est nécessaire.

**Source** : Togo (Adjanohoun et coll., 1986).

### **8.2 Urétrite**

\* **Drogue** : la plante entière fraîche.

**Préparation** : décoction d'une poignée de plante dans un litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : boire le décocté à volonté.

**Source** : Comores (Anonyme, 1986).

## II - 9 PROPRIETES CICATRISANTES

### Fissurations anales

\* **Drogue** : la plante entière.

**Préparation** : décocté de la plante entière (deux poignées de plante pour l'adulte, une poignée pour l'enfant, dans un ou deux litres d'eau).

**Mode d'emploi** : asseoir le malade dans le décocté tiède.

**Source** : Sénégal (Dalil, 1986).

\* **Drogue** : le latex.

**Mode d'emploi** : appliquer matin et soir le suc de la tige feuillée, jusqu'à cicatrisation.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

## II - 10 UTILISATION CONTRE LES MORSURES DE SCORPIONS

\* **Drogue** : la tige feuillée.

**Préparation** : écraser sur le point de piqûre, une tige feuillée de Cymbopogon schrenanthus et d'E. hirta, deux fois par jour.

**Source** : Togo (Adjanooun et coll., 1986).

## II - 11 UTILISATION DANS LE RETARD A LA MARCHE DE L'ENFANT

\* **Drogue** : les feuilles fraîches.

**Préparation** : triturer les feuilles d'E. hirta et de Dissotis rotundifolia, dans la paume de la main ; délayer la pulpe obtenue dans un demi litre d'eau.

**Mode d'emploi - posologie** : la préparation est utilisée en lavement, une fois par jour.

**Source** : Côte d'Ivoire (Anonyme, 1986).

*TROISIEME PARTIE*

*ETUDE*

*TOXICOLOGIQUE*

Bien que très couramment prescrite en médecine traditionnelle et dans de très nombreux pays, E. hirta a fait l'objet d'un certain nombre d'études, tant au niveau de sa toxicité aiguë et chronique sur l'animal de laboratoire, qu'au niveau de sa bonne tolérance chez l'homme.

Si les premières données expérimentales datent de 1885 (observations faites sur l'animal par le docteur Marsset), l'essentiel des études toxicologiques a été réalisé entre 1948 et 1968.

Ainsi, la toxicité aiguë de différentes préparations, administrées par voie intra-veineuse (I.V.), intra-péritonéale (I.P.) ou orale, a pu être étudiée sur divers animaux tels que la souris, le rat, le lapin, le cobaye (Hazleton et Hellerman, 1948 - Feng et coll., 1962 - Dhar et coll., 1968).

Les effets de l'administration orale et chronique de différents extraits d'E. hirta ont également été recherchés, chez le rat et le cobaye (Hazleton et Hellerman, 1948 - Blanc et coll., 1963 - Ridet et Chartol, 1964).

Enfin, l'utilisation de différents extraits, dans le traitement chronique d'affections intestinales du type amibiase affectant des patients de tous âges (nourrissons, enfants, adultes, personnes âgées), a permis le suivi régulier des sujets, le contrôle clinique de leur état général et, par là-même, l'étude de la tolérance du produit (Martin et coll., 1964 - Ridet et Chartol, 1964)

L'ensemble de ces travaux et des résultats obtenus fait l'objet de la section A de cette troisième partie consacrée à l'étude toxicologique d'E. hirta.

Dans un second temps (section B), nous avons recherché les effets toxiques d'un extrait aqueux d'E. hirta, préparé par nos soins et utilisé pour l'étude pharmacologique.

Dans cet objectif, la toxicité aiguë, due à l'administration I.P. de l'extrait végétal, a été recherchée sur la souris mâle, tandis qu'une étude en chronique a pu être menée sur des souris mâles et femelles, E. hirta étant administrée durant quinze jours, par deux voies différentes (orale et I.P.).

*SECTION A*

*ETUDES TOXICOLOGIQUES*

*ANTERIEURES*

# I TOXICITE AIGUE

## Etude sur l'animal de laboratoire

### I - 1 ACTION ICHTHYOTOXIQUE (Ridet et Chartol, 1964)

Le décocté aqueux à 30 % de la plante provoque la mort de petits poissons du genre Alestes nurse de 10 g, en trois heures.

La solution aqueuse à 1 pour 3000 du saponoside pur (non identifié) les tue en quatre heures trente minutes.

### I - 2 ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VEGETAL PAR VOIE INTRA-VEINEUSE (I.V.) (Hazleton et Hellerman, 1948)

Remarque : Les doses testées sont exprimées en ml/kg. La correspondance en g de plante sèche n'est pas donnée par les auteurs.

#### 2.1 Expérimentation sur le rat

L'injection d'un extrait fluide déalcoolisé et partiellement purifié permet de déterminer la DL 50 : 7 ml/kg.

#### 2.2 Expérimentation sur la souris

Un extrait fluide déalcoolisé et partiellement purifié est testé à différentes doses, soit 5 - 7,5 et 10 ml/kg.

#### Résultats

Doses (ml/kg)	nombre de souris	vivants	morts
5	12	9	3
7,5	10	5	5
10	14	4	10

DL 50 = 7,4 ml/kg.

### **Observations**

Les injections provoquent une accélération du rythme respiratoire, une vasodilatation au niveau des oreilles et de la queue et parfois des convulsions.

A 10 ml/kg, un des quatre survivants présente des hémorragies au niveau des yeux.

### **2.3 Expérimentation sur le lapin**

Le même extrait fluide, que celui testé sur la souris, provoque chez le lapin, à des doses léthales, une stimulation respiratoire suivie d'un ralentissement puis d'un arrêt de la respiration.

#### **I - 3 ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VÉGÉTAL PAR VOIE INTRA-PERITONEALE (I.P.) (Feng et coll., 1962)**

Des lots de deux souris (20-35 g) sont utilisés, pour chaque dose testée.

Deux extraits végétaux différents sont préparés :

**A extrait aqueux** : obtenu par macération et ébullition de 500g de parties aériennes fraîches dans 2,5 l d'eau, pendant une heure, suivies d'une filtration sur calicot. Le résidu obtenu est soumis au même processus. Les filtrats sont réunis et évaporés sous pression réduite, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 500ml.

**B extrait aqueux**, dont le matériel à haut poids moléculaire est précipité par l'éthanol : obtenu par dilution de l'extrait A (500 ml) avec l'éthanol (1500 ml). La solution est laissée au repos pendant trois heures, à 4°C. Après élimination du précipité (par filtration ou centrifugation), le filtrat est concentré sous pression réduite, jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml. Cette solution est alors diluée dans 400 ml d'eau distillée.

Les doses testées (exprimées en volume d'extrait injecté) sont les suivantes : 1 - 0,5 - 0,1 - 0,05 et 0,001 ml.

La dose minimale entraînant la mort des deux animaux représente la dose toxique.

## **Résultats**

L'extrait A est toxique à 1 ml. L'extrait B se révèle atoxique, aux doses testées.

### **I - 4 ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT VEGETAL PAR VOIE ORALE (PER OS)**

#### **4.1 Expérimentation sur la souris**

##### **4.1.1 Etude de la toxicité aiguë d'un extrait sec (Dhar et coll., 1968)**

L'extrait végétal est testé sous sa forme sèche, après suspension dans 0,1 % d'agar ou dans 1 % de gomme d'acacia dans de l'eau distillée.

Les concentrations sont ajustées de façon à ce qu'une souris de 20 g reçoive 0,2 ml.

La plus faible dose testée est de 400 mg/kg, la plus forte étant de 1000 mg/kg.

Les doses intermédiaires croissent d'un facteur 2.

Les témoins reçoivent le solvant seul.

Chaque lot est constitué de 2 ou 3 souris albinos adultes de chaque sexe et pesant entre 15 et 20 g.

Les animaux sont suivis pendant les cinq ou six premières heures, au cours desquelles sont notés les effets visibles. La mortalité est relevée au bout de 24 heures.

## **Résultats**

La dose maximale testée (1000 mg/kg) ne provoque pas de décès.

**4.1.2 Etude de la toxicité d'un extrait fluide déalcoolisé**  
(Hazleton et Hellerman, 1948)

Différentes doses sont testées : 5, 10, 20, 30, 60 et 75 ml/kg.

**Résultats**

Doses (ml/kg)	nombre de souris	vivants	morts
5	2	2	0
10	2	2	0
20	2	2	0
30	10	10	0
60	10	8	2
75	10	10	0

**Observations**

Les effets sont faibles, excepté aux plus fortes doses pour lesquelles une légère dépression et un phénomène de catharsis sont observés.

**4.2 Expérimentation sur le cobaye**  
(Hazleton et Hellerman, 1948)

Un extrait fluide déalcoolisé est administré, par voie orale, à différentes doses (de 0,5 à 15 ml/kg).

**Résultats** : Aucune toxicité apparente n'est observée.

## **II TOXICITE CHRONIQUE**

**Etude sur l'animal de laboratoire**

**Administration de l'extrait végétal par voie orale**

### **II - 1 EXPERIMENTATION SUR LE RAT ALBINOS MALE**

#### **1.1 Etude de la toxicité chronique d'un extrait fluide déalcoolisé (Hazleton et Hellerman, 1948)**

Chaque lot est composé de dix rats albinos mâles pesant environ 100 g.

Le lot témoin reçoit une alimentation normale ; les deux lots traités reçoivent respectivement 1 % et 5 % d'extrait ajouté à la nourriture.

Chaque animal est placé en cage individuelle et a libre accès à la nourriture et à la boisson.

Chaque semaine, les animaux sont pesés et la quantité de nourriture consommée est évaluée.

Le test dure 97 jours.

#### **Résultats**

Un seul décès est enregistré (le 88ème jour), dans le lot recevant l'extrait végétal à 5 %.

D'après les auteurs, l'extrait fluide serait pratiquement dépourvu de toxicité et pourrait être ajouté régulièrement au régime alimentaire normal, à la dose de 5 %, sans provoquer d'intolérance ni de phénomènes toxiques.

#### **1.2 Etude de la toxicité chronique d'un extrait fluide hydro-alcoolique (Ridet et Chartol, 1964)**

Un cm<sup>3</sup> d'extrait fluide correspond sensiblement à 0,50 g de poudre sèche stabilisée.

L'expérience est réalisée sur trois rats albinos de 150-160 g.

L'extrait végétal est administré par gavage gastrique, à raison de 1 cm<sup>3</sup>/jour (soit, rapportée au poids de l'animal, sensiblement six fois la dose thérapeutique humaine).

Les poids corporels et les volumes d'eau consommés sont relevés quotidiennement.

Des examens histologiques sont effectués au bout de 9, 18 et 27 jours.

### **Résultats**

Aucune toxicité n'est relevée et l'état général est excellent. Chez les animaux ayant fait l'objet d'ingestions prolongées, l'examen histopathologique montre des lésions au niveau des viscères vraisemblablement dues à l'action vasodilatatrice de l'alcool employé dans la préparation.

## **II - 2 EXPERIMENTATION SUR LE COBAYE**

### **2.1 Etude de la toxicité chronique de la poudre végétale** (Blanc et coll., 1963)

La poudre végétale est conditionnée sous forme de pilules, dosées à 50 mg.

Les essais sont pratiqués sur des lots homogènes de cobayes femelles impubères.

Chaque animal reçoit une pilule par jour, pendant 20 jours.

Les relevés pondéraux sont effectués tous les trois jours.

### **Résultats**

Aucun signe d'intoxication n'est observé. De plus, le poids des animaux augmente régulièrement.

### **2.2 Etude de la toxicité chronique d'un extrait concentré hydro-alcoolique** (Ridet et Chartol, 1964)

Un cm<sup>3</sup> d'extrait concentré correspond sensiblement à 1 g de poudre sèche stabilisée (soit six fois la dose thérapeutique quotidienne humaine).

L'extrait est administré par gavage gastrique, à raison de 1 cm<sup>3</sup> par jour.

Des examens histopathologiques sont effectués au bout de 7 et 196 jours.

### **Résultats**

Aucune toxicité n'est relevée et l'état général des animaux est excellent. Chez les animaux ayant fait l'objet d'injections prolongées, l'examen histopathologique montre des lésions au niveau des viscères vraisemblablement dues à l'action vasodilatatrice de l'alcool employé dans la préparation.

### **III EFFETS CONSECUTIFS A L'ADMINISTRATION D'E. HIRTA**

#### **Etude sur l'animal de laboratoire**

Holmes (1923) et Maiden (1889) font référence au Docteur Marsset (Gazette thérapeutique, Février 1885) :

Le principe actif serait toxique pour les petits animaux ; il provoquerait leur mort par arrêt des mouvements respiratoires et des pulsations cardiaques, après les avoir préalablement accélérés, puis ralentis. Cette action sur les centres cardiaques et respiratoires serait directe.

De plus, les autres organes ne seraient pas atteints. Par contre, la plante provoquerait une irritation locale au niveau de la muqueuse gastrique, la peau et les autres muqueuses n'étant pas affectées.

Les effets ne sont pas cumulatifs et l'élimination semble se faire par voie hépatique.

Kerharo et Adam (1974) font référence à Dikshit et Rao (1931) :

La plante ralentit la respiration et produit une dilatation marquée des bronches, chez le rat et le chien.

Administrée par voie buccale, elle provoque à fortes doses une irritation de l'estomac, des nausées et des vomissements.

En injections intra-veineuses, elle exerce un effet dépresseur sur les mouvements de l'intestin (arrêt immédiat du péristaltisme et diminution du tonus musculaire), sur le système cardio-vasculaire et la pression sanguine, principalement en raison de l'action exercée sur le coeur.

En 1962, Feng et ses collaborateurs étudient les effets consécutifs à l'injection intra-péritonéale d'extraits aqueux et éthanoliques de l'espèce jamaïcaine :

Ainsi, les extraits aqueux se révèlent légèrement toxiques pour la souris. Ils provoquent également une légère diminution de l'amplitude et du rythme cardiaque sur le coeur de lapin, ainsi qu'une diminution de la pression sanguine du chien.

Les extraits éthanoliques, quant à eux, provoquent une légère inhibition sur l'intestin isolé de cobaye, une très forte variation du débit sanguin de la patte postérieure du rat, une légère augmentation de l'amplitude et du rythme cardiaque du coeur de lapin, ainsi qu'une diminution de la pression sanguine du chien.

## **IV TOLERANCE HUMAINE**

### **IV - 1 REFERENCE A LA MEDECINE TRADITIONNELLE**

Steinmetz (1964) rapporte la légère toxicité d'E. hirta, consommée fraîche ou bouillie, par les indigènes de l'île d'Ambon (Indonésie), lorsque la plante est ingérée en trop grande quantité.

### **IV - 2 ETUDES CLINIQUES**

Les études ont été réalisées dans le cadre du traitement d'amibiases intestinales affectant des adultes et des enfants (le plus jeune étant âgé de 18 mois).

#### **2.1 Utilisation d'un extrait hydro-alcoolique**

(Ridet et Chartol, 1964)

L'extrait (100 g correspondent à 50 g de plante sèche stabilisée) est administré par voie orale, à raison de plusieurs prises par jour. Le nombre de prises journalières et la durée du traitement varient selon les cas (quantité maximale quotidienne de quatre cuillerées à soupe, consommée pendant neuf jours au maximum).

Le nombre total de patients traités est de 53.

Certains malades ont été suivis pendant plus d'une année.

Tous les sujets ont subi un examen clinique complet avant et après le traitement ; quelques uns ont également été soumis à des examens hématologiques et urinaires.

#### **Résultats**

Le produit testé est bien toléré. Aucun trouble cardiovasculaire, rénal ou neurologique n'est observé.

## **2.2 Utilisation d'un nébulisat concentré, exempt d'alcool** (Martin et coll., 1964)

Le nébulisat (atomisat) est présenté en comprimés dragéifiés, dosés à 0,45 g.

La posologie est généralement la suivante :

4 prises de 4 comprimés, les 4 premiers jours.

4 prises de 3 comprimés, les 4 jours suivants.

4 prises de 2 comprimés, les 2 derniers jours.

Soit, au total, 128 comprimés représentant une dose totale de 57,6 g de nébulisat, avec un maximum journalier de 7,2 g.

Dans le cas d'enfants de moins de sept ans, la posologie est réduite de moitié.

Le nombre total de patients traités est de 150 (108 sujets de sexe masculin et 42 de sexe féminin), dont trois sont des personnes âgées de 65, 71 et 88 ans ; 100 sont des adultes de 20 à 60 ans ; 25 sont des adolescents de 10 à 20 ans, 22 sont des petits enfants (6 âgés de 5 ans, 4 âgés de 4 ans, 3 âgés de 3 ans, 5 âgés de 2 ans et 2 âgés de 18 mois).

Chaque patient est soumis aux différents contrôles cliniques et paracliniques suivants :

Observation de l'état général, relevés du poids et de la température.

Contrôles de l'appareil cardio-vasculaire, du rythme cardiaque, de la tension artérielle, du système nerveux (réflexes, psychisme, statut végétatif), de la diurèse, du transit intestinal.

Examens complémentaires variant selon les cas (coprocultures ; hémogrammes ; examens rectoscopiques, radiologiques, des urines ; vitesse de sédimentation).

### **Résultats**

La tolérance du produit est excellente. Aucun incident n'a été observé, aussi bien chez les nourrissons, que chez les personnes âgées, ou les malades atteints d'affections graves. Aucun signe de souffrance rénale ou hépatique, aucun trouble

comportemental ou psychique, aucun effet subjectif désagréable n'a été détecté.

Cependant, différents cas sont à mentionner :

Un cas de nausées, durant les quatre premiers jours de traitement ; ces nausées disparaissent ensuite malgré la poursuite du traitement.

Deux cas de vomissements.

Une crise d'urticaire, apparue trois heures après la première prise et persistant pendant trois jours, pour disparaître après réduction légère de la posologie.

Un cas de météorisme abdominal important, apparu au troisième jour du traitement et disparaissant spontanément en cinq jours.

Un fléchissement des chiffres tensionnels, affectant principalement la minima, relativement marqué chez cinq patients, mais ne revêtant pas un caractère sérieux et ne nécessitant pas de thérapeutique corrective.

*SECTION B*

*TRAVAUX PERSONNELS*

## **I EVALUATION DE LA DOSE LETHALE 50 (DL 50)**

### **I - 1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

La toxicité aiguë est étudiée sur des souris Swiss mâles (Césal), présentant les mêmes caractéristiques que celles utilisées au cours de l'étude pharmacologique d'E. hirta (cinquième partie, section B, chapitre A II)

Les caractéristiques et le mode de préparation de l'extrait végétal testé sont détaillés dans la partie consacrée aux expérimentations pharmacologiques (cinquième partie, section B, chapitre A I).

La mortalité est relevée 1, 4, 24 heures, puis 2 et 3 jours après l'injection I.P. de l'extrait végétal.

Les animaux sont maintenus en observation pendant 8 jours.

La DL 50 est estimée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### **I - 2 ESSAIS PRELIMINAIRES**

Ces essais sont réalisés sur des lots de trois souris mâles.

Des doses, exprimées en mg de plante sèche et croissant d'un facteur deux, sont administrées. La dose minimale est de 200 mg/kg, la dose maximale étant de 6400 mg/kg.

#### **Résultats**

Ces essais préliminaires permettent de mettre en évidence l'absence de toxicité de l'extrait végétal, jusqu'à la dose de 6,4 g/kg (0% de mortalité, au bout de 8 jours).

### Observations

Pour tous les lots traités, divers phénomènes sont observés aussitôt après l'injection :

Des contractions abdominales apparaissent, d'autant plus importantes que la dose d'extrait végétal est plus forte. Ces phénomènes subsistent encore une heure après l'injection de la dose maximale testée, soit 6,4 g/kg.

Une immobilisation de l'animal se manifeste également, de façon dose-dépendante, notamment à partir de 800 mg/kg ; de plus, de fréquents étirements des pattes postérieures sont observés.

La "récupération" est apparemment totale, une heure après l'injection des doses de 200 et 400 mg/kg, quatre heures après celle des doses de 800 et 1600 mg/kg, les souris traitées par les doses de 2 - 3,2 et 6,4 g/kg étant encore apathiques. Un jour après l'administration de l'extrait végétal, tous les animaux survivants ne présentent plus de signes cliniques particuliers.

### I - 3 ESTIMATION DE LA DL 50

Cette estimation est réalisée sur des lots de dix souris mâles.

Les doses croissantes testées sont les suivantes : 7 - 8 - 10 - 11 - 11,5 - 12 - 12,5 - 13 - 14 - 15 et 17 g/kg (exprimées en plante sèche).

Les pourcentages de mortalité, obtenus trois jours après l'injection d'E. hirta, sont reportés dans le tableau 3.

### Résultats

Très généralement, la mortalité survient entre 4 et 48 heures après l'injection, avec un effet maximal au relevé de 24 heures.

**TABLEAU 3** : TOXICITE AIGUE RELEVÉE TROIS HEURES APRES L'INJECTION I.P. D'E. HIRTA.

DOSES (g/kg)	MORTALITE (%)
7	30
8	40
10	60
11	60
11,5	80
12	90
12,5	80
13	90
14	100
15	80
17	100

La DL 50 est estimée à 8,82 g/kg (8,79-8,85)

### Observations

Les divers phénomènes précédemment observés lors des essais préliminaires, à savoir de fortes contractions abdominales et des étirements des pattes postérieures, sont à nouveau obtenus, l'apathie des animaux étant d'autant plus prolongée que la dose d'extrait végétal est élevée.

## **II ETUDE SYMPTOMATOLOGIQUE APRES ADMINISTRATION DE DOSES INFÉRIEURES OU ÉGALES A LA DL 50**

### **II - 1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

L'extrait aqueux d'E. hirta, précédemment utilisé (paragraphe I) est administré par voie intra-péritonéale (I.P.), ou orale (per os), aux doses de 3, 6 et 9 g/kg.

Chaque dose est testée sur cinq souris mâles et cinq souris femelles (Janvier), âgées de neuf semaines au début de l'expérimentation et présentant les mêmes caractéristiques que celles utilisées au cours de l'étude pharmacologique d'E. hirta (cinquième partie, section B, chapitre A II).

La mortalité, le poids corporel, ainsi que les effets sur le comportement (activité, démarche, convulsions, tremblements), sur l'aspect extérieur (fourrure, peau, yeux, oreilles, dents) et sur diverses fonctions (respiration, selles, urines) sont relevés 15 minutes, puis 1, 2 et 4 heures après l'injection de l'extrait végétal, pour être ensuite suivis journallement pendant 14 jours.

### **II - 2 RESULTATS**

Les résultats obtenus respectivement chez les souris femelles et mâles sont consignés dans les tableaux 4 et 5, dans le cas d'un traitement par voie I.P., et dans les tableaux 6 et 7, dans le cas de l'administration par voie orale.

#### **2.1 Administration I.P.**

##### **Mortalité**

Administrée aux doses de 3, 6 et 9 g/kg, E. hirta ne provoque la mort d'aucun des animaux femelles et mâles et ceci durant les 15 jours que dure l'expérimentation.

### **Poids corporel**

Aux trois doses testées, l'extrait végétal provoque une légère diminution du poids corporel se manifestant au bout de 4 heures, pour atteindre un maximum soit au bout de 24 heures (cas de la plus faible dose), soit au bout de 2 et 3 jours (cas de la dose de 6 mg/kg), soit au bout de 2 jours et de 24 heures (cas de la plus forte dose), respectivement pour les animaux femelles et mâles.

La reprise progressive de poids est visible dès le jour qui suit l'obtention de l'effet maximal et se poursuit jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Cette diminution du poids corporel apparaît plus importante chez les souris mâles.

### **Effets sur le comportement, l'aspect extérieur et diverses fonctions**

Sur l'ensemble des paramètres pris en compte, les seules manifestations visibles consistent en une réduction de l'activité générale des animaux (A), un ptosis plus ou moins important (YF) et l'apparition de contractions abdominales (FC)

Ces trois phénomènes se manifestent aussi bien chez les souris femelles que chez les souris mâles, dans les 15 minutes qui suivent l'injection de l'extrait végétal, et sont d'autant plus intenses que la dose d'E. hirta est forte.

La réduction de l'activité générale et la présence de contractions abdominales sont nettement plus importantes dans l'heure qui suit l'administration de l'extrait végétal et régressent au bout de 2 heures.

Le ptosis, quant à lui, reste important durant les 4 premières heures, notamment pour les doses de 6 et 9 g/kg.

Très généralement, l'ensemble des paramètres est redevenu normal au bout de 24 heures, excepté dans le cas de la dose de 9 g/kg, à laquelle quelques animaux manifestent encore une

activité légèrement réduite (souris plus calmes) et un ptosis partiel (yeux mi-clos).

## 2.2 Administration orale

Administrée aux doses de 3, 6 et 9 g/kg, E. hirta est bien tolérée.

Ainsi, aucune mortalité n'est obtenue, le poids corporel ne se trouve pas affecté et aucun des paramètres pris en compte n'est modifié ; en particulier, l'activité générale des souris femelles et mâles reste normale, aucune contraction abdominale, aucun ptosis n'est observé.

**TABLEAU 4 : TOXICITE AIGUE , EVOLUTION DU POIDS CORPOREL ET SYMPTOMES ASSOCIES A L'ADMINISTRATION I.P. D'E. HIRTA, CHEZ LA SOURIS FEMELLE.**

E. HIRTA (g/kg)	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	26,8 + 0,6	26,9 + 0,6	26,9 + 0,6	26,4 + 0,5	25,7 + 0,4	26,8 + 0,6	27,3 + 0,6	26,7 + 0,3	27,1 + 0,5	27,8 + 0,8	27,7 + 0,7	28 + 0,4	29 + 0,5	29,6 + 0,8	29,6 + 0,8	29,6 + 0,7	29,2 + 0,7	30,5 + 0,8
	SYMPTOMES	A FC YF	A FC YF	A FC YF	A FC YF														
6	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	27,2 + 0,3	27,3 + 0,3	27,3 + 0,3	27,1 + 0,3	25,4 + 0,7	24,4 + 0,6	27,4 + 0,5	27,1 + 0,4	27 + 0,4	27,4 + 0,6	27,8 + 0,6	28,2 + 0,5	28,3 + 0,6	28,3 + 0,7	28,7 + 0,7	29,9 + 0,4	29,9 + 0,5	30 + 1
	SYMPTOMES	N FC YF	A FC YF	A FC YF	A FC YF														
9	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	26,5 + 1	26,5 + 1	26,4 + 0,9	26,2 + 0,9	24,7 + 0,8	24,1 + 0,7	25,2 + 0,7	25,3 + 0,7	26,1 + 0,9	27,5 + 0,8	27,8 + 0,7	28,3 + 1	28,7 + 0,9	28,6 + 0,7	27,8 + 0,8	28,4 + 1	28,9 + 0,9	29,4 + 0,9
	SYMPTOMES	N FC YF	A FC YF	A FC YF	A FC YF	A N YF													

A = ACTIVITE

FC = FLANCS CONTRACTES

YF = YEUX MI-CLOS OU CLOS

N = NORMAL

**TABEAU 5 : TOXICITE AIGUE, EVOLUTION DU POIDS CORPOREL ET SYMPTOMES ASSOCIES A L'ADMINISTRATION I.P. D'E. HIRTA, CHEZ LA SOURIS MALE.**

E. HIRTA (g/kg)	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	35,2 + 0,4	35 + 0,5	34,8 + 0,5	34,3 + 0,3	32,4 + 0,6	32,9 + 1,5	33,4 + 2,1	33,6 + 2,4	34 + 2,4	34,6 + 2,3	34,7 + 2,2	34,6 + 2,2	34,7 + 2,1	35,3 + 2,1	35,9 + 2,1	35,9 + 2	35,8 + 2	36,6 + 1,9
	SYMPTOMES	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF			←				N			→				
6	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	34,8 + 0,9	35,4 + 1,1	35,4 + 1,1	35 + 1,1	33 + 0,9	31,1 + 1	29,2 + 0,9	35 + 1	36 + 1,3	37,1 + 1,1	36,6 + 1,1	36,7 + 1	36,9 + 1,1	36,7 + 1	37,2 + 0,9	37,9 + 1	38,4 + 0,8	38,5 + 0,9
	SYMPTOMES	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF		←				N			→				
9	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	35,9 + 0,8	35,8 + 0,8	35,8 + 0,8	35,5 + 0,8	33,3 + 0,7	33,3 + 0,8	34,8 + 0,8	35,4 + 0,6	35,6 + 0,8	36,5 + 1	36,7 + 1	36,6 + 1,2	36,9 + 1,2	37,8 + 1	38,5 + 1,1	38,5 + 1,1	38,7 + 1,2	38,3 + 1,2
	SYMPTOMES	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ FC YF	A\ N YF	A\ N YF	←				N			→				

A = ACTIVITE

FC = FLANCS CONTRACTES

YF = YEUX MI-CLOS OU CLOS

N = NORMAL

TABLEAU 6 : TOXICITE AIGUE, EVOLUTION DU POIDS CORPOREL ET SYMPTOMES ASSOCIES A L'ADMINISTRATION PER OS D'E. HIRTA, CHEZ LA SOURIS FEMELLE.

E. HIRTA (g/kg)	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	27,2 + 0,4	27,1 + 0,4	27,1 + 0,5	27,1 + 0,5	27,3 + 0,6	27 + 0,8	27,3 + 0,7	27,7 + 0,5	27,5 + 0,5	28,1 + 0,7	28,3 + 0,6	28,4 + 0,6	28,3 + 0,6	28,9 + 0,7	29,2 + 0,8	29,5 + 0,7	29,1 + 0,7	29,9 + 0,8
	SYMPTOMES	← N →				← N →							← N →						
6	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	26,2 + 0,5	26,1 + 0,4	25,9 + 0,4	25,7 + 0,3	26,4 + 0,4	26,3 + 0,4	27,2 + 0,3	27 + 0,3	26,9 + 0,3	27,8 + 0,6	28,1 + 0,4	28 + 0,4	28,3 + 0,2	28 + 0,5	28,6 + 0,3	29,4 + 0,4	28,7 + 0,7	30,2 + 0,6
	SYMPTOMES	← N →				← N →							← N →						
9	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	26,3 + 0,3	26,3 + 0,4	26,6 + 0,5	26,5 + 0,4	26,8 + 0,6	26,9 + 0,7	27,3 + 0,6	26,9 + 0,4	27,2 + 0,7	28 + 0,7	28,3 + 0,7	28,3 + 0,6	28,3 + 0,8	29 + 0,8	29,3 + 0,8	29,1 + 0,7	27,9 + 0,8	30 + 1,1
	SYMPTOMES	← N →				← N →							← N →						

N = NORMAL

TABLEAU 7 : TOXICITE AIGUE, EVOLUTION DU POIDS CORPOREL ET SYMPTOMES ASSOCIES A L'ADMINISTRATION PER OS D'E. HIRTA, CHEZ LA SOURIS MALE.

E. HIRTA (g/kg)	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	33,5 + 1,1	33,6 + 1	34,1 + 0,9	34,7 + 0,7	36,7 + 0,6	36,2 + 0,5	36,6 + 0,4	36,8 + 0,5	36,9 + 0,7	37,1 + 0,7	38,2 + 0,7	37,7 + 0,7	38 + 0,6	38 + 0,7	38 + 0,7	38,3 + 0,6	39 + 0,7	39,6 + 0,7
	SYMPTOMES	← N →				← N →													
6	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	32,3 + 1	33,9 + 1	34,2 + 1,1	35,3 + 1,1	35,1 + 1	35,8 + 1,3	36,1 + 1,4	36,5 + 1,4	36,5 + 1,6	37,8 + 1,4	37,8 + 1,4	37,2 + 1,2	36,5 + 1,4	36,5 + 1,2	37,1 + 1,3	37,5 + 1,1	37,5 + 0,9	37,6 + 1,1
	SYMPTOMES	← N →				← N →													
9	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS MOYEN DES CINQ SOURIS	32,9 + 0,6	33,4 + 0,6	33,4 + 0,7	33,9 + 0,6	33,8 + 0,6	34,2 + 0,7	34,6 + 0,7	34,8 + 0,6	35,2 + 0,6	36 + 0,8	35,3 + 0,8	35 + 0,9	35,2 + 0,9	34,5 + 0,9	35,4 + 1	35,1 + 0,9	35,3 + 1,2	35,4 + 1
	SYMPTOMES	← N →				← N →													

N = NORMAL

### III DISCUSSION

L'ensemble de cette étude toxicologique permet de confirmer la très faible toxicité d'un extrait aqueux d'E. hirta, sur la souris.

Ainsi, la DL 50 aiguë a pu être estimée à 8,82 g/kg, lorsque l'extrait végétal est injecté par voie I.P..

L'absence de toxicité a pu être confirmée après l'administration de doses inférieures ou égales à 9 g/kg, par voie I.P. ou orale.

De plus, les perturbations affectant le comportement, l'aspect extérieur et certaines fonctions, perturbations occasionnées par les fortes doses de 3, 6 et 9 g/kg, sont limitées et même totalement absentes dans le cas d'un traitement par voie orale. Consistant en une réduction de l'activité, en contractions abdominales et en un ptosis, elles se manifestent dans le quart d'heure qui suit l'injection de l'extrait végétal, pour disparaître généralement le lendemain.

L'apathie des animaux, observée durant cette première phase du test et se traduisant par la réduction de l'activité générale, pourrait expliquer la légère diminution du poids corporel visible dans les 2 ou 3 jours qui suivent l'injection I.P. de l'extrait aqueux, les animaux restant blottis dans un coin de la cage et ne s'alimentant pas.

L'apparition de contractions abdominales n'est observée qu'après traitement par voie I.P. et semble donc liée à ce mode d'administration. Toutefois, ces phénomènes ne se manifestant pas immédiatement, mais environ un quart d'heure après l'injection et persistant approximativement durant 4 heures, la présence d'un ou plusieurs constituants ou de métabolites issus de leur dégradation pourrait être incriminée.

Si l'on tente d'établir une corrélation avec l'homme, la DL 50 aiguë obtenue après injection I.P., soit 8,82 g/kg, et la dose maximale non toxique testée par voie orale, soit 9 g/kg, correspondraient respectivement à l'administration de 617 g et 630 g de plante sèche pour un homme de 70 kg, quantités nettement supérieures aux doses employées en thérapeutique.

En effet, de récents travaux effectués sur un décocté lyophilisé des parties aériennes d'E. hirta, dans le cadre d'un traitement clinique d'amibiases intestinales (Dalil, 1984), ont pu démontrer, non seulement son efficacité, mais également sa bonne tolérance, suite à l'administration orale de 300 g de poudre végétale (soit 30 g de lyophilisat) sur une durée totale de 3 jours et aux doses journalières de 100 g de poudre (10 g de lyophilisat). Selon l'auteur, cette posologie quotidienne correspondrait à celle employée par les tradipraticiens.

En fait, cette absence de toxicité aiguë aux doses couramment prescrites, démontrée chez la souris après l'administration I.P. ou orale de l'extrait aqueux d'E. hirta, ne fait que confirmer les études précédemment réalisées sur différents animaux (rats, souris, cobayes, lapins...), avec différentes préparations (aqueuses, hydro-alcooliques ou alcooliques) administrées en aiguë ou en chronique (troisième partie, section A).

De tels résultats ne sont pas étonnants, si l'on considère la grande notoriété de cette plante, largement prescrite en médecine traditionnelle pour de très nombreuses indications (deuxième partie, section A), mais également utilisée actuellement en clinique pour le traitement des dysentéries amibiennes ; cet usage clinique a, par ailleurs, permis de confirmer la bonne tolérance des extraits administrés en chronique et par voie orale (troisième partie, section A).

*QUATRIEME PARTIE*

*ETUDE CHIMIQUE*



Si la toxicité d'E. hirta a suscité l'intérêt de nombreux auteurs (troisième partie), notamment en raison de la présence d'un suc laiteux ou latex, caractéristique des Euphorbiaceae et pouvant contenir divers principes toxiques (diterpènes, euphorbone...), différents travaux ont également été menés, afin d'isoler et d'identifier non seulement ces éventuelles substances toxiques, mais aussi divers autres composés ou groupes chimiques susceptibles d'être responsables des activités pharmacologiques.

Les premières études chimiques importantes effectuées date- raient du début du 20ème siècle, avec notamment les travaux de Power et Browning (1913).

Par la suite, si quelques recherches isolées et fragmentaires ont été réalisées, visant à isoler et à identifier un ou quel- ques composés donnés (Hallet et Parks, 1951 - Takemoto et Inagaki, 1958), ou encore à rechercher la présence de groupes chimiques susceptibles de présenter une certaine activité pharmacologique ou une certaine toxicité, tels que les alcaloïdes (Ueda et Hsu, 1949 - Debaille et Pétard, 1953 - Arthur, 1954) et les dérivés cyanogénétiques (Juliano, 1923 - Quisumbing, 1947), il faut attendre les années 1960 pour retrouver un certain regain d'intérêt à l'égard d'E. hirta.

A partir de cette époque et jusqu'à nos jours, les travaux se sont multipliés. Si quelques études importantes et relativement complètes ont été effectuées, notamment sur la présence et l'identification des polyphénols (Blanc et coll., 1968, 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971), des triterpènes (Ponsinet et Ourisson, 1968 - Atallah et Nicholas, 1972 - Anton, 1974 - Baslas et Agarwal, 1980), des acides aminés (Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971 - Afria et Mukherjee, 1981), des glucides (Ndir et Pousset, 1982) et des acides organiques (Afria et Mukherjee, 1981 - Ndir et Pousset, 1982 - Gupta et Garg, 1965), très souvent, il s'agit de travaux non axés sur l'étude d'un groupe chimique particulier, mais sur la caracté- risation de familles chimiques diverses.

Devant l'importance des études précédemment entreprises par les auteurs, tant au niveau des composés recherchés que des techniques utilisées, nous nous sommes limités à faire l'inventaire des différents groupes chimiques étudiés et des substances identifiées et isolées dans les différentes parties de la plante (plante entière : PE ; parties aériennes PA ; non déterminé : ND ; feuilles : F ; fleurs : FL ; tiges : T et racines : R) (section A).

Dans un second temps (section B), nous nous sommes attachés à vérifier la présence des différents groupes chimiques principaux précédemment mis en évidence (section A) et ceci sur les extraits végétaux d'E. hirta préparés par nos soins et utilisés pour l'étude pharmacologique.

*SECTION A*

*ETUDES CHIMIQUES*

*ANTERIEURES*

**COMPOSES CHIMIQUES**

**ORGANES**

**REFERENCES**

**I POLYPHENOLS**

**I - 1 TANINS**

* tanins pyrogalliques	PA	Ridet et Chartol, 1964
* tanins catéchiques (traces)	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
* tanins galliques (traces)	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971

**I - 2 ACIDES PHENOLS**

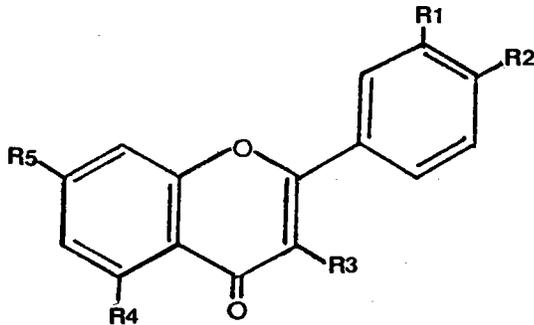
* acide ellagique	PE	Power et Browning, 1913 - Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
	FL	Gupta et Garg, 1966
* acide gallique	PE	Power et Browning, 1913 - Greenway, 1941 - Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui- Sannes, 1971
* acide chlorogénique	PE	Blanc et coll., 1968,1971 (de) Saqui-Sannes, 1971
* acide caféique	PE	Blanc et coll., 1968,1971 (de) Saqui-Sannes, 1971

**I - 3 COMPOSES FLAVONIQUES**

La teneur en composés flavoniques a pu être évaluée à 0,4 %, par De Saqui-Sannes (1971).

* quercétol (quercétine)	PE	Power et Browning, 1913 - Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
-----------------------------	----	--

* kaempférol	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
* quercitrine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
	ND	Hallett et Parks, 1951
* chlorogényl-3-rhamnoside quercétol	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
* xanthorhamnine (teneur : 0,2 % )	ND	Ueda et Hsu, 1949 - Karrer, 1958



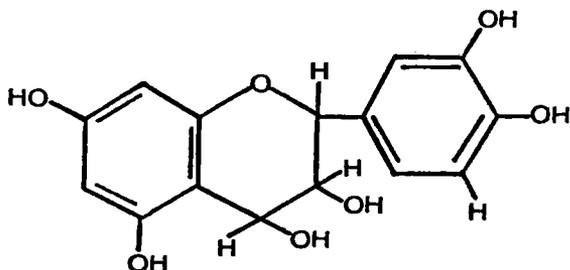
Structure générale

	: R1 :	R2 :	R3	: R4 :	R5 :
: quercétol	:	:	:	:	:
: (quercétine)	: OH :	OH :	OH	: OH :	OH :
: kaempférol	: H :	OH :	OH	: OH :	OH :
: quercitrine	: OH :	OH :	O-rhamnose	: OH :	OH :
: chlorogényl-3-	:	:	O-rhamnose	:	:
: rhamnoside	: OH :	OH :	acide chloro-	: OH :	OH :
: quercétol	:	:	génique	:	:
: xanthorhamnine	: OH :	OH :	O-rhamnose	: OH :	O-CH <sub>3</sub> :
:	:	:	:	:	:

I - 4 LEUCOANTHOCYANES - ANTHOCYANES

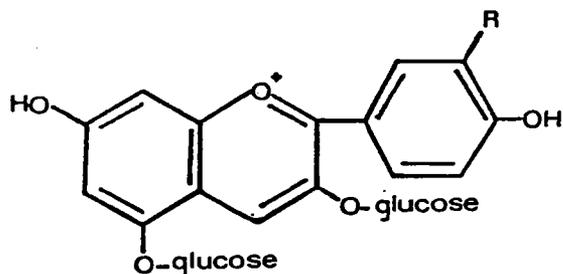
\* leucocyanidol  
(0,35 %)

PE Blanc et coll., 1971  
(de) Saqui-Sannes, 1971



\* anthocyanosides

R Baslas et Agarwal, 1980  
F Veeranjanyulu et Das,  
1982



	: R :
:cyanidine-3-5-diglucoside	: OH :
-----	-----
:pélargonidine-3-5-diglucoside	: H :
_____	_____

Remarque : Les anthocyanosides ont été trouvés dans les feuilles pourpres d'E. hirta, ces dernières se développant lorsque la plante croît sur un sol à faible taux d'humidité et exposé à de fortes radiations.

I - 5 DERIVES DE LA BENZO PYRONE

En 1971, De Saqui-Sannes isole, à partir de la plante entière (PE), une substance non identifiée et pouvant correspondre à un dérivé coumarinique, certainement différent d'une ombelliférone (hydroxy-7-coumarine).

## II DERIVES TERPENIQUES

### II - 1 MONOTERPENES

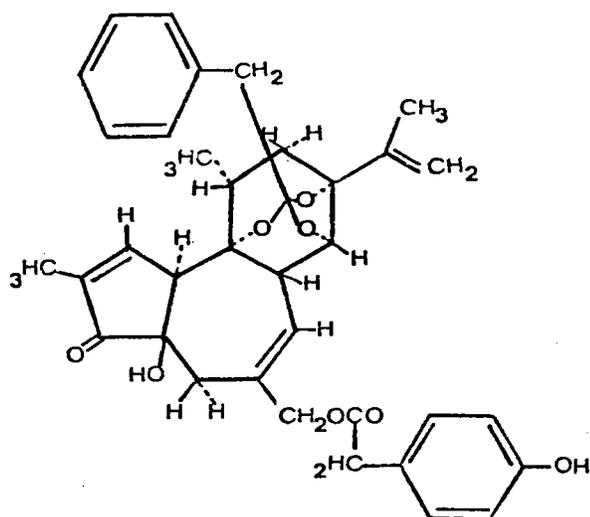
En 1913, Power et Browning isolent une huile essentielle, à l'état de traces (3,7 g obtenus à partir de 20,07 kg de plante entière sèche).

Par contre, Arthur (1954) en mentionne l'absence, dans la plante entière fraîche.

### II - 2 DITERPENES

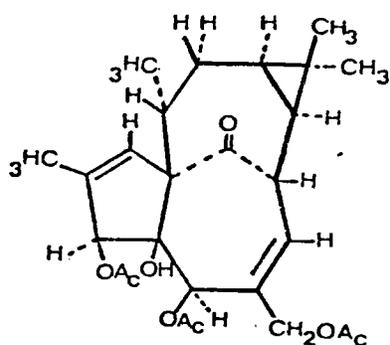
\* tinyatoxine  
(C<sub>36</sub> H<sub>38</sub> O<sub>8</sub>)

PA Baslas et Agarwal, 1980



\* ingénol triacétate  
(C<sub>26</sub> H<sub>34</sub> O<sub>8</sub>)

PA Baslas et Agarwal, 1980  
R

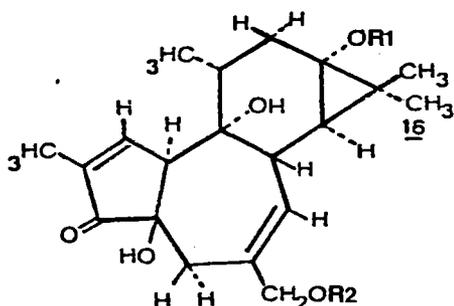


**\* dérivés du phorbol**

- 12-déoxy-4β-hydroxyphorbol-13-phénylacétate-20-acétate (C30 H36 O7) PA Baslas et Agarwal, 1980

- 12-déoxy-4β-hydroxyphorbol-13-dodécanoate-20-acétate (C34 H52 O7) PA R Baslas et Agarwal, 1980

- 12-déoxyphorbol-13-phénylacétate-16-O-α-méthylbutyrate-20-acétate (C33 H43 O8) R Baslas et Agarwal, 1980

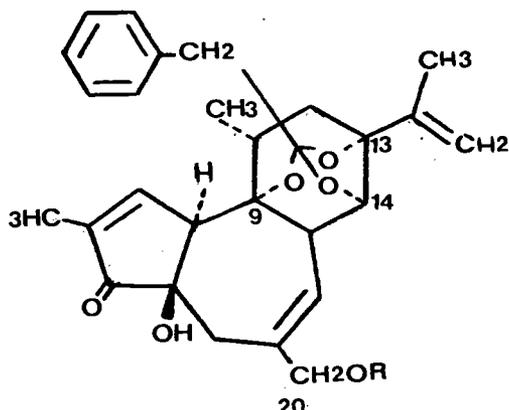


Structure générale

	R1	R2
: 12-déoxy-4β-hydroxyphorbol-13-phénylacétate-20-acétate	: CO-CH2-C6H5	: CO-CH3
: 12-déoxy-4β-hydroxyphorbol-13-dodécanoate-20-acétate	: CO-(CH2)10-CH3	: CO-CH3
: 12-déoxyphorbol-13-phénylacétate-16-O-α-méthylbutyrate-20-acétate	: CO-CH2-C6H5	: CO-CH3
:	: en C16 : substitution de CH3 par un groupe O-α-méthylbutyrate	:

**\* dérivé du réséniféronol**

20-O-acétylréséniféronol-9,13,14-orthophényl acétate R Baslas et Agarwal, 1980



Structure des esters du réséniféronol (Evans et Taylor, 1983)

Remarque : Evans et Taylor (1983) mentionnent, quant à eux, l'absence de diterpènes chez E. hirta.

## II - 3 TRITERPENES

\*  $\alpha$  amyryne

T et F Atallah et Nicholas, 1972

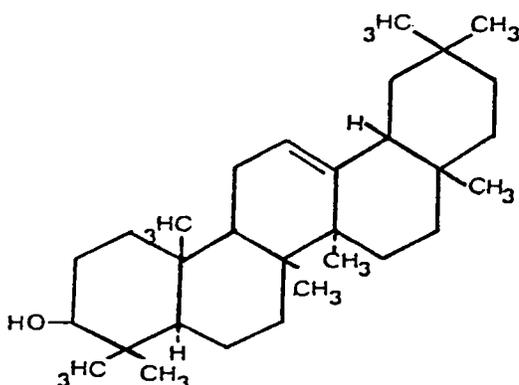
\*  $\beta$  amyryne

PA Baslas et Agarwal, 1980

T Gupta et Garg, 1966

T et F Atallah et Nicholas, 1972

L Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974



Structure générale

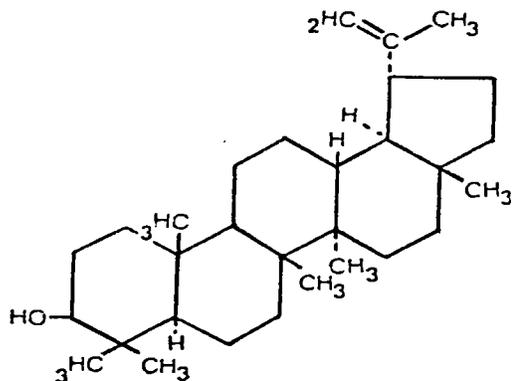
(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)

Remarque : En 1972, Atallah et Nicholas isolent l' $\alpha$  et la  $\beta$  amyrynes, sous leur forme estérifiée uniquement et dans un rapport 10/1.

\* lupéol

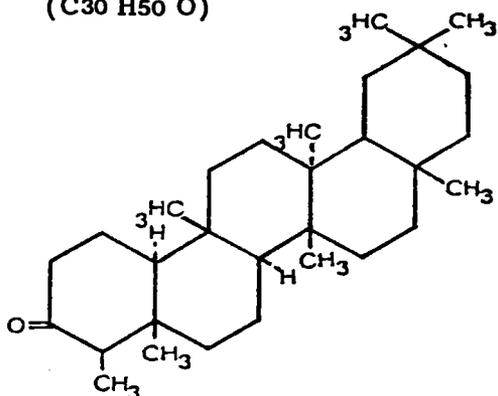
(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)

L Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974



\* friédeline  
(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)

T Gupta et Garg, 1966

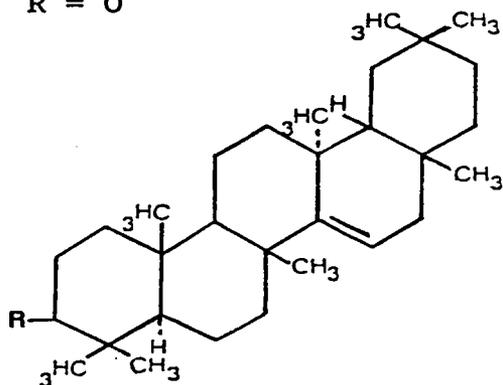


\* taraxérol  
(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)  
R = OH

PE Takemoto et Inagaki, 1958  
T Gupta et Garg, 1966  
T et F Atallah et Nicholas, 1972

\* taraxérone  
(C<sub>30</sub> H<sub>48</sub> O)  
R = O

PE Takemoto et Inagaki, 1958  
T et F Atallah et Nicholas, 1972



Structure générale

Remarques : En 1954, Arthur mentionne l'absence de triterpènes, dans la plante entière.

Selon certains auteurs, la plante entière ((de) Saqui-Sannes, 1971) ou les parties aériennes (Ridet et Chartol, 1964) contiendraient des saponosides formés de pentoses (rhamnose) et d'une génine triterpénique. Par contre, Arthur (1954) affirme l'absence de saponines, dans la plante entière.

## II - 4 POLYTERPENES

En 1964, Ridet et Chartol isolent, à partir de la plante entière fraîche, une substance jaune-pâle qu'ils nomment "caoutchouc" (point de fusion : 77°C).

## II - 5 STEROLS

### \* euphorbol

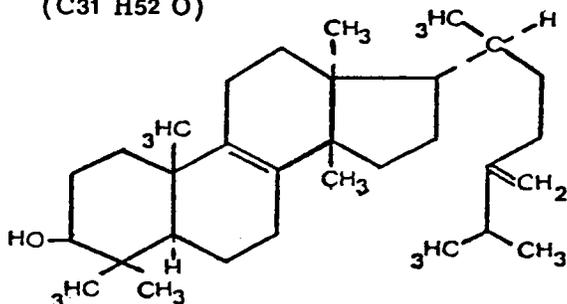
(C<sub>31</sub> H<sub>52</sub> O)

PA

Baslas et Agarwal, 1980

L

Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974

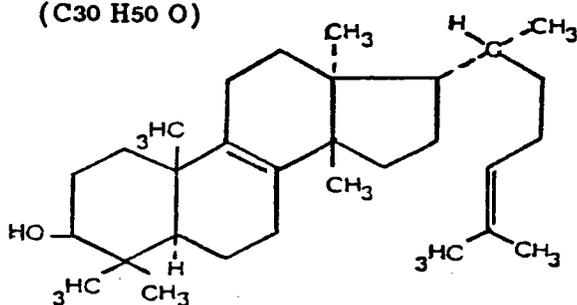


### \* euphol

(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)

L

Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974



### \* cycloarténol

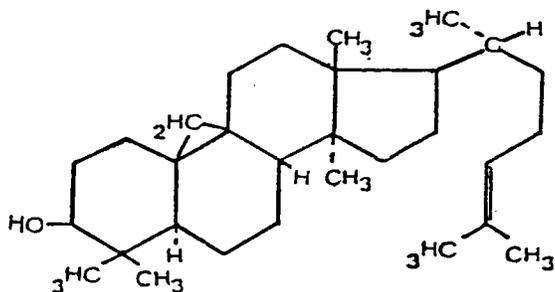
(C<sub>30</sub> H<sub>50</sub> O)

PA

Baslas et Agarwal, 1980

L

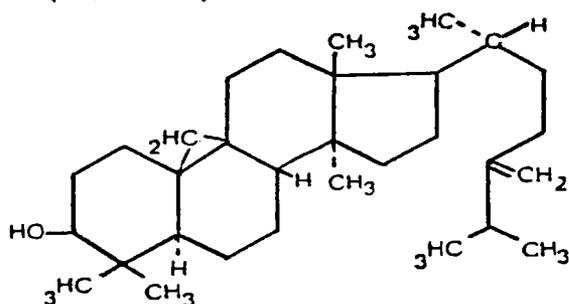
Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974



\* méthylène-24-cycloartanol  
(C<sub>31</sub> H<sub>52</sub> O)

PA  
L

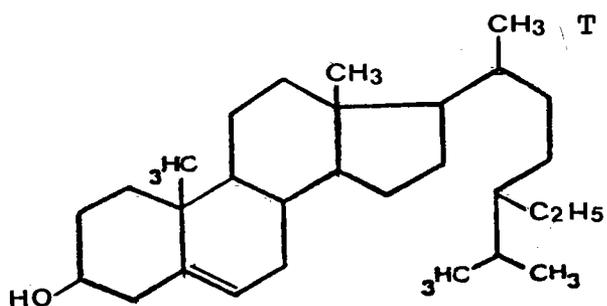
Baslas et Agarwal, 1980  
Ponsinet et Ourisson,  
1968 - Anton, 1974



\* β sitostérol  
(C<sub>29</sub> H<sub>50</sub> O)

PA  
T

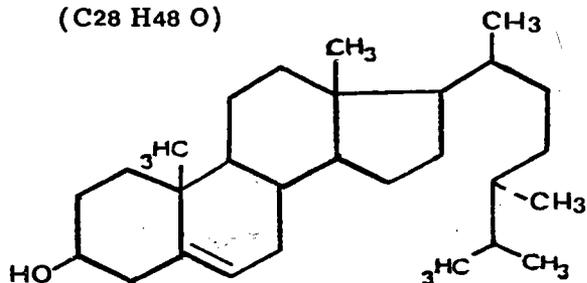
Baslas et Agarwal, 1980  
Gupta et Garg, 1966  
Atallah et Nicholas, 1972



\* campestérol  
(C<sub>28</sub> H<sub>48</sub> O)

T et F

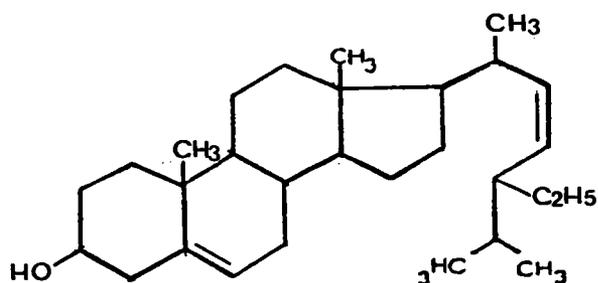
Atallah et Nicholas, 1972



\* stigmastérol  
(C<sub>29</sub> H<sub>48</sub> O)

T et F

Atallah et Nicholas, 1972



Remarques : En 1913, Power et Browning isolent de l'euphostérol (C<sub>25</sub> H<sub>39</sub> OH), un phytostérol et une phytostéroline, à partir de la fraction insoluble dans l'eau d'un extrait alcoolique de la plante entière.

Selon Takemoto et Inagaki (1958), cet euphostérol correspondrait au taraxérol.

En 1964, Ridet et Chartol isolent une euphorbone (mélange d'euphols et d'euphorbols) ou un isomère, ainsi qu'un euphorborésène, à partir de la plante entière.

Une euphorbone a également été mise en évidence dans le latex (Githens, 1949, auteur mentionné par Watt et Breyer-Brandwijk, 1962).

En 1972, Atallah et Nicholas mentionnent l'absence d'euphol, d'euphorbol, de cycloarténol et de méthylène-24-cycloartanol, dans les tiges et les feuilles de la plante.

Ces mêmes auteurs isolent le  $\beta$  sitostérol, le campestérol et le stigmastérol, sous leurs formes libre et estérifiée, aux taux respectifs de 70, 20 et 10 %.

La présence de substances stéroïdiques non identifiées, dans la plante entière, est mentionnée par divers auteurs (Blanc et coll., 1963 - (de) Saqui-Sannes, 1971). Par contre, Arthur (1954) en constate l'absence.

D'après sa composition en triterpènes et en stérols, le latex d'E. hirta serait de type C<sub>2</sub>, caractérisé par la présence de constituants majeurs (cycloarténol (25 %) et méthylène-24-cycloartanol (25 %)) et de constituants mineurs ( $\beta$  amyryne et lupéol, 50 % au total) (Ponsinet et Ourisson, 1968 - Anton, 1974).

### III ACIDES ORGANIQUES

* acide glyoxylique	F	Afria et Mukherjee, 1981
* acide pyruvique	F	Afria et Mukherjee, 1981
* acide lactique	PE	Ndir et Pousset, 1982
* acide fumarique	T et F	Gupta et Garg, 1965
* acide succinique	T et F	Gupta et Garg, 1965
* acide malique	PA	Ridet et Chartol, 1964
* acide tartrique	PE	Ndir et Pousset, 1982
	PA	Ridet et Chartol, 1964
* acide shikimique	PE	Ndir et Pousset, 1982
	PA	El Naggar et coll., 1978

Remarque : En 1982, Ndir et Pousset signalent la présence, dans la plante entière, d'un autre acide organique non identifié de façon certaine et hésitent entre l'acide oxalique et l'acide maléique.

### IV ACIDES ET ALCOOLS ALIPHATIQUES

#### IV - 1 ACIDES ALIPHATIQUES SATURES

* acide palmitique	PE	Power et Browning, 1913
* acide mélassique (C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub> )	PE	Power et Browning, 1913

#### IV - 2 ACIDES ALIPHATIQUES INSATURES

* acide linoléique	PE	Power et Browning, 1913
* acide oléique	PE	Power et Browning, 1913

#### IV - 3 ALCOOLS ALIPHATIQUES

* alcool cérylique	PE	Power et Browning, 1913
(1-hexacosanol) (C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O)	PA	Baslas et Agarwal, 1980
* alcool myricylique (C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O)	T	Gupta et Garg, 1966
* jambulol (C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> (OH) <sub>5</sub> )	PE	Power et Browning, 1913

**V CARBURES ALIPHATIQUES SATURES**

- \* triacontane (C<sub>30</sub> H<sub>62</sub>) PE Power et Browning, 1913
- \* hentriacontane (C<sub>31</sub> H<sub>64</sub>) T Gupta et Garg, 1965

**VI ACIDES AMINES ET DERIVES AMINES**

**VI - 1 ACIDES AMINES**

**1.1 Acides aminés aliphatiques**

- \* glycocolle PE Blanc et coll., 1971 -  
(de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981
- \* α alanine PE Blanc et coll., 1971 -  
(de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981
- \* valine PE (de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981
- \* leucine PE Blanc et coll., 1971 -  
(de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981
- \* isoleucine PE (de) Saqui-Sannes, 1971
- \* acide aspartique PE Blanc et coll., 1971 -  
(de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981
- \* asparagine F Afria et Mukherjee, 1981
- \* acide glutamique PE Blanc et coll., 1971 -  
(de) Saqui-Sannes, 1971  
F Afria et Mukherjee, 1981

* glutamine	F	Afria et Mukherjee, 1981
* sérine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
	F	Afria et Mukherjee, 1981
* thréonine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
* lysine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
* arginine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
	F	Afria et Mukherjee, 1981
* histidine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971
	F	Afria et Mukherjee, 1981
* acide $\gamma$ aminobutyrique	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
	F	Afria et Mukherjee, 1981
* cystine	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
* cystéine	F	Afria et Mukherjee, 1981
* méthionine	PE	Blanc et coll., 1971 - (de) Saqui-Sannes, 1971

## 1.2 Acides aminés aromatiques

* proline	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
* phénylalanine	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
	F	Afria et Mukherjee, 1981
* tyrosine	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971
* L-tryptophane	PE	(de) Saqui-Sannes, 1971

## VI - 2 ALCOOLS AMINES

- |                |    |                          |
|----------------|----|--------------------------|
| * éthanolamine | PE | (de) Saqui-Sannes, 1971  |
| * choline      | PA | El Naggar et coll., 1978 |

## VII GLUCIDES

### VII - 1 SUCRES SIMPLES

- |             |    |   |
|-------------|----|---|
| * xylose    | PE | Ridet et Chartol, 1964                          |
| * galactose | PE | Blanc et coll., 1963                            |
| * glucose   | PE | Ridet et Chartol, 1964<br>Ndir et Pousset, 1982 |
| * lévulose  | PE | Blanc et coll., 1963                            |

### VII - 2 ITOLS

- |              |    |                          |
|--------------|----|--------------------------|
| * adonitol   | PE | Ndir et Pousset, 1982    |
| * l-inositol | PE | Ndir et Pousset, 1982    |
| (1-inositol) | PA | El Naggar et coll., 1978 |
|              | ND | Hallett et Parks, 1951   |
| * sorbitol   | PE | Ndir et Pousset, 1982    |

### VII - 3 OSIDES

- |             |    |                        |
|-------------|----|------------------------|
| * raffinose | PE | Ridet et Chartol, 1964 |
|-------------|----|------------------------|

Remarques : La présence de sucres, dans la plante entière, est mentionnée dès 1913, par Power et Browning qui obtiennent une matière glucosidique amorphe et un sucre lévogyre (probablement du lévulose pour l'essentiel).

Ridet et Chartol (1964) isolent également un composé non identifié (en faible quantité) qui serait un polyholoside ou un sucre méthylé. Les auteurs évaluent la

teneur en sucres (exprimée en glucose) à 1,3 g/kg de plante fraîche.

### **VIII COMPOSES MINERAUX**

En 1971, De Saqui-Sannes met en évidence, dans la plante entière, la présence de sodium, de potassium, de magnésium, de calcium, de titane, d'aluminium, de fer, de cuivre, de nickel, de zinc, de plomb, de vanadium, de molybdène et de silicium.

### **IX DERIVES CYANOGENETIQUES**

La présence de composés cyanogénétiques est mentionnée par Juliano en 1923 (dans les feuilles et les tiges, à l'état de traces, ainsi que dans les racines) et par Quisumbing en 1947 (dans les organes végétaux et reproducteurs). Toutefois, cette présence est contestée par Arthur (1954) et par De Saqui-Sannes (1971).

### **X ALCALOIDES**

La présence d'alcaloïdes est également très controversée, certains auteurs en ayant décelé de très faibles quantités, dans la plante entière (Power et Browning, 1913 - Ueda et Hsu, 1949 - Blanc et coll., 1963), tandis que d'autres en mentionnent l'absence (Debaille et Pétard, 1953 - Arthur, 1954 - Ridet et Chartol, 1964 - (de) Saqui-Sannes, 1971).

*SECTION B*

*TRAVAUX PERSONNELS*

La finalité de cette étude consiste à confirmer la présence des différents groupes chimiques précédemment mis en évidence par divers auteurs (section A), pour différents extraits d'E. hirta (aqueux, hydro-alcooliques et alcooliques...).

Cette recherche a été menée sur les extraits aqueux préparés en 1984, 1985, 1986 et 1987, à partir d'un même lot de plante sèche reçu en 1984, et utilisés au cours de l'étude pharmacologique (cinquième partie), permettant ainsi d'établir et de comparer les profils chimiques obtenus au moyen de réactions d'identification caractéristiques et d'études chromatographiques.

## **I RECHERCHE DES POLYPHENOLS**

### **I - 1 TANINS**

Dans les plantes, ces polyphénols non azotés peuvent exister sous forme complexée (tanoïdes) ou combinés à des sucres (tanozides). Très souvent, ils sont répartis en deux groupes principaux :

- \* **Les tanins galliques** (esters d'acides phénols hydrolysables)
- \* **Les tanins catéchiques** (tanins condensés non hydrolysables)

De par leur caractère hydrosoluble, leur présence dans les différents extraits aqueux d'E. hirta n'est pas exclue.

Leur précipitation peut être obtenue par des sels de métaux lourds ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ). Par contre, le réactif de Stiasny ne précipite que les tanins catéchiques.

#### **1.1 Procédure expérimentale**

La présence de tanins galliques et catéchiques est recherchée à l'aide de différentes réactions de précipitation.

### 1.1.1 Recherche des tanins catéchiques et galliques

#### Réactif au chlorure ferrique :

A 5 ml de solution aqueuse à 5 % d'extrait végétal, on ajoute un ml de solution aqueuse à 1 % de chlorure ferrique.

La présence de tanins est indiquée par l'apparition d'un précipité verdâtre ou bleu-noir.

#### Réactif de Stiasny :

A 30 ml de la solution aqueuse à 5 % d'extrait, on ajoute 10 ml de réactif de Stiasny (formol à 30 % - acide chlorhydrique concentré ; 2V/1V). L'ensemble est porté au bain-marie, à une température de 80°C, pendant une demi-heure.

L'apparition de flocons roses indique la présence de tanins catéchiques.

### 1.1.2 Recherche des tanins galliques

Par filtration de la solution précédente, le précipité (flocons roses) est éliminé. Le filtrat est alors saturé par de l'acétate de sodium pulvérisé. Après addition de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1 %, le développement d'une coloration bleu-noir indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

## 1.2 Résultats

En présence de chlorure ferrique à 1 %, une coloration bleu-noir apparaît.

En présence d'acide chlorhydrique concentré, un précipité rouge est obtenu.

L'addition du réactif de Stiasny provoque la formation d'un précipité rose, tandis que le filtrat se teinte en bleu-noir, après l'ajout de chlorure ferrique à 1 %.

L'ensemble de ces résultats indique donc la présence de tanins galliques et catéchiques dans les extraits aqueux d'E. hirta.

## I - 2 ACIDES PHENOLS ET COMPOSES FLAVONIQUES

### 2.1 Procédure expérimentale

La présence d'acides phénols libres et de composés flavoniques est recherchée par chromatographie sur couche mince (C.C.M.).

De plus, les composés flavoniques sont également caractérisés par la réaction à la cyanidine.

#### **Réaction à la cyanidine :**

A 5 ml de solution aqueuse à 5 % d'extrait, on ajoute 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95° - eau distillée - acide chlorhydrique concentré, à parties égales en volume), puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique.

L'apparition d'une coloration rose-orangé (flavones), rose-violacé (flavanones), ou rouge (flavonols, flavononols), dans la couche surnageante d'alcool isoamylique, indique la présence de flavonoïdes libres ou génines.

#### **Chromatographie sur couche mince :**

##### - Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

##### - Solvant de migration :

Acétate d'éthyle - butanone - acide formique - eau (50:30:10:10 V/V).

##### - Révéléateur :

Solution d'ester éthylamino-diphényl borique à 1 % dans le méthanol (réactif de NEU).

##### - Solutions analysées :

Extraits : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

Témoins : 10 mg d'acides chlorogénique, caféique, gallique (Sarsynthèse), de rutine (Merck), de kaempférol (Fluka) et de quercétine (Sarsynthèse) dans 2 ml de pyridine, excepté pour les acides chlorogénique et gallique dissous dans 2 ml d'éthanol.

- Dépôt des échantillons :

10  $\mu$ l de chaque solution à analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque de silice.

- Migration :

Elle est stoppée lorsque le solvant arrive approximativement à 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

Après séchage de la plaque, le réactif de NEU est pulvérisé, puis les chromatogrammes sont observés sous U.V., à une longueur d'onde de 366 nm.

## 2.2 Résultats

### Réaction à la cyanidine :

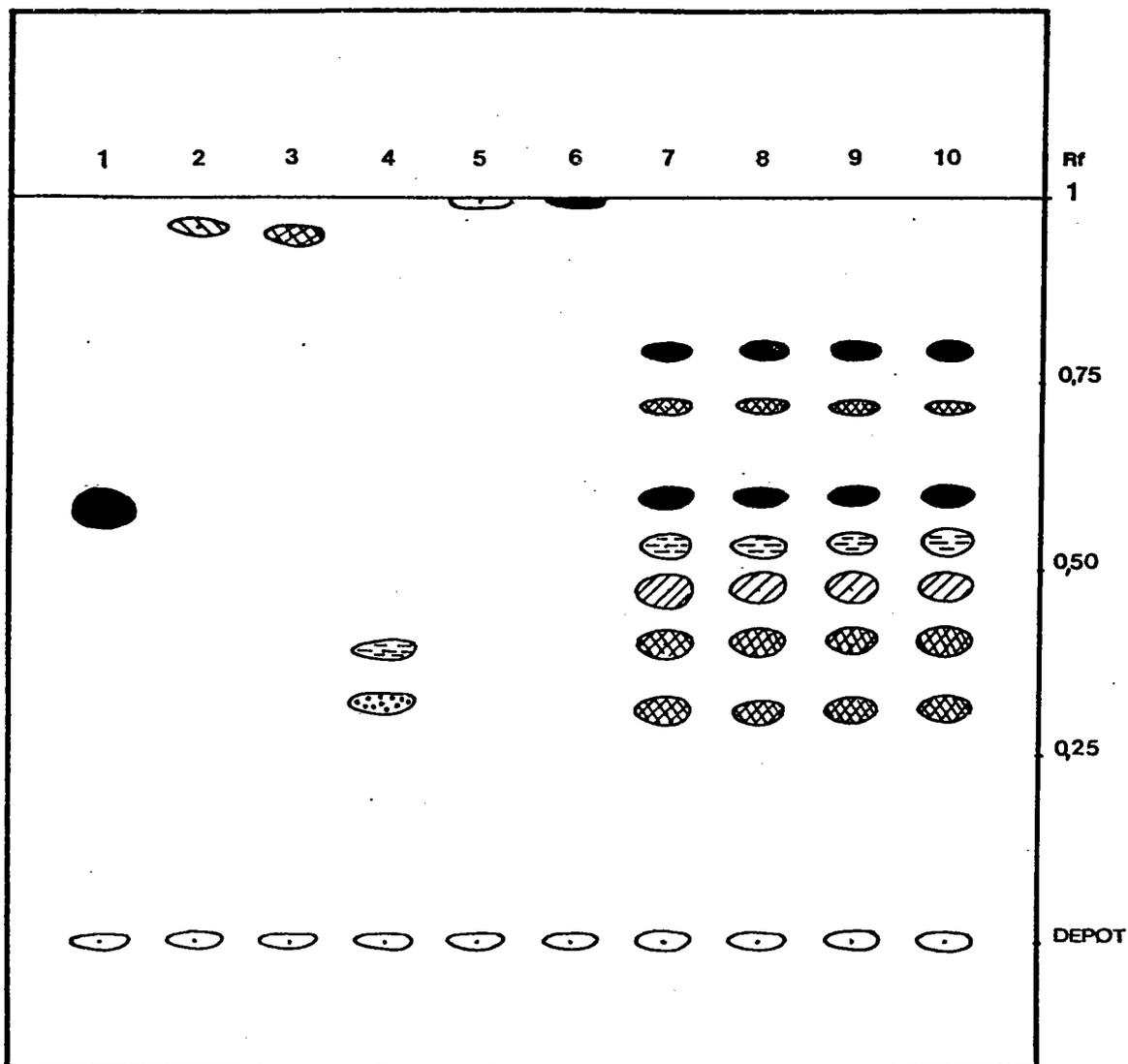
L'apparition d'une coloration rose nous permet de conclure à la présence de composés flavoniques.

### Chromatographie sur couche mince (figure 3) :

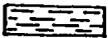
Après révélation par le réactif de NEU, l'observation du chromatogramme sous U.V., à 366 nm, permet de constater la similitude des profils chromatographiques des quatre extraits d'E. hirta (7, 8, 9 et 10). Sept taches sont ainsi visualisées, de teinte marron (Rf : 0,79 et 0,59), bleu-violet (Rf : 0,72 ; 0,40 et 0,31), verdâtre (Rf. 0,53) et bleu-vert (Rf : 0,47).

Les témoins acide chlorogénique (1), acide caféique (2) et acide gallique (3) migrent aux Rf respectifs de 0,58 (tache marron), 0,96 (tache bleu-clair) et 0,95 (tache bleu-violet). Dans le cas de la rutine (4) deux taches sont obtenues aux Rf respectifs de 0,39 (tache verdâtre) et 0,32 (tache orange), tandis que le kaempférol (5) et la quercétine (6) migrent au front du solvant (taches respectives jaune et marron).

Parmi les différents composés présents dans les extraits végétaux, seul l'acide chlorogénique peut être identifié.



1 : ACIDE CHLOROGENIQUE ; 2 : ACIDE CAFEIQUE ;  
3 : ACIDE GALLIQUE ; 4 : RUTINE ; 5 : KAEMPFEROL ;  
6 : QUERCETINE  
7 - 10 : EXTRAITS D'E. HIRTA (1984, 1985, 1986, 1987)

	bleu-clair		jaune
	bleu-vert		orange
	bleu-violet		marron
	verdâtre		

**FIG. 3** : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DES ACIDES PHENOLS ET DES COMPOSES FLAVONIQUES D'E. HIRTA REVELATION PAR LE REACTIF DE NEU.

## I - 3 ANTHOCYANOSIDES

### 3.1 Procédure expérimentale

La présence d'anthocyanosides est recherchée à l'aide d'une réaction acido-basique :

A la solution aqueuse à 5 % d'extrait, on ajoute successivement quelques gouttes d'un acide (acide chlorhydrique), puis d'une base (ammoniaque).

L'accentuation de la coloration ocre naturelle de la solution aqueuse par acidification, puis son virage au bleu-violacé en milieu basique, permet de conclure à la présence d'anthocyanes.

### 3.2 Résultats

Aucune modification dans la coloration des solutions aqueuses d'extrait n'étant observée, nous pouvons conclure à l'absence d'anthocyanes.

## I - 4 DERIVES DE LA BENZO $\alpha$ PYRONE

### 4.1 Procédure expérimentale

La présence de coumarines est recherchée par fluorescence.

Au résidu précédemment obtenu lors de la recherche des composés flavoniques par la réaction à la cyanidine, on ajoute 2 ml d'eau chaude. Après partage en deux de la solution, une partie est additionnée de 0,5 ml d'ammoniaque à 25 %. Après agitation, la solution est observée sous U.V., à 366 nm.

Une fluorescence intense dans l'échantillon contenant de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

### 4.2 Résultats

Sous U.V., à 366 nm, aucune fluorescence n'apparaît pour les différents extraits végétaux testés, indiquant l'absence de coumarines.

## II RECHERCHE DES COMPOSES REDUCTEURS

Cette étude est réalisée par chromatographie sur couche mince, à l'aide d'un réactif général des composés réducteurs, l'anisal-déhyde acide phosphomolybdique en milieu méthanolique.

### II - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

- Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

- Solvant de migration :

Acétate d'éthyle - acide formique - acide acétique - eau  
(68:7:7:18 V/V).

- Révélateur :

anisaldéhyde (Merck)	0,11 ml
acide phosphomolybdique à 10 % dans le méthanol (Prolabo)	0,25 ml
acide sulfurique concentré (Prolabo)	1,13 ml
acide acétique (Prolabo)	2,25 ml
méthanol (Merck)	22 ml.

- Solutions analysées :

Extraits : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

Témoin : 10 mg de  $\beta$  amyryne (Koch-Light Laboratories LTD) dans 2 ml d'éthanol.

- Dépôt des échantillons :

10  $\mu$ l de chaque solution à analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration :

La migration du solvant est stoppée lorsque celui-ci est arrivé à environ 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

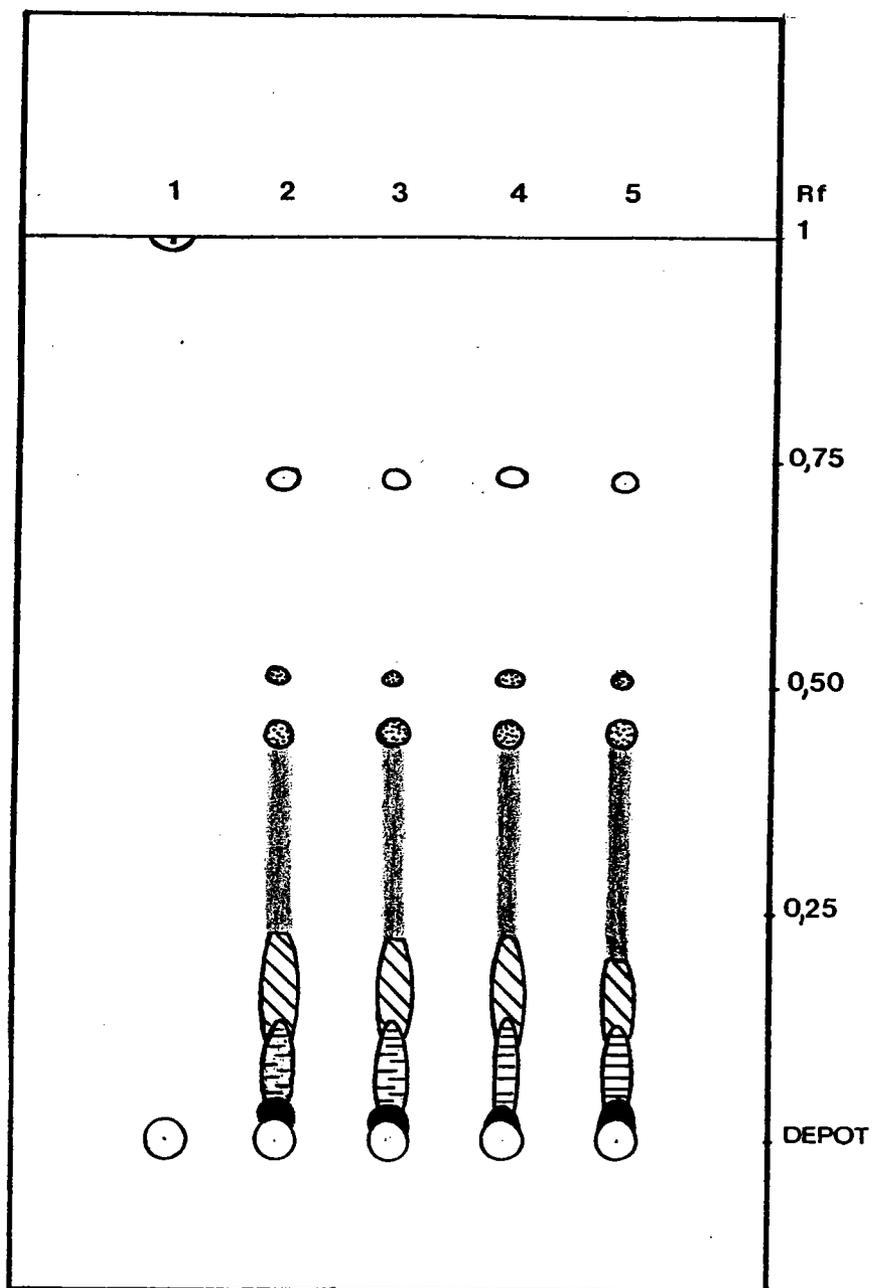
Après séchage de la plaque de silice, le révélateur est pulvé-

risé. La plaque est ensuite placée à l'étuve à 120°C, pendant dix minutes.

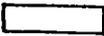
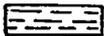
## II - 2 RESULTATS

La révélation par le réactif à l'anisaldéhyde permet l'obtention de profils chromatographiques comparables pour les quatre extraits aqueux d'E. hirta (2, 3, 4 et 5). Six taches sont ainsi visualisées, de teinte jaune (Rf : 0,73), brun-vert (Rf : 0,51 et 0,45), rose (Rf : 0,20), verte (Rf : 0,11) et brun-gris (Rf : 0,01) (figure 4).

Le témoin  $\beta$  amyryne (1), quant à lui, migre au front du solvant. Ce composé ne semble pas présent dans les extraits d'E. hirta.



1 :  $\beta$  AMYRINE  
2 - 5 : EXTRAITS D'E. HIRTA (1984, 1985, 1986, 1987)

	jaune		vert
	brun-vert		brun-gris
	rose		

**FIG. 4** : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DES SUBSTANCES REDUCTRICES D'E. HIRTA REVELATION PAR LE REACTIF A L'ANISALDEHYDE.

### III RECHERCHE DES ACIDES ORGANIQUES

#### III - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

- Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

- Solvant de migration :

Toluène - formiate d'éthyle - acide formique (50:40:10 V/V).

- Révélateur :

Réactif de Schwepp :

solution aqueuse à 10 % de glucose 20 ml

solution éthanolique à 10 % d'aniline 20 ml

n-butanol 80 ml.

- Solutions analysées :

Extraits : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

Témoins : 10 mg d'acides fumarique (Merck), glyoxylique (Pro-labo), lactique à 90 % (Merck), malique (Prolabo), succinique (Merck) et tartrique (Merck) dans 2 ml d'éthanol.

- Dépôt des échantillons :

10 µl de chaque solution à analyser sont déposée à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration :

La migration est stoppée lorsque le solvant est arrivé à environ 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

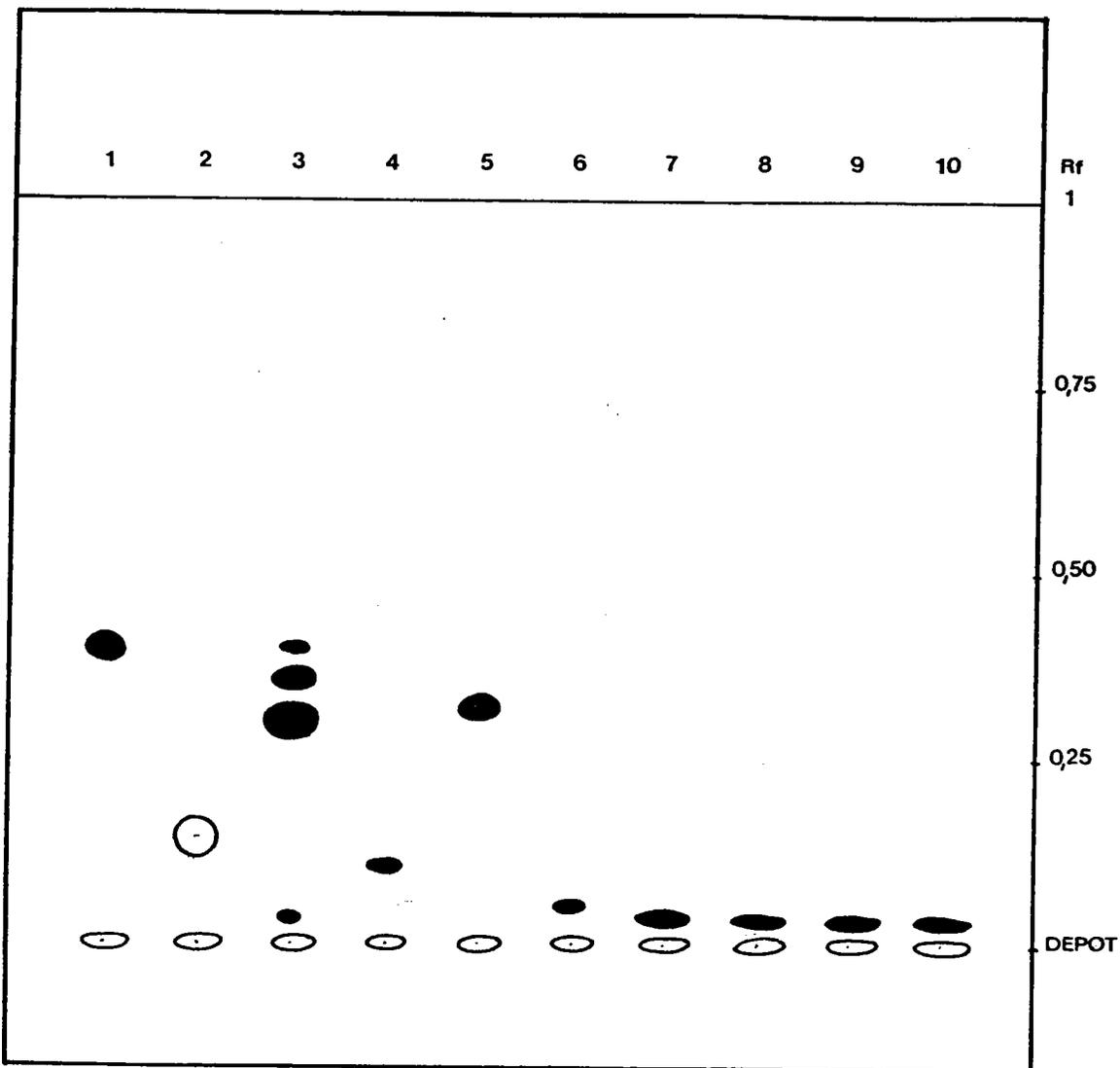
Le réactif de Schwepp est pulvérisé sur la plaque préalablement séchée ; celle-ci est ensuite placée à l'étuve, à une température de 110°C, pendant dix minutes.

### III - 2 RESULTATS

Après révélation par le réactif de Schwepp, les profils chromatographiques obtenus pour chacun des quatre extraits aqueux d'E. hirta sont identiques et caractérisés par la présence d'une tache marron au Rf de 0,03 (figure 5).

Les acides fumarique, glyoxylique, malique, succinique et tartrique migrent, quant à eux, aux Rf respectifs de 0,39 - 0,14 - 0,11 - 0,32 et 0,05. Les taches ainsi obtenues sont de teinte marron, excepté pour l'acide glyoxylique (tache jaune).

Dans le cas de l'acide lactique à 90 %, quatre taches marron sont visualisées (Rf de 0,39 - 0,35 - 0,30 et 0,03). Le composé obtenu au Rf de 0,03 semble correspondre à celui révélé dans les quatre extraits végétaux.



1 : ACIDE FUMARIQUE ; 2 : ACIDE GLYOXYLIQUE ;  
3 : ACIDE LACTIQUE 90 % ; 4 : ACIDE MALIQUE ;  
5 : ACIDE SUCCINIQUE ; 6 : ACIDE TARTRIQUE  
7 - 10 : EXTRAITS D'E. HIRTA (1984, 1985, 1986, 1987)

□ jaune  
■ marron

FIG. 5 : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DES ACIDES ORGANIQUES  
D' E. HIRTA  
REVELATION PAR LE REACTIF DE SCHWEPP.

#### IV RECHERCHE DES ACIDES AMINES

Cette étude est réalisée par chromatographies sur couche mince uni et bidimensionnelles, à l'aide du réactif à la ninhydrine.

##### IV - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

###### 1.1 Chromatographie unidimensionnelle

- Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

- Solvant de migration :

N butanol - acétone - acide acétique - eau (35:35:10:20 V/V).

- Révéléateur :

ninhydrine (Merck)	30 mg
acide acétique (Prolabo)	0,3 ml
n-butanol (Prolabo)	10 ml.

- Solutions analysées :

Extraits : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

Témoin : 10 mg d'acide  $\gamma$  aminobutyrique (Aldrich-Chimie) dans 2 ml d'eau distillée.

- Dépôt des échantillons :

10  $\mu$ l de chaque solution à analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration :

Elle est stoppée lorsque le solvant est arrivé à environ de 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

Le réactif à la ninhydrine est pulvérisé sur la plaque préalablement séchée ; celle-ci est ensuite placée à l'étuve à 120°C, pendant dix minutes.

L'apparition d'une tache rose violacée indique la présence d'acides aminés, excepté pour la proline et l'hydroxyproline

qui se colorent en jaune.

## 1.2 Chromatographie bidimensionnelle

### - Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

### - Solvants :

De première dimension : chloroforme - méthanol - ammoniacque  
17 % (40:40:20 V/V)

De seconde dimension : phénol - eau (75:25 P/V).

### - Révélateur :

ninhydrine (Merck)	30 mg
acide acétique (Prolabo)	0,3 ml
n-butanol (Prolabo)	10 ml.

### - Solutions analysées :

Extrait : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée  
(extrait préparé en 1986).

Témoin : 10 mg d'acide  $\gamma$  aminobutyrique (Aldrich-Chimie) dans 2  
ml d'eau distillée.

### - Dépôt des échantillons :

10  $\mu$ l de chaque solution à analyser sont déposés à 2 cm de la  
base de la plaque.

### - Migration :

Elle est stoppée lorsque le solvant est arrivé à 3 cm du bord  
supérieur de la plaque.

### - Révélation :

Le réactif à la ninhydrine est pulvérisé sur la plaque préala-  
blement séchée ; celle-ci est ensuite placée à l'étuve à 120°C,  
pendant dix minutes.

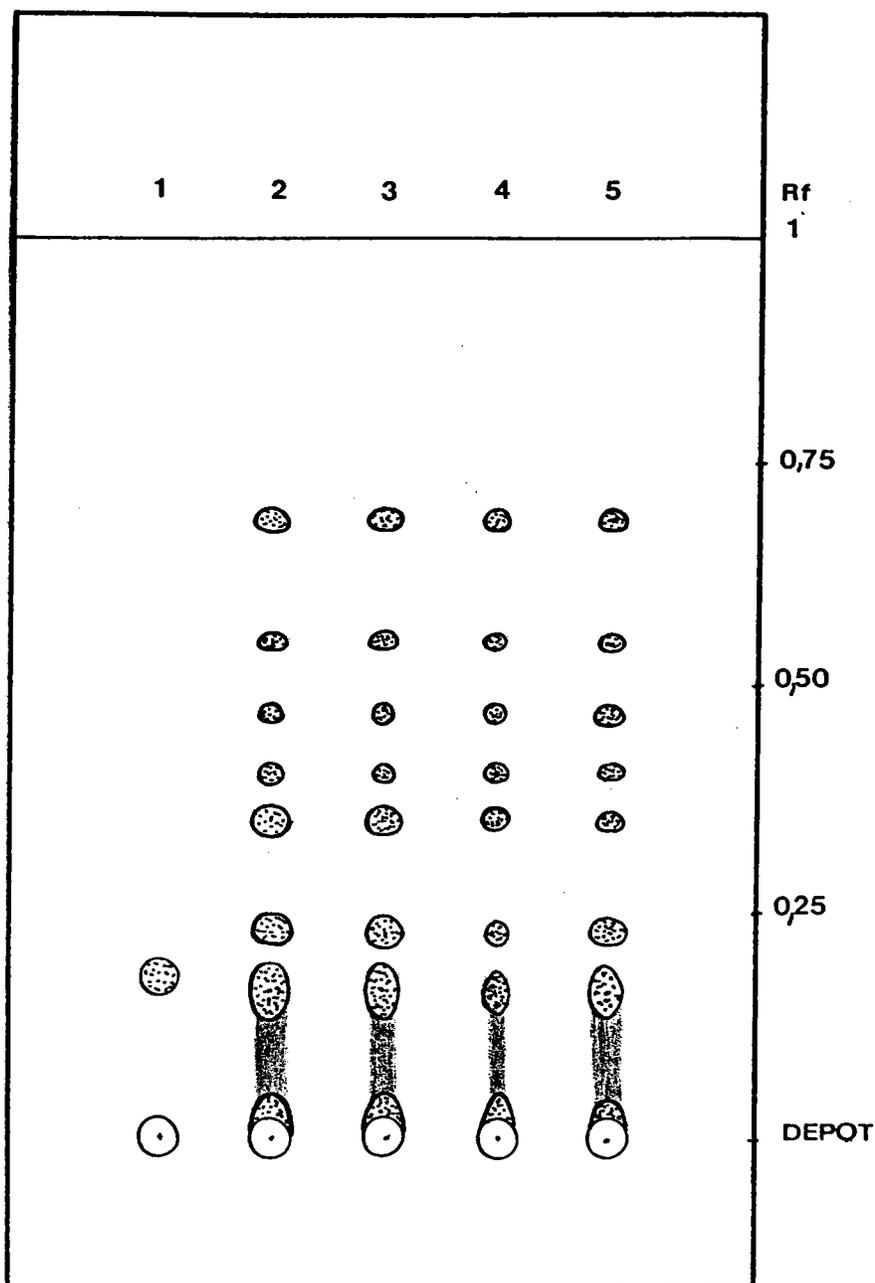
#### IV - 2 RESULTATS

Après révélation par le réactif à la ninhydrine, les profils chromatographiques obtenus pour les quatre extraits d'E. hirta sont tout à fait comparables. Huit taches sont visualisées, aux Rf suivants : 0,69 ; 0,55 ; 0,46 ; 0,41 ; 0,35 ; 0,23 ; 0,16 et 0,05 (figure 6).

Le témoin acide  $\gamma$  aminobutyrique (1) migre au Rf 0,17.

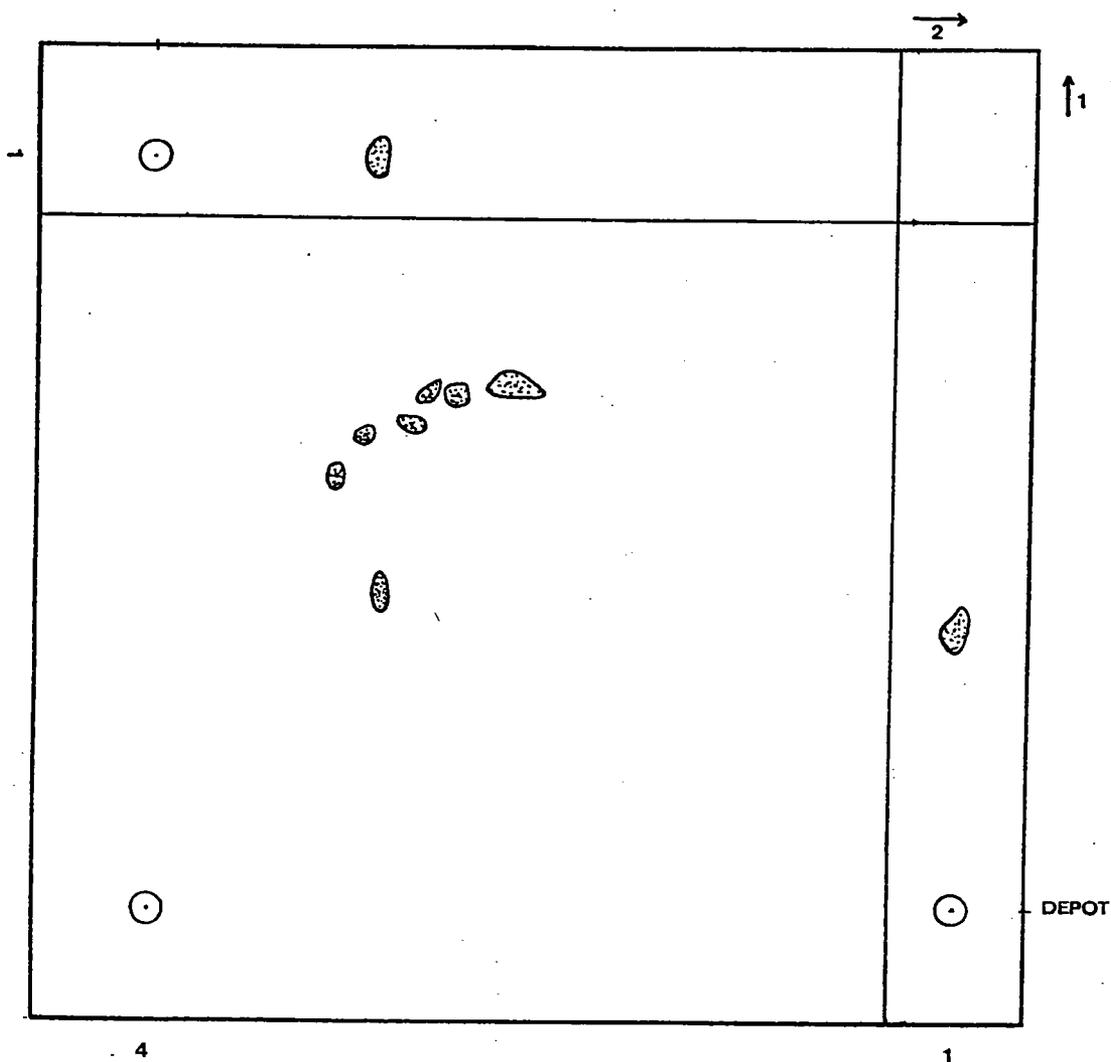
Les chromatogrammes laissent donc entrevoir la présence d'au moins huit acides aminés dont l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, dans les quatre extraits végétaux.

Par chromatographie bidimensionnelle et révélation par la ninhydrine (figure 7), sept taches roses peuvent être individualisées, à partir de l'extrait végétal préparé en 1986 (extrait 4). Parmi ces acides aminés, la présence d'acide  $\gamma$  aminobutyrique précédemment révélée par chromatographie unidimensionnelle (figure 6) peut être confirmée.



1 : ACIDE  $\gamma$  AMINOBUTYRIQUE  
2 - 5 : EXTRAITS D'E. HIRTA (1984, 1985, 1986, 1987)

**FIG. 6** : CHROMATOGRAMME UNIDIMENSIONNEL SUR COUCHE MINCE DES ACIDES AMINES D'E. HIRTA REVELATION PAR LE REACTIF A LA NINHYDRINE.



1 : ACIDE  $\gamma$  AMINOBUTYRIQUE  
4 : EXTRAIT D'E. HIRTA (1986)

FIG. 7 : CHROMATOGRAMME BIDIMENSIONNEL SUR COUCHE MINCE DES ACIDES AMINES D'E. HIRTA REVELATION PAR LE REACTIF A LA NINHYDRINE.

## V RECHERCHE DES GLUCIDES

Cette étude est réalisée par chromatographie sur couche mince, à l'aide du réactif à l'aldéhyde  $\beta$  anisidique.

### V - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

- Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

- Solvant de migration :

Acétate d'éthyle ; mélange isopropanol 2V - eau 1V (65:35 V/V).

- Révélateur :

Réactif à l'aldéhyde  $\beta$  anisidique :

éthanol	9 ml
acide sulfurique concentré	0,5 ml
$\beta$ anisidique (Prolabo)	0,5 ml.

- Solutions analysées :

Extraits : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

Témoins : 10 mg de galactose, lactose, lévulose et glucose (Prolabo) dans 2 ml d'eau distillée.

- Dépôt des échantillons :

10  $\mu$ l de chaque solution à analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration :

Elle est stoppée lorsque le solvant est à environ 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

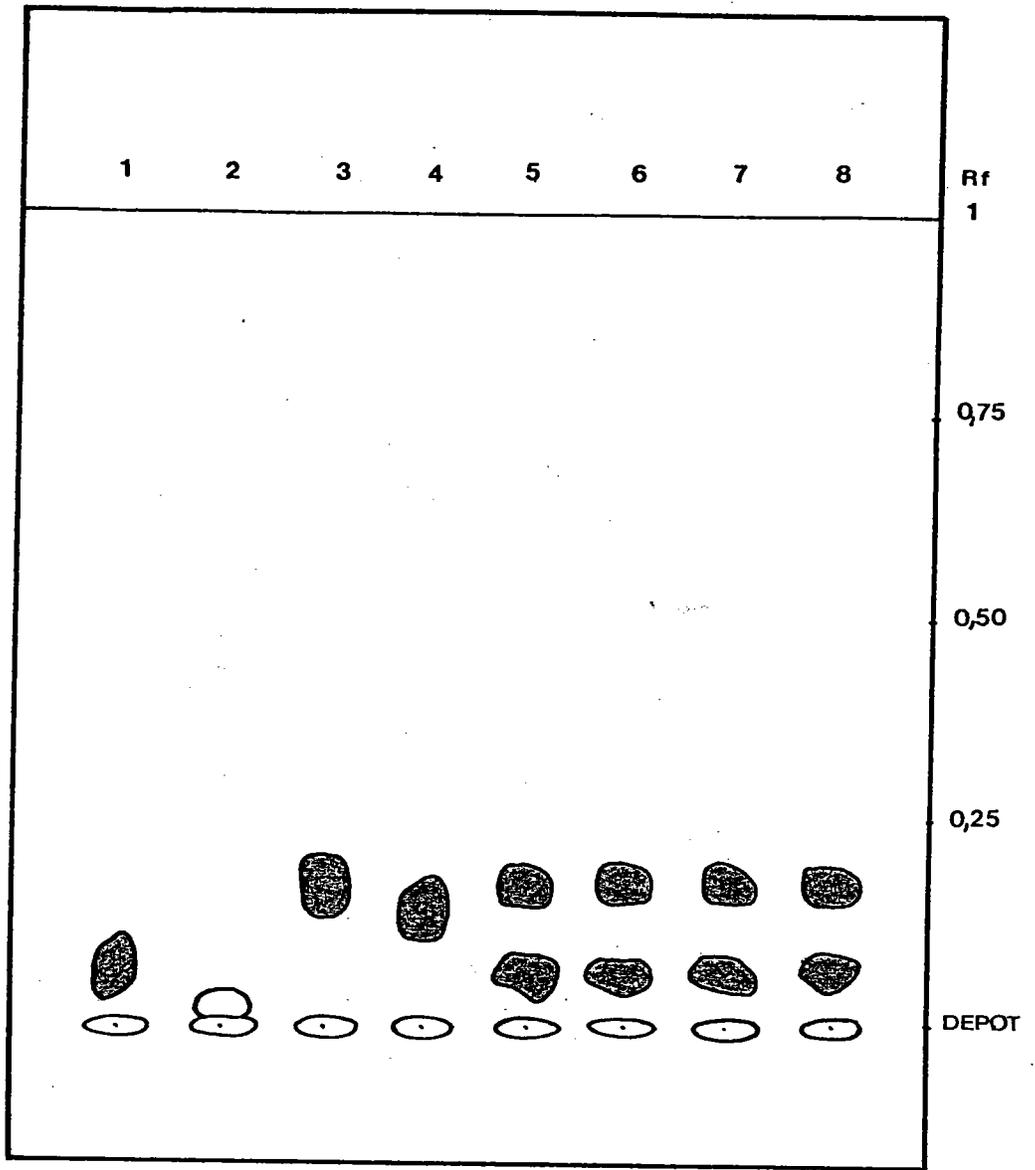
Le révélateur est pulvérisé sur la plaque préalablement séchée. celle-ci est ensuite placée à l'étuve, à une température de 110°C, pendant dix minutes.

## V - 2 RESULTATS

Les profils chromatographiques obtenus pour les quatre extraits d'E. hirta (5, 6, 7 et 8), après révélation par l'aldéhyde  $\beta$  anisidique, sont comparables. Deux taches grises sont visualisées, aux Rf respectifs de 0,17 et 0,06 (figure 8).

Les témoins galactose (1), lactose (2), lévulose (3) et glucose (4) migrent, quant à eux, aux Rf respectifs de 0,06 ; 0,02 ; 0,17 et 0,13.

Ainsi, la présence de galactose et de lévulose peut être confirmée, dans les quatre extraits végétaux.



1 : GALACTOSE ; 2 : LACTOSE ; 3 : LEVULOSE ;  
4 : GLUCOSE  
5 - 8 : EXTRAITS D'E. HIRTA (1984, 1985, 1986, 1987)

□ jaune  
■ gris

**FIG. 8** : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DES GLUCIDES  
D'E. HIRTA  
REVELATION PAR L'ALDEHYDE  $\beta$  ANISIDIQUE.

## **VI RECHERCHE DES SELS MINERAUX**

Les sels minéraux sont recherchés et dosés à partir d'une solution aqueuse de chaque extrait, par spectrophotométrie de flamme pour les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et par colorimétrie pour les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **VI - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

Une quantité de lyophilisat correspondant à 400 mg de plante sèche est solubilisée dans 5 ml d'eau distillée.

Après centrifugation à 10000 tours/minutes, pendant dix minutes (centrifugeuse Kontron LC 1000), le surnageant est récupéré et servira aux dosages des sels minéraux.

Le dosage est réalisé au moyen de l'automate R.A. 1000 (Kontron).

La teneur en éléments minéraux est calculée en grammes pour 100 grammes de plante sèche.

Les sels minéraux, présents dans l'eau distillée utilisée comme solvant, sont également recherchés et dosés.

### **VI - 2 RESULTATS**

D'après les résultats reportés dans le tableau 8, les teneurs en sels minéraux, dosés dans les extraits aqueux préparés en 1984, 1986 et 1987, sont relativement voisines ; par contre, l'extrait de 1985 apparaît moins riche.

Ces quatre préparations contiennent une très faible quantité de sodium ( $< 0,1 \%$ ), entre 0,2 et 0,5 % de chlorures et de calcium, ainsi qu'une quantité importante de potassium (voisine de 1 %).

**TABLEAU 8 : CONCENTRATION EN ELEMENTS MINERAUX DES QUATRE EXTRAITS D'E. HIRTA, EXPRIMEES EN G POUR 100 G DE PLANTE SECHE.**

EXTRAITS	Na <sup>+</sup> g/100g	Cl <sup>-</sup> g/100g	Ca <sup>2+</sup> g/100g	K <sup>+</sup> g/100g
E. HIRTA 1984	0,09	0,27	0,50	1,08
E. HIRTA 1985	0,06	0,18	0,33	0,68
E. HIRTA 1986	0,09	0,22	0,51	0,95
E. HIRTA 1987	0,09	0,31	0,54	1,08

## VII RECHERCHE DES DERIVES CYANOGENETIQUES

Les dérivés cyanogénétiques sont recherchés par la méthode du papier micro-sodé.

Le cyanure de potassium (Prolabo) est utilisé comme substance de référence.

### VII - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

Une petite quantité des produits (lyophilisat de chaque extrait végétal, cyanure de potassium) est introduite dans un tube à essai, avec quelques gouttes d'une solution diluée d'acide chlorhydrique et quelques gouttes de toluène.

Un papier micro-sodé humide est fixé dans le tube, à l'aide d'un bouchon. Les tubes à essai sont ensuite placés à l'étuve à 35°C, pendant douze heures.

Au contact de l'acide cyanhydrique libéré lors de l'hydrolyse des hétérosides cyanogénétiques par l'acide chlorhydrique et le toluène, à la température de 35°C, le papier micro-sodé prend une teinte rouge.

### VII - 2 RESULTATS

Aucune modification dans la coloration du papier micro-sodé n'est observée, dans les tubes contenant les différents extraits végétaux, à la différence du tube renfermant le cyanure de potassium.

Nous pouvons donc conclure à l'absence de dérivés cyanogénétiques, dans les extraits d'E. hirta testés.

## VIII RECHERCHE DES ALCALOIDES

Les alcaloïdes sont recherchés par chromatographie sur couche mince, à l'aide du réactif de Dragendorff.

### VIII - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE

- Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck).

- Solvant de migration :

Benzène - éthanol - ammoniacque (80:20:2 V/V).

- Révélateur :

Réactif de Dragendorff (Wagner et coll., 1983 - réactif 11A).

- Solutions analysées :

Extrait préparé en 1986 : 200 mg de plante sèche dans 2 ml d'eau distillée.

- Dépôt des échantillons :

10 µl de chaque solution sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration :

La migration est stoppée lorsque le solvant est à environ 3 cm du bord supérieur de la plaque.

- Révélation :

Le réactif de Dragendorff est pulvérisé sur la plaque préalablement séchée.

L'apparition immédiate de taches oranges indique la présence d'alcaloïdes.

### VIII - 2 RESULTATS

Après révélation au réactif de Dragendorff, aucune tache orange n'apparaissant, nous pouvons donc conclure à l'absence d'alcaloïdes, dans l'extrait d'E. hirta testé.

## **IX RECHERCHE DES SAPONOSIDES**

La recherche des saponosides est menée par évaluation de l'indice de mousse (méthode tirée de la pharmacopée française, 1969).

### **IX - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

Une quantité de lyophilisat correspondant à 1 g de plante sèche est solubilisée dans 10 ml d'eau distillée.

A partir de chaque solution, une série de dilutions est réalisée dans des tubes à essais (1,6 x 16 cm). Chaque tube est agité dans le sens de la longueur, pendant quinze secondes, à raison de deux agitations par seconde. Après quinze minutes de repos, on mesure la hauteur de la mousse.

Pour une hauteur de mousse inférieure à 1 cm, l'indice est considéré comme inférieur à 100.

### **IX - 2 RESULTATS**

La formation et la persistance d'une mousse, quinze minutes après l'agitation des solutions permet de confirmer la présence de saponosides, dans les quatre extraits aqueux d'E. hirta.

La quantité de mousse formée est d'autant plus importante que la solution est concentrée ; toutefois, la hauteur mesurée est toujours inférieure à un cm et donc l'indice de mousse peut être considéré comme inférieur à 100.

## X DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude permet donc de confirmer la présence des différents groupes chimiques précédemment mis en évidence par divers auteurs (section A) et ceci dans les quatre extraits aqueux d'E. hirta préparés respectivement en 1984, 1985, 1986 et 1987, à partir d'un même lot de plante sèche reçu en 1984.

L'obtention de profils chromatographiques similaires nous laisse en droit d'affirmer la stabilité chimique du lot de plante sèche, au cours du temps.

Parmi les polyphénols présents dans les extraits d'E. hirta, la présence de tanins galliques et catéchiques a pu être confirmée.

Si quatre acides phénols ont été identifiés au cours de travaux antérieurs (acides ellagique, gallique, caféique et chlorogénique), seul l'acide chlorogénique est retrouvé dans les extraits aqueux testés, l'acide ellagique n'ayant pas été employé comme témoin de référence.

Les nombreux composés flavoniques présents dans ces quatre extraits n'ont pu être identifiés. Ces préparations ne paraissent pas contenir de quercétine, ni de kaempférol, contrairement aux données bibliographiques, ni de rutine.

A la différence des travaux antérieurs, aucun anthocyanoside, aucun dérivé de la benzo  $\delta$  pyrone n'a pu être décelé.

Ces quatre extraits végétaux semblent également renfermer une quantité importante de composés réducteurs non identifiés.

Il est peu probable qu'il s'agisse de dérivés terpéniques ou stéroliques, identifiés en grand nombre dans E. hirta, par divers auteurs, ces composés étant généralement peu solubles dans l'eau (solvant d'extraction utilisé). Ainsi, la  $\beta$  amyryne, triterpène antérieurement identifié dans E. hirta, n'a pu être mise en évidence dans ces quatre préparations.

La présence d'acides organiques a pu être confirmée ; toutefois, leur identification n'a pas été possible, les acides fumarique, glyoxylique, lactique, malique, succinique et tartrique,

antérieurement identifiés chez E. hirta n'étant pas retrouvés.

Sur les vingt deux acides aminés mentionnés dans la littérature, au moins huit ont pu être séparés par chromatographie, l'acide  $\gamma$  aminobutyrique étant identifié dans les quatre extraits aqueux.

La recherche des glucides a abouti à l'identification du galactose et du lévulose, tandis que le glucose n'a pu être retrouvé dans aucune des préparations. L'absence de lactose peut également être confirmée.

Le dosage des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  a permis d'évaluer leur teneur respective dans chacun des quatre extraits et de constater une forte concentration en ions  $\text{K}^+$  (environ 1 %), une faible concentration en ions  $\text{Na}^+$  (< 0,1 %), tandis que la teneur en ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  varie entre 0,2 et 0,5 %.

La présence controversée de dérivés cyanogénétiques et d'alcaloïdes, mentionnée lors de l'étude chimique dans la bibliographie, a pu être infirmée, dans le cas des quatre extraits aqueux d'E. hirta.

De plus, la présence de choline, également mentionnée dans la bibliographie, semble peu probable, la réaction au réactif de Dragendorff étant négative. Effectivement, ce révélateur n'est pas spécifique des alcaloïdes, mais peut caractériser d'autres substances et notamment des amines quaternaires telles que la choline.

Enfin, l'évaluation de l'indice de mousse, estimé comme étant inférieur à 100, a permis de confirmer la présence de saponosides, dans les quatre extraits aqueux d'E. hirta.

*CINQUIEME PARTIE*

*ETUDE*

*PHARMACOLOGIQUE*

Depuis son introduction en Europe, E. hirta n'a cessé de susciter l'intérêt de nombreux chercheurs, tant au niveau de sa toxicité et de sa composition chimique, qu'au niveau de ses propriétés thérapeutiques.

La grande notoriété de cette espèce en médecine traditionnelle ne pouvait que conforter ces auteurs dans leur volonté de vérifier expérimentalement certaines de ses indications thérapeutiques essentielles, non seulement sur le modèle animal, mais surtout en clinique humaine.

Très souvent, le but recherché a consisté dans l'élaboration d'une préparation galénique contrôlée et facilement utilisable par les populations autochtones, afin de permettre le traitement des affections auxquelles ces dernières se trouvaient tout particulièrement exposées (affections intestinales, telles que la dysentérie amibienne...).

Les premières références, quant aux propriétés pharmacologiques d'E. hirta semblent dater de la fin du 19ème siècle (notes du docteur Marsset (1885)) et concernent l'action de cette plante sur le système cardio-vasculaire et notamment son action bénéfique dans le traitement de diverses atteintes respiratoires (asthme...).

A partir de cette époque, de nombreux travaux ont été réalisés, portant essentiellement sur les propriétés anti-asthmatiques, spasmolytiques et anti-dysentériques de cette plante. Ce sont surtout ces dernières qui ont fait et font encore actuellement l'objet de nombreuses études expérimentales et cliniques (Martin et coll., 1964 - Ridet et Chartol, 1964 - Basit et coll., 1977 - Ndir et Pousset, 1982 - Dalil, 1984) et qui sont en grande partie responsables du regain d'intérêt manifesté, depuis quelques années, à l'encontre d'E. hirta.

A côté de ces trois indications thérapeutiques principales, diverses autres propriétés pharmacologiques, connues ou non en médecine traditionnelle, ont été recherchées ; c'est notamment

le cas des propriétés galactagogues, hypoglycémiantes et anthelminthiques, des effets irritants liés à la présence de latex, d'éventuels effets anti-cancéreux et/ou co-carcinogènes, mais également de diverses activités telles que les activités anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-virales et insecticides.

Dans un premier temps, nous avons tenté de rassembler et de présenter, aussi clairement que possible, les différents résultats principaux obtenus au cours de ces travaux pharmacologiques antérieurs (section A).

La seconde partie de cette étude (section B) est consacrée à notre recherche personnelle, originale en comparaison de celles précédemment menées, puisque axée sur la recherche d'effets psychotropes et sur la confirmation de certaines indications thérapeutiques traditionnelles, à notre avis non dénuées d'un intérêt certain, telles que les activités sédatives, analgésiques, fébrifuges et anti-inflammatoires.

*SECTION A*

*ETUDES PHARMACOLOGIQUES*

*ANTERIEURES*

## I PROPRIETES ANTI-DYSENTERIQUES

### I - 1 EXPERIMENTATIONS PHARMACOLOGIQUES IN VIVO (SUR L'ANIMAL) ET IN VITRO

En 1964, Ridet et Chartol testent des décoctions aqueuses plus ou moins concentrées et un extrait hydro-alcoolique obtenu à partir des parties aériennes fraîches stabilisées (100 g d'extrait correspondent à 50 g de plante sèche stabilisée).

Des tests in vitro démontrent l'action inhibitrice et létale de diverses préparations, vis-à-vis d'Entamoeba dysenteriae. Ainsi, l'inhibition totale est obtenue avec une décoction au 1/5 (100 g de plante fraîche fournissent 500 g de décoction), à la concentration de 1/15 ; comparativement, le chlorhydrate d'émétine au 1/1000 est actif à la concentration 1/20000. La destruction complète des amibes est obtenue en 18 à 24 heures, avec une décoction au 1/5, à la concentration de 3/10 ; un extrait fluide hydro-alcoolique (50 g de plante sèche fournissent 100 g d'extrait) est actif à la concentration de 1/8 et se comporte comme le chlorhydrate d'émétine à 1/8000.

En 1968, Dhar et coll. mettent en évidence l'activité amoebicide d'un extrait alcoolique de la plante entière, vis-à-vis d'Entamoeba histolytica STA, grâce à des tests in vitro (concentrations actives  $\leq$  125 ug/ml) et in vivo, sur des rats infestés (dose active, administrée par voie orale : 300 mg/kg). De plus, cet extrait n'a pas d'activité vis-à-vis d'un autre protozoaire le Trypanosoma evansi.

En 1977, Basit et coll. étudient l'action in vitro d'une décoction aqueuse (23,4 % du poids de plante sèche) et d'un extrait hydro-alcoolique (20,65 % du poids de plante sèche), vis-à-vis d'Entamoeba histolytica. Les concentrations testées sont les suivantes : 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 mg/ml. Les auteurs obtiennent 100 % de mortalité, avec la concentration de 35 mg/ml de décoction ou d'extrait hydro-alcoolique,

respectivement en 12 et 36 heures. Ils concluent à la plus grande solubilité du principe actif dans l'eau chaude, comparativement au mélange "eau-alcool".

En 1982, Ndir et Pousset vérifient, in vitro, l'activité amoebicide d'E. hirta, sur Entamoeba histolytica.

Trois extraits différents sont testés, à différentes dilutions:

- Un extrait total lyophilisé, obtenu à partir de la plante entière (100 g de plante sèche fournissent 15 g de lyophilisat).
- Un extrait à l'acétate d'éthyle, obtenu après traitement du lyophilisat par l'acétate d'éthyle (100 g de lyophilisat fournissent 2,6 g d'extrait ; ce dernier est donc 38 fois plus concentré que le lyophilisat).
- Un extrait méthanolique, obtenu par traitement au méthanol du résidu récupéré après l'épuisement précédemment réalisé par l'acétate d'éthyle (100 g de lyophilisat fournissent 1,20 g d'extrait ; ce dernier est donc 84 fois plus concentré que le lyophilisat).

Les auteurs observent une activité inhibitrice (disparition de toutes les amibes) pour l'extrait total testé à la dilution 1/10 (soit une concentration de 33 mg d'extrait/ml), mais seulement au bout de quatre jours.

Concernant l'extrait à l'acétate d'éthyle, l'inhibition de la culture amibienne est observée au quatrième jour, avec la dilution 1/200 (soit 1,6 mg d'extrait/ml). L'extrait étant 38 fois plus concentré que le lyophilisat, 0,78 mg/ml aurait dû suffire à inhiber la culture ; on peut donc en conclure que les principes actifs sont peu solubles dans l'acétate d'éthyle.

L'extrait méthanolique, quant à lui, inhibe la culture amibienne dès le troisième jour, avec la dilution 1/100 (soit 3,3 mg d'extrait/ml). L'extrait étant 84 fois plus concentré que le lyophilisat, 0,35 mg/ml aurait dû suffire à inhiber la culture ; on peut donc en conclure que les principes actifs sont peu solubles dans le méthanol.

Le chlorhydrate d'émétine, utilisé comme produit de référence, est actif dès le premier jour de la culture, à partir de la

dilution 1/80000.

## I - 2 EXPERIMENTATIONS CLINIQUES

L'efficacité de la décoction de plante fraîche a été vérifiée en 1948, sur plusieurs cas de diarrhées amibiennes et de diarrhées dysentéroides observées à l'hôpital de Conakry, par Kerharo et Bouquet (observations mentionnées par Debaille et Pétard, en 1953).

Cependant, les essais n'ont pu être poursuivis assez longtemps, notamment en raison de la mauvaise conservation de la préparation et de son emploi peu pratique, le patient devant absorber un volume très important (plus d'un litre par jour).

En 1953, Debaille et Pétard étudient l'effet d'un extrait fluide obtenu à partir des parties aériennes stabilisées, desséchées, pulvérisées, puis épuisées par lixiviation avec de l'alcool à 45° (2 g d'extrait correspondent à 1 g de poudre de plante sèche stabilisée).

Administré à un sujet sain, à raison de trois cuillerées à soupe par jour, l'extrait ne provoque ni constipation, ni diarrhées sensibles.

La posologie prescrite à des sujets atteints d'amibiase intestinale aiguë est de quatre cuillerées à soupe par jour pendant trois jours, puis trois cuillerées par jour pendant trois jours et finalement deux cuillerées par jour pendant trois jours. Une telle médication entraîne la disparition des amibes présentes dans les selles, au bout de trois à cinq jours de traitement, les selles redevenant normales, la diarrhée et les phénomènes douloureux disparaissant en quatre jours. Une réactivation, dix jours après la fin du traitement, par le cyanure de mercure (1 cg/jour, durant trois jours, en injection I.V.) et le sulfate de soude (15 g, per os, le troisième jour) reste inefficace. Aucune rechute n'est observée, durant les 95 jours d'observation après la cessation du traitement. Signalons l'inefficacité de la plante, vis-à-vis de *Trichomonas* et d'oeufs de *Tricocéphales* et d'*Ascaris* observés dans les selles de certains

malades.

Des études cliniques ont été effectuées à Bobo-Dioulasso (Haute-Volta) (Ridet et Chartol (1964)), sur des patients (53) atteints de divers types d'amibiase (dysentéries amibiennes aiguës vraies, amibiase intestinale à forme diarrhéique simple, amibiase intestinale fruste de première atteinte, amibiase chronique vraie à type de diarrhée prédominante déjà traitée, amibiase intestinale de rechute, colites para-amibiennes affectant d'anciens amibiens, amibiase intestinale chronique, colites non spécifiques sans antécédents amibiens confirmés). La posologie quotidienne optimale est de quatre cuillerées à soupe d'extrait hydro-alcoolique obtenu à partir des parties aériennes fraîches (100 g d'extrait correspondant à 50 g de plante sèche stabilisée) ; le médicament est absorbé en quatre prises espacées, pour une durée totale de traitement de neuf jours. Pour les enfants, la dose journalière est de deux ou trois cuillerées, la durée totale restant identique. Si l'on considère qu'une cuillerée à soupe contient 15 ml ou environ 15.g d'extrait (celui-ci est constitué par une forte proportion d'eau), une prise correspond donc à 7,5 g de plante sèche  $(15 \times 50) / 100$ . Dans le cas du traitement le plus couramment utilisé pour un adulte (quatre prises pendant trois jours, trois prises pendant trois jours, deux prises pendant trois jours, soit 27 cuillerées), la cure est de 202,5 g de plante sèche.

Ces essais ont permis de révéler l'efficacité de l'extrait contre les symptômes de la dysentérie amibienne aiguë et une négativation coprologique rapide. Dans les formes chroniques, les résultats s'avèrent encourageants. Le traitement est bien toléré ; ainsi, aucun trouble cardio-vasculaire, rénal ou neurologique n'est constaté.

Signalons l'inefficacité du traitement, vis-à-vis des autres parasites possibles, la plupart des malades étant polyparasités. Toutefois, les signes fonctionnels attribuables à ces infections semblent améliorés.

Ces expérimentations ont été poursuivies par Martin et coll., en 1964, qui ont testé un nébulisat concentré exempt d'alcool, obtenu à partir d'un extrait hydro-alccolique et présenté sous la forme de comprimés dragéifiés dosés à 0,45 g de nébulisat.

La posologie est la suivante : quatre prises de quatre comprimés pendant quatre jours, puis quatre prises de trois comprimés pendant quatre jours et quatre prises de deux comprimés pendant deux jours ; soit, au total, 128 comprimés représentant 57,60 g de nébulisat, avec un maximum journalier de 7,20 g. Pour les enfants de moins de sept ans, les posologies sont réduites de moitié.

Ce traitement a permis d'obtenir une guérison dans 83 % des cas (97 patients en tout) et 89 % si l'on ne considère que les amibiases de première atteinte. Les résultats sont rapides et ne nécessitent qu'une cure unique. La guérison est durable, elle résiste à la réactivation et se maintient sans rechute pendant toute la durée d'observation après traitement (cinq à douze mois ou plus).

La tolérance est excellente, le produit pouvant être administré à des nourrissons, des personnes âgées ou des malades atteints d'affections graves.

Les auteurs penchent en faveur d'une activité amoebicide directe et d'un mode d'action du type "tout ou rien" (les échecs observés sont cliniquement et parasitologiquement complets dans la majorité des cas, c'est-à-dire que le syndrome clinique persiste et que les amibes sont constamment présentes dans les selles).

En 1984, Dalil étudie les propriétés anti-amibiennes d'un décocté lyophilisé, obtenu à partir des parties aériennes (1 kg de poudre végétale fournit 100 g de lyophilisat). La forme pharmaceutique utilisée consiste en sachets d'élastomère contenant chacun 5 g de lyophilisat. Le contenu du sachet est consommé, dissous dans un grand verre d'eau, à raison de 5 g le matin et 5 g le soir pendant trois jours. La posologie quotidienne, soit 10 g de lyophilisat, correspond à la dose

journalière des tradipraticiens.

Le traitement est effectué sur six femmes et quatre hommes, âgés de plus de 18 ans et atteints d'amibiase intestinale confirmée par un examen parasitologique des selles. Sont exclus, les sujets atteints d'amibiase extra-intestinale ou chronique, ainsi que les sujets ayant reçu un traitement amoebicide, dans les quinze jours qui précèdent. Les patients sont soumis à des examens cliniques et parasitologiques avant le traitement, puis deux jours après la fin du traitement. Une surveillance clinique et parasitologique est effectuée huit et quinze jours après le début de la cure. Les sujets sont encore suivis pendant un mois.

L'auteur obtient de très bons résultats, qui se manifestent dès le cinquième jour (deuxième jour après la fin du traitement) par la disparition des signes cliniques (huit cas), ou par leur amélioration (deux cas) et par la disparition totale (sept cas) ou presque (rares amibes dans deux cas et quelques kystes dans un cas) des amibes. Au huitième jour, sur neuf malades suivis, le dixième ayant été perdu de vue, la disparition des signes cliniques est générale (neuf cas) et l'absence d'amibes est observée dans huit cas (persistance de rares kystes, chez un sujet). La guérison totale est obtenue au quinzième jour.

Aucune rechute n'a été notée, pendant la période d'observation (un mois). Le traitement est bien toléré ; il faut cependant mentionner deux cas de constipation légère et réversible à l'arrêt du traitement.

E. hirta semble donner des résultats comparables à ceux obtenus avec le metronidazole (amoebicide tissulaire et de contact prescrit à raison de 1,5 à 2 g/kg/jour pour un adulte et 40 à 50 mg/kg/jour pour un enfant, la durée du traitement variant de cinq à sept jours). Toutefois, cet amoebicide provoque souvent des effets secondaires divers (nausées, vomissements, gastralgies, céphalées, vertiges, accidents sanguins...) ; de plus, diffusant dans tout l'organisme, il est retrouvé dans la salive et le lait et passe la barrière placentaire.

Enfin, le coût du traitement par malade est de 1534 CFA pour le métronidazole et de 200 CFA pour la plante (hormis le prix de

la lyophilisation et de la main-d'oeuvre).

Les résultats obtenus avec E. hirta, au cours de ces expérimentations pharmacologiques réalisées in vivo, in vitro et en clinique, confirment largement les indications traditionnelles préconisant la plante comme amoebicide.

**Remarque : Recherche d'une activité vis-à-vis des Trichomonas.**

En 1984, Karimou met en évidence l'absence d'activité lytique d'un extrait aqueux lyophilisé, sur une culture de Trichomonas vaginalis, avec les concentrations suivantes : 10 - 5 - 2 - 1 - 0,5 - 0,2 et 0,1 mg d'extrait/ml de milieu liquide. Toutefois, après 48 et 72 heures d'incubation en présence de concentrations supérieures (40, 20 et 15 mg/ml), les cultures sont moins florissantes.

## **II ACTION SUR LES SYSTEMES RESPIRATOIRE ET CARDIO-VASCULAIRE**

Dès 1885, Marsset (mentionné par Maiden (1889) et Holmes (1923)) constate l'existence d'un principe actif, toxique pour les petits animaux et provoquant leur mort par arrêt des mouvements respiratoires et des pulsions cardiaques préalablement accélérées puis ralenties.

La plante agirait directement sur les centres cardiaques et respiratoires et donne de bons résultats dans les cas d'asthme spasmodique, d'emphysème et de bronchite chronique.

En 1931, Dikshit et Rao (mentionnés par Kerharo et Adam, en 1974) constatent une action assez forte sur l'appareil respiratoire ; ainsi, la plante ralentit la respiration et provoque une dilatation marquée des bronches, chez le rat et le chien. Le système cardio-vasculaire est également déprimé et la pression sanguine chute, principalement en raison de l'action exercée sur le coeur.

Les effets cardio-vasculaires et respiratoires d'un extrait fluide hydro-alcoolique déalcoolisé et partiellement purifié (traitement par le réactif de Lloyd) ont été étudiés sur des chiens, à la dose de 0,1 ml/kg, en I.V. (Hazleton et Hellerman, 1948).

Sur la **pression sanguine**, la plante provoque une réponse biphasique (augmentation suivie d'une chute plus nette), la phase initiale semblant liée à un phénomène de tachyphylaxie et disparaissant après l'administration de plusieurs doses. Cette vasodépression ressemble à celle induite par l'histamine, cependant le retour à la normale est plus rapide, la durée d'action brève et il n'y a pas d'accumulation évidente des effets. De plus, des injections alternées d'histamine et d'extrait végétal indiquent clairement l'absence d'activité anti-histaminique de la part d'E. hirta.

Les **effets respiratoires** sont faibles et se traduisent, à fortes doses, par une augmentation du rythme respiratoire

suivie d'une apnée.

L'absence d'effet significatif vis-à-vis des actions hémodynamiques de l'adrénaline ou de l'acétylcholine et l'absence d'antagonisme des effets de la plante par des doses d'atropine (parasympatholytique) indiquent que les effets vasculaires seraient indépendants du système nerveux autonome.

D'après les auteurs, E. hirta exercerait une activité myotrope directe ; l'action vasodépressive ne serait pas due à l'histamine ou à toute autre substance comparable. Effectivement, au cours de sa préparation, l'extrait végétal fluide déalcoolisé et partiellement purifié, utilisé dans ces tests pharmacologiques, a subi une filtration à travers le réactif de Lloyd ; or, injectée à un chien, une solution d'histamine soumise au même traitement ne présente plus d'activité histaminique ; ceci indiquerait l'absence de toute substance de type histaminique, dans l'extrait végétal testé. De plus, l'injection d'un anti-histaminique (pyrabenzamine HCl) n'a pas d'effet appréciable sur l'action vasodépressive de la plante. Enfin, après administration, à des chiens, d'un inhibiteur cholinestérasique (le parathion), l'injection d'atropine antagonise la stimulation vagale et augmente temporairement les échanges respiratoires ; cependant, lors de la phase de diminution des échanges respiratoires, l'injection de l'extrait végétal produit la réponse biphasique caractéristique et augmente les échanges respiratoires ; ces effets seraient dûs à une dilatation bronchiale neurotropic dans le cas de l'atropine et myotropique dans le cas d'E. hirta.

En 1962, Feng et coll. préparent des extraits aqueux et éthanoliques de l'espèce jamaïcaine (1 ml d'extrait correspond à 1 g de plante fraîche) et aboutissent aux constatations suivantes :

- L'extrait aqueux provoque une diminution de l'amplitude et du rythme cardiaque, à la dose de 1 ml, sur le coeur isolé de lapin, ainsi qu'une diminution de la pression sanguine du chien, à des doses  $\leq 0,1$  ml/kg de poids corporel.
- L'extrait éthanolique provoque également une augmentation de

l'amplitude et du rythme cardiaque, à la dose de 1 ml, sur le coeur isolé de lapin, ainsi qu'une diminution de la pression sanguine du chien, à des doses inférieures à 0,1 ml/kg et une forte augmentation du débit sanguin de la patte postérieure du rat, à la dose de 0,01 ml.

En 1964, Steinmetz mentionne la dilatation bronchiale, occasionnée chez des animaux anesthésiés, après des injections I.V. de petites doses d'extrait. La plante accélère puis ralentit les mouvements respiratoires et cardiaques ; son action s'exerce principalement par le nerf pneumogastrique ; de trop fortes doses paralysent la respiration et le coeur ; enfin, il n'y a pas d'effets cumulatifs.

L'auteur signale également l'utilisation thérapeutique de l'extrait fluide ou de la teinture, dans un mélange composé généralement des parties aériennes de Lobelia, des bulbes de Scilla alba ou des rhizomes de Polygala senega, pour son action sédative sur le système cardio-vasculaire et son effet broncho-dilatateur.

En 1968, Dhar et coll. étudient les effets d'un extrait alcoolique sur la respiration et le système cardio-vasculaire. Les expériences sont réalisées sur des chiens ou des chats anesthésiés. L'extrait est administré par voie I.V., à des doses allant jusqu'à 50 mg/kg. Concernant la pression sanguine, les effets d'E. hirta sont testés sur le taux normal, ainsi que vis-à-vis des réponses induites par l'adrénaline (0,5 à 1 µg/kg, en I.V.), l'acétylcholine et l'histamine (0,25 à 0,5 µg/kg, en I.V.).

Les auteurs mettent ainsi en évidence une certaine activité sur la pression sanguine sans en préciser la nature, aucune action n'étant obtenue sur la respiration, aux doses utilisées.

Des expérimentations sont également réalisées sur le coeur isolé de cobaye. L'extrait végétal est injecté dans le liquide de perfusion, sous un volume de 0,5 ml. Aucun effet n'est observé.

### III PROPRIETES SPASMOLYTIQUES

Dikshit et Rao, en 1931 (cités par Kerharo et Adam (1974)), mentionnent les effets d'E. hirta sur l'intestin, après injection I.V., se manifestant par l'arrêt immédiat du péristaltisme et par la diminution du tonus musculaire.

En 1948, Hazleton et Hellerman mettent en évidence les effets relaxants et anti-histaminiques d'un extrait fluide hydro-alcoolique déalcoolisé, vis-à-vis de l'iléon de cobaye. L'extrait végétal seul ( $10^{-2}$  ml d'extrait/ml de cuve, ce qui correspond à un volume d'extrait de 1 ml pour une cuve de 100 ml) provoque une contraction du muscle, suivie d'un retour au péristaltisme basal. De plus, il antagonise et prévient la contraction induite par l'histamine ( $2 \cdot 10^{-5}$  mg/ml de cuve). Ces effets sont retrouvés avec un extrait fluide déalcoolisé et partiellement purifié (traitement par le réactif de Lloyd), ainsi qu'avec ce même extrait traité par l'acide chlorhydrique N/10, à la température de l'eau bouillante et pendant quinze minutes (histamine testée à  $5 \cdot 10^{-5}$  mg/ml de cuve et extraits testés à  $10^{-2}$  ml/ml de cuve) ; toutefois, la contraction induite est nettement diminuée. Un antagonisme est également obtenu, vis-à-vis de contractions induites par l'acétylcholine ( $2 \cdot 10^{-5}$  mg/ml de cuve), avec l'extrait déalcoolisé et partiellement purifié ( $2 \cdot 10^{-2}$  ml/ml de cuve).

Différents extraits d'E. hirta sont également testés :

- Une extraction étherée de l'extrait fluide déalcoolisé ne déplace pas les principes actifs, le résidu aqueux présentant la plus grande partie des propriétés relaxantes et contractantes ; après élimination de l'éther, la fraction étherée présente essentiellement des propriétés stimulantes.
- Un extrait aqueux présente une activité anti-histaminique réduite de moitié par rapport à celle de l'extrait fluide déalcoolisé, avec une phase de contraction proportionnelle.
- Un extrait alcoolique à 95 %, obtenu à partir du résidu sec d'un extrait aqueux (après remplacement de l'alcool par de

l'eau), présente presque toutes les propriétés stimulantes. L'action développée ressemble à celle de l'histamine et est antagonisée par l'extrait fluide déalcoolisé. De plus, cet extrait alcoolique renforce la contraction histaminique.

Selon les auteurs, E. hirta exercerait une action dépressive directe sur les muscles lisses, plutôt qu'une activité anti-histaminique spécifique. Cette action serait typiquement anti-spasmodique (relaxation des spasmes induits sur l'intestin ou les bronches, mais faible effet sur les tissus normaux et absence d'interférence avec les contractions rythmiques intestinales normales).

La plante contiendrait au moins deux principes actifs :

- **L'un responsable de l'action stimulante**, soluble dans l'eau et les solvants organiques, déplacé par filtration à travers le réactif de Lloyd, isolé par extraction étherée d'un extrait fluide déalcoolisé ou extrait du résidu obtenu à partir d'un extrait aqueux.

- **Le second, responsable de l'action relaxante**, serait hydro-soluble et se maintiendrait stable en solutions aqueuses conservées à température ambiante ; ce principe n'est pas adsorbé par le réactif de Lloyd, il n'est pas hydrolysé par un acide minéral faible à la température de l'eau bouillante et il ne peut être extrait par l'éther d'une solution à pH acide ou par l'alcool à partir du résidu sec. Il ne semble pas de nature alcaloïdique ou glycosidique.

Ces expérimentations ont été poursuivies en 1950, par les mêmes auteurs, sur divers organes isolés et avec un extrait fluide déalcoolisé et partiellement purifié.

Ainsi, E. hirta, testée à  $10^{-2}$  ml d'extrait/ml de cuve, présente des effets préventifs et curatifs, vis-à-vis de la contraction induite sur l'iléon de souris, par l'acétylcholine ( $2 \cdot 10^{-4}$  mg/ml de cuve).

A  $2 \cdot 10^{-3}$  ml d'extrait/ml de cuve, l'extrait supprime également la contraction induite sur l'iléon de cobaye, par le chlorure de baryum (0,1 mg/ml de cuve).

Des effets préventifs et curatifs, vis-à-vis de la contraction histaminique (histamine testée à  $2 \cdot 10^{-3}$  mg/ml de cuve) induite sur l'utérus de cobaye, sont obtenus avec l'extrait végétal testé à  $5 \cdot 10^{-2}$  ml d'extrait/ml de cuve.

Des essais sont également réalisés sur la trachée de cobaye et permettent de mettre en évidence un effet relaxant immédiat et réversible provoqué par l'extrait végétal seul, ainsi que des effets préventifs et curatifs vis-à-vis de la contraction histaminique (histamine testée à  $10^{-2}$  mg/ml de cuve) obtenus avec la concentration de  $4 \cdot 10^{-2}$  ml d'extrait/ml cuve.

Concernant toujours la relaxation des contractions histaminiques, une légère synergie est observée entre E. hirta ( $4 \cdot 10^{-2}$  ml d'extrait/ml de cuve), l'aspirine (0,1 mg/ml de cuve) et la caféine (0,1 mg/ml de cuve).

Signalons l'action inhibitrice de la caféine vis-à-vis de la contraction histaminique de la trachée et son inefficacité vis-à-vis de celle induite sur l'iléon. A l'inverse, l'aspirine supprime la contraction histaminique induite sur l'iléon, mais reste sans effet vis-à-vis de celle induite sur la trachée. Associée à la caféine ou à la plante, l'aspirine n'interfère pas avec les effets relaxants de ces substances, vis-à-vis de la contraction histaminique de la trachée.

Enfin, un léger effet relaxant est obtenu avec l'extrait végétal testé à  $4 \cdot 10^{-2}$  ml/ml de cuve (relaxation sous la valeur basale, par apport d'une même dose d'extrait), vis-à-vis de la contraction induite par le blanc d'oeuf à  $10^{-2}$  ml/ml de cuve, sur la trachée de cobaye préalablement sensibilisé au blanc d'oeuf (injection I.P. de 5 ml de blanc d'oeuf à 25 %, deux semaines avant le prélèvement de la trachée). Comme dans le cas de la contraction histaminique, la caféine (0,1 mg/ml de cuve) supprime l'effet du blanc d'oeuf, l'aspirine (0,1 mg/ml cuve) n'ayant pas d'action. De plus, l'administration simultanée de l'extrait végétal ( $4 \cdot 10^{-2}$  ml/ml de cuve), de caféine (0,1 mg/ml de cuve) et d'aspirine (0,1 mg/ml de cuve) provoque une relaxation immédiate et comparable à celle induite par l'administration de cet extrait suivie de celle du mélange "caféine - aspirine".

Les auteurs mentionnent les travaux de Castillo (1948), permettant l'obtention d'effets comparables, par utilisation de sérum de cheval comme antigène de sensibilisation, à la place de blanc d'oeuf.

De l'ensemble de ces travaux, les auteurs tirent différentes conclusions et notamment :

- L'existence d'une plus grande sensibilité de l'iléon, comparativement à la trachée, vis-à-vis de l'histamine et de l'extrait végétal.
- L'existence d'une efficacité supérieure de la part de l'extrait, vis-à-vis du spasme histaminique provoqué sur la trachée, en comparaison avec la contraction induite par un allergène tel que le blanc d'oeuf.
- E. hirta aurait une action dépressive relativement spécifique sur la musculature trachéenne ; cette activité serait différente de celle des anti-histaminiques et des anti-spasmodiques du type "atropine" (parasympholytique et antagoniste de l'acétylcholine) et similaire à celle de l'adrénaline et de l'aminophylline.

Les propriétés anti-spasmodiques d'E. hirta ont également pu être mises en évidence sur l'iléon isolé de cobaye, par Hallett et Parks (1953). La contraction est induite par l'histamine ( $0,25 \cdot 10^{-5}$  à  $3 \cdot 10^{-5}$  mg/ml de cuve). L'extrait végétal fluide et déalcoolisé (obtenu par percolation avec de l'alcool dilué ou par extraction alcoolique continue, puis élimination du solvant et remplacement par de l'eau) est testé à des doses variant de  $10^{-2}$  à  $2 \cdot 10^{-2}$  mg de plante fraîche/ml de cuve.

Avant traitement par le réactif de Lloyd, l'extrait provoque une contraction supplémentaire à celle induite par l'histamine suivie d'un antagonisme des effets histaminiques ; après traitement, seul l'effet relaxant subsiste.

D'autres préparations ont été testées telles qu'un macérat de la plante, obtenu par traitement sous reflux avec des fractions successives d'alcool et qui présente les deux activités (rela-

xation et contraction), mais également un macérat aqueux, qui toutefois renferme de forts taux de substances mucilagineuses inactives. Un extrait au Skelly B et à l'éther ne présente aucune des deux activités considérées.

Les auteurs ont également évalué la stabilité du principe anti-spasmodique obtenu dans l'extrait déalcoolisé. Ils ont ainsi mis en évidence la formation importante de moisissure, lorsque la solution est laissée quelques mois à la température de la pièce ; cependant, après élimination de celle-ci par filtration, l'activité reste intacte. Les propriétés anti-spasmodiques sont stables, après conservation dans le chloroforme pendant deux ans. Ceci est également le cas, après chauffages prolongés de la solution, en présence d'acide chlorhydrique. Enfin, l'oxygénation de la solution pendant quelques heures ne diminue pas l'activité.

Hallett et Parks mentionnent l'existence de deux principes actifs :

- **Un principe responsable de l'activité stimulante**, apparemment extrait en plus grandes quantités par l'alcool pur, comparativement à l'alcool dilué ou à l'eau. Ce principe est stable à la chaleur, aux acides et aux alcalis pendant de courtes durées. Les solutions acides aqueuses perdent leur activité au bout de quelques semaines ; par contre, les solutions hydroalcooliques ou aqueuses, stockées sous chloroforme, la conservent au bout de quelques mois. Ce principe traverse facilement une membrane de dialyse et est adsorbé par le réactif de lloyd, à partir duquel il ne peut être élué ; il est également adsorbé par une résine échangeuse de cations, à partir de laquelle il peut être élué avec de l'acide chlorhydrique à 5 %. Il pourrait s'agir d'une substance très faiblement basique.

- **Le second principe est responsable de l'activité relaxante.** Il n'est pas extractible par l'éther à pH 4,5, à partir de solutions aqueuses ; il n'est pas détruit par ébullition en présence d'acide chlorhydrique dilué ; maintenu à la température de la pièce et en solution acide aqueuse, il reste stable pendant de longues périodes. Ce principe est très soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants non polaires.

Il est également sensible aux conditions alcalines et n'est pas adsorbé par le réactif de Lloyd. Selon les auteurs, cette activité spasmolytique ne serait pas associée à une substance fortement basique, mais ceux-ci n'éliminent pas la possibilité d'un alcaloïde. Une substance glycosidique semble également peu probable.

En 1962, Feng et coll. étudient les effets spasmolytiques d'extraits aqueux et éthanologique de l'espèce jamaïcaine (1 ml d'extrait correspond à 1 g de plante fraîche), vis-à-vis des mouvements spontanés et du tonus du duodénum isolé de lapin, vis-à-vis des spasmes induits par l'ocytocine et le 5-hydroxytryptophane sur l'utérus isolé de ratte et vis-à-vis des spasmes induits par l'acétylcholine, l'histamine, le baryum et la nicotine sur l'iléon isolé de cobaye.

Les résultats suivants sont obtenus :

- **Les extraits aqueux et éthanologiques**, testés à des volumes inférieurs ou égaux à un ml, n'ont aucun effet inhibiteur, vis-à-vis des mouvements spontanés du duodénum isolé de lapin et vis-à-vis de l'action des différents composés spasmogènes testés sur l'utérus isolé de ratte.
- **L'extrait éthanologique** exerce une action spasmolytique, vis-à-vis des effets des substances spasmogènes testées sur l'iléon isolé de cobaye. Cette action se manifeste pour un volume d'extrait de 0,1 ml.
- **L'extrait aqueux**, quant à lui, reste inefficace.

En 1968, Dhar et coll. testent l'activité spasmolytique d'un extrait alcoolique d'E. hirta, sur l'iléon isolé de cobaye. Les agents spasmogènes utilisés sont le chlorure d'acétylcholine ( $5 \times 10^{-9}$  g), le phosphate acide d'histamine ( $10^{-8}$  g) et, dans certains cas, le sulfate de créatine 5-hydroxytryptamine, le chlorure de baryum et le sulfate de nicotine.

Ajouté une minute avant l'agent spasmogène, l'extrait végétal présente une activité spasmolytique.

En 1978, El Naggar et coll. démontrent les propriétés relaxantes et stimulantes, sur l'iléon isolé de cobaye, de différentes fractions obtenues à partir d'un extrait éthanolique des parties aériennes (après fractionnement par le chloroforme et l'eau, puis extractions successives de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle et le n-butanol).

L'extrait éthanolique, la fraction soluble dans le n-butanol et la fraction aqueuse finale provoquent la contraction de l'intestin ; la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle provoque la relaxation de l'iléon.

Par différentes extractions et par plusieurs chromatographies successives, les auteurs isolent et identifient les composés responsables : L'activité relaxante serait due à la présence d'acide shikimique, l'activité stimulante serait imputable à la choline.

#### IV PROPRIETES GALACTOGENES

Ces propriétés ont été étudiées, en 1963, par Blanc et coll. sur des cobayes femelles impubères. La poudre végétale, conditionnée sous forme de pilules dosées à 50 mg, est administrée journallement par voie orale, pendant vingt jours.

Cette étude a permis de mettre en évidence un accroissement mammaire très net, quelques jours après le début de l'administration de la drogue (cinq à six jours), suivi d'un début de sécrétion de type colostrum ou lactescent (septième et huitième jours du traitement).

Ces résultats sont corroborés par des constatations histologiques effectuées sur les glandes mammaires (involution correspondant cytologiquement à un stade de sécrétion lactée) et sur l'hypophyse (présence d'un stock de cellules éosinophiles prolactinogènes plus important que la normale, au niveau du lobe antérieur).

Les auteurs obtiennent également un phénomène synergique, par l'association d'E. hirta et de Sersalisia djalonensis, une autre plante galactogène.

Ainsi, la plante renfermerait une ou plusieurs substances à activité anti-oestrogénique, ou à activité prolactinique. Les auteurs penchent en faveur de la seconde hypothèse, la sécrétion lactée étant établie en dehors de toute période de gestation.

Ces expérimentations ont été poursuivies par (de) Saqui-Sannes, en 1971. L'extrait alcoolique total ou ses fractions étherée, éthéro-acétique et butanolique sont administrées oralement à des pigeons, sous forme de pilules et à différentes posologies.

A la fin de l'essai, les jabots sont prélevés et pesés. En effet, l'administration d'une substance capable d'accroître la sécrétion antéhypophysaire de prolactine se traduit par une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium du jabot avec accroissement pondéral de ce dernier.

Ces essais ont permis de mettre en évidence une activité (accroissement pondéral significatif) de l'extrait total administré pendant six jours, à raison de 2 g d'extrait par animal et par jour, soit 12 g au total. Cet effet est sensiblement le même que celui provoqué par l'administration sous-cutanée et quotidienne de 0,5 U.I. de prolactine, pendant six jours, soit 3 U.I. au total.

De plus, l'effet biologique est retrouvé dans la fraction butanolique, administrée pendant six jours, à raison de 0,2 g d'extrait par animal et par jour, soit 1,2 g au total. Cette activité est sensiblement la même que celle induite par l'administration quotidienne, en sous-cutanée, de 0,3 U.I. de prolactine, pendant six jours, soit 1,8 U.I. au total.

L'auteur conclut à la présence très probable du ou des principes actifs considérés, dans cette fraction butanolique.

## V RECHERCHE D'EFFETS IRRITANTS, ANTI-CANCEREUX OU CO-CARCINOGENES

### V - 1 PROPRIETES IRRITANTES

Dès 1885, Marsset mentionne les effets irritants d'E. pilulifera sur la muqueuse gastrique, la peau et les autres muqueuses n'étant pas affectées.

En 1975, Kinghorn et Evans étudient les propriétés irritantes du latex de diverses Euphorbes, vis-à-vis de la peau. Pour ce faire, 5 µl d'extrait acétonique sont appliqués sur la face interne des oreilles de souris femelles Laca. E. hirta, testée à des doses allant de 6,25 à 400 µg/5 µl, ne provoque aucune irritation. Cependant, les auteurs mentionnent l'obtention d'une faible irritation, lorsque les doses sont fortement augmentées.

### V - 2 PROPRIETES ANTI-CANCEREUSES OU CO-CARCINOGENES

En 1968, Dhar et coll. mentionnent l'activité anticancéreuse d'un extrait alcoolique de la plante entière (doses testées non précisées) vis-à-vis de la leucémie de Friend induite chez la souris et l'inefficacité de ce même extrait vis-à-vis du carcinome épidermique du naso-pharynx humain, de la leucémie L-1210 lymphoïde et du sarcome 180 induits chez la souris.

En 1981, Ito et coll. réalisent des essais in vitro, sur des cellules lymphoblastoïdes humaines contenant le génome du virus d'Epstein-Barr. Les auteurs n'observent aucune activité promotrice vis-à-vis du cancer induit par le virus (moins de 0,1 % de cellules humaines expriment les antigènes correspondant au virus), après addition des concentrations de 100 et 10 µg/ml d'un extrait obtenu par extraction étherée des tiges d'E. hirta, suivie d'une concentration et d'une dissolution du

résidu dans l'éthanol.

En 1980, Baslas et Agarwal mentionnent l'activité co-carcinogénétique de divers diterpènes présents dans différents extraits d'E. hirta. Ainsi, le 20-0-acétylréséniféronol-9,13,14-orthophénylacétate est isolé d'un extrait étheré des racines ; l'ingénol triacétate est obtenu dans un extrait étheré des parties aériennes et dans un extrait éthanolique des racines dégraissées à l'éther de pétrole.

Cependant, Evans et Taylor (1983) mentionnent l'absence de diterpènes, chez E. hirta L.

## VI PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DIVERSES

### VI - 1 ACTION PREVENTIVE VIS-A-VIS DU CHOC ANAPHYLACTIQUE

Un effet préventif modéré a été mis en évidence, en 1948, par Hazleton et Hellerman, avec un extrait fluide déalcoolisé d'E. hirta.

En effet, l'injection I.P. de blanc d'oeuf pur (0,75 ml) à des cobayes préalablement sensibilisés (injection I.P. de 5 ml de blanc d'oeuf à 25 %) provoque des difficultés respiratoires importantes accompagnées de hoquets et de mouvements convulsifs, puis le coma et finalement la mort des animaux.

E. hirta, administrée oralement (15 ml d'extrait/kg, une heure avant le blanc d'oeuf), semble protéger modérément du choc anaphylactique et ceci malgré la variabilité des résultats obtenus. Ainsi, l'administration de l'extrait maintient tous les animaux en vie ; cependant, la moitié meurt, après une nouvelle injection de blanc d'oeuf. Après traitement des survivants par l'extrait végétal, puis injection de blanc d'oeuf, tous meurent.

E. hirta agit essentiellement sur la respiration en la rendant plus facile et en l'accélération. Effectivement, une injection I.V. de 0,10 ml d'extrait accélère momentanément la respiration, tandis que plusieurs injections successives d'extrait (0,10 ml) réduisent progressivement l'effet dépressif du blanc d'oeuf (une injection I.P. de 0,75 ml), pour finalement permettre le retour à un rythme respiratoire normal (volume total d'extrait nécessaire : 0,4 ml).

### VI - 2 ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

En 1949, Collier met en évidence une certaine activité antibiotique, pour des extraits testés aux dilutions de 1/5 à 1/60 ; ces résultats sont en contradiction avec ceux de Bushnell (1950) et de Karel et Roach (1951), faisant état de tests négatifs (observations mentionnées par Watt et Breyer-Brandwijk, en 1962).

En 1968, Dhar et coll. étudient l'activité d'un extrait alcoolique de la plante entière, vis-à-vis de 2 gram + (Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus), de 3 gram - (Salmonella typhi, Escherichia coli et Agrobacterium tumefaciens) et de Mycobacterium tuberculosis H37RV, grâce à des essais in vitro.

Pour les cinq premiers microorganismes, l'extrait végétal est considéré comme actif si la concentration de 25 µg d'extrait sec/ml inhibe la croissance bactérienne. Pour Mycobacterium, l'extrait végétal est testé à 80, 40 et 20 µg/ml.

Les auteurs n'observent aucune activité bactéricide, dans les six cas considérés.

En 1984, Ajao et coll. étudient in vitro l'activité antibactérienne des feuilles (extrait liquide A, obtenu par pulvérisation du matériel frais, centrifugation du jus récupéré et collecte du surnageant ; extrait liquide C, obtenu de la même manière que A avec, en plus, ébullition du matériel frais pulvérisé pendant trois heures) et des tiges (extrait B obtenu de la même manière que A).

Les microorganismes sont les suivants : Micrococcus luteus (NCIB 196), Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Streptococcus dysenteriae, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Bacillus subtilis (NCIB 3610) et Escherichia coli.

Les auteurs observent une certaine activité bactéricide des trois extraits, sur les différents microorganismes gram + et gram -, l'inhibition de la croissance variant selon l'extrait et la bactérie. Le suc des tiges (extrait B) semble le plus actif.

### VI - 3 ACTIVITE ANTI-FONGIQUE

Ces propriétés ont été étudiées par Dhar et coll., en 1968, sur un extrait alcoolique de la plante entière, grâce à des tests in vitro.

Les microorganismes utilisés consistent en deux levures (Candida albicans, Cryptococcus neoformans), deux dermatophytes (Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis) et un champignon pathogène des plantes (Aspergillus niger).

L'extrait végétal est considéré comme actif, si la concentration de 25 µg d'extrait sec/ml inhibe la croissance de l'organisme considéré.

Les auteurs n'observent aucune activité fongicide, dans les conditions envisagées et avec les organismes considérés.

#### VI - 4 ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

En 1968, Dhar et coll. réalisent des essais in vitro (sur cultures d'anthelminthes obtenus à partir de souris préalablement infectées avec des oeufs mûres) et in vivo (inoculation des vers à des rats nouvellement sevrés ou à des souris, respectivement huit et quatorze jours avant l'administration orale de 250 mg/kg d'extrait alcoolique de la plante entière, puis sacrifice des animaux trois jours après le traitement et comptage des vers isolés de l'intestin.

Aucune activité anthelminthique n'est observée, vis-à-vis de Nippostrongylus brasiliensis et Hymenolepis nana.

#### VI - 5 ACTIVITE ANTI-VIRALE

Ces propriétés ont été étudiées in vitro par Dhar et coll. (1968), sur un extrait alcoolique de la plante entière, testé à la concentration de 0,05 mg/ml.

L'inhibition est mesurée par la diminution de la concentration virale induite par l'extrait végétal, en comparaison à des témoins (une chute de 75 % et de 100 % est reconnue significative pour les concentrations respectives de Ranikhet disease et Vaccinia).

Aucune activité anti-virale n'est observée.

## VI - 6 ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE

Les propriétés hypoglycémiantes d'E. hirta ont été mises en évidence par Dhar et coll. (en 1968), chez le rat. L'extrait alcoolique de plante entière est administré par voie orale, à raison de 250 mg/kg. Le taux de glucose sanguin est déterminé deux et quatre heures après l'administration de l'extrait ; l'hypoglycémie est considérée comme significative, si la chute est au moins de 30 %.

## VI - 7 ACTIVITE SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET ACTIVITE ANALGESIQUE

En 1968, Dhar et coll. mettent en évidence, chez la souris, l'absence d'effets d'un extrait alcoolique de plante entière (doses testées non précisées), sur les paramètres suivants : activité motrice spontanée ; réflexes de redressement ; réflexes cornéen et pinéal ; tonus musculaire ; posture ; démarche (ataxie et contorsions) ; yeux (pupille et ptose) ; respiration ; apparition éventuelle de tremblements, de convulsions, de piloérection, de cyanose, de larmoiement, de diarrhée, du comportement processionnaire de la souris (test caractéristique des morphinomimétiques).

De plus, aucun effet analgésique n'est obtenu dans les tests de Haffner (douleur occasionnée par le pincement de la queue) et de la plaque chauffante.

## VI - 8 PROPRIETES INSECTICIDES

En 1950, Heal et coll. étudient ces propriétés, grâce à deux types de tests :

- Le test d'injection dans le sang, effectué sur des blattes américaines Periplaneta americana (L.), permettant de rechercher la présence de toxiques actifs par injection et non par contact ou par administration orale.

- Le test d'immersion, réalisé sur des blattes allemandes Blatella germanica et des punaises du laiteron Oncopeltus fasciatus, permettant de rechercher la présence de toxiques actifs par contact.

E. hirta est testée sous la forme d'un extrait aqueux. Dans le test d'injection, la dose administrée est de 0,004 ml pour une blatte de 0,1 g, soit environ 4 g de plante sèche/kg ; l'injection est effectuée entre la tête et le prothorax. Dans le cas du test d'immersion, l'animal est immergé dans l'extrait, pendant une minute.

Les auteurs obtiennent 100 % de paralysie, au bout de deux jours, sans récupération ultérieure, dans le premier test. Dans le second test, une mortalité moyenne inférieure à 20 % est obtenue, au bout de quatre jours.

#### VI - 9 RESISTANCE AUX HERBICIDES

En 1979, Khosla met en évidence la résistance d'E.hirta à l'épandage de 2,4-D (solution saline à 80 %) testé aux doses de 0,625 - 1,25 et 2,50 kg/ha ; la durée des effets de cet herbicide n'est environ que de deux mois (le sarclage manuel, quant à lui, n'est efficace que pendant une dizaine de jours). Par contre, la Gramoxone a, herbicide de contact, testée à 5/16 L/ha, tue la plante dans les douze heures.

*SECTION B*

*TRAVAUX PERSONNELS*

Largement répandue dans toutes les zones tropicales et subtropicales du globe et présentant une plasticité écologique importante (pourtour des agglomérations, bas-côté des routes, jachères, terrains vagues, cultures...), E. hirta fait partie des plantes médicinales très couramment employées en médecines traditionnelles.

Selon les pays, selon les ethnies, ses nombreuses indications peuvent être différemment mises à profit, tant au niveau des parties de la plante utilisées, des préparations, qu'au niveau des modes d'administration (usage interne ou externe) (deuxième partie : "Indications thérapeutiques traditionnelles"). Si certaines de ces indications sont communément retrouvées, telles que les propriétés anti-diarrhéiques, anthelminthiques, laxatives, anti-asthmiques, galactagogues, antiseptiques et cicatrisantes, ce sont essentiellement ses propriétés amoebicides qui ont fait l'objet de très nombreux travaux (Debaille et Petard, 1953 - Martin et coll., 1964 - Ridet et Chartol, 1964 - Dhar et coll., 1968 - Basit et coll., 1977 - Ndir et Pousset, 1982 - Dalil, 1984 - Karimou, 1984) (cinquième partie - section A : "Etudes pharmacologiques antérieures") et qui constituent actuellement le pôle d'intérêt des chercheurs, notamment en raison du caractère presque endémo-épidémique de cette affection parasitaire.

A notre connaissance, aucune recherche approfondie n'a été menée jusqu'alors, sur une éventuelle activité de cette plante au niveau du système nerveux central. Il faut bien reconnaître qu'aucune indication thérapeutique traditionnelle précise et suffisamment usitée ne pouvait susciter une telle investigation pharmacologique ; en effet, les seules données de la littérature, par ailleurs relativement peu précises, que nous ayons pu retrouver sont celles de Caius (1938) mentionnant la mise à profit des propriétés narcotiques d'E. hirta à la Réunion, ainsi que celles de Steinmetz (1964) signalant une action légèrement sédative connue en Asie orientale. De plus,

aux Philippines, la plante entière serait employée, entre autre, comme sédatif et soporifique (Quisumbing, 1951).

Bien plus, au cours d'un large screening effectué sur 285 plantes indiennes, Dhar et ses collaborateurs (1968) constatent l'absence de tout effet sur le système nerveux central d'un extrait alcoolique de plante entière (études portant sur l'activité motrice spontanée ; les réflexes de redressements ; les réflexes cornéen et pinéal ; le tonus musculaire ; la posture ; la démarche ; le ptosis ; la respiration ; l'apparition de tremblements, de convulsions, de piloérection, de cyanose, de larmimation, de diarrhée, du comportement processionnaire de la souris), ainsi que l'absence d'effet analgésique dans les tests de Haffner et de la plaque chauffante (cinquième partie - Section A : "Etudes pharmacologiques antérieures").

Aussi, toutes ces données constituaient autant d'éléments peu motivants pour la réalisation d'une étude pharmacologique approfondie dans le domaine des substances neurotropes.

Toutefois, les observations rapportées par P. Cabalion, lors d'une communication personnelle (1983), ont particulièrement retenu notre attention. Ainsi, ce dernier confirmait, d'une part, l'activité amoebicide d'E. hirta, expérimentalement démontrée à Port-Vila (Nouvelles Hébrides) sur certains cas de polyparasitoses infantiles (infections par des amibes, des *Giardia lamblia*, ...) dont le traitement par les amoebicides usuels posait de sérieux problèmes, et proposait, d'autre part, d'étendre cette indication aux *Giardia lamblia*.

Mais l'observation la plus intéressante pour nous, révélée après consommation d'une décoction d'E. hirta prescrite pour traiter un cas d'amibiase rebelle, consistait dans l'obtention inattendue d'un effet calmant. Trois personnes, dont P. Cabalion lui-même, ont ainsi déclaré se trouver dans un état de "calme serein très agréable". D'après les termes employés, ces trois cas pouvaient laisser présager une activité sédatrice ; Cabalion envisageait, quant à lui, un effet apparemment de type anxiolytique non soporifique.

Bien évidemment, ces trois observations ponctuelles sont loin de suffire pour dépasser le stade des hypothèses et avancer

l'existence de tels effets.

Néanmoins, en raison de l'engouement sans cesse croissant, d'une part pour les médicaments "anti-stress" et notamment pour les benzodiazépines, dans les pays industrialisés où l'anxiété reste l'un des problèmes de société majeur, et d'autre part pour les médecines dites "douces" souvent préférées aux substances chimiques de synthèse dont les effets secondaires indésirables sont loin d'être négligeables, la vérification expérimentale des hypothèses avancées par Cabalion nous est apparue fortement intéressante.

L'intérêt porté à de telles indications, pour un extrait végétal, s'est trouvé conforté par la confirmation de l'existence de propriétés sédatives et anxiolytiques pour d'autres extraits végétaux, au cours de précédents travaux effectués au sein de notre laboratoire (Bertrand, 1988 - Rolland, 1988).

Notre démarche pharmacologique a été conçue de la façon suivante :

- dans un premier temps, nous nous sommes attachés à vérifier la validité des hypothèses précédemment avancées, sur l'animal, au moyen de différents tests pharmacologiques comportementaux. Cette confirmation de l'existence de propriétés sédatives et anxiolytiques pour E. hirta a pu être complétée par la recherche de propriétés hypnotiques, neuroleptiques et anti-dépressives, permettant ainsi de mieux cerner l'activité psychotrope de l'extrait végétal.

- la deuxième étape de notre travail a été consacrée à la recherche d'un mécanisme d'action de type benzodiazépinique, les benzodiazépines constituant les tranquillisants mineurs les plus largement employés.

Pour ce faire, nous avons entrepris, par la réalisation de techniques in vitro, de déceler certaines propriétés secondaires caractéristiques de ces composés (propriétés anti-convulsivantes et myorelaxantes) et de rechercher une éventuelle inhibition des effets sédatifs d' E. hirta par un antagoniste spécifique des récepteurs benzodiazépiniques. Nous

avons ensuite complété cette étude en tentant d'adapter, aux extraits végétaux, une technique in vitro de binding appliquée aux molécules de synthèse, dans le but de mettre en évidence une éventuelle affinité de l'extrait d'E. hirta pour les sites récepteurs aux benzodiazépines.

- dans un troisième temps, nous avons complété le profil pharmacologique d' E. hirta en abordant le domaine des anti-histaminiques, au moyen d'une technique in vitro permettant la mise en évidence d'une éventuelle affinité de l'extrait végétal pour les sites récepteurs histaminiques.

Nous avons également recherché l'existence de propriétés analgésiques centrales et périphériques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires, à l'aide de modèles expérimentaux couramment utilisés pour l'étude de telles activités, chez l'animal.

Enfin, nous avons tenté d'aborder les problèmes de tolérance et de dépendance, caractéristiques des analgésiques opioïdes.

Dans ce but, l'influence d'administrations répétées d'E. hirta par voie intra-péritonéale a été recherchée sur diverses activités pharmacologiques précédemment obtenues chez la souris, à la suite d'un prétraitement unique, à savoir les propriétés sédatives, inductrices du sommeil barbiturique et analgésiques

- La dernière partie de cette recherche pharmacologique regroupe les différentes tentatives d'administration orale de l'extrait aqueux d'E. hirta, chez le rat et la souris, menées afin de retrouver les effets sédatifs et analgésiques précédemment décelés, après administration intra-péritonéale.

*CHAPITRE A*

*EXTRAITS ET ANIMAUX*

*UTILISES*

## **I PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES**

### **I - 1 EXTRAITS D'E. HIRTA**

L'ensemble de cette étude pharmacologique a été réalisé sur un même lot de plante entière sèche, fourni gracieusement en 1984 par Cabalion P., chargé de mission aux Nouvelles Hébrides (île de Vaté ou Sandwich, mission de Port-Vila, Vanuatu).

E. hirta nous est parvenue après identification d'un échantillon, sur le lieu de la récolte, et après comparaison aux spécimens des herbiers de Nouméa (Nouvelle Calédonie) et de Port-Vila (Nouvelles Hébrides).

#### **1.1 Extraction**

La plante entière sèche est réduite en poudre fine (particules inférieures à 1,5 mm), puis jetée dans de l'eau distillée bouillante, à raison de 60 g de plante sèche pour 600 ml d'eau. Après agitation, la préparation est placée à l'étude à 44°C, pendant 24 heures.

Le macérat aqueux ainsi obtenu est filtré sur Büchner.

#### **1.2 Déshydratation**

L'extrait aqueux obtenu est ensuite lyophilisé (lyophilisateur CD 52-1, Heto, Danemark). Cette opération permet l'obtention d'une poudre ocre qui sera conservée dans des flacons munis d'un bouchon dessiccateur, à l'abri de la lumière.

Le rendement de l'extraction est généralement proche de 14 % (10 % - 17 %).

#### **1.3 Les différents extraits aqueux d'E. hirta**

Depuis la réception du lot de plante sèche, plusieurs lyophilisats ont été préparés en 1984 (EH 84), 1985 (EH 85), 1986 (EH 86) et 1987 (EH 87).

Leur conformité a pu être contrôlée par chromatographie sur couche mince, permettant l'obtention de profils chromatographiques similaires, présentés dans la quatrième partie de ce travail (Etude chimique - Section B).

C'est pourquoi, nous parlerons toujours de "l'extrait végétal", au cours de cette étude pharmacologique, sans différencier les différentes préparations réalisées, exception faite des expérimentations de reproductibilité.

Dans tous les tests pharmacologiques, l'extrait végétal est injecté par voie intra-péritonéale (I.P.), après dissolution dans une solution de NaCl 0,9 %.

Les doses d'E. hirta administrées aux animaux sont toujours exprimées en mg de plante sèche par kg de poids corporel.

## I - 2 EXTRAIT DE POA SPECIES (POACEAE)

Un extrait hydro-alcoolique de Poa species est utilisé sous forme de lyophilisat.

### 2.1 Extraction

Après séchage à température ambiante, les parties aériennes de la plante sont réduites en poudre fine (particules inférieures à 1,5 mm), puis soumises à une lixiviation par de l'éthanol à 60 %, à l'aide d'un extracteur en continu (Soxhlet).

La filtration de l'extrait hydro-alcoolique ainsi obtenu permet de séparer une phase hydro-alcoolique limpide, d'un résidu solide.

Cette phase est ensuite débarrassée de l'alcool, par évaporation sous vide, à 36°C.

## **2.2 Déshydratation**

La phase aqueuse précédemment obtenue est lyophilisée (lyophilisateur CD 52-1, Heto, Danemark), permettant l'obtention d'une poudre ocre qui sera conservée dans des flacons munis d'un bouchon dessiccateur, à l'abri de la lumière. Le rendement de l'extraction est de 14 %.

## **II CARACTERISTIQUES ET CONDITIONS D'ELEVAGE DES ANIMAUX UTILISES DANS LES DIFFERENTES EXPERIMENTATIONS**

### **II - 1 ESPECES UTILISEES**

#### **1.1 Souris**

Les souris mâles hétérozygotes utilisées sont issues de la lignée Swiss et proviennent des centres d'élevage Césal (Montmédy (55)), Janvier (Le Genest (53)) ou du laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg.

Un certain nombre de tests pharmacologiques sont effectués sur des animaux âgés de 7 à 9 semaines (élevages Césal et Janvier), d'autres étant réalisés sur des souris âgées de 11 à 14 semaines (élevage du laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg).

#### **1.2 Rats**

Les expérimentations in vivo font appel à des rats mâles de la lignée OFA (Iffa-Credo, l'Arbresle (69)), d'un poids moyen compris entre 200 et 300 g au moment du test.

Dans le cas particulier de la recherche de propriétés anti-inflammatoires, des rats mâles de la lignée Wistar (Iffa-Credo, l'Arbresle (69)) sont rendus polyarthritiques par injection intra-dermique, à la base de la queue, de 0,1 ml d'une suspension huileuse à 4 % de *Mycobacterium butyricum* tués. Leur poids moyen est de 195 g au début de l'expérimentation

Les expérimentations in vitro sont réalisées sur des rats femelles Wistar (Iffa-Credo, l'Arbresle (69)), pesant entre 300 et 400 g au moment de leur utilisation.

#### **1.3 Cobayes**

Il s'agit de cobayes mâles (Iffa-Credo, l'Arbresle (69)), dont le poids moyen est compris entre 250 et 300 g au moment du test.

## II - 2 CONDITIONS D'ELEVAGE

### 2.1 Souris

Dès leur réception, les animaux en provenance des centres d'élevage Césal ou Janvier sont répartis au hasard et par groupe de 5, dans des cages en macrolon (22 x 16 x 14 cm), puis placés dans une animalerie soumise à un cycle jour/nuit de 12 heures d'éclairement et 12 heures d'obscurité et maintenue à une température constante de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Les animaux élevés au laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg sont sevrés à l'âge de 4 semaines, puis groupés par 5 dans des cages en macrolon (22 x 16 x 14 cm). L'animalerie est également cyclée et maintenue à une température constante de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

L'eau et la nourriture (croquettes complètes et vitaminées M25 Extra-labo, Provins (77)) sont fournies à volonté.

Quinze jours avant le test, les animaux sont placés dans la pièce expérimentale également cyclée et maintenue à température constante. Les expérimentations sont réalisées durant la phase nocturne et donc active des animaux et ceci en lumière rouge.

### 2.2 Rats et cobayes

Dès leur réception, les animaux sont répartis au hasard par groupe de 5 ou 10 dans des cages en macrolon (37 x 37 x 18 cm). La période d'adaptation est de 15 jours, durant lesquels les animaux sont maintenus dans une animalerie cyclée (12 heures d'éclairement/12 heures d'obscurité) et thermostatée (température de  $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Les rats polyarthritiques sont réceptionnés 7 jours après l'injection de l'adjuvant de Freund (suspension huileuse à 4 % de *Mycobacterium butyricum* tués) et utilisés immédiatement. L'eau et la nourriture leur sont fournies ad libitum. Les rats

reçoivent des croquettes complètes et vitaminées M25 (Extra-Labo, Provins (77)) ; les cobayes, quant à eux, sont nourris de croquettes vitaminées M25 spéciales cobayes (Extra-Labo, Provins (77)), de plus, l'eau de boisson leur est fournie enrichie en vitamine C (250 mg/l).

*CHAPITRE B*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*PSYCHOTROPES*

Depuis les travaux de Delay et coll. (1952) concernant l'emploi thérapeutique psychiatrique du premier neuroleptique synthétisé, la chlorpromazine, les substances psychotropes sont arbitrairement classées en trois groupes principaux :

- les **psycholeptiques** (hypnotiques, neuroleptiques ou tranquillisants majeurs et anxiolytiques ou tranquillisants mineurs), qui réduisent l'activité mentale.
- les **psychoanaleptiques** (nooanaleptiques, anti-dépresseurs et psychostimulants), qui augmentent l'activité mentale.
- les **psychodysleptiques**, regroupant les substances hallucinogènes et non hallucinogènes capables de dévier l'activité mentale dans un sens ou dans l'autre.

En fait, très souvent, la classification de certaines substances s'avère très difficile, la séparation pharmacologique entre ces trois groupes de psychotropes n'étant pas aussi aisée que le classement arbitraire précédemment présenté pourrait le laisser supposer.

Ainsi, les tranquillisants mineurs, mais également certains hypnotiques, neuroleptiques et anti-dépresseurs sont dotés de propriétés sédatives et/ou anxiolytiques plus ou moins marquées (Simon, 1979). Certains tranquillisants mineurs peuvent exercer des effets hypnotiques et/ou anti-dépresseurs (Simon, 1979 - Kostowski et coll., 1986).

Dans la mesure où les hypothèses de départ, concernant des effets sédatifs et anxiolytiques, sont toutes ou en partie vérifiées, il n'est pas envisageable d'effectuer la recherche d'une activité psychotrope, sans aborder les différentes autres classes essentielles, pour lesquelles de telles propriétés sont susceptibles d'être décelées.

C'est pourquoi, après la mise en évidence d'effets sédatifs et anxiolytiques pour E. hirta, nous avons recherché l'existence de propriétés hypnotiques propres, mais aussi une éventuelle interaction avec les barbituriques, souvent constatée pour

certaines substances psychotropes qui sont capables de potentialiser ou d'inhiber l'action de ces hypnotiques.

Nous avons également abordé la classe des neuroleptiques, puis celle des anti-dépresseurs, au moyen de tests pharmacologiques plus ou moins caractéristiques, afin de compléter cette recherche de propriétés psychotropes et de tenter un éventuel rapprochement d'E. hirta avec l'une de ces classes, ou tout au moins de dégager un profil d'activité suffisamment précis.

*I*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*SEDATIVES*

## I - 1 INTRODUCTION

La recherche de propriétés sédatives est réalisée grâce à l'étude du comportement d'un petit rongeur, la souris, confronté à diverses situations particulières plus ou moins contraignantes.

En effet, il faut savoir que cet animal est territorial et que les repères olfactifs jouent un rôle important dans l'expression de son comportement, la souris marquant son territoire par diverses odeurs familières (sécrétions urinaires...).

Ainsi, le fait d'introduire la souris, de force, dans un milieu nouveau, dépourvu de ces repères familiers, constitue une situation très stressante et a pour effet d'activer le système nerveux central de l'animal, ce qui se traduit entre autre par une activation de l'axe hypothalamo-hypophysocorticosurrénalien (Misslin et coll., 1982), phénomène non observé lorsque la continuité topographique entre les milieux nouveau et familier est maintenue.

L'administration préventive d'une substance dotée de propriétés sédatives doit donc s'opposer à cette activation du système nerveux central, ce qui peut se traduire, au niveau expérimental, par la réduction de certains paramètres, tels que l'activité générale de l'animal, la locomotion, les redressements, l'activité exploratrice dans un milieu nouveau. Selon la situation choisie (contraignante ou non contraignante), selon les paramètres pris en compte, chaque procédure expérimentale peut apporter différentes informations, quant au comportement de l'animal.

Toutefois, seul l'ensemble de ces méthodes peut présenter une certaine valeur prévisionnelle et permettre de confirmer ou non l'existence d'une activité sédative.

D'une façon très générale, deux grands types expérimentaux peuvent être distingués : d'une part, les expérimentations contraignantes, dites paradoxalement de "situation libre" et dont le modèle actuel est le test de l'open-field ; d'autre part, les expérimentations non contraignantes.

\* les premières consistent généralement à retirer l'animal de sa cage d'élevage pour l'introduire de force dans une enceinte nouvelle, souvent fortement éclairée, sans possibilité de s'y soustraire ou d'y trouver un refuge, une cachette plus sécurisante. De telles procédures, si elles sont très fréquemment utilisées afin d'observer les conduites d'adaptation de l'animal au milieu nouveau, sont également connues pour provoquer d'importantes réactions neuro-végétatives (miction, défécation) et neuro-endocriniennes (augmentation de la réponse corticosurrénalienne).

Ainsi, en raison des importantes perturbations de l'état émotionnel de l'animal et donc des répercussions évidentes sur son comportement, ces méthodes sont très souvent utilisées lors de la recherche de propriétés anxiolytiques, mais également pour révéler l'existence d'effets sédatifs suffisamment conséquents.

Parmi les diverses procédures expérimentales mises à notre disposition (open-field, planche à trous, enceinte claire/obscur...), nous en avons sélectionnées deux : **l'activitest** et **le test de l'escalier**.

Le premier est réalisé en lumière rouge et repose sur l'enregistrement de l'activité générale de l'animal, tandis que le second se déroule en lumière blanche fortement aversive et permet de prendre en compte deux paramètres comportementaux plus restrictifs, les redressements effectués et les marches montées par l'animal.

Par modification de la procédure expérimentale, une variante a pu être introduite dans l'activitest : ainsi, l'animal peut être soumis à une situation très contraignante, à la suite de son prélèvement de la cage d'élevage et de son introduction forcée dans une enceinte nouvelle dépourvue de sciure et donc d'odeurs familières ou de tout autre repère familier. Une autre méthode consiste à laisser l'animal dans sa cage d'élevage, celle-ci étant déplacée sur l'appareil de mesure ; d'où un degré anxiogène moindre, l'animal n'étant pas directement manipulé et conservant ses repères familiers.

L'activitest apporte des informations très générales sur le comportement de l'animal, par l'enregistrement de l'activité

globale ; aussi, cette expérimentation est généralement employée lors des premiers screenings, afin de déceler l'existence d'éventuelles propriétés sédatives.

\* Le second type expérimental, pouvant être mis à profit lors de la recherche de propriétés sédatives, consiste à étudier le comportement de l'animal confronté à une situation non contraignante. C'est notamment le cas du **test d'exploration d'un milieu nouveau**, dans lequel l'animal a la possibilité d'accéder à un compartiment inconnu, contigu à son environnement familier et auquel il peut se soustraire à tout moment en retournant dans le compartiment familier. La conservation des repères familiers, grâce au maintien de la continuité topographique entre les milieux nouveau et familier, permet d'éviter toute perturbation neuro-végétative et neuro-endocrinienne majeure ; ce protocole est particulièrement adapté à l'étude du comportement explorateur des animaux.

Divers paramètres comportementaux peuvent être pris en considération, tels que la préférence de l'animal pour le milieu nouveau, les redressements effectués dans chacun des deux milieux (nouveau et familier), les comportements auto-plastiques (toilette, prise de nourriture), le temps mis par l'animal avant de pénétrer pour la première fois dans le compartiment nouveau (temps de latence), les évitements précédant cette première entrée, mais aussi l'activité locomotrice développée dans chacun des deux milieux.

Cette dernière activité a très souvent été considérée comme l'archétype de la conduite exploratrice. En fait, si elle peut être à l'occasion exploratrice, la locomotion n'est pas synonyme d'exploration, mais elle peut servir à toute une variété de fonctions selon les circonstances. L'étude de l'activité exploratrice nécessite, quant à elle, la prise en compte de diverses autres réponses et notamment des réponses d'orientation (modification de la posture...), d'investigation (exploration active d'un objet, d'une situation, d'un congénère), d'évitement, d'enfouissement, de marquage par diverses sécrétions odorantes, mais aussi d'agression (Misslin, 1983 - File et Pellow, 1987).

Cependant, la recherche de propriétés sédatives peut être menée de façon efficace simplement par l'étude de l'activité locomotrice de l'animal, l'enregistrement de divers autres paramètres comportementaux (préférence néotique, redressements, comportements autoplastiques...) présentant un intérêt moindre et ne devant permettre que de confirmer les effets observés sur la locomotion.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces trois expérimentations contraignantes (activitest, test de l'escalier) ou non contraignante (test d'exploration d'un milieu nouveau) devrait permettre de confirmer ou non l'existence de propriétés sédatives pour E. hirta, et d'en quantifier l'importance, par estimation des doses nécessaires selon la procédure expérimentale envisagée.

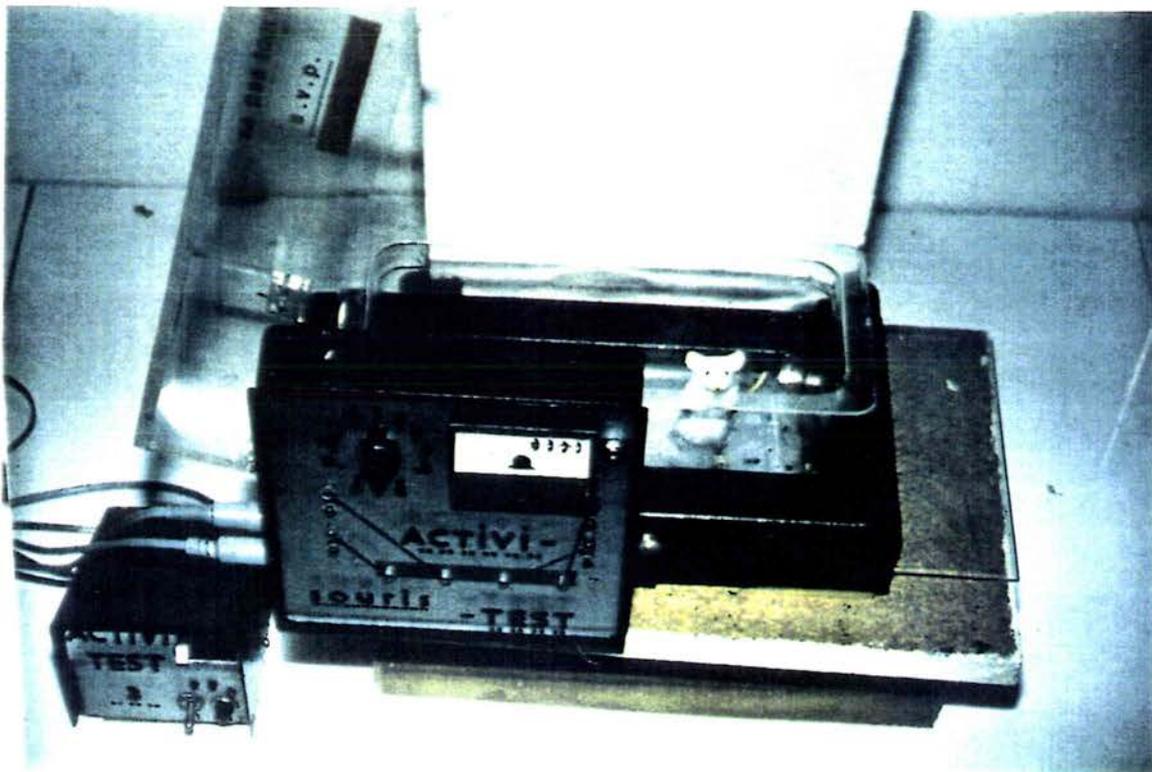


PHOTO 4 : L'ACTIVIMETRE.

## I - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACÉE DANS L'ACTIVIMÈTRE

### 2.1 Procédure expérimentale

#### 2.1.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Césal) dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le test est basé sur l'enregistrement de la motilité des animaux, à l'aide d'un activimètre de conception originale, réalisé dans notre laboratoire.

L'enceinte est constituée d'une cage standard en matière plastique (24 x 11 x 10 cm) reposant sur deux cables d'acier multibrin, eux-mêmes reliés à quatre cellules piezzo. Toute composante de force créée par chaque mouvement de la souris, qu'elle soit verticale, latérale ou transversale, provoque une flexion des cellules céramiques, engendrant un signal électrique amplifié et retransmis à un compteur mécanique. Des diodes reliées aux cellules piezzo et un micro ampèremètre permettent de contrôler le bon fonctionnement de l'appareil. La sensibilité de cet activimètre est telle qu'on arrive à enregistrer jusqu'aux mouvements respiratoires des animaux.

#### 2.1.2 Méthode

##### Expérimentation en situation contraignante

Trente minutes après l'administration I.P. des substances à tester, l'animal est saisi par la queue pour être déposé dans une cage à usage unique (24 x 11 x 10 cm), dépourvue de litière et placée sur l'appareil de mesure. Son activité générale est alors enregistrée de minute en minute, pendant cinq minutes.

E. hirta est administrée aux doses de 50, 100, 200, 400 et 800 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

### Expérimentation en milieu familial

Vingt-quatre heures avant le test, chaque animal est placé dans une cage individuelle (24 x 11 x 10 cm) contenant un poids de sciure identique. La nourriture et l'eau sont fournies à volonté.

Trente minutes après l'injection I.P. des produits à tester, la cage contenant l'animal est délicatement placée sur l'appareil de mesure. L'activité globale, ainsi que les redressements effectués par la souris, sont comptabilisés de minute en minute, pendant dix minutes.

E. hirta est administrée aux doses de 12,5 - 25 - 50 - 100 et 400 mg/kg.

Le produit de référence choisi, le clorazépate dipotassique (Tranxène<sup>®</sup>, Clin-Midy, Paris), est injecté aux doses de 1, 10 et 80 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

#### **2.1.3 Analyse statistique**

Après vérification de l'homogénéité des variances, par le test de Bartlett et réalisation d'une analyse de variance (ANOVA) sur l'ensemble des lots témoin et traités, ceux-ci sont comparés entre eux à l'aide d'un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

Le calcul des DE 50, doses efficaces réduisant de 50 % la motilité et les redressements effectués par l'animal, est effectué selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

## 2.2 Résultats

### 2.2.1 Expérimentation en situation contraignante

Les résultats présentés sur la figure 9 et dans le tableau 9 permettent de mettre en évidence une diminution progressive de l'activité motrice, avec des doses croissantes d'E. hirta. Cet effet devient significatif dès la dose de 100 mg/kg (réduction de l'activité de 40 % par rapport au lot témoin), pour atteindre un maximum à partir de 400 mg/kg (réduction de l'activité de 71 % par rapport au lot témoin).

La DE 50 est estimée à 227 mg/kg (224-230).

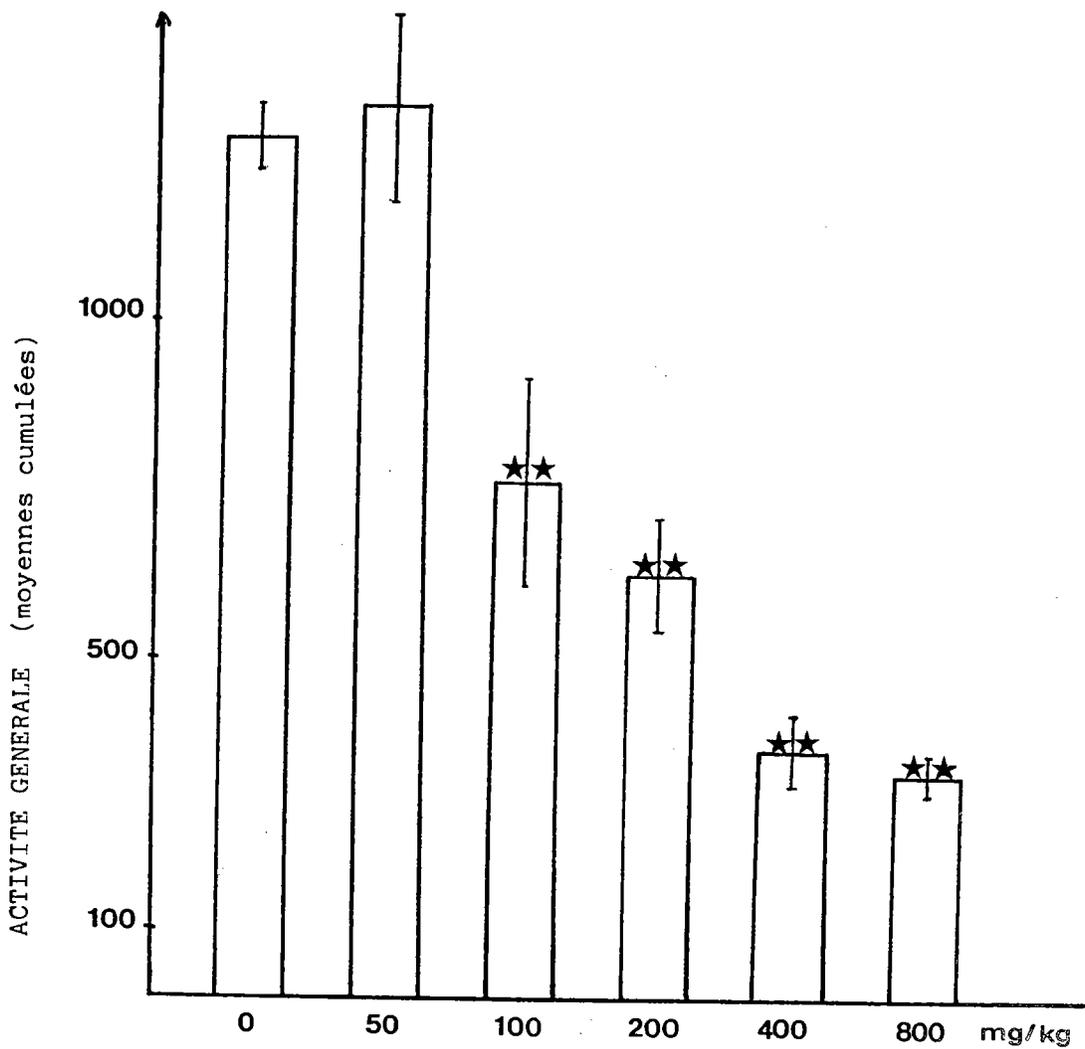
Signalons l'observation de flancs contractés, pour les animaux ayant reçu E. hirta aux doses de 100, 200, 400, ou 800 mg/kg ; ce phénomène est d'autant plus marqué que la dose d'extrait végétal est plus forte. De plus, les souris étirent leurs pattes postérieures, lors de leur déplacement.

**TABLEAU 9** : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR L'ACTIVITE GENERALE DE LA SOURIS SOUMISE A UNE SITUATION CONTRAIGNANTE : ACTIVITEST (durée totale du test : cinq minutes).

LOTS	TEMOIN:	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)				
	NaCl	50	100	200	400	800
	(N=50)	(N=10)	(N=10)	(N=20)	(N=20)	(N=10)
MOYENNE	1271	1316	760	624	364	330
			**	**	**	**
ECART-TYPE REDUIT	50	142	153	80	54	30
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+3%	-40%	-51%	-71%	-74%

N = nombre d'animaux par lot.

\*\* p < 0,01.



**FIG. 9** : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR L'ACTIVITE GENERALE DE LA SOURIS SOUMISE A UNE SITUATION CONTRAIGNANTE TEST DE L'ACTIVIMETRE (durée totale du test: 5 minutes)

\*\* P < 0,01

### 2.2.2 Expérimentation en milieu familial

Les résultats concernant l'activité globale et les redressements effectués par les animaux ayant reçu un prétraitement par E. hirta, sont présentés sur la figure 10 et dans le tableau 10 .

Les résultats obtenus après traitement par le clorazépate dipotassique sont reportés sur la figure 11 et dans le tableau 11 .

Un prétraitement par E. hirta induit une réduction dose-dépendante de la motilité des animaux enregistrée au bout de dix minutes, réduction devenant significative dès la dose de 100 mg/kg (chute de l'activité de 60 % par rapport au lot témoin). Cette action inhibitrice, significative dès la dose de 100 mg/kg, se manifeste également sur le nombre moyen de redressements effectués durant ces dix minutes (réduction de 63% par rapport au lot témoin).

Il est intéressant de constater une réduction plus précoce du nombre moyen de redressements effectués par la souris (pourcentages de variation pratiquement toujours identiques, obtenus cinq et dix minutes après l'injection des différentes doses d'extrait végétal), en comparaison de la motilité qui est affectée de façon plus importante au bout de dix minutes.

La DE 50 concernant l'activité globale est estimée à 123 mg/kg (120-125).

La DE 50 concernant les redressements est estimée à 83 mg/kg (81-84).

**TABEAU 10 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR L'ACTIVITE GENERALE ET LES REDRESSEMENTS EFFECTUES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE EN MILIEU FAMILIER (durée totale du test : dix minutes).**

**ACTIVITE GENERALE**

LOTS	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)											
	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	12,5 (N=10)		25 (N=10)		50 (N=10)		100 (N=10)		400 (N=10)		
	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn
MOYENNE CUMULEE	551	1090	575	1037	624	1021	527	857	300	433	190	295
ECART-TYPE REDUIT	38	78	88	150	65	113	66	135	57	104	24	33
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS			+4%	-5%	+13%	-6%	-4%	-21%	-46%	-60%	-65%	-73%

**REDRESSEMENTS**

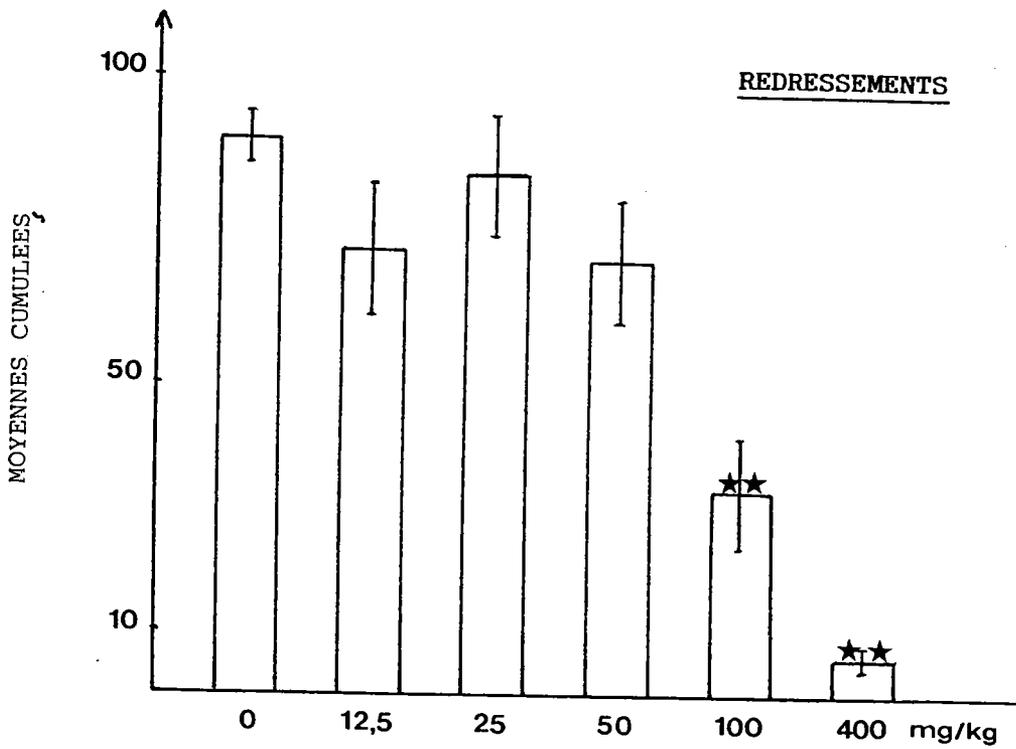
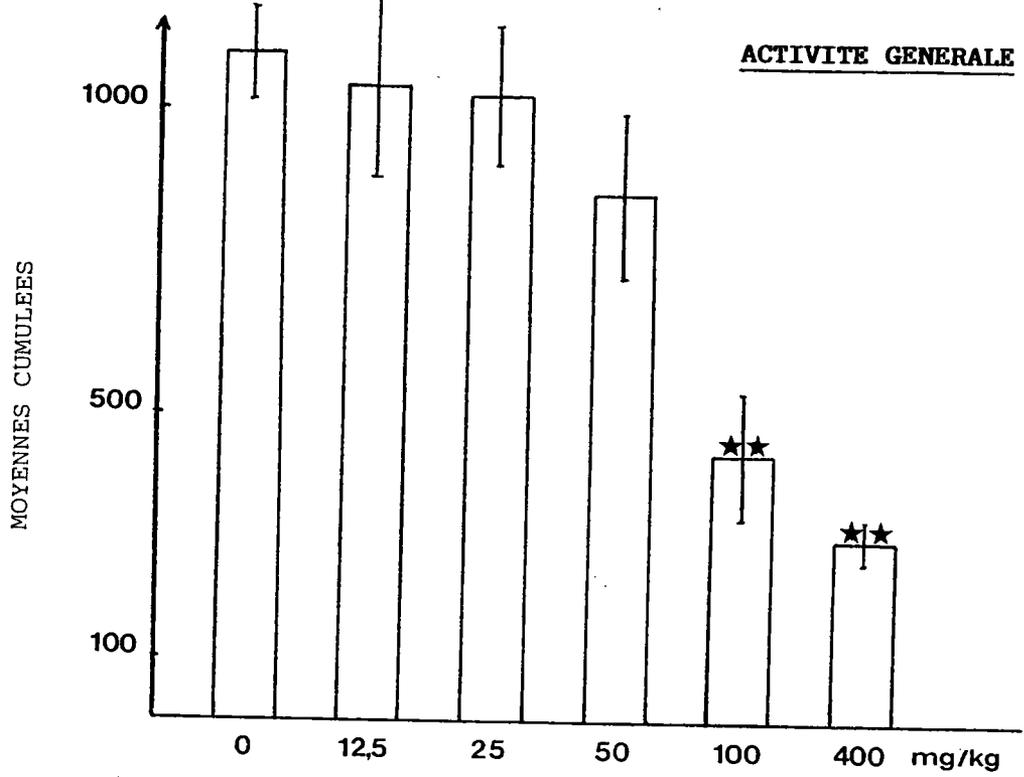
LOTS	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)											
	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	12,5 (N=10)		25 (N=10)		50 (N=10)		100 (N=10)		400 (N=10)		
	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn	T5mn	T10mn
MOYENNE CUMULEE	54	90	45	72	51	84	43	70	20	33	5	6
ECART-TYPE REDUIT	3	4	7	11	6	10	4	10	6	9	1	2
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS			-17%	-20%	-6%	-7%	-20%	-22%	-63%	-63%	-91%	-93%

N = nombre d'animaux par lot

T5mn = valeurs moyennes cumulées enregistrées au bout des cinq premières minutes.

T10mn = valeurs moyennes cumulées enregistrées au bout de dix minutes.

\*\* p < 0,01.



**FIG.10** : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA MOTILITE ET SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE, PENDANT 10 MINUTES (activitest en milieu familier).

★★  $p < 0,01$

Dans les mêmes conditions, le clorazébate dipotassique exerce une inhibition dose-dépendante sur les deux paramètres pris en compte. Toutefois, dans le cas de la motilité, cet effet ne devient significatif qu'à très forte dose, soit 80 mg/kg (chute de 63 % par rapport au lot témoin), tandis qu'une réduction significative du nombre moyen de redressements se manifeste dès la dose de 10 mg/kg (chute de 42 % par rapport au lot témoin). Contrairement aux observations faites pour l'extrait végétal, la motilité et les redressements sont plus affectés au bout de dix minutes.

Il est intéressant de constater l'effet moindre exercé par la plus forte dose de clorazébate dipotassique testée, soit 80 mg/kg, sur la motilité et les redressements (chutes respectives de 63 % et de 81 % par rapport au lot témoin), en comparaison de l'inhibition exercée par la dose de 400 mg/kg d'extrait végétal (chutes respectives de 73 % et de 93 % par rapport au lot témoin).

D'autre part, après administration d'une dose de 1 mg/kg de clorazébate dipotassique, on observe une augmentation des deux paramètres, et notamment de la motilité qui se trouve, par ailleurs, fortement affectée, cinq minutes après l'injection (augmentations respectives à cinq et dix minutes de 77 % et 50 % par rapport au lot témoin).

**TABLEAU 11 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR L'ACTIVITE GENERALE ET LES REDRESSEMENTS EFFECTUES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE EN MILIEU FAMILIER (durée totale du test : dix minutes).**

ACTIVITE GENERALE

LOTS	CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (mg/kg)							
	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)		1 (N=10)	10 (N=10)	80 (N=10)			
	T5min	T10min	T5min	T10min	T5min	T10min	T5min	T10min
MOYENNE CUMULEE	551	1090	976	1640	456	667	247	401
			**	**			*	**
ECART-TYPE REDUIT	38	78	137	252	76	144	65	88
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS			+77%	+50%	-17%	-39%	-55%	-63%

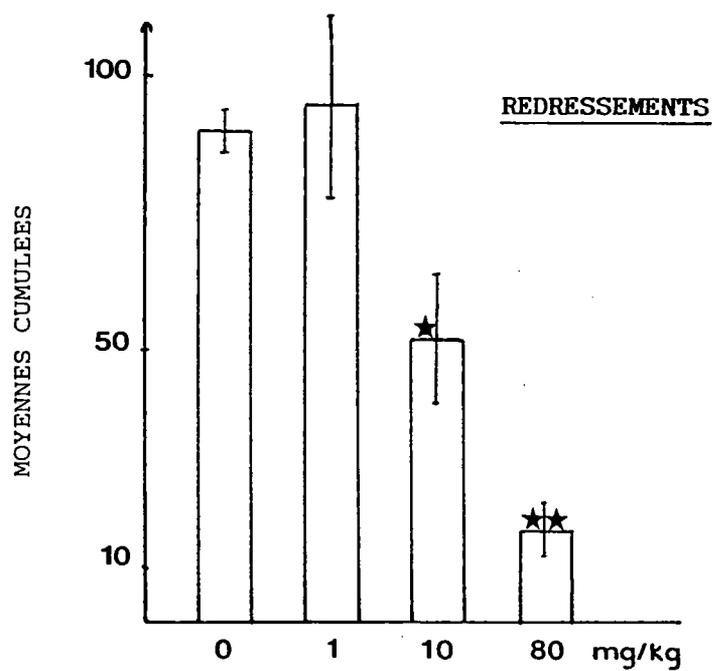
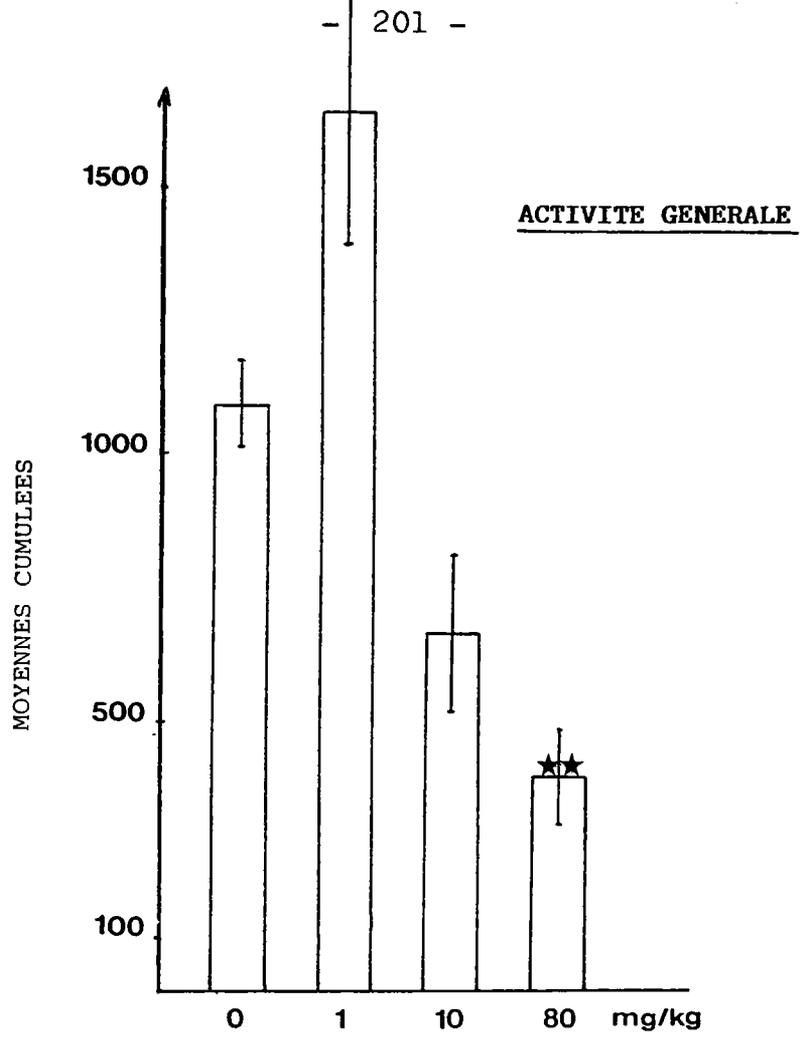


FIG. 11 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR L'ACTIVITE GENERALE ET SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE, PENDANT 10 MINUTES (activitest en milieu familier).

★  $p < 0,05$  ; ★★  $p < 0,01$

REDRESSEMENTS

LOTS	CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (mg/kg)							
	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)		1 (N=10)		10 (N=10)		80 (N=10)	
	T5min	T10min	T5min	T10min	T5min	T10min	T5min	T10min
MOYENNE CUMULEE	54	90	47	95	38	52	12	17
ECART-TYPE REDUIT	3	4	8	17	7	12	4	5
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS			-13%	+6%	-30%	-42%	-78%	-81%

N = nombre d'animaux par lot

T5min. = valeurs moyennes cumulées, enregistrées au bout des cinq premières minutes

T10min. = valeurs moyennes cumulées, enregistrées au bout de dix minutes

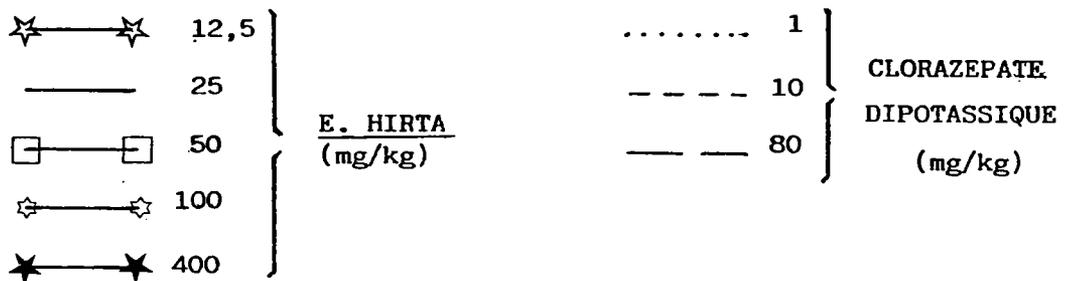
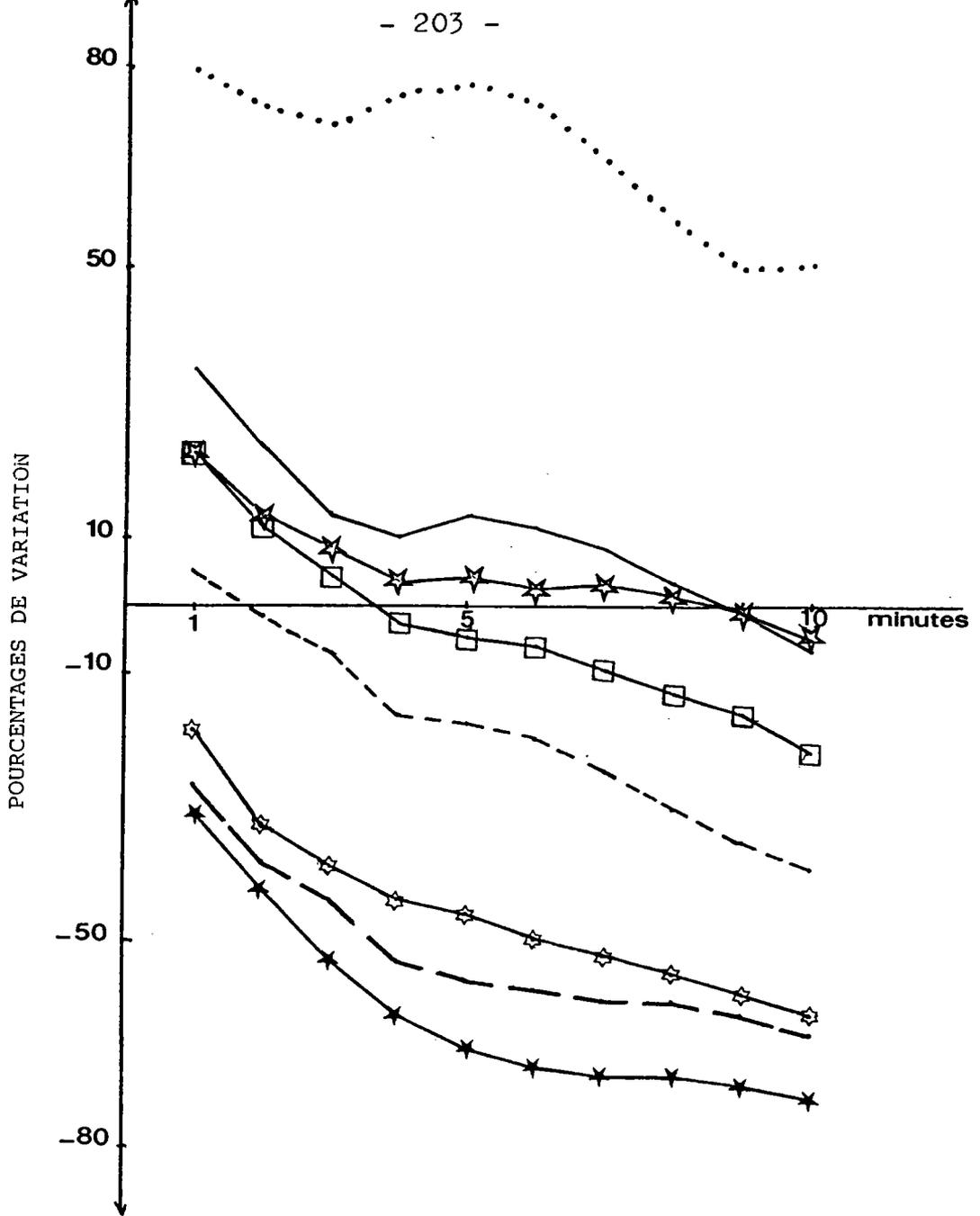
\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01

L'enregistrement minute par minute de la motilité de l'animal, présenté sur la figure 12 permet de visualiser une diminution progressive de ce paramètre pour tous les lots traités, les animaux se déplaçant de moins en moins, pour finir, parfois, par se blottir dans un coin de la cage et ceci notamment après traitement par les plus fortes doses d'extrait végétal (100 et 400 mg/kg) ou de clorazépate dipotassique (80 mg/kg).

Tout au long de cette expérimentation, cette forte dose de clorazépate dipotassique occupe une position intermédiaire entre les doses significativement actives d'E. hirta (100 et 400 mg/kg).

La dose de 10 mg/kg de produit de référence, quant à elle, se positionne entre ces deux fortes doses d'extrait végétal et les doses plus faibles, significativement inactives de 50 - 25 et 12,5 mg/kg.

Signalons enfin l'observation de flancs contractés et de fréquents étirements des pattes postérieures, chez les animaux ayant reçu les doses d'extrait végétal de 100 et 400 mg/kg.



**FIG. 12** : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LA MOTILITE DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ACTIVIMETRE (activitest en milieu familier).

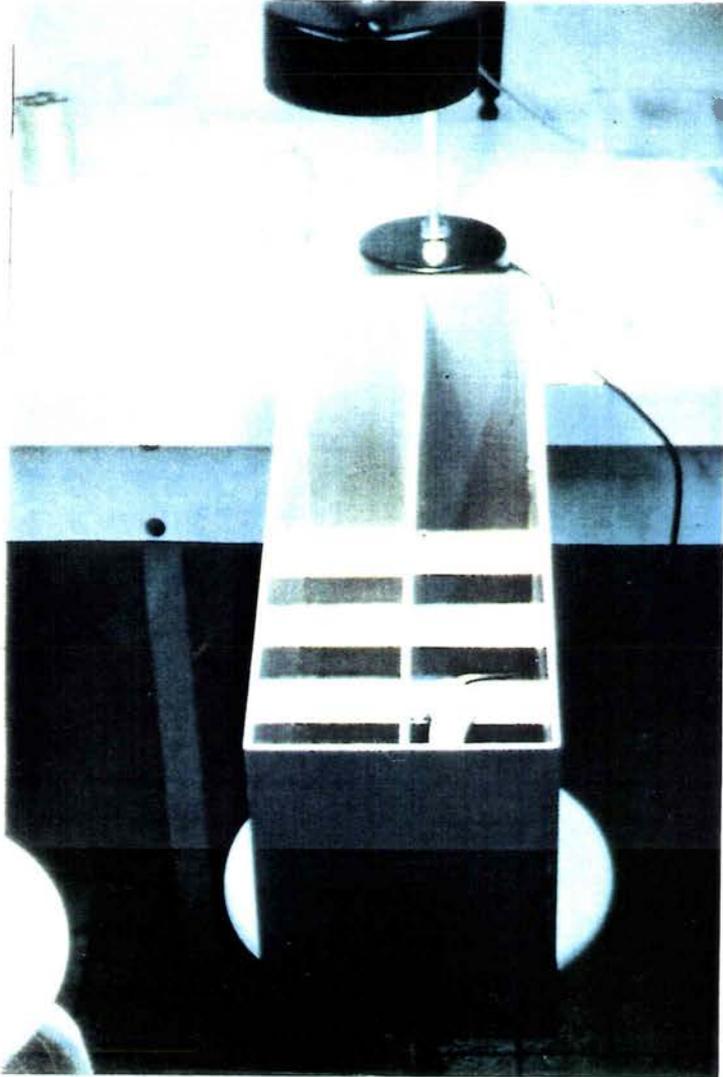


PHOTO 5 : L'ESCALIER.

## I - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACÉE DANS L'ESCALIER

### 3.1 Procédure expérimentale

#### 3.1.1 Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Césal) ; leurs caractéristiques ainsi que les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en une enceinte en plexiglass opaque (47 x 10 x 25 cm), contenant un escalier composé de 5 marches de 3 cm de haut, 7 cm de profondeur et 10 cm de large. Une lampe à incandescence blanche, placée au dessus de la marche la plus haute permet d'éclairer l'enceinte.

#### 3.1.2 Méthode

La technique utilisée est inspirée de la méthode de Molinengo et Ricci-Canaleros (1970), mise au point sur les rats et adaptée aux souris par Simiand et coll. (1984).

Trente minutes après l'injection I.P. des produits à tester, l'animal est retiré de sa cage d'élevage pour être déposé en bas de l'escalier, le dos tourné par rapport aux marches. Le nombre de redressements effectués, ainsi que le nombre de marches montées par la souris, sont comptabilisés de minute en minute, pendant cinq minutes.

E. hirta est administrée aux doses de 50, 100 et 200 mg/kg. Le clorazépate dipotassique (Tranxène<sup>®</sup>, Clin-Midy, Paris) est à nouveau utilisé comme produit de référence, aux doses de 10, 20, 40 et 80 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

### 3.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, chaque lot traité est comparé à son lot témoin (réalisé le même jour, dans les mêmes conditions expérimentales), par le test de Student.

Le calcul des DE 50, doses efficaces réduisant de 50 %, les redressements effectués et les marches montées par l'animal, est effectué selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### 3.2 Résultats

D'après les résultats présentés sur la figure 13 et dans le tableau 12, E. hirta exerce un effet inhibiteur dose-dépendant, significatif dès la dose de 100 mg/kg, sur les redressements effectués par la souris (chute de 59 % par rapport au lot témoin) et sur les marches montées (chute de 53 % par rapport au lot témoin).

Cette activité inhibitrice est, par ailleurs, très légèrement supérieure dans le cas des redressements.

La DE 50, concernant les redressements, est estimée à 74,7 mg/kg (73,9-75,5).

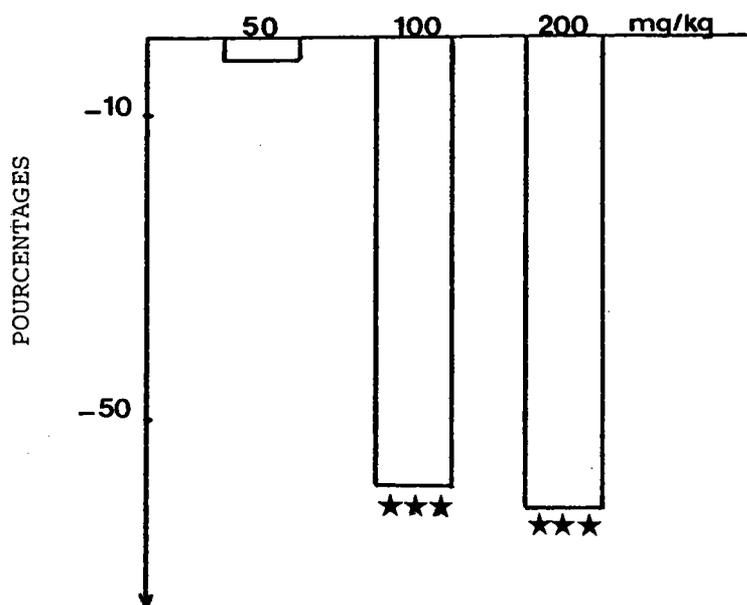
La DE 50, concernant les marches montées, est estimée à 98,7 mg/kg (97,5-100).

**TABLEAU 12** : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES ET LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS, DANS L'ESCALIER.

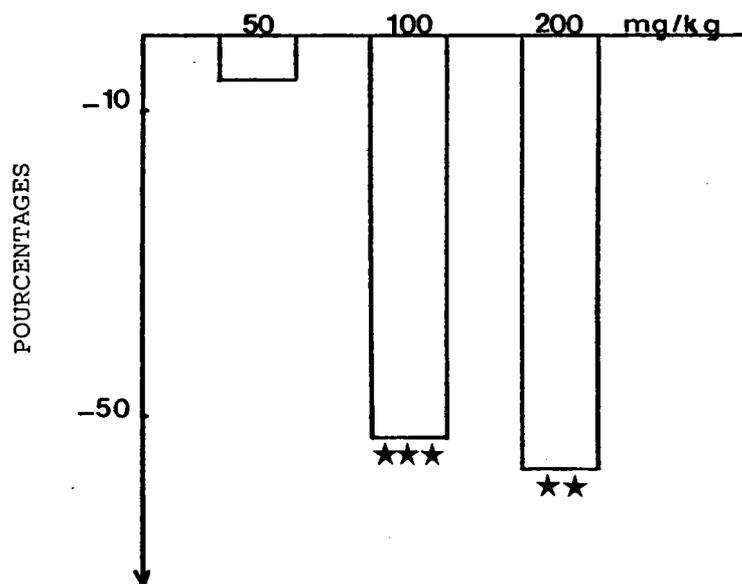
#### REDRESSEMENTS

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 50 mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 100mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 200mg/kg (N=10)
MOYENNE	32	31,1	33,9	14	33,3	12,5
ECART-TYPE REDUIT	3,9	4,9	3,2	3,4	3,7	2,7
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		-3%		-59%		-62%

REDRESSEMENTS



MARCHES MONTEES



**FIG.13** : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES ET SUR LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER (pourcentages de variation calculés pour chaque lot traité et par rapport à son témoin correspondant).

★★  $p < 0,01$  ; ★★★  $p < 0,001$

## MARCHES MONTEES

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 50 mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 100mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E.HIRTA 200mg/kg (N=10)
MOYENNE	39,8	37,3	38,8	18,3	33,3	14,3
ECART-TYPE REDUIT	3,7	3,7	3,8	2,9	4,2	3,2
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		-6%		-53%		-57%

N = nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

Des contractions abdominales, ainsi que de fréquents étirements des pattes postérieures, sont à nouveau observés chez les animaux traités par les fortes doses d'extrait végétal, soient 100 et 400 mg/kg.

Quant au produit de référence utilisé, le clorazébate dipotassique, les résultats présentés sur la figure 14 et dans le tableau 13 permettent la mise en évidence d'une réduction dose-dépendante des deux paramètres pris en compte. Cet effet se manifeste significativement sur les redressements, dès la dose de 20 mg/kg (chute de 55 % par rapport au lot témoin), mais seulement dès la dose de 80 mg/kg, sur les marches montées (chute de 82 % par rapport au lot témoin). Par ailleurs, cette inhibition est plus importante sur les redressements.

Il est intéressant de mentionner les effets très proches, observés vis-à-vis des redressements, après traitement par la dose de clorazébate dipotassique de 20 mg/kg et après administration de l'extrait végétal à la dose de 100 mg/kg (chutes respectives par rapport aux témoins correspondants de 55 % et 59 %). Par contre, l'action d'E. hirta sur les marches montées se rapproche nettement de la plus forte dose de clorazébate dipotassique testée, soit 80 mg/kg (chutes

respectives par rapport aux témoins correspondants de 53 % et 55 %).

La DE 50, concernant les redressements, est estimée à 15,6 mg/kg (15,4-15,8).

La DE 50, concernant les marches montées, est estimée à 22,6 mg/kg (22,3-22,9)

**TABLEAU 13 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD) SUR LES REDRESSEMENTS ET LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS DANS L'ESCALIER.**

**REDRESSEMENTS**

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 10mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 20mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 40mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 80mg/kg (N=10)
MOYENNE	32	43,2	35	15,7 **	35	7,5 ***	33,3	6,1 ***
ECART-TYPE REDUIT	3,9	5,3	2,9	4,7	2,9	2,6	3,7	1,9
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+35%		-55%		-79%		-82%

**MARCHES MONTEES**

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 10mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 20mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 40mg/kg (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	CD 80mg/kg (N=10)
MOYENNE	39,8	57,7	39,7	40,7	39,7	21,9	33,3	15 *
ECART-TYPE REDUIT	3,7	10,7	3,8	12,1	3,8	8,6	4,2	5,5
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+45%		+2%		-45%		-55%

N : nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

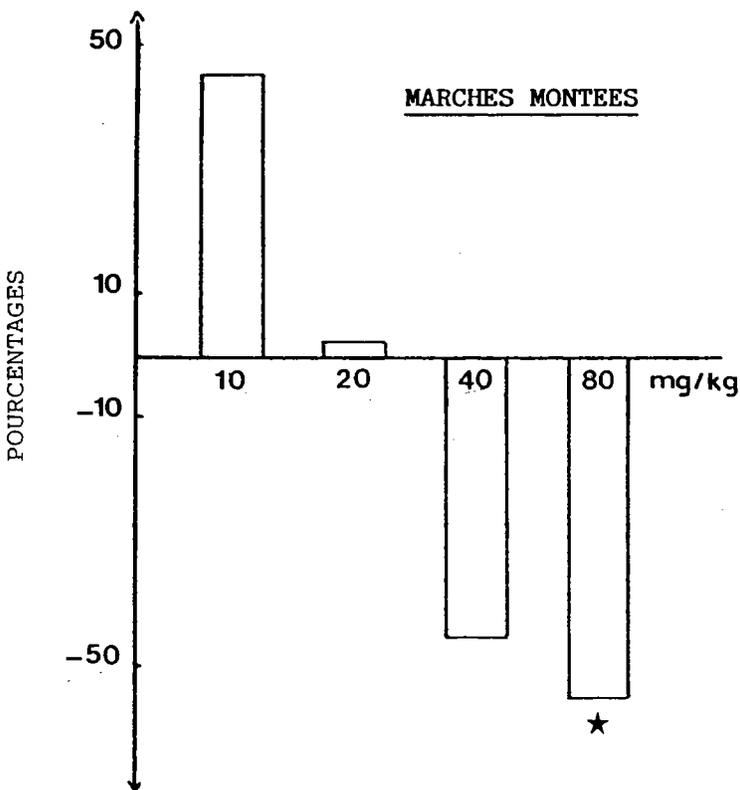
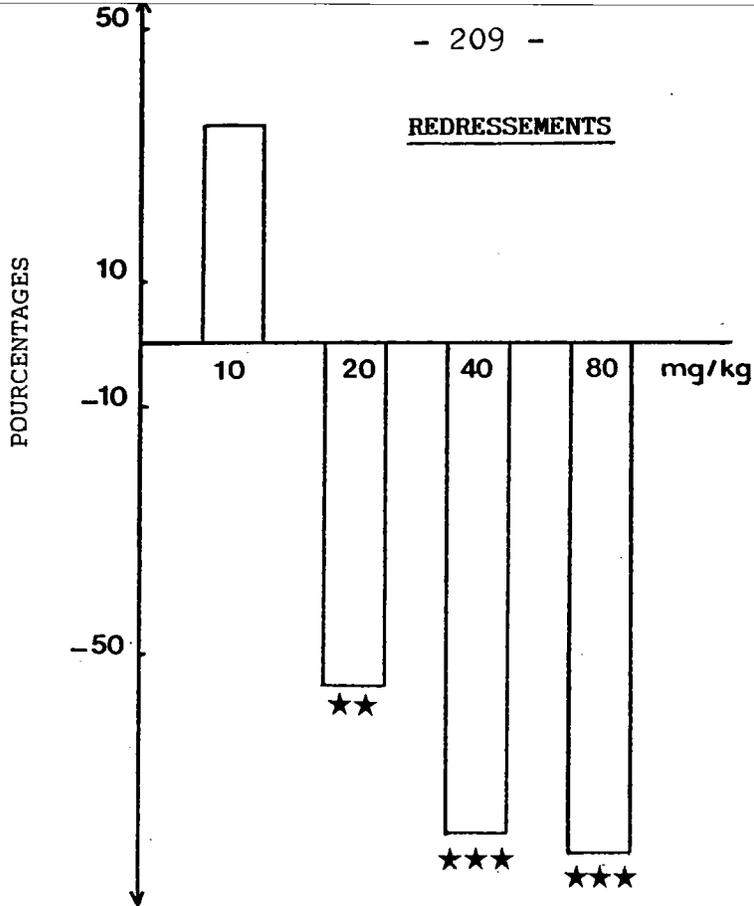


FIG. 14 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LES REDRESSEMENTS ET SUR LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER (pourcentages de variation calculés pour chaque lot traité et par rapport à son témoin correspondant).

★  $p < 0,05$  ; ★★  $p < 0,01$  ; ★★★  $p < 0,001$

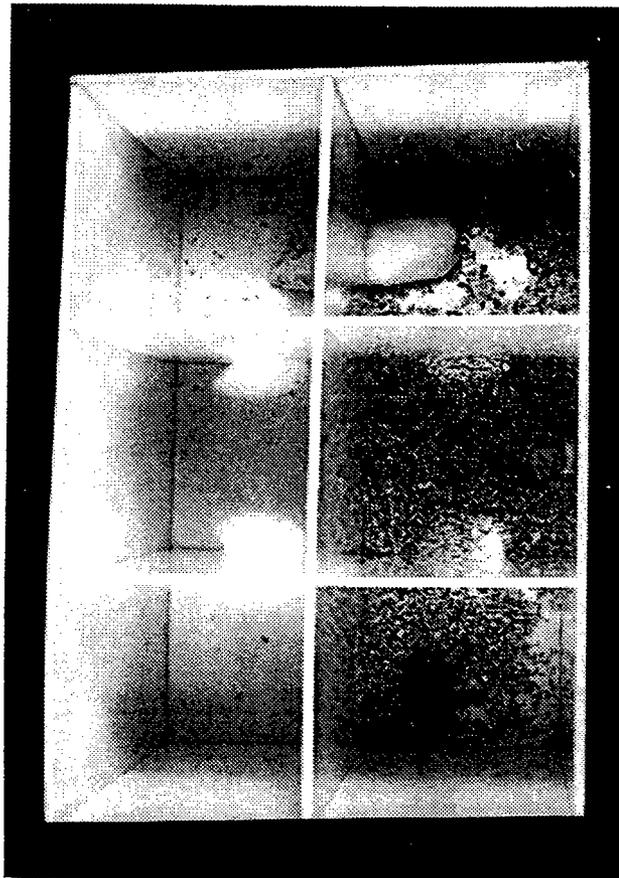


PHOTO 6 : TEST D'EXPLORATION D'UN  
MILIEU NOUVEAU.

## **I - 4 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS SOLLICITEE POUR L'EXPLORATION NON FORCEE D'UN MILIEU NOUVEAU**

### **4.1 Procédure expérimentale**

#### **4.1.1 Matériel**

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss, élevées au laboratoire de Psychophysicologie de Strasbourg. Leurs caractéristiques, ainsi que les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en une cage en PCV (30 x 30 x 20 cm) subdivisée en six unités carrées de surface égale, communiquant entre elles par de petites ouvertures. La cage est recouverte de plexiglass. Elle peut être temporairement partagée, dans le sens de la longueur, en deux compartiments égaux, au moyen d'une cloison percée de trois ouvertures, chacune d'elles étant munie d'une porte-guillotine.

#### **4.1.2 Méthode**

Décrite chez le rat, par Hughes (1965), la technique utilisée a été adaptée aux souris par Misslin et coll. (Misslin et Ropartz, 1981 - Misslin et coll., 1982 - Misslin, 1983).

Vingt quatre heures avant le test, les animaux sont isolés dans l'un des deux compartiments (désigné comme le compartiment familial, CF), l'autre restant provisoirement inaccessible. Ce compartiment familial contient de la sciure et l'animal reçoit de l'eau et de la nourriture à volonté.

Au moment du test, chaque animal est exposé au compartiment nouveau (CN), par l'escamotage des portes-guillottes. Son comportement est alors observé de minute en minute, pendant dix minutes. Le paramètre pris en compte est l'activité locomotrice, évaluée par comptabilisation du nombre d'unités

pénétrées par la souris, dans chacun des deux compartiments : activité locomotrice dans le familier (LF), dans le nouveau (LN) et totale ( $L = LF + LN$ ).

E. hirta est administrée par voie I.P., trente minutes avant le test, aux doses de 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200 mg/kg. Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

#### 4.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, et réalisation d'une analyse de variance (ANOVA), sur l'ensemble des lots témoins et traités, ceux-ci sont comparés entre eux par un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

Le calcul de la DE 50, dose efficace réduisant de 50 % la locomotion de l'animal est effectuée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

#### 4.2 Résultats

D'après les résultats présentés sur la figure 15 et dans le tableau 14, E. hirta réduit significativement et de façon dose-dépendante l'activité locomotrice totale (L) de la souris, dès la dose de 12,5 mg/kg (diminution de 26 % par rapport au lot témoin). Cet effet se manifeste sur l'activité locomotrice enregistrée dans chaque compartiment (LF et LN), dès la dose de 25 mg/kg.

De plus, pour tous les lots traités et témoin, l'activité locomotrice enregistrée dans le milieu nouveau (LN) est toujours plus importante que celle développée dans le compartiment familier (LF). Toutefois, cette différence est très minime, dans le cas des traitements aux doses de 50 et 100 mg/kg.

La DE 50 est estimée à 45,8 mg/kg (45-46,6 dans le cas de L ; 45,1-46,7 dans le cas de LN ; 44,9-46,5 dans le cas de LF).

Signalons l'observation de contractions abdominales et de fréquents étirements des pattes postérieures, chez les animaux traités par les plus fortes doses d'extrait végétal, soit 100 et 400 mg/kg.

TABLEAU 14 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DE LA SOURIS SOLLICITEE POUR L'EXPLORATION NON FORCEE D'UN MILIEU NOUVEAU.

LOCOMOTION TOTALE (L)

LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)				
	NaCl (N=20)	12,5 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=14)	200 (N=10)
MOYENNE	108,3	80,3	62,7	60,5	44,8	12,5
ECART-TYPE REDUIT	6,4	7,5	9,1	12,8	10,7	5,7
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		-26%	-42%	-44%	-59%	-88%

LOCOMOTION DANS LE FAMILIER (LF)

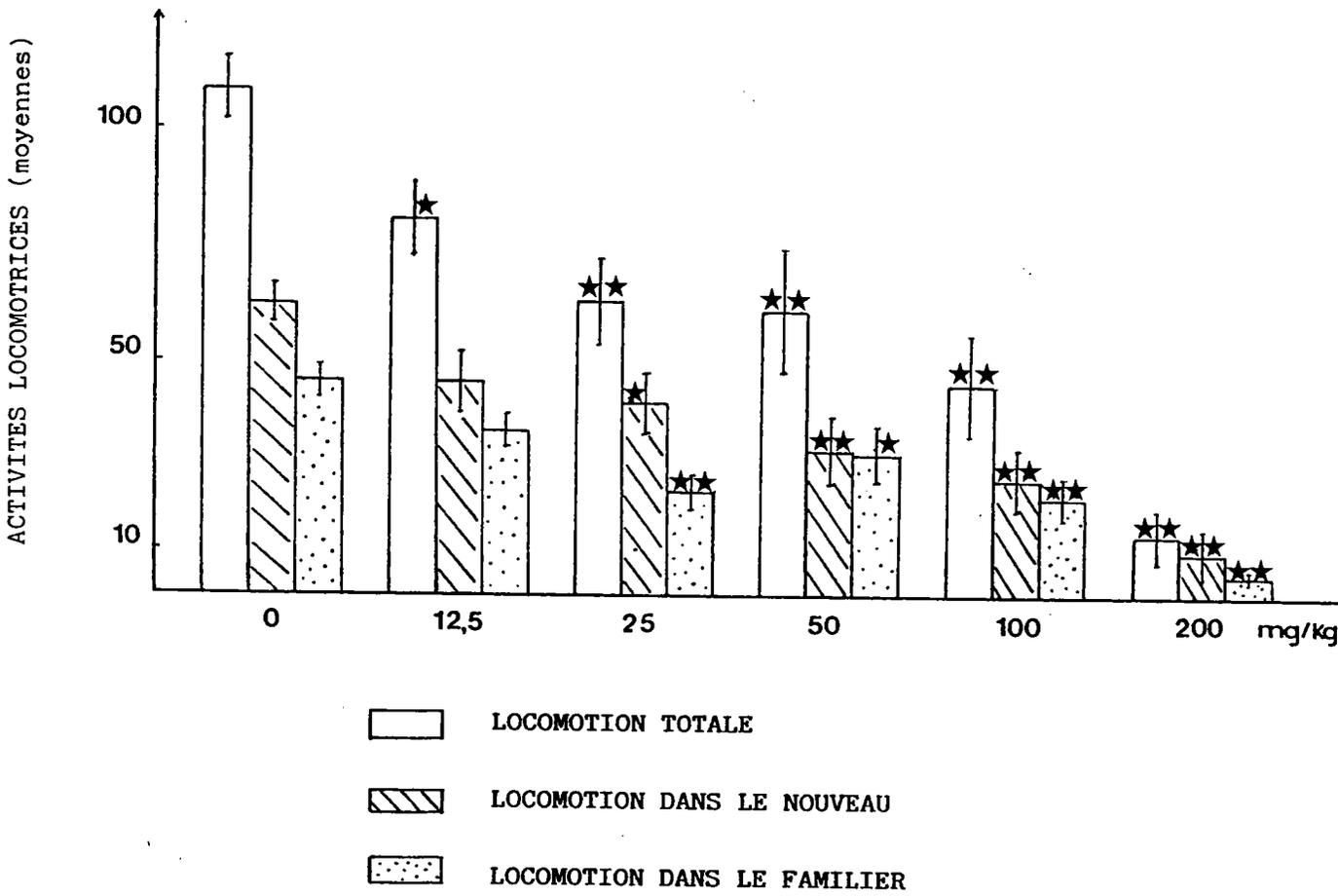
LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)				
	NaCl (N=20)	12,5 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=14)	200 (N=10)
MOYENNE	45,9	34,9	21,9	29,7	20,4	3,8
ECART-TYPE REDUIT	3,4	3,6	3,4	5,8	4,4	1,1
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		-24%	-52%	-35%	-56%	-92%

LOCOMOTION DANS LE MILIEU NOUVEAU (LN)

LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)				
	NaCl (N=20)	12,5 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=14)	200 (N=10)
MOYENNE	62,3	45,4	40,8	30,8	24,4	8,7
ECART-TYPE REDUIT	4,2	6,6	6,7	7,2	6,7	5,2
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		-27%	-34%	-51%	-61%	-86%

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .



**FIG. 15 :** INFLUENCE D'E. HIRTA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DE LA SOURIS SOLLICITEE POUR L'EXPLORATION NON FORCEE D'UN MILIEU NOUVEAU.

★  $p < 0,05$  ;    ★★  $p < 0,01$

## I - 5 DISCUSSION

Parmi les nombreuses expérimentations, couramment usitées lors de la réalisation d'un premier screening visant à rechercher, par des méthodes relativement simples et rapides, des propriétés psychotropes pour une substance inconnue, nous avons sélectionné trois tests comportementaux permettant une bonne approche d'une activité psychotrope et plus particulièrement des propriétés sédatives : l'activitest et le test de l'escalier, expérimentations dites de contrainte, le test d'exploration d'un milieu nouveau, quant à lui non contraignant.

Considérées isolément, la valeur prévisionnelle de ces expérimentations est nulle ; seule la prise en compte de l'ensemble des résultats peut permettre d'affirmer ou d'infirmer l'existence de propriétés sédatives, notamment grâce à l'étude de différents aspects du comportement de l'animal, tels que l'activité globale, l'activité locomotrice, le comportement explorateur, chacun pouvant être représenté par divers paramètres (redressements, marches montées...), selon la procédure retenue.

Un autre intérêt essentiel de la réalisation conjointe de ces trois expérimentations est lié aux différents niveaux de contrainte imposés à l'animal, selon l'expérimentation choisie, mais également, pour un même test, selon la procédure retenue.

\* Ainsi, dans l'activitest, deux cas de figures se sont présentés, l'animal pouvant être soumis à une situation contraignante (après préhension par la queue, celui-ci est placé de force dans un environnement inconnu, dépourvu de tout repère familier tel que la sciure, les odeurs...) ou laissé dans son environnement familier (l'animal n'est pas directement manipulé, mais c'est la cage d'élevage qui est déposée sur l'activimètre).

Cette seconde procédure, beaucoup moins stressante, permet d'étudier le comportement d'un animal moins perturbé, mais manifestant également moins d'intérêt pour son environnement

déjà connu, le seul stimulus consistant dans le déplacement de sa cage d'élevage sur l'appareil de mesure et par le rabattement du couvercle sur celle-ci. Sa curiosité s'exprime alors essentiellement durant les toutes premières minutes du test, pour ensuite diminuer progressivement.

Ce phénomène a pu être observé lors de notre étude, chez les animaux témoins et ceux pré-traités par E. hirta, l'activité de ces derniers pouvant même parfois s'annuler (les souris ne se déplacent plus et restent inactives dans un coin de la cage), notamment après administration de fortes doses d'extrait végétal (100 et 400 mg/kg). Les activités moyennes cumulées, enregistrées durant les cinq premières minutes du test, rendent également compte de cet intérêt moindre, les valeurs moyennes obtenues pour les lots témoins et traités étant beaucoup plus réduites en comparaison de celles enregistrées pour les animaux placés en situation contraignante.

Toutefois, si ces deux procédures expérimentales influencent l'intensité du comportement de l'animal témoin ou traité, elles ne modifient pas la dose efficace d'E. hirta : en effet, quel que soit le protocole retenu, l'extrait d'E. hirta exerce une activité sédatrice dose-dépendante et significative dès 100 mg/kg, cet effet se manifestant sur les deux paramètres pris en compte, à savoir la motilité et les redressements effectués par la souris.

\* Cette même dose d'extrait végétal, soit 100 mg/kg, s'avère également efficace dans la seconde expérimentation contraignante, le test de l'escalier, et ceci sur les deux paramètres enregistrés (redressements et marches montées).

Si cet effet sédatif dose-dépendant se manifeste de façon très légèrement supérieure vis-à-vis des redressements, cette supériorité d'activité est beaucoup plus importante, après traitement par le clorazépate dipotassique, produit de référence utilisé.

Par ailleurs, différents auteurs (Thiébot et coll., 1973, 1976 Simiand et coll., 1984) ont pu obtenir une modification relativement indépendante de ces deux paramètres, par l'action de diverses substances telles que des hypnotiques et des

tranquillisants mineurs, dont le clorazépate dipotassique, et notamment une réduction du nombre de redressements à des doses pour lesquelles le nombre de marches montées est augmenté ou inchangé. Ce phénomène a pu être observé, au cours de notre étude, en particulier avec la dose de 20 mg/kg de clorazépate dipotassique. Cependant, contrairement à ces précédents travaux, nous obtenons une réduction du nombre de marches montées, après traitement par de plus fortes doses de ce composé (40 et 80 mg/kg). De plus, précédemment mentionnées par certains auteurs (Simiand et coll., 1984), les importantes variations inter-individuelles, observées vis-à-vis du nombre de marches montées, pourraient expliquer l'absence fréquente de différence significative (lots traités par les doses de 10 et 40 mg/kg).

\* La réalisation d'une troisième expérimentation, quant à elle non contraignante, le test d'exploration d'un milieu nouveau, permet de compléter cette étude des propriétés sédatives d'E. hirta et d'obtenir de tels effets significatifs dès la dose de 12,5 mg/kg, dose inefficace dans les deux tests précédents. Cette plus grande sensibilité est essentiellement liée au maintien de la continuité topographique entre le milieu familier et le milieu nouveau ; ainsi, rassuré par l'accessibilité toujours possible à son environnement familier, l'animal est beaucoup moins perturbé, désorienté et par conséquent, une activité sédative masquée par des conditions expérimentales plus stressantes peut se révéler à de faibles doses d'extrait végétal.

Ceci transparait également dans les DE 50 obtenues qui sont d'autant plus élevées que le test est plus contraignant (soit 227 mg/kg pour l'activité générale en situation contraignante, dans l'activitest ; 123 mg/kg pour l'activité générale en milieu familier, dans l'activitest ; 46 mg/kg pour la locomotion dans le test d'exploration d'un milieu nouveau).

Au cours de cette expérimentation, le comportement de l'animal, observé dès la mise en communication des deux milieux (familier et nouveau), par l'ouverture des portes-guillottes, a tout

particulièrement retenu notre attention : ainsi, selon sa réactivité émotionnelle, celui-ci peut mettre un temps variable à s'apercevoir de ce changement : si les témoins réagissent aussitôt l'ouverture des portes, par des réponses d'alerte et d'orientation, il arrive que certaines souris, traitées par la plus forte dose d'E. hirta (200 mg/kg), s'en désintéressent et restent immobiles, le dos tourné par rapport à l'ouverture.

Une fois son attention mobilisée, l'animal ne pénètre pas immédiatement dans le compartiment nouveau, mais commence par s'approcher de l'ouverture, mouvement d'approche aussitôt suivi par un recul vers le familier. Cette succession de mouvements d'approche et de recul se poursuit pendant un certain temps durant lequel la souris progresse graduellement vers le milieu nouveau : le corps s'allonge, puis l'animal avance son museau, puis progressivement le corps tout entier, le sol nouveau étant intensément flairé. Dès cette première pénétration, l'animal revient dans le familier, pour retourner aussitôt dans le nouveau.

Après cette première phase, l'exploration du milieu nouveau commence : la souris s'y déplace lentement, manifestant de nombreuses hésitations, notamment lors du franchissement de chaque nouvelle unité (trois pour chaque compartiment), flairant le sol, les parois contre lesquelles elle se redresse fréquemment, tout en effectuant quelques passages rapides dans le milieu familier.

Traitées par des doses sédatives d'E. hirta, les souris mettent plus de temps avant de pénétrer pour la première fois dans le milieu nouveau, marquant nettement plus d'hésitation, de mouvement de recul ; elles s'y déplacent plus lentement et y effectuent moins de redressements. Ces phénomènes sont, par ailleurs, d'autant plus prononcés que la dose de plante est forte.

L'utilisation du clorazébate dipotassique (benzodiazépine), comme produit de référence, peut nous permettre d'établir

certaines comparaisons entre l'intensité des effets sédatifs de ce composé et ceux d'E. hirta.

Ainsi, administré à la dose de 100 mg/kg, première dose significativement efficace dans les deux tests contraignants (activitest et test de l'escalier), l'extrait végétal exerce une activité relativement proche de celle développée par la dose de 80 mg/kg de clorazébate dipotassique, vis-à-vis de l'activité générale de la souris enregistrée dans le test de l'activimètre en milieu familial, ainsi que vis-à-vis des marches montées par l'animal dans l'escalier. Par contre, cette même dose d'extrait végétal serait à rapprocher de la dose de 20 mg/kg du produit de référence, si l'on considère les redressements effectués par la souris dans l'escalier.

Toutefois, la dose de 80 mg/kg de clorazébate dipotassique est très probablement beaucoup trop élevée. La dépression centrale induite est très importante ; l'animal ainsi traité ne réagit pratiquement plus à son environnement et reste assoupi dans un coin.

L'existence de propriétés sédatives étant démontrée pour E. hirta, permettant ainsi de confirmer en partie les hypothèses de Cabalion P., quant à un effet calmant, le problème s'est posé de savoir s'il s'agissait d'une activité essentielle ou secondaire.

En effet, diverses substances psychotropes appartenant à différentes classes pharmacologiques, telles que les tranquillisants mineurs, les hypnotiques, les neuroleptiques et les anti-dépresseurs, peuvent présenter des effets secondaires se traduisant par des propriétés sédatives qui peuvent être considérés comme thérapeutiquement indésirables ou au contraire être recherchées.

Au cours de cette recherche de propriétés sédatives, le choix d'une benzodiazépine comme produit de référence, en l'occurrence le clorazébate dipotassique, n'est pas le fruit du hasard.

Effectivement, ces substances représentent le chef de file des tranquillisants mineurs ; leur succès thérapeutique repose

essentiellement sur leurs propriétés anxiolytiques, qui sont toutefois très souvent étroitement liées à une activité sédatrice plus ou moins développée selon les composés.

C'est pourquoi, après la confirmation d'effets sédatifs pouvant s'apparenter à ceux obtenus avec certaines benzodiazépines, il nous est apparu nécessaire d'aborder cette classe de psychotropes, par la recherche de propriétés anxiolytiques.

*II*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANXIOLYTIQUES*

## II - 1 INTRODUCTION

Si de nombreuses substances très différentes, telles que certains neuroleptiques, hypnotiques ou anti-dépresseurs, mais également la morphine et certains agents bloquants  $\beta$  adrénergiques, sont susceptibles de développer secondairement une certaine activité anxiolytique plus ou moins prononcée, les médicaments thérapeutiquement employés par un tel effet principal sont représentés par les tranquillisants mineurs, encore appelés, de ce fait, "anxiolytiques".

Leur positionnement parmi les psychotropes psycholeptiques permet de les différencier des neuroleptiques, par une activité anti-psychotique généralement faible et par l'absence d'effets secondaires neurologiques extra-pyramidaux, ainsi que des hypnotiques proprement dits, leur effet tranquillisant apparaissant avec des posologies nettement inférieures à celles nécessaires à la manifestation d'une somnolence ; cependant, très souvent, l'administration de fortes doses ou la prise en posologie progressive permet l'obtention de tels effets hypnotiques.

Généralement, il s'agit de médications symptomatiques prescrites contre les états d'anxiété, de malaise, de tension émotionnelle ou d'insomnie.

Actuellement, les tranquillisants mineurs les plus fréquemment employés appartiennent au groupe des benzodiazépines.

(Deniker et Poirier, 1978 - Simon, 1979).

### \* Pharmacocinétique

(Deniker et Poirier, 1978 - Simon, 1979).

La pharmacocinétique des anxiolytiques, mais surtout des benzodiazépines, est assez bien connue. Ainsi, administrés par voie orale, leur résorption intestinale est presque totale. Leur affinité pour les protéines plasmatiques serait généralement faible, quoique variable selon les composés (fixation à 96 % pour le diazépam). Leur diffusion rapide se ferait dans tous les tissus. Après diverses transformations hépatiques, les métabolites obtenus sont essentiellement

excrétés dans les urines, une petite partie pouvant toutefois être retrouvée dans les selles.

Un phénomène de tolérance peut apparaître en raison de l'induction enzymatique plus ou moins développée, exercée sur les microsomes hépatiques (notamment par le méprobamate).

#### \* Mécanismes d'action

Malgré la relative hétérogénéité de cette classe, le point commun à tous ces composés serait leur action dépressive centrale, dépression qui s'exercerait de façon relativement spécifique sur l'hypothalamus et le système limbique, sans modification de l'activité du cortex et du thalamus (Simon, 1979).

En fait, peu de certitudes sont actuellement avancées, en ce qui concerne les mécanismes d'action mis en jeu pour cette activité anxiolytique ; de très nombreux travaux ont été consacrés à cette classe de psychotropes, au cours de ces dernières années, qui ont permis d'émettre diverses hypothèses plus ou moins tangibles et faisant notamment appel à l'intervention du gaba (principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central humain), de la glycine, du GMP cyclique, des catécholamines. Un intérêt tout particulier s'est manifesté à l'égard du groupe des benzodiazépines, permettant la découverte de sites récepteurs centraux et de sites accepteurs périphériques (localisés dans divers organes) ainsi que l'élaboration d'un complexe macromoléculaire hypothétique, composé de trois unités (benzodiazépinique, gabaergique et barbiturique) associées à un canal ionique, chacune d'entre elles pouvant moduler plus ou moins le fonctionnement des autres (Polc et coll., 1982 - Richards et Möhler, 1984 - File et Pellow, 1985 - File et coll., 1986 - Stolerman et coll., 1986 - File et Pellow, 1987 - Miller et coll., 1987).

\* Effets secondaires

(Deniker et Poirier, 1978 - Simon, 1979).

Aux **propriétés anxiolytiques principales**, viennent s'adjoindre divers effets plus ou moins marqués selon les composés et notamment un **effet sédatif**, qui lui est très souvent étroitement lié.

Fréquemment, cette activité sédatrice est thérapeutiquement considérée comme indésirable, en raison de l'apparition d'effets secondaires, quoique peu importants et assez rares, du type somnolence, apathie, ralentissement des réflexes, vertiges, légère hypotension et amnésie.

Signalons également les **propriétés myorelaxantes**, développées par la plupart de ces anxiolytiques lorsqu'ils sont administrés à fortes doses, les **propriétés anti-convulsivantes**, plus particulièrement caractéristiques des benzodiazépines, ainsi qu'une **activité anti-agressive**, quant à elle peu spécifique des tranquillisants mineurs, puisque la majorité des psychotropes (y compris les amphétaminiques) sont capables d'exercer un tel effet ; de plus, si cette activité anti-agressive peut être obtenue expérimentalement sur l'animal, son existence reste beaucoup plus hypothétique vis-à-vis de l'agressivité humaine.

A ces divers effets secondaires, il faut ajouter l'observation occasionnelle d'**effets paradoxaux d'excitation**, tels que l'augmentation de l'agressivité, des crises de rage ou des actes de violence.

\* Modèles expérimentaux chez l'animal

Concernant les **effets sédatifs**, leur mise en évidence expérimentale est rendue possible par l'observation de la réduction de la motilité et de l'exploration de l'animal, par la potentialisation de tous les dépresseurs centraux (hypnotiques anesthésiques généraux, alcool...), ainsi que par la suppression de tous les réflexes conditionnés pré-établis.

Le problème majeur, posé par l'étude de **propriétés anxiolytiques** pour une substance donnée, réside dans l'impossibilité que nous avons d'affirmer l'existence chez les animaux d'états subjectifs analogues à ceux de l'homme et qui sont à l'origine du concept d'anxiété.

En fait, de telles études réalisées sur l'animal ne permettent que d'observer son comportement face à certaines situations considérées comme aversives, se traduisant notamment par une inhibition comportementale induite par le stress créé.

Les benzodiazépines, administrées à faibles doses, sont capables de réduire plus ou moins ces effets inhibiteurs. Ainsi, cette action désinhibitrice observée chez l'animal est généralement corrélée aux propriétés tranquillisantes de ces substances obtenues chez l'homme, le qualificatif anxiolytique étant alors employé, par commodité, pour désigner cette désinhibition.

De telles propriétés désinhibitrices sur le comportement de l'animal peuvent être abordées par la suppression des réponses émotionnelles conditionnées (poursuite de l'activité normale des animaux conditionnés, même lorsqu'un stimulus conditionnel les avertit de l'imminence d'une punition inéluctable), ou par l'inhibition d'un conditionnement suppressif (placé dans une situation conflictuelle, telle que le désir d'une récompense et la peur d'une punition, l'animal reprend son activité normalement interrompue lorsque la peur de la punition l'emporte).

Divers autres modèles expérimentaux, de réalisation plus aisée, peuvent être utilisés pour cette recherche de propriétés anxiolytiques :

Ainsi, le **test de l'escalier**, précédemment utilisé lors de la recherche d'effets sédatifs (Chapitre B I), est couramment employé, de par son caractère aversif. Effectivement, l'animal, en l'occurrence la souris, est introduit de force dans un milieu inconnu dépourvu de repères familiers et fortement éclairé, sans possibilité de s'y soustraire, ni d'y trouver un refuge.

Autre test anxiogène, le test de la chambre claire/obscur, consiste en une situation de conflit spontané, basée sur la tendance de la souris à préférer un endroit sombre plus sécurisant à un endroit éclairé.

Comme dans le test de l'escalier, l'animal (souris) est introduit de force dans un milieu inconnu dépourvu de repères familiers et fortement éclairé ; cependant, celui-ci conserve la possibilité de se soustraire à cette situation aversive, en se réfugiant dans un compartiment également inconnu, mais rendu moins anxiogène en raison de l'obscurité qui y règne. La souris peut donc moduler son activité exploratrice en fonction de son état d'émotivité.

Nous avons choisi de mener cette recherche de propriétés anxiolytiques pour E. hirta par la réalisation de ces deux dernières expérimentations.

## II - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER

### 2.1 Procédure expérimentale

#### 2.1.1 Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques, ainsi que leurs conditions d'élevages sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental est identique à celui précédemment décrit lors de la recherche de propriétés sédatives (Chapitre B I - 3).

#### 2.1.2 Méthode

La technique utilisée est inspirée de la méthode de Molinengo et Ricci-Canaleros (1970), mise au point sur les rats et adaptée aux souris par Simiand et coll. (1984).

Les produits testés sont administrés par voie I.P., trente minutes avant le test.

E. hirta est injectée aux doses de 3,12 - 6,25 - 12,5 et 25 mg/kg.

Le produit de référence, le clorazépate dipotassique (Tranxène<sup>R</sup>, Clin-Midy, Paris), est utilisé aux doses de 1 et 5 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Trente minutes après l'administration des produits, l'animal est déposé au bas de l'escalier, le dos tourné par rapport aux marches.

Les paramètres pris en compte sont les redressements effectués et les marches montées par la souris, pendant cinq minutes, l'enregistrement étant effectué de minute en minute.

### 2.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances, par le test de Bartlett, chaque lot traité est comparé statistiquement à son lot témoin (réalisé le même jour, dans les mêmes conditions expérimentales), par le test de Student.

### 2.2 Résultats

D'après les résultats présentés dans le tableau 15 et sur la figure 16, l'administration d'E. hirta provoque une augmentation des redressements effectués par la souris.

Cet effet est significatif aux doses de 12,5 et 25 mg/kg, le maximum d'activité étant obtenu avec la plus faible dose d'extrait végétal (augmentation de 31 % par rapport au lot témoin).

E. hirta augmente également, mais plus faiblement, le nombre moyen de marches montées par les animaux. Cette activité se manifeste à des doses plus faibles, soit 6,25 et 12,5 mg/kg. Une augmentation maximale est obtenue avec la dose de 6,25 mg/kg (+19 % par rapport au lot témoin) ; toutefois, seule la dose de 12,5 mg/kg induit un effet statistiquement significatif.

**TABLEAU 15 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES REDRESSEMENTS ET LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER**

REDRESSEMENTS

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 3,12 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 6,25 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 12,5 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 25 mg/kg (N=20)
MOYENNE	37,4	44,8	37,4	45,2	39,7	51,9	39,9	50,4
ECART-TYPE REDUIT	3,2	2,7	3,2	4	3,1	3,3	3,8	3,5
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+20%		+21%		+31%		+26%

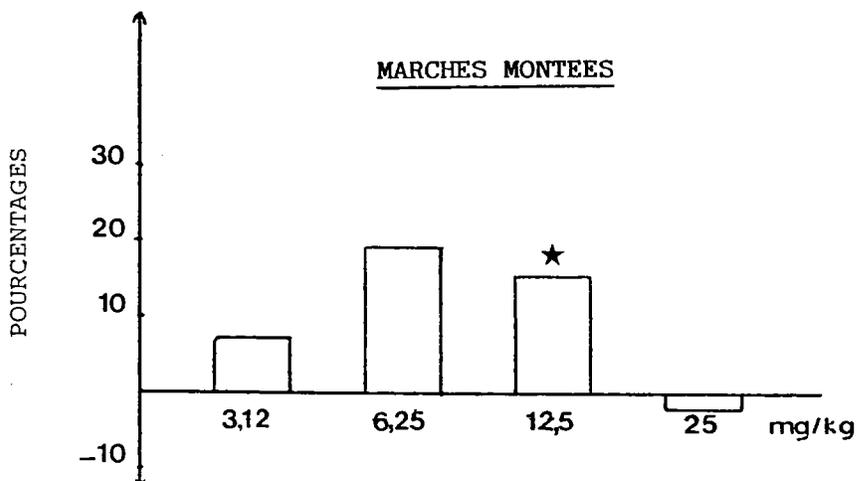
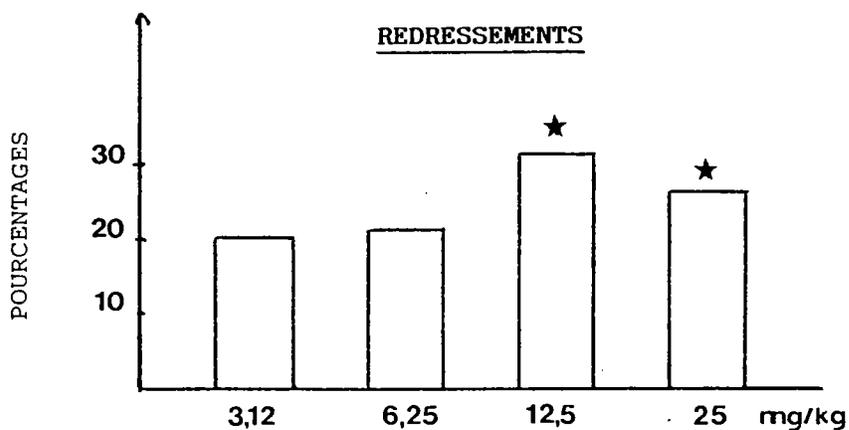


FIG. 16 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES ET SUR LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER. (pourcentages de variation calculés pour chaque lot traité et par rapport à son témoin correspondant)

★  $p < 0,05$

MARCHES MONTEES

LOTS	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 3,12 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 6,25 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 12,5 mg/kg (N=20)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	E.HIRTA 25 mg/kg (N=20)
MOYENNE	37,6	40,2	37,6	44,7	39,9	46	42,4	41,5
ECART-TYPE REDUIT	2,6	2,7	2,6	3,7	2,4	2	3,4	2,6
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+7%		+19%		+15%		-2%

N = nombre d'animaux par lot

\* p < 0,05

Les résultats concernant l'influence du produit de référence, le clorazépatate dipotassique, sur les redressements et les marches montées par l'animal dans l'escalier, sont reportés sur la figure 17 et dans le tableau 16 .

L'augmentation des deux paramètres pris en compte est significative, dès la dose de 5 mg/kg.

L'intensité des effets est, par ailleurs, variable pour une même dose : ainsi, un effet maximal est obtenu sur les redressements, avec la dose de 1 mg/kg (augmentation de 82 % par rapport au lot témoin), tandis qu'une activité maximale sur les marches montées se manifeste à la dose de 5 mg/kg (augmentation de 105 % par rapport au lot témoin).

**TABLEAU 16** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD) SUR LES REDRESSEMENTS ET LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER.

**REDRESSEMENTS**

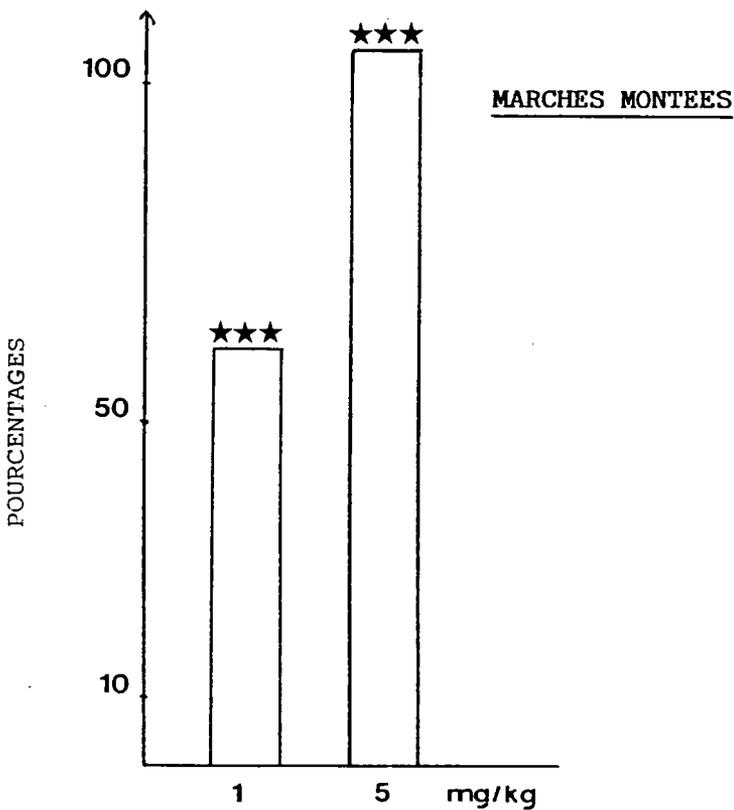
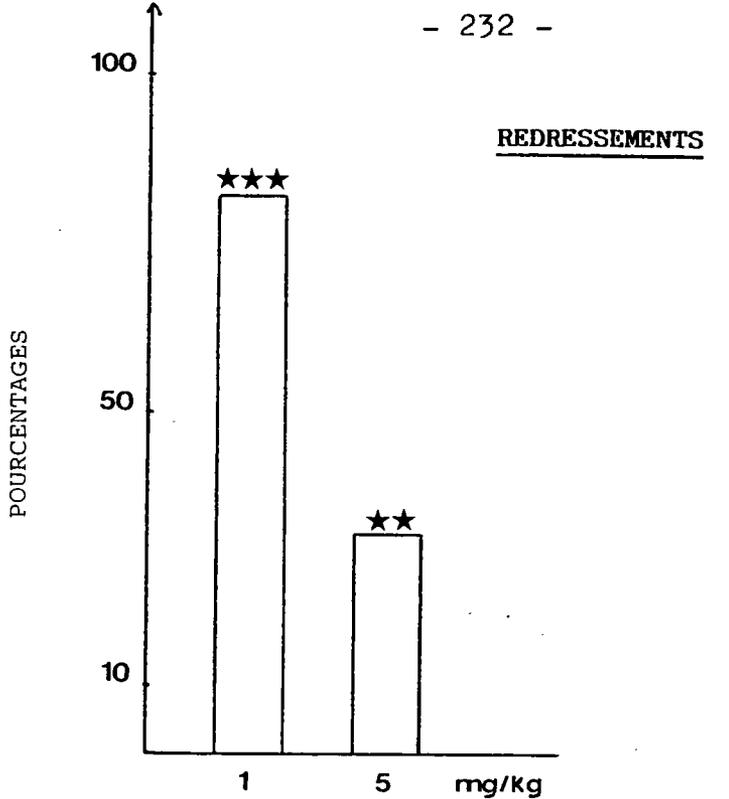
LOTS	TEMOIN	CD	TEMOIN	CD
	NaCl 0,9% (N=20)	1mg/kg (N=20)	NaCl 0,9% (N=20)	5mg/kg (N=20)
MOYENNE	31,6	57,6 ***	37,4	49,3 **
ECART-TYPE REDUIT	2,7	3,2	3,2	3,3
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+82%		+32%

**MARCHES MONTEES**

LOTS	TEMOIN	CD	TEMOIN	CD
	NaCl 0,9% (N=20)	1mg/kg (N=20)	NaCl 0,9% (N=20)	5mg/kg (N=20)
MOYENNE	38,5	62 ***	37,6	77,3 ***
ECART-TYPE REDUIT	2,8	3,7	2,6	4,8
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS		+61%		+105%

N = nombre d'animaux par lot.

\*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



**FIG.17** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LES REDRESSEMENTS EFFECTUES ET SUR LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER. (pourcentages de variation calculés pour chaque lot traité et par rapport à son témoin correspondant).

★★  $p < 0,01$  ; ★★★  $p < 0,001$

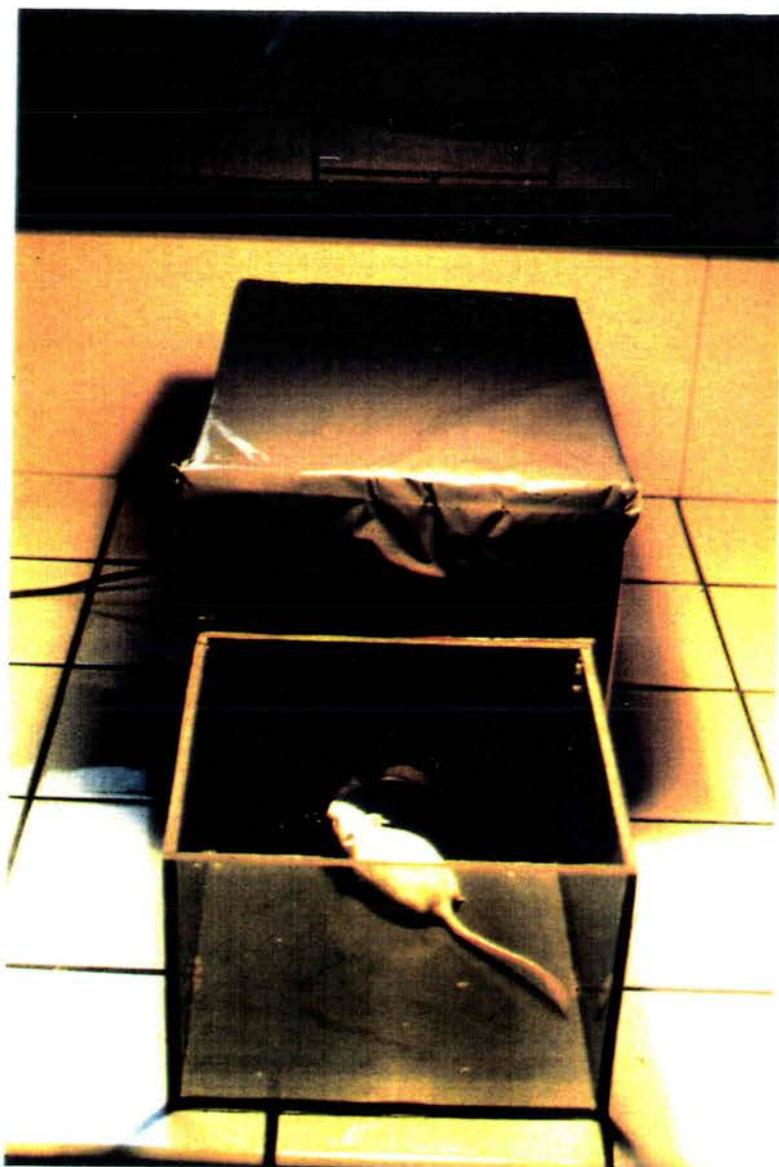


PHOTO 7 : L'ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE.

## II - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS CONFRONTEE A UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE

### 3.1 Procédure expérimentale

#### 3.1.1 Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg) ; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en deux cages en plexi-glass (20 x 20 x 20 cm) reliées entre elles par un court tunnel. A la base de chaque cage, sur l'une des faces, se trouve une ouverture permettant à l'animal de passer d'une cage à l'autre. L'une des deux cages est fortement éclairée, tandis que la seconde est rendue obscure au moyen d'un cache.

#### 3.1.2 Méthode

La procédure expérimentale retenue est inspirée de la technique décrite par Crawley et Goodwin (1980).

E. hirta est administrée par voie I.P., aux doses de 12,5 et 25 mg/kg, trente minutes avant le test. Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Trente minutes après l'injection de l'extrait végétal, l'animal est prélevé de sa cage d'élevage, pour être introduit dans l'enceinte éclairée. Son comportement est alors observé pendant cinq minutes (= temps global), après son premier passage dans le compartiment obscur (= temps de latence).

Les paramètres pris en compte sont le temps passé dans le compartiment éclairé (temps passé dans le clair / (temps global-temps de latence) x 100), le nombre de transitions effectuées par l'animal (nombre de passages du compartiment

obscur au compartiment éclairé) et le temps indexé (temps passé dans le clair / nombre de transitions).

### 3.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, chaque lot traité est comparé au lot témoin, par un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

## 3.2 Résultats

Le temps moyen passé dans le compartiment éclairé, le nombre moyen de transitions effectuées par la souris, ainsi que le temps indexé, sont reportés dans le tableau 17 et sur la figure 18 .

A la vue des résultats, E. hirta provoque une augmentation du temps passé dans le compartiment éclairé (+14,5 % et +32,6 % par rapport au lot témoin, respectivement après traitement par les doses de 12,5 et 25 mg/kg). Toutefois, cet effet n'est significatif qu'avec la plus forte dose d'extrait végétal.

Un effet similaire, mais non significatif, est observé sur le temps indexé.

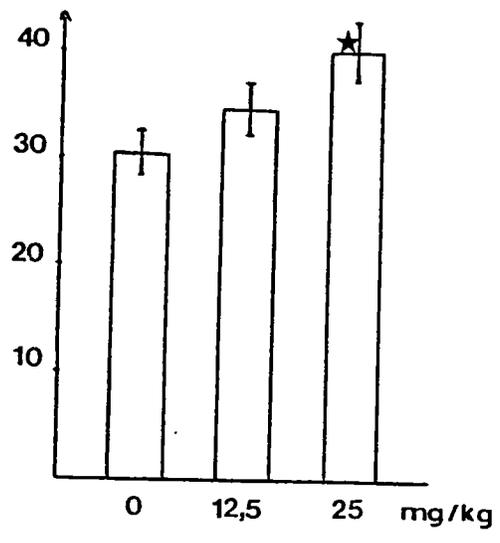
Concernant le nombre moyen de transitions effectuées par les animaux, si la dose de 12,5 mg/kg augmente ce paramètre, quoique de façon non significative, l'administration d'une dose de 25 mg/kg exerce un effet inverse, mais également non significatif.

**TABLEAU 17 : EFFETS D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS  
PLACÉE DANS UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSCUR.**

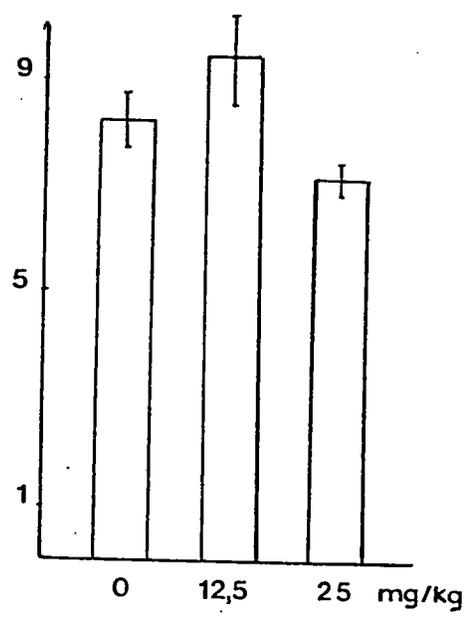
PARAMETRES : LOTS	TEMPS MOYEN PASSE : DANS LE COMPARTI- MENT ECLAIRE (sec)	NOMBRE MOYEN : DE TRANSITIONS	TEMPS : INDEXE : (secondes)
TEMOINS NaCl 0,9% (N=20)	30,4 ± 1,9	8,2 ± 0,5	2,8 ± 0,3
E.HIRTA 12,5 mg/kg (N=10)	34,8 ± 2,4	9,4 ± 0,9	4,1 ± 0,6
E.HIRTA 25 mg/kg (N=10)	40,3 ± 2,7	7,1 ± 0,3 *	5,8 ± 0,5

N = nombre d'animaux par lot.

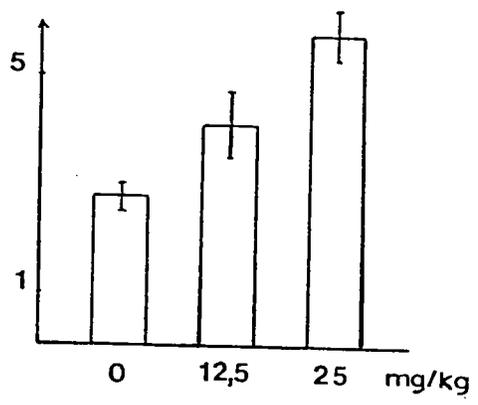
\*  $p < 0,05$ .



TEMPS MOYEN DANS LE  
COMPARTIMENT ECLAIRE  
(secondes)



NOMBRE MOYEN DE  
TRANSITIONS



TEMPS INDEXE  
(secondes)

FIG. 18 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE.

★  $p < 0,05$

## II - 4 DISCUSSION

L'activité désinhibitrice des tranquillisants mineurs, et en particulier des benzodiazépines, exercée sur le comportement de l'animal confronté à une situation aversive et source de stress, est habituellement considérée comme pouvant refléter une activité tranquillisante ou anxiolytique chez l'homme.

Divers modèles expérimentaux ont pu être élaborés, dans le but de simuler des situations sensées créer l'anxiété chez l'homme.

Parmi les plus couramment utilisés, nous avons sélectionné les tests de l'escalier et de la chambre claire/obscur, du fait de leurs facilité et rapidité d'exécution, en comparaison d'autres modèles basés notamment sur le comportement conditionné des animaux, modèles qui par ailleurs ne présentent pas une performance supérieure et dont l'utilisation ne se justifiait pas vraiment pour cette première approche.

Dans les deux cas expérimentaux retenus, les situations imposées à l'animal créent un certain degré de stress, plus ou moins important selon le test, mais aussi selon la réactivité émotionnelle de chaque animal, pouvant entraîner une inhibition comportementale notamment de l'exploration et de la locomotion, inhibition qui pourrait être levée par l'administration d'un anxiolytique.

\* Ainsi, dans le test de l'escalier, cette désinhibition se caractérise par l'augmentation de l'un ou des deux paramètres pris en compte, à savoir les redressements et les marches montées par la souris.

Un tel effet, quoique léger en comparaison de l'activité développée par le clorazébate dipotassique, benzodiazépine de référence, et à la limite de la significativité, a pu être obtenu après traitement par de faibles doses d'extrait végétal soient 6,25 - 12,5 et 25 mg/kg, cette activité se manifestant surtout sur les redressements effectués par l'animal.

De plus, un certain décalage au niveau des doses actives peut être mentionné, un effet maximal sur les redressements étant obtenu à une dose supérieure (12,5 mg/kg) à celle induisant un maximum d'activité vis-à-vis des marches montées (6,25 mg/kg). Un tel décalage, toutefois inversé, est également obtenu après l'administration du clorazépate dipotassique, un effet maximal sur les redressements étant obtenu à une dose inférieure (1 mg/kg) à celle induisant un maximum d'activité sur les marches montées (5 mg/kg).

Autre différence entre cette benzodiazépine de référence et l'extrait d'E. hirta, le clorazépate dipotassique exerce une activité anxiolytique beaucoup plus importante vis-à-vis des marches montées, E. hirta influençant essentiellement les redressements effectués par l'animal ; sur ce dernier paramètre, l'activité manifestée par la dose de 12,5 mg/kg d'extrait végétal peut être rapprochée, au niveau intensité des effets, de celle de 5 mg/kg de clorazépate dipotassique.

Cette modification indépendante des deux variables prises en compte dans cette expérimentation a précédemment été observée par divers auteurs (Thiébot et coll., 1973, 1976 - Simiand et coll., 1984 - Stéru et coll., 1987), après l'administration de certains hypnotiques et tranquillisants mineurs, dont le clorazépate dipotassique : ainsi, ces substances peuvent augmenter le nombre de marches montées, à des doses qui diminuent ou n'affectent pas, ou encore qui parfois augmentent très légèrement le nombre de redressements, augmentation par ailleurs obtenue au cours de notre expérimentation avec la dose de clorazépate dipotassique de 5 mg/kg.

Concernant E. hirta, ce phénomène peut être mentionné pour la dose de 25 mg/kg, mais sur les paramètres inversés, les redressements étant augmentés et le nombre de marches montées non modifié.

Thiébot et coll. (1973, 1976) émettent l'hypothèse selon laquelle la variable "marches montées" serait un indice du comportement explorateur et locomoteur, et représenterait une mesure sensible d'une activité anxiolytique (augmentation du nombre de marches montées). Quant à la seconde variable, les redressements, elle représenterait un indice d'anxiété,

d'émotivité et serait, par conséquent, diminuée sous l'action de substances anxiolytiques.

En fait, ceci n'a pu être observé, au cours de notre étude, aux doses anxiolytiques de clorazépate dipotassique testées, soit 1 et 5 mg/kg.

Par ailleurs, cette hypothèse est mise en doute par certains auteurs (Simiand et coll., 1984).

D'autres auteurs (Stéru et coll., 1987) considèrent ce second paramètre comme une première indication d'une activité sédative, ce qui confirme nos observations personnelles précédemment rapportées (Chapitre I - 3), le clorazépate dipotassique diminuant le nombre de redressements à des doses qui ne modifient pas le nombre de marches montées (dose de 20 mg/kg).

Quant à E. hirta, il est intéressant de mentionner la différence d'activité manifestée sur les deux paramètres (augmentation plus importante des redressements), en comparaison des substances anxiolytiques testées par nos soins ou par les différents auteurs précédemment cités.

Diverses études réalisées au sein de notre laboratoire, sur d'autres extraits végétaux, ont permis de mettre en évidence un profil d'activité relativement similaire à celui d'E. hirta (Rolland, 1988).

\* L'existence de différences entre les activités d'E.hirta et des benzodiazépines est également constatée dans le second modèle expérimental, le test de l'enceinte claire/obscur.

Ainsi, les benzodiazépines sont connues pour augmenter le temps passé dans le clair et le nombre de transitions effectuées par l'animal (Thiébot et Soubrié, 1983 - Treit, 1985). Si Crawley et Goodwin (1980) interprètent l'augmentation du nombre de transitions comme un effet anti-conflit, Misslin (Misslin, 1984 - Misslin et coll., 1988) considère ces excursions dans le milieu éclairé comme des tentatives de fuite, plutôt que comme des conduites exploratrices.

E. hirta, quant à elle, tend à augmenter le temps passé dans l'enceinte claire, surtout avec la dose de 25 mg/kg. Cette variable étant considérée comme un indice de réactivité

émotionnelle de la souris (plus elle est élevée, moins l'animal réagit au caractère aversif de l'enceinte et donc, moins il aura tendance à se réfugier dans la cage obscure pour l'éviter), l'action d'E. hirta laisserait présager un effet anti-stress ou anxiolytique.

Le nombre de transitions effectuées par l'animal du compartiment obscur au compartiment éclairé, paramètre d'activité, tend à être augmenté après administration de la dose de 12,5 mg/kg, tandis que la dose de 25 mg/kg tend à le diminuer, ce dernier fait pouvant probablement rendre compte d'un léger effet sédatif.

Il est intéressant de constater que les souris traitées par une dose de 25 mg/kg sortent moins (réduction du nombre de transitions), mais restent plus longtemps dans la cage éclairée (augmentation du temps passé dans le clair), d'où un niveau plus élevé du temps indexé. Les animaux mettent à profit leur passage dans l'enceinte éclairée, pour l'explorer de façon plus ou moins intense, notamment dans le cas du lot traité par la dose de 25 mg/kg, cette activité exploratrice se manifestant en particulier par des reniflements du sol, des parois, des coins, ainsi que par de fréquents redressements.

Ainsi, si les effets obtenus avec la dose de 12,5 mg/kg, quoique statistiquement non significatifs, rappellent un peu l'activité des benzodiazépines (augmentation du temps passé dans le clair et du nombre de transitions), la dose de 25 mg/kg serait, quant à elle, à la limite de la sédation (réduction du nombre de transitions).

En fait, ces deux types de propriétés, anxiolytiques et sédatives, semblent étroitement liées et difficilement dissociables.

Ainsi, en situation moins aversive (tests de l'enceinte claire/obscur et de l'exploration d'un milieu nouveau), en comparaison du caractère beaucoup plus anxiogène des tests dits de contrainte (activitétest et test de l'escalier), une activité sédatrice peut encore se manifester, à des doses de composé beaucoup plus faibles et inefficaces en situation contraignante.

De telles observations ont pu être faites pour E. hirta, qui exerce une action sédatrice, à partir de doses d'autant plus faibles que la situation est moins aversive (100 mg/kg en situation contraignante - 25 mg/kg, dose limite dans le test de l'enceinte claire/obscur - 12,5 mg/kg dans le test d'exploration d'un milieu nouveau).

Actuellement, la physiopathologie de l'anxiété, ainsi que les mécanismes d'action des anxiolytiques, sont encore assez mal connus ; de nombreux points obscurs subsistent, de nombreuses données restent à l'état d'hypothèses.

Si l'anxiolyse est parfois considérée comme un degré faible de la sédation, tout au moins pour les composés présentant ces deux types d'activités, cette hypothèse est fortement mise en doute par divers auteurs (Koe, 1979 - Lippa et coll., 1979 - Wauquier, 1979 - File et coll., 1986), qui pencheraient pour la mise en jeu de mécanismes d'action différents faisant intervenir des voies neurotransmettrices et des récepteurs différents.

A ce stade de notre recherche, si des propriétés sédatrices conséquentes ont pu être mises en évidence pour E. hirta (Chapitre B I), l'existence de propriétés anxiolytiques reste sujette à caution, en raison de la faible intensité des effets obtenus, par rapport à l'activité de la benzodiazépine de référence utilisée, le clorazépine dipotassique.

En fait, de nombreuses substances très différentes sont susceptibles d'exercer des effets anxiolytiques plus ou moins marqués. C'est notamment le cas des neuroleptiques administrés à faible dose (halopéridol, fluphénazine...), des hypnotiques pris en faibles quantités réparties dans la journée (phénobarbital, amobarbital...), de certains anti-dépresseurs dits sédatifs ou anxiolytiques, mais également de la morphine dont les propriétés analgésiques, psychodysléptiques et anxiolytiques sont bien difficilement dissociables ; enfin,

des agents  $\beta$ -bloquants pourraient exercer un effet favorable sur l'anxiété (Simon, 1979).

Aussi, en l'état actuel de nos connaissances, quant au profit d'activité pharmacologique d'E. hirta, son rapprochement avec la classe des psychotropes anxiolytiques nous est apparu peu fondé et beaucoup trop prématuré.

Nous avons donc décidé d'approfondir ce profil d'activité, par la recherche d'autres propriétés psychotropes, en tenant compte, bien évidemment, de l'existence de propriétés sédatives conséquentes et de légers effets anxiolytiques.

La première classe de psychotropes abordée, dans cet objectif, est celle des hypnotiques.

*III*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*HYPNOTIQUES*

### III - 1 INTRODUCTION

(Boissier et Simon, 1966 - Passouant et Billiard, 1978 - Warot et coll., 1979).

Les hypnotiques constituent une classe très hétérogène. Si de nombreuses définitions ont pu être données à ces substances psycholeptiques, l'une des plus concises semble être celle de Warot et coll. (1979) qui définissent les hypnotiques comme des substances destinées à permettre aux insomniaques de dormir.

Le sommeil induit par ces composés est généralement différent du sommeil physiologique, des modifications pouvant intervenir dans la durée totale du sommeil profond et/ou paradoxal, ainsi qu'au niveau des différents stades du premier.

Les hypnotiques appartiennent à des classes chimiques très variées, puisqu'on y rencontre des alcools, des aldéhydes, des sulfones, des carbamates, des uréides...

Leur répartition se fait principalement en deux groupes : les **barbituriques** et les **non-barbituriques**, par ailleurs fréquemment associés dans diverses spécialités pharmaceutiques. Leur caractéristique commune est de provoquer une dépression du système nerveux central, qui se traduit par leurs effets principaux, à savoir la sédation, le sommeil et l'anesthésie générale.

Parmi le groupe des non-barbituriques, il est intéressant de mentionner la présence de certaines benzodiazépines (nitrazépam, flurazépam...) utilisées comme hypnotiques sans que l'on sache très bien si ces substances possèdent une action vraie ou si leur seule activité anxiolytique permet l'endormissement, mais également certains autres tranquillisants mineurs (méprobamate...), certains neuroleptiques sédatifs (chlorpromazine) et anti-histaminiques (prométhazine...) dont on peut se demander s'ils exercent une réelle action hypnotique ou si leur activité n'est pas due uniquement à leurs effets sédatifs.

A ces deux groupes viennent s'adjoindre diverses substances, telles que l'hydrate de chloral, le glutéthimide (chimiquement très proche des barbituriques), des dérivés des quinazolones, le L-tryptophane, le 5-hydroxy-tryptophane.

De nombreuses substances psychotropes, dépourvues de toute activité hypnotique propre, peuvent cependant modifier le sommeil expérimental induit par un barbiturique. Ainsi, les neuroleptiques, les tranquillisants mineurs et les anti-dépresseurs peuvent potentialiser cet effet hypnotique, tandis que les psychoanaleptiques nooanaleptiques et psychostimulants l'antagonisent (Boissier et Simon, 1966 - Simon et coll., 1982).

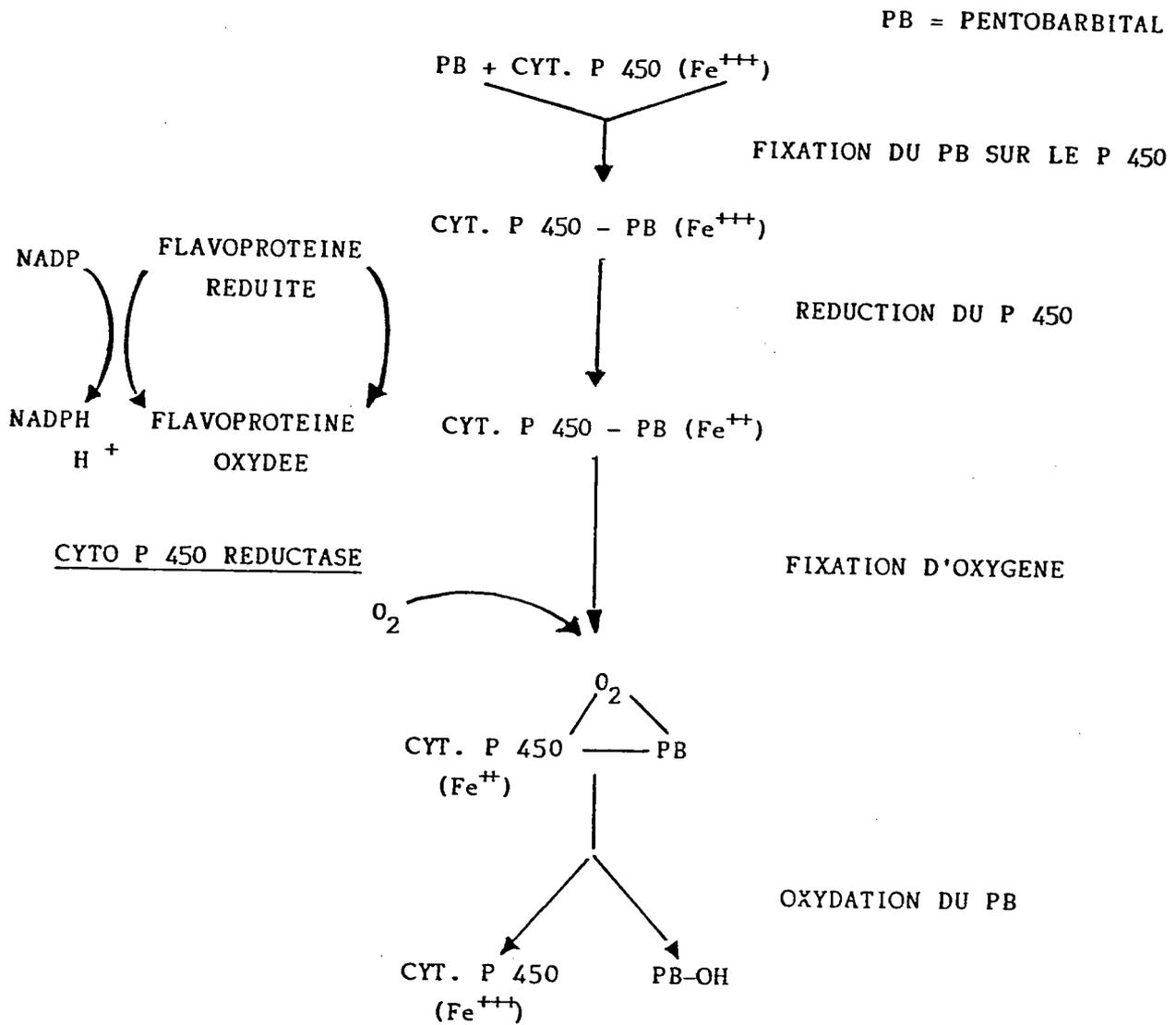
De ce fait, la recherche d'une influence d'E. hirta sur la narcose barbiturique devrait apporter un certain nombre d'informations supplémentaires, utiles à son positionnement parmi les substances psychotropes.

Dans cet objectif, deux barbituriques ont été employés, caractérisés par des voies cataboliques différentes : le **pentobarbital**, à métabolisme hépatique et le **barbital** dont l'élimination s'effectue par les reins, sous une forme inchangée.

Ces deux barbituriques sont en effet très fréquemment employés au cours des screenings pharmacologiques pour la recherche d'une interaction vis-à-vis du sommeil qu'ils induisent (Boissier et coll., 1972 - Simon, 1985 - Rambert et coll., 1986 - Porsolt et coll., 1987).

Quelques rappels sur la pharmacocinétique et les propriétés pharmacologiques de ces substances nous ont paru profitables, pour une meilleure compréhension des interactions et des mécanismes impliqués.

(Harvey, 1975 - Schmitt, 1973 - Passouant et Billiard, 1978 - Warot et coll., 1979 - Sato et coll., 1979, 1980 - Gerardy, 1982 - Simon et coll., 1982 - Haefely, 1983 - Hô et Harris, 1981)



**FIG. 19** : ROLE DU CYTOCHROME P 450 DANS LE METABOLISME DU PENTOBARBITAL (PB)  
 (d'après Warot et coll., 1979)

### \* Pharmacocinétique

Dérivés de l'acide barbiturique ou malonyl-urée, après substitution d'un atome d'hydrogène placé sur le carbone en position 5, par un groupement alkyl ou aryl (Harvey, 1975 - Schmitt, 1973 - Warot et coll., 1979), les barbituriques sont caractérisés par deux propriétés physico-chimiques essentielles leur liposolubilité et leur degré d'ionisation.

Le caractère lipophile de la molécule lui permet de diffuser au travers des membranes cellulaires et de se fixer au niveau des protéines plasmatiques et cellulaires (fixation estimée à 35 %, pour le pentobarbital et à 5 % pour le barbital). Cette liposolubilité, définie par le coefficient de partage huile/eau (39 pour le pentobarbital et 1 pour le barbital), rend compte du tropisme important des barbituriques pour le système nerveux central, organe abondamment irrigué.

Le degré d'ionisation définit, quant à lui, l'hydrosolubilité de la molécule. Celui-ci est fonction du pH et du pKa et joue un rôle important dans les mécanismes d'action de certains barbituriques, ainsi que dans les interférences possibles avec diverses autres substances (Sato et coll., 1979, 1980).

A l'exception du barbital, éliminé sous forme inchangée par les reins (entre 65 et 90 %), le catabolisme des barbituriques s'effectue au niveau hépatique, par l'intermédiaire du système "NADPH-Cytochrome P450 réductase-Cytochrome P450" qui inactive la molécule par hydroxylation de la chaîne latérale en position 5 (figure 19 ). Les catabolites hydrosolubles et inactifs obtenus sont alors éliminés par la bile, les reins et les fécès.

### \* Propriétés pharmacologiques

- Au niveau du système nerveux central, les barbituriques dépriment de façon réversible et dose-dépendante l'activité de l'ensemble des tissus excitables, pouvant aller, en fonction de la dose, de la sédation au coma, en passant par l'anesthésie.

L'excitabilité corticale et thalamique, les systèmes limbiques, ainsi que la formation réticulée sont inhibés.

- **L'électro-encéphalogramme** permet de constater la modification des activités électriques des différentes structures encéphaliques, par le pentobarbital. A dose hypnotique, il altère les étapes du sommeil, diminue la latence d'endormissement et augmente faiblement les ondes delta et l'activité de l'électro-encéphalogramme enregistrée durant le sommeil. Ce barbiturique diminue la durée totale du sommeil paradoxal, son pourcentage par rapport au sommeil physiologique, ainsi que les stades III et IV du sommeil profond.

- Le pentobarbital est également un puissant **inducteur enzymatique**. Il stimule l'activité métabolique du foie, augmente le réticulum endoplasmique lisse, la biosynthèse des phospholipides microsomaux, l'ARN polymérase et le système du cytochrome P 450.

- De plus, la plupart des barbituriques présentent des **propriétés anti-convulsivantes et myorelaxantes**.

Si le mécanisme d'action des barbituriques n'est pas totalement élucidé, diverses hypothèses ont pu être avancées par certains auteurs. Ainsi, selon Simon et ses collaborateurs (1982), le pentobarbital pourrait agir en augmentant la quantité d'acétylcholine dans tout le cerveau et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex cérébral, mais aussi en diminuant le turn-over de la noradrénaline et de la sérotonine et en augmentant celui de la dopamine.

Toutefois, de nombreux auteurs (Hô et coll., 1975 - Gerardy, 1982 - Haefely, 1983) suggèrent une action au niveau du récepteur au gaba et de l'ionophore chlore, par l'intermédiaire du récepteur aux barbituriques, qui leur serait couplé pour former un complexe multimoléculaire, auquel participerait également le site récepteur aux benzodiazépines (modèle hypothétique élaboré par Polc et coll., 1982).

Par contre, les informations concernant le mécanisme d'action du barbital sont beaucoup moins nombreuses. Selon certains auteurs (Simon et coll., 1982), ces deux barbituriques agiraient par des mécanismes différents, pouvant ainsi expliquer les effets dissociés exercés par diverses substances psychotropes, telles que certains anti-dépresseurs (nialamide, miansérine, nomifensine, viloxazine...), certains nooanaleptiques et psychostimulants (acide oxolinique, méthylphénidate...) certaines substances en relation avec les systèmes noradrénergiques et dopaminergiques (apomorphine) ou avec le système sérotoninergique (quipazine, méthysergide, parachlorophénylalanine...), ainsi que certains composés agissant sur le système enzymatique (proadifen, rifampicine...) (Tableau 18 ).

**TABLEAU 18** : ACTION DE DIFFERENTS PSYCHOTROPES SUR LES TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE BARBITAL ET LE PENTOBARBITAL (Simon et coll., 1982).

Substances	Barbital	Pentobarbital
Propranolol, salbutamol, yohimbine	=	=
Iproniazide, clonidine, chlorpromazine diazépan, clobazam, L.5HTP, fenfluramine, imipramine, trazodone, L-Dopa	↗	↗
Amphétamine, caféine	↘	↘
Apomorphine, nialamide, miansérine, proadifen	=	↗
Rifampicine	=	↘
Sulpiride, quipazine	↗	=
Viloxazine	↘	↗
Acide oxolinique, méthysergide, para- chlorophénylalanine, nomifensine, amineptine, méthylphénidate, pyrova- lérone, parachlorométhylamphétamine, cocaïne	↘	=

### \* Problèmes méthodologiques

Des études précédemment réalisées au sein de notre laboratoire (Rolland, 1984), visant à mettre au point un protocole opératoire pour la recherche d'interactions vis-à-vis du sommeil barbiturique, ont permis de déceler le rôle important de certains paramètres environnementaux et physiologiques, dans la variabilité obtenue sur le temps d'endormissement et sur la durée du sommeil des animaux.

Ainsi, d'importantes variations ont pu être observées en fonction de la **saison**, et du **cycle nyctéméral** des animaux. Effectivement, le pentobarbital s'avère plus actif durant la période estivale (juillet à septembre), pendant laquelle la variabilité des résultats est moindre. De plus, les animaux, en l'occurrence des souris, présentent une activité globale maximale au cours de la phase nocturne et minimale au cours de la phase diurne ; pendant la première citée, le temps d'endormissement est augmenté, tandis que la durée du sommeil est diminuée. Aussi, il est apparu indispensable de limiter la durée du test, afin d'éviter un chevauchement sur ces deux phases du cycle nyctéméral.

Quant aux autres paramètres susceptibles d'intervenir, mentionnons le **poids**, l'**âge** et le **sex**e des animaux.

Ces précédents travaux ont abouti à la mise au point d'un protocole expérimental rigoureux, permettant de définir les paramètres suivants :

- les animaux utilisés (souris) doivent avoir un âge compris entre 7 et 9 semaines.
- des souris mâles sont employées, en raison des variations endocriniennes des souris femelles pouvant interférer sur la durée du sommeil
- le test doit toujours être réalisé en phase nocturne, phase active des animaux.

En tenant compte de ces diverses données, nous avons donc, dans un premier temps, recherché l'existence de propriétés hypnotiques propres pour E. hirta, grâce à l'administration de doses sédatives croissantes.

Puis, nous avons étudié l'influence de l'extrait végétal sur la narcose barbiturique, en utilisant deux composés différemment métabolisés : le **pentobarbital**, dégradé au niveau hépatique et le **barbital**, éliminé sous forme inchangée par les reins.

Ainsi, une interaction avec l'hypnose induite par le pentobarbital pourrait résulter, soit d'un effet au niveau du récepteur central, soit d'une modification du catabolisme hépatique de ce barbiturique.

Par contre, une interaction avec l'hypnose induite par le barbital ne peut s'expliquer que par une action centrale et permet donc de trancher entre les deux hypothèses précédemment avancées.

Nous avons donc abordé cette étude d'éventuelles interactions d'E. hirta sur la narcose barbiturique, en recherchant l'existence d'effets potentialisateurs et inducteurs du sommeil barbiturique, respectivement, dans le cas de l'administration de chacun de ces deux composés (pentobarbital et barbital) à doses hypnotiques et infra-hypnotiques.

### III - 2 RECHERCHE DE PROPRIETES HYPNOTIQUES

#### 2.1 Procédure expérimentale

##### 2.1.1 Matériel

Les caractéristiques et les conditions d'élevage des animaux utilisés (souris mâles Swiss, Césal) sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

##### 2.1.2 Méthode

L'extrait végétal est administré par voie I.P., aux doses non toxiques suivantes : 200 - 400 - 800 - 1600 - 3200 et 6400 mg/kg.

Le solvant utilisé est le NaCl 0,9 %.

Les animaux sont maintenus en observation durant 24 heures.

#### 2.2 Résultats

Aux doses non toxiques testées, aucun effet inducteur du sommeil n'est visualisé.

Toutefois, si aucun animal ne s'endort, tous sont plus ou moins "apathiques" et restent immobiles, blottis les uns contre les autres dans un coin de la cage. Cette immobilisation se manifeste surtout à partir de la dose de 800 mg/kg et s'accroît avec des doses croissantes.

Ces phénomènes semblent disparaître totalement au bout d'une heure, pour les doses de 200 et 400 mg/kg, et au bout de quatre heures, pour les doses de 800 et 1600 mg/kg. Les animaux traités par les deux plus fortes doses, soit 3200 et 6400 mg/kg sont encore "indolents", quatre heures après l'administration de l'extrait végétal.

Signalons l'apparition de contractions abdominales, précédemment mentionnées lors de l'étude des propriétés

sédatives et anxiolytiques (Chapitre B I et II) et dont l'intensité croît avec la dose d'extrait végétal administré. Dans le cas de la plus forte dose, soit 6400 mg/kg, ces effets subsistent encore, une heure après l'injection.

### III - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA NARCOSE BARBITURIQUE

#### 3.1 Influence d'E. hirta sur la narcose induite par le pentobarbital

##### 3.1.1 Procédure expérimentale

##### 3.1.1.1 Matériel et méthode

Les expérimentations sont réalisées sur des souris Swiss mâles (Césal), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

E. hirta est administrée par voie I.P., trente minutes avant l'injection I.P. de pentobarbital (pentobarbital sodique, laboratoires Clin-Midy, St Jean de la Ruelle (45)).

Deux paramètres sont alors mesurés : le temps d'endormissement, ou intervalle de temps entre l'injection du barbiturique et l'apparition du sommeil, et la durée du sommeil, ou intervalle de temps entre le début du sommeil et le réveil.

Le début du sommeil est pris en compte lorsque les animaux acceptent la position en décubitus latéral et le temps de réveil, lorsque la souris quitte cette position après trois tentatives de remise en position initiale.

#### \* Potentialisation du sommeil narcotique

Le pentobarbital est administré à une dose hypnotique, soit 40 mg/kg.

L'extrait végétal, quant à lui, est testé aux doses de 50, 100, 200, 400 et 800 mg/kg, le lot témoin recevant le solvant (NaCl 0,9 %) dans les mêmes conditions.

### **\* Induction du sommeil narcotique**

Une dose infra-hypnotique de pentobarbital est utilisée, à savoir 25 mg/kg.

L'extrait végétal (EH 84) est testé aux doses de 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400 et 800 mg/kg (expérimentation réalisée en 1984).

La reproductibilité des résultats est étudiée à deux reprises, en février 1986 sur un lyophilisat préparé en 1986 (EH 86), et en juin 1987 sur un extrait préparé en 1987 (EH 87).

Le clorazépate dipotassique (Tranxène<sup>R</sup>, laboratoires Clin-Midy, Paris), précédemment utilisé comme produit de référence, lors de la recherche de propriétés sédatives (Chapitre B I et II), est administré aux doses de 5 et 20 mg/kg.

#### 3.1.1.2 Analyse statistique

### **\* Potentialisation du sommeil narcotique**

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, une analyse de variance (ANOVA) est réalisée sur l'ensemble des lots témoin et traités. Ceux-ci sont ensuite comparés par un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

Le calcul de la DE 50, dose efficace potentialisant le sommeil barbiturique chez 50 % des animaux, est effectué selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### **\* Induction du sommeil**

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test du  $\chi^2$  corrigé (correction de Yates), sur les pourcentages d'endormissements obtenus pour chaque lot.

Dans le cas des trois lots traités par la dose de 200 mg/kg végétal, le temps moyen d'endormissement et la durée moyenne du sommeil sont comparés deux à deux par le test de Student.

Le calcul de la DE 50, dose efficace induisant le sommeil chez 50 % des animaux, est effectué selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### 3.1.2 Résultats

#### 3.1.2.1 Potentialisation du sommeil narcotique

D'après les résultats présentés en figure 20 et dans le tableau 19, l'administration de doses croissantes d'E. hirta, trente minutes avant l'injection d'une dose hypnotique de pentobarbital (40 mg/kg), n'affecte pas significativement le temps d'endormissement, mais provoque une augmentation de la durée du sommeil.

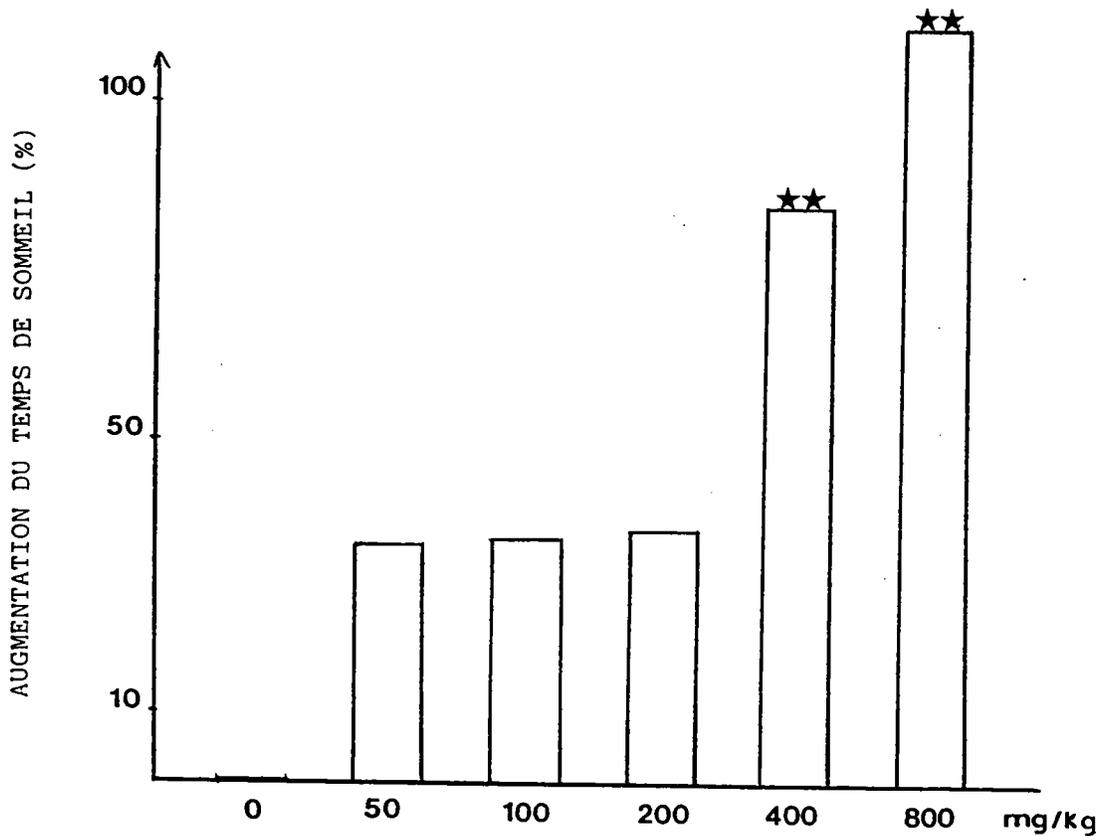
Si cet effet est pratiquement le même pour les doses de plante de 50, 100 et 200 mg/kg (respectivement 35, 36 et 37 % de variation par rapport aux témoins), il n'est significatif qu'à partir de la dose de 400 mg/kg.

Aux plus fortes doses (400 et 800 mg/kg), l'augmentation du temps de sommeil est nettement plus importante (respectivement 85 et 111 % de variation par rapport aux témoins).

La DE 50 est estimée à 137,8 mg/kg (135-139,8).

**TABLEAU 19 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT CHEZ LA SOURIS, PAR UNE DOSE HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (40 mg/kg).**

TEMPS D'ENDORMISSEMENT		EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)					
LOTS	TEMOIN	50	100	200	400	800	
	NaCl	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	
	0,9%						
	(N=35)						
MOYENNE	229	194	244	210	199	245	
(secondes)							
ECART-TYPE	18	11	26	11	10	18	
REDUIT							
% PAR RAPPORT	/	-15%	+7%	-8%	-13%	+7%	
AUX TEMOINS							



**FIG. 20 :** INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL ADMINISTRE A UNE DOSE HYPNOTIQUE (40 mg/kg)

(pourcentages de variation par rapport aux témoins).

★★  $p < 0,01$

DUREE DU SOMMEIL

LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)				
	NaCl	50	100	200	400	800
	0,9% (N=35)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
MOYENNE (secondes)	1500	2022	2047	2059	2775	3163
ECART-TYPE REDUIT	129	275	249	206	331	375
% PAR RAPPORT AUX TEMOINS	/	+35%	+36%	+37%	+85%	+111%

N = nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01

3.1.2.2 Induction du sommeil narcotique

Les résultats présentés dans le tableau 20 et sur la figure 21 permettent de constater une augmentation dose-dépendante du pourcentage d'animaux endormis, après traitement par E. hirta. En effet, à 12,5 mg/kg, ce pourcentage est pratiquement identique à celui des témoins (respectivement 10 et 13 %) ; il augmente ensuite progressivement pour devenir significatif à partir de la dose de 50 mg/kg et pour atteindre 100 % d'endormissement dès la dose de 200 mg/kg.

La reproductibilité de cet effet inducteur a pu être démontrée, grâce au renouvellement de cette expérimentation effectuée en 1984 sur un extrait végétal préparé à cette époque (EH 84), en février 1986 et juin 1987, dans les mêmes conditions expérimentales, mais sur des extrait végétaux préparés en 1986 (EH 86) et en 1987 (EH 87).

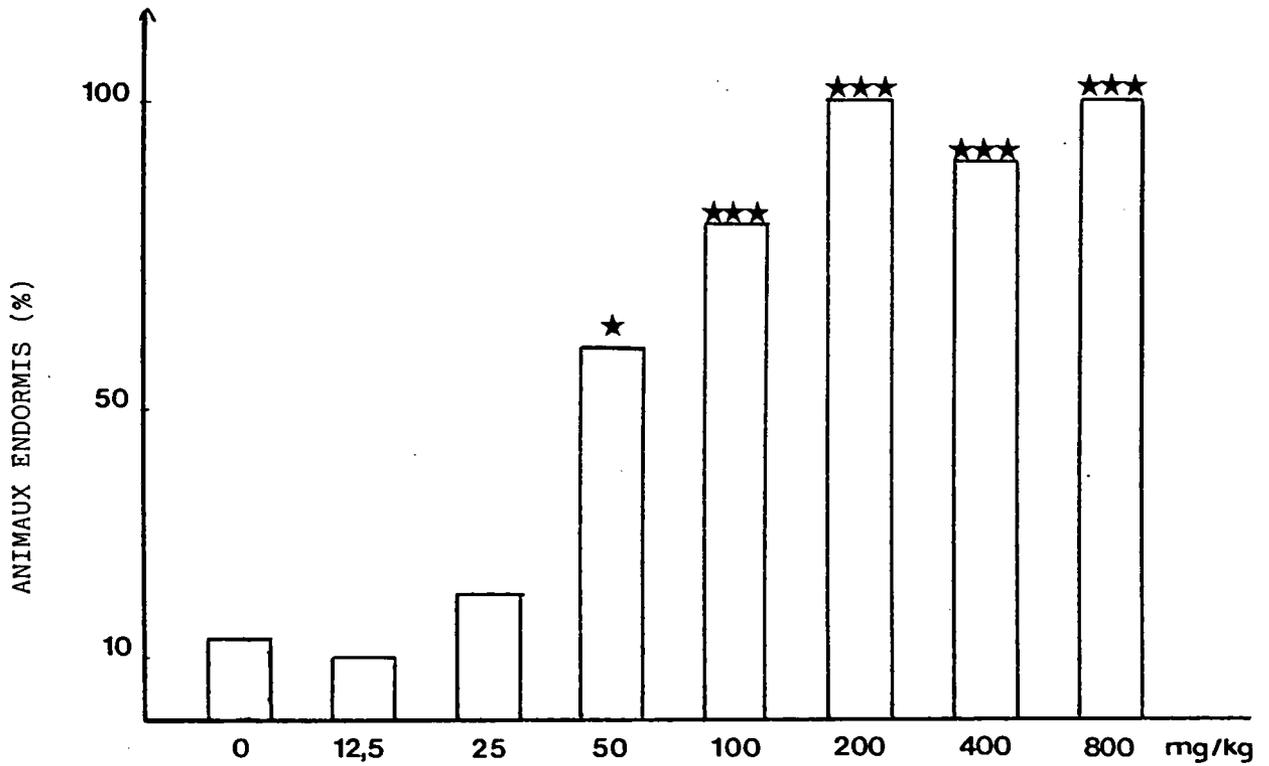
E. hirta, administrée à la dose de 200 mg/kg, induit à nouveau 100% d'endormissement.

TABLEAU 20 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT CHEZ LA SOURIS, PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/kg).

TEMPS D'ENDORMISSEMENT		-----1984-----								-----1986-----		-----1987-----	
LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)								TEMOIN	E.HIRTA	TEMOIN	E.HIRTA
	NaCl 0,9% (N=30)	12,5 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=10)	200 (N=10)	400 (N=20)	800 (N=10)	NaCl 0,9% (N=20)	200 mg/kg (N=10)	NaCl 0,9% (N=10)	200 mg/kg (N=10)	
MOYENNE (secondes)	67	33	106	280	249	360	357	364	88	369	0	417	
ECART-TYPE REDUIT	33	33	71	79	59	38	32	24	63	24	0	39	

DUREE DU SOMMEIL		-----1984-----								-----1986-----		-----1987-----	
LOTS	TEMOIN	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)								TEMOIN	E.HIRTA	TEMOIN	E.HIRTA
	NaCl 0,9% (N=30)	12,5 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=10)	200 (N=10)	400 (N=20)	800 (N=10)	NaCl 0,9% (N=20)	200 mg/kg (N=10)	NaCl 0,9% (N=10)	200 mg/kg (N=10)	
MOYENNE (secondes)	92	50	132	473	1626	1296	1224	1733	130	1843	0	1899	
ECART-TYPE REDUIT	48	51	95	168	312	82	135	242	100	76	0	204	
POURCENTAGE ENDORMISSEMENT:	13%	10%	20%	60%	80%	100%	90%	100%	10%	100%	0%	100%	
				*	***	***	***	***		***		***	

\* p < 0,05 ; \*\*\* p < 0,001.



**FIG. 21 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE POURCENTAGE D'ENDORMISSEMENT  
INDUIT PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL  
(25 mg/kg)**

★  $p < 0,05$  ;    ★★★  $p < 0,001$

Toutefois, si les temps moyens d'endormissement obtenus au cours de ces trois expérimentations ne diffèrent pas significativement entre eux, la durée moyenne du sommeil est nettement augmentée dans les deux tests les plus récents (1986, 1987).

La DE 50 est estimée à 43,5 mg/kg (43-44,1).

Les résultats obtenus après traitement par le clorazépate dipotassique sont présentés dans le tableau 21 et sur la figure 22 .

Aux deux doses testées, soit 5 et 20 mg/kg, ce composé induit significativement le sommeil narcotique (respectivement 60 et 100 % d'endormissement).

**TABLEAU 21** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT CHEZ LA SOURIS, PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/kg).

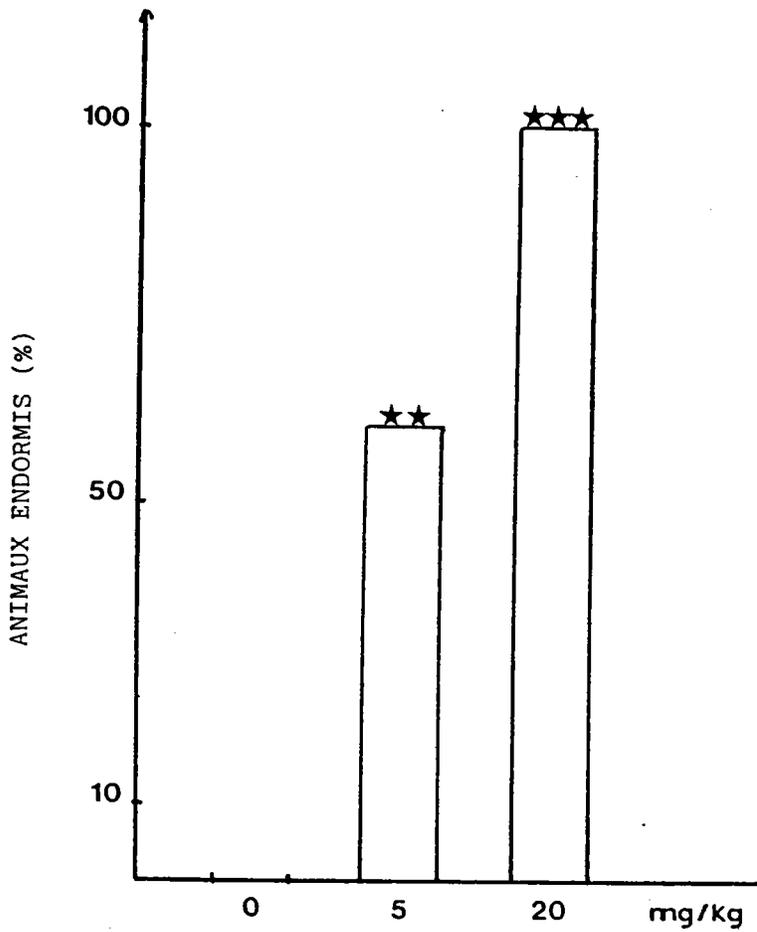
TEMPS D'ENDORMISSEMENT			
LOTS	TEMOIN	CLORAZEPATE	
	NaCl 0,9% (N=10)	DIPOTASSIQUE (mg/kg) 5 (N=10)	20 (N=10)
MOYENNE (secondes)	0	359	293
ECART-TYPE REDUIT	0	100	16

DUREE DU SOMMEIL

	TEMOIN	CLORAZEPATE
LOTS	NaCl	DIPOTASSIQUE (mg/kg)
	0,9%	
	(N=10)	(N=10) : (N=10)
MOYENNE (secondes)	0	601 : 2886
ECART-TYPE REDUIT	0	168 : 305
POURCENTAGE ENDORMISSEMENT:	/	60% : 100% ** : ***

N = nombre d'animaux par lot.

\*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



**FIG. 22** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LE POURCENTAGE D'ENDORMISSEMENT INDUIT PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/kg) .

★★p < 0,01 ; ★★★p < 0,001

### 3.2 Influence d'*E. hirta* sur la narcose induite par le barbital

#### 3.2.1 Procédure expérimentale

##### 3.2.1.1 Matériel et méthode

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Césal), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le chapitre A II.

Trois doses différentes de barbital (Coopération Pharmaceutique Française, Melun) sont testées, par injection I.P., soit 80, 150 et 200 mg/kg, de façon à cerner la dose infra-hypnotique et celle induisant 50 % d'endormissement (DE 50).

*E. hirta* (EH 85) est administrée par voie I.P., trente minutes avant l'injection du barbiturique ; la dose d'extrait végétal choisie est 200 mg/kg, dose provoquant 100 % d'endormissement dans le test d'induction du sommeil au pentobarbital (expérimentation réalisée en 1986).

La reproductibilité des effets d'*E. hirta* sur la narcose induite par la dose de 200 mg/kg de barbital, est étudiée par renouvellement de l'expérimentation en juin 1986 (quelques jours après le premier essai) sur le même extrait, puis en septembre 1987 sur un extrait préparé en 1987 (EH 87).

Le lot témoin reçoit le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Les paramètres pris en compte sont le temps d'endormissement et la durée du sommeil.

##### 3.2.1.2 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques sont effectuées sur les pourcentages d'endormissement obtenus pour chaque lot traité et par rapport à ceux du lot témoin. Le test utilisé est un X<sup>2</sup> corrigé (correction de Yates).

Dans le cas des trois lots traités par l'extrait végétal et recevant le barbital à la dose de 200 mg/kg, les comparaisons des lots pris deux à deux sont effectuées par le test de Student.

### 3.2.2 Résultats

Les résultats présentés dans le tableau 22 et sur la figure 23 permettent les différentes constatations suivantes :

#### \* Induction du sommeil barbiturique :

E. hirta, administrée à la dose de 200 mg/kg, induit significativement le sommeil, après injection d'une dose infra-hypnotique de barbital, soit 150 mg/kg (40 % d'endormissement).

#### \* Potentialisation du sommeil barbiturique :

Cette même dose d'extrait végétal potentialise le sommeil induit par une dose de barbital proche de la DE 50, soit 200 mg/kg et entraîne l'endormissement de tous les animaux.

#### \* Reproductibilité :

Le renouvellement de cette première expérimentation réalisée en juin 1986, à deux reprises (en juin 1986, quelques jours après le premier essai et sur le même extrait, puis en septembre 1987 sur un extrait préparé en 1987), permet de confirmer cette action potentialisatrice du sommeil barbiturique.

Toutefois, si la durée moyenne du sommeil, obtenue au cours de ces trois expérimentations, pour les lots traités par l'extrait végétal, ne diffère pas significativement, les temps moyens d'endormissement obtenus en 1986 sont significativement supérieurs à celui obtenu en 1987.

**TABLEAU 22 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT CHEZ LA SOURIS, PAR DES DOSES INFRA-HYPNOTIQUE (80 et 150 mg/kg) ET HYPNOTIQUE (200 mg/kg) DE BARBITAL.**

**TEMPS D'ENDORMISSEMENT**

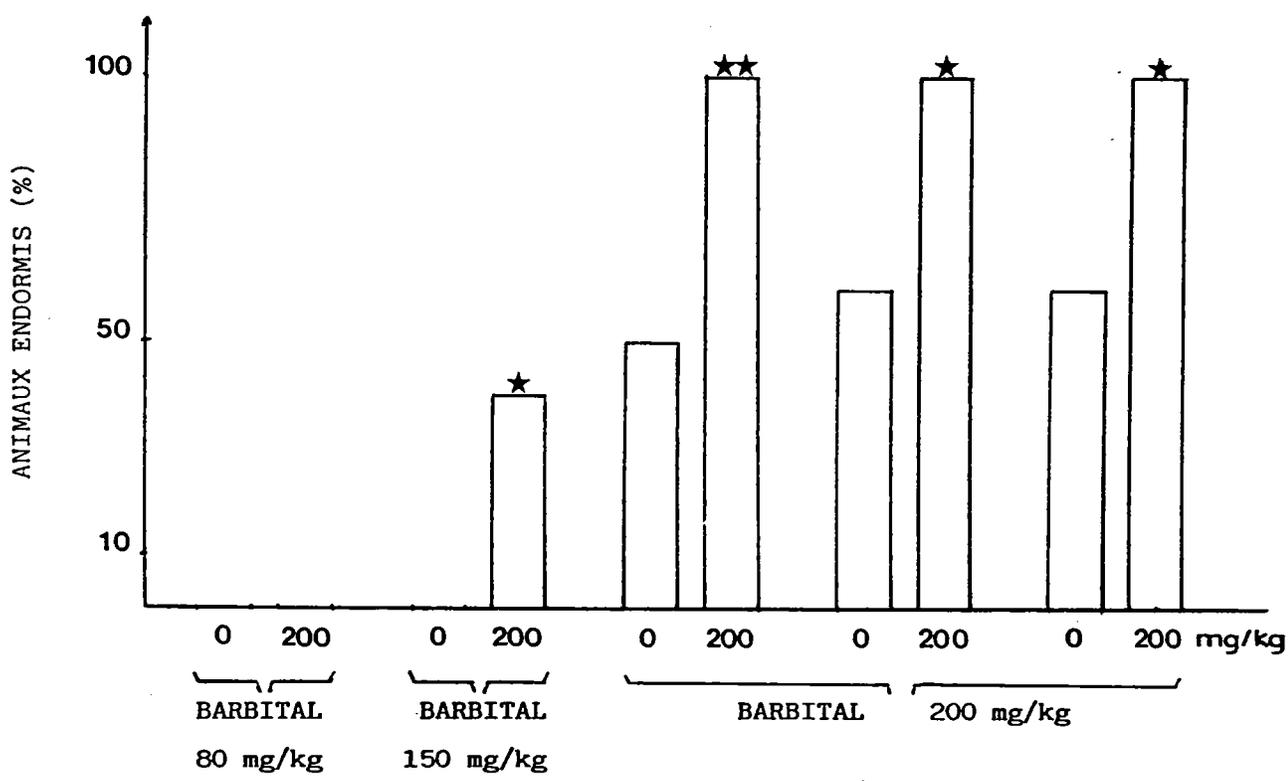
LOTS	BARBITAL 80 mg/kg		BARBITAL 150 mg/kg		BARBITAL 200 mg/kg					
	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)
MOYENNE (secondes)	0	0	0	928	1122	2074	1640	1894	1228	1366
ECART-TYPE REDUIT	0	0	0	386	387	176	401	99	350	78
	INDUCTION				POTENTIALISATION					

**DUREE DU SOMMEIL**

LOTS	BARBITAL 80 mg/kg		BARBITAL 150 mg/kg		BARBITAL 200 mg/kg					
	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)	TEMOIN: NaCl	E. HIRTA 200 0,9% (N=10)
MOYENNE (secondes)	0	0	0	942	960	2919	1005	2938	1672	3558
ECART-TYPE REDUIT	0	0	0	392	360	348	328	488	473	356
POURCENTAGE ENDORMISSEMENT:	0%	0%	0%	40%	50%	100%	60%	100%	60%	100%
				*		**		*		*
	1986				1986		1987			

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .



**FIG. 23 : INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE POURCENTAGE D'ENDORMISSEMENT INDUIT PAR LE BARBITAL .**

★  $p < 0,05$  ; ★★  $p < 0,01$

### III - 4 DISCUSSION

La première partie de cette étude nous permet donc d'affirmer l'absence de propriétés hypnotiques pour E. hirta, après administration de fortes doses sédatives et non toxiques, et par là-même, d'émettre un doute certain concernant la reconnaissance de propriétés narcotiques pour cette plante, à la Réunion (Caius, 1938).

Cependant, cette distinction par rapport à la classe des hypnotiques n'est pas vraiment inattendue, en raison notamment de leur action nulle ou faible sur la motilité et l'exploration, lorsqu'ils sont administrés à des doses infra-hypnotiques. La motilité n'est franchement diminuée qu'avec l'apparition de phénomènes ataxiques, ou parfois légèrement augmentés aux faibles doses (action excitante de certains barbituriques). Or, de tels phénomènes n'ont pas été observés avec cet extrait végétal, lors de la recherche de propriétés sédatives (Chapitre B I).

Dans la seconde partie de cette étude, E. hirta se révèle dotée de propriétés potentialisatrices et inductrices du sommeil barbiturique, vis-à-vis du pentobarbital et du barbital.

\* Concernant le pentobarbital, ses effets hypnotiques (administration d'une dose de 40 mg/kg) sont significativement potentialisés par un pré-traitement avec les doses sédatives d'E. hirta de 400 et 800 mg/kg (respectivement 85 et 111 %), le temps d'endormissement n'étant toutefois pas influencé.

Par contre, cet extrait végétal se révèle plus efficace vis-à-vis d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/kg) et induit significativement le sommeil barbiturique, dès la dose de 50 mg/kg (60 % d'endormissement).

Par comparaison avec l'effet inducteur du clorazépate dipotassique, si la dose de 5 mg/kg de cette benzodiazépine conduit au même pourcentage d'endormissement que la dose de

50 mg/kg d'E. hirta, les animaux s'endorment moins rapidement, mais dorment plus longtemps.

A 20 mg/kg, dose de clorazépate dipotassique induisant le sommeil chez tous les animaux traités, le temps d'endormissement moyen (environ 5 minutes) est très proche de celui obtenu avec les plus fortes doses d'extrait végétal, soit 200, 400 et 800 mg/kg (environ 6 minutes) ; par contre, le sommeil est nettement prolongé (durées moyennes d'environ 48 minutes pour le clorazépate dipotassique et variant entre 21 et 31 minutes pour les trois doses d'E. hirta).

\* Concernant le **barbital**, notre objectif étant de confirmer ou d'infirmer l'existence d'actions potentialisatrices et inductrices du sommeil barbiturique pour E. hirta, et non d'établir une relation dose-effet, seule la dose de 200 mg/kg d'extrait végétal a été testée, dose induisant significativement le sommeil dans le test au pentobarbital.

Ainsi, les effets hypnotiques du barbital (administration de la DE 50, soit 200 mg/kg) sont significativement potentialisés après pré-traitement par E. hirta injectée à la dose sédatrice de 200 mg/kg (100 % d'endormissement).

L'extrait végétal se révèle également efficace, lors de l'administration d'une dose infra-hypnotique de barbiturique, soit 150 mg/kg (40 % d'endormissement).

\* La **reproductibilité** des effets d'E. hirta sur la narcose barbiturique a pu être abordée au cours de la recherche d'une induction de l'action hypnotique du pentobarbital et de la potentialisation des effets du barbital.

Ainsi, administré à la dose sédatrice de 200 mg/kg, l'extrait végétal provoque constamment l'endormissement de tous les animaux, quel que soit l'année ou le mois de réalisation du test et quel que soit la date de préparation de l'extrait (1984 - 1985 - 1986 - 1987).

Les variations observées sur la durée du sommeil et le temps d'endormissement, au fil des années (1984 - 1986 - 1987) et avec des extraits de plus en plus récents (EH 84 - EH 85 - EH 86 - EH 87) sont difficilement interprétables en raison de l'influence simultanée possible des années et des saisons

auxquelles ces expérimentations ont été réalisées, mais aussi des divers extraits d'E. hirta préparés à des époques différentes (tendance à l'augmentation de la durée du sommeil, dans le cas du pentobarbital et du barbital ; tendance à l'augmentation et à la réduction du temps d'endormissement, respectivement dans le cas du pentobarbital et du barbital).

Du fait de son catabolisme au niveau des microsomes hépatiques, par le système "NADPH-Cytochrome P 450 réductase-Cytochrome P 450", l'activité du pentobarbital peut être indirectement modifiée par des substances hépatotropes, pouvant notamment perturber la cinétique de la pénétration ou le catabolisme enzymatique de ce barbiturique.

C'est en effet le cas de certains inhibiteurs enzymatiques tels que le proadifen ; une telle action indirecte a pu également être proposée pour certains anti-dépresseurs tels que l'iproniazide et l'imipramine (Simon et coll., 1982).

De plus, de précédents travaux réalisés dans notre laboratoire, sur une plante hépatotrope originaire du Yémen, Crepis rueppellii (Fleurentin et coll., 1986 - Lanhers et coll., 1986) ont révélé l'activité potentialisatrice de cet extrait végétal sur l'hypnose au pentobarbital, sans modification de l'hypnose au barbital. Une action au niveau hépatique, sur la cinétique de biotransformation du pentobarbital ou sur la perméabilité membranaire des hépatocytes a été proposée pour expliquer cette activité différenciée (Fleurentin, 1983).

L'influence d'E. hirta sur la narcose au barbital, barbiturique non dégradé au niveau hépatique mais directement éliminé par voie rénale, permet de rejeter l'hypothèse d'une interaction hépatique comme seul mécanisme d'action et suggère une action directe sur le système nerveux central.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent, quant au profil d'activité d'E. hirta, a donc permis de révéler l'existence de propriétés sédatives, à fortes doses, et anxiolytiques, à faibles doses, ainsi que des effets

potentialisateurs et inducteurs du sommeil barbiturique, corrélés à une action directe d'E. hirta sur le système nerveux central.

Cependant, à ce stade de notre étude, il ne nous est pas possible de définir avec précision la classe pharmacologique à laquelle pourrait appartenir cet extrait végétal. Effectivement, de nombreuses substances psychotropes, parmi les tranquillisants mineurs, les neuroleptiques ou les anti-dépresseurs, peuvent présenter des effets pharmacologiques similaires.

Aussi, la recherche d'une activité psychotrope pour E. hirta ne saurait s'envisager sans l'étude d'éventuelles propriétés neuroleptiques et anti-dépressives.

Nous avons donc décidé de poursuivre cette investigation, en abordant la classe des neuroleptiques, grâce à la réalisation de quelques expérimentations caractéristiques de ces psycholeptiques.

*IV*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*NEUROLEPTIQUES*

#### IV - 1 INTRODUCTION

(Boissier et Simon, 1966 - Deniker et Poirier, 1978 - Lecrubier et coll., 1979 - Zarifian et coll., 1980 - Puech et coll.).

##### \* Propriétés caractéristiques et effets secondaires

Les neuroleptiques peuvent être définis comme des médicaments réduisant les psychoses aiguës et chroniques.

Tous possèdent trois effets principaux plus ou moins prononcés selon les composés :

- une **activité anti-psychotique**, anti-délicante, mise à profit pour calmer les agitations, les hallucinations (états hétéphréniques).

- une **activité désinhibitrice**, permettant l'amélioration de l'apragmatisme, favorisant une reprise de contact et de l'activité, diminuant le désintérêt, l'inaffectivité (état paranoïde).

- une **activité sédatrice**

Parmi les composés les plus sédatifs, citons les phénothiazines aliphatiques (chlorpromazine...), la réserpine ; parmi les plus désinhibiteurs, nous trouvons certaines phénothiazines pipérazinées (thiopropérazine...), certaines butyrophénones (triflupéridol...), le sulpiride (benzamide substituée) ; divers autres neuroleptiques sont polyvalents et exercent les trois activités, tels que l'halopéridol (butyrophénone), certaines phénothiazines pipérazinées (fluphénazine), pipéridinées (pipotiazine).

A ces trois propriétés essentielles, sont associés divers effets secondaires particuliers :

- **effets neurologiques** et surtout **extra-pyramidaux** (akinésie - hypertonie - hyperkinésie - dyskinésie...), plus fréquemment avec les neuroleptiques désinhibiteurs et pouvant s'expliquer par le blocage des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques de la voie nigrostriatale.

- **effets neuro-végétatifs** (modifications du métabolisme, de la régulation de la température, des sécrétions, du pouls, de la

tension artérielle...), survenant plus volontiers avec les neuroleptiques sédatifs. Les plus fréquents de ces effets sont liés aux propriétés adrénolytiques (hypotension orthostatique), toutefois des actions parasympholytiques peuvent également être observées (activité anticholinergique de la chlorpromazine...).

- **effets endocriniens** (aménorrhée, galactorrhée, impuissance, frigidité...), rencontrés avec certains neuroleptiques tels que le sulpiride et pouvant s'expliquer par l'inhibition d'un certain nombre de facteurs hypothalamiques, la voie dopaminergique tubéro-infundibulaire jouant probablement un rôle important.

- de plus, des **effets analgésiques** sont connus, sans que l'on puisse affirmer s'il s'agit d'effets sur la douleur proprement dite ou d'une intégration différente des phénomènes douloureux.

#### \* Pharmacocinétique

La pharmacocinétique des neuroleptiques est bien connue. Ainsi, leur importante résorption (70 à 90 %) se fait sous forme non ionisée, au niveau de l'intestin grêle et par diffusion passive, la plus grande liposolubilité de la substance favorisant ce processus.

Dans le sang, ils se trouvent en proportion pratiquement égale, dans la fraction plasmatique (sous forme libre ou liée aux protéines circulantes et notamment à l'albumine et aux lipoprotéines) et dans la fraction érythrocytaire.

A partir du plasma, leur diffusion se fait ensuite dans tous les tissus, mais surtout dans les plus vascularisés (coeur, poumons, foie, reins et cerveau) ; cette fixation tissulaire très stable est, par ailleurs, responsable du stockage prolongé du médicament dans les tissus.

L'élimination lente et prolongée des substances s'effectue par les urines et les selles, soit sous leur forme initiale, soit après transformations hépatiques.

\* Mécanismes d'action

Les neuroleptiques sont des dépresseurs du système nerveux central et en particulier de la formation réticulée ascendante méso-diencéphalique.

Leur action sur la transmission dopaminergique semble jouer un rôle important dans l'expression de leurs effets pharmacologiques. Ainsi, l'activité anti-psychotique serait en rapport avec une diminution de la fonction dopaminergique, par blocage des récepteurs post-synaptiques DA2 (type pimozide, à forte dose) ou DA1 (type chlorpromazide), ou par destruction des granules de stockage (type réserpine) ; tandis que l'activité désinhibitrice serait liée à l'augmentation de cette fonction, par blocage des récepteurs pré-synaptiques DA2 (type pimozide, à faible dose).

Toutefois, de nombreuses inconnues subsistent actuellement, quant au mode d'action de ces psycholeptiques, telles que le rôle direct ou indirect du blocage des récepteurs dopaminergiques sur les effets pharmacologiques, notamment en raison de la complexité des voies dopaminergiques et de leurs interactions avec d'autres systèmes à neurotransmetteurs (rôle inhibiteur du gaba, de la sérotonine, de la substance P...).

La plupart des neuroleptiques bloquent également les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques et sérotoninergiques. Des actions anti-histaminiques (blocage des récepteurs H1 et H2) et anticholinergiques (blocage des récepteurs muscariniques) sont aussi connues.

Un rôle de ces différents autres effets biochimiques, dans l'action thérapeutique de ces composés, n'est donc pas exclue. Ainsi, l'activité anti-histaminique et vis-à-vis du système adrénergique serait corrélée à un effet sédatif.

### \* Modèles expérimentaux

Les différents effets thérapeutiques des neuroleptiques peuvent être mis en parallèle avec diverses activités pharmacologiques observables chez l'animal.

- Ainsi, l'**activité sédatrice** se mesure par la diminution de l'activité motrice et de la curiosité des animaux, par la réduction de l'agressivité spontanée et provoquée, par la potentialisation des dépresseurs centraux (hypnotiques, alcool, analgésiques, hypotenseurs, anesthésiques généraux).

\_ L'**activité anti-psychotique** peut être évaluée par l'étude d'une protection exercée vis-à-vis de la toxicité de groupe induite par l'amphétamine, ou d'un antagonisme développé face à certains syndromes d'hyperexcitabilité du système nerveux central (mouvements stéréotypés bucco-linguo-masticateurs) provoqués par l'amphétamine ou l'apomorphine.

- L'apparition d'une incapacitation motrice et du phénomène cataleptique (perte de l'initiative spontanée et acceptation d'attitudes anormales imposées) permet de déceler l'existence des **effets secondaires extra-pyramidaux** caractéristiques de cette classe de psychotropes.

- De plus, les neuroleptiques sont également dotés de **propriétés hypothermisantes**, par action directe sur les centres thermorégulateurs hypothalamiques.

La recherche d'une activité neuroleptique pour E. hirta nous a amené à étudier l'influence de cet extrait végétal sur la toxicité de groupe et sur les mouvements stéréotypés induits par la dexamphétamine, substance stimulatrice des récepteurs dopaminergiques et dont les effets sont antagonisés par les neuroleptiques. Nous avons également recherché l'existence éventuelle d'une activité cataleptique, représentative des effets secondaires extra-pyramidaux, ainsi qu'une action hypothermique.

#### IV - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA TOXICITE INDUITE PAR UN DERIVE AMPHETAMINIQUE, LA DEXAMPHETAMINE, CHEZ LES SOURIS GROUPEES.

##### 2.1 Quelques généralités sur les dérivés amphétaminiques

L'amphétamine et ses dérivés sont rattachés à la classe des nooanaleptiques, terme qui signifie "substances élevant le niveau de vigilance".

Leur activité s'exerce de façon privilégiée sur le système cardio-vasculaire (élévation de la tension artérielle systolique et diastolique, action sur les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques), sur le muscle lisse (relâchement du muscle bronchique par action sur les récepteurs  $\beta$ , contractibilité accrue de la vessie...), mais surtout sur le système nerveux central par libération des catécholamines (noradrénaline et dopamine) des vésicules neuronales de stockage ; cette libération résulterait de l'inhibition du recaptage de ces amines biogènes et de l'inhibition de la mono-amine-oxydase intraneuronale, enzyme de dégradation.

Cette action sur la transmission dopaminergique provoque, chez l'animal, à forte et moyenne doses, une stimulation du système nerveux central se manifestant par une augmentation de l'activité locomotrice, souvent accompagnée de mouvements stéréotypés (Costa et coll., 1972 - Samanin et coll., 1977), ainsi qu'une stimulation de l'humeur sans manifestation d'effets anti-dépresseurs vrais (Lapierre, 1979). A faible dose, l'amphétamine inhibe le comportement explorateur de la souris (Misslin et Ropartz, 1981 - Misslin, 1983).

De ces diverses activités découlent de nombreuses interactions avec différentes substances, telles que l'augmentation des effets hypertenseurs des anti-dépresseurs IMAO par les dérivés amphétaminiques, la réduction des effets stimulants amphétaminiques par les barbituriques, pour ne citer que ces deux exemples.

Par ailleurs, les dérivés amphétaminiques sont connus pour s'opposer pratiquement point par point aux neuroleptiques (actions anti-sommeil, anti-cataleptique, hyperthermique...),

mais également pour induire un phénomène toxique sur les animaux groupés. Cette toxicité est provoquée par des doses d'amphétamine infra-léthales sur l'animal isolé, à la suite d'une surexcitation mutuelle et croissante des animaux groupés, aboutissant finalement à leur mort (lapin, 1962 - Boissier et coll., 1971).

Diverses substances favorisant la transmission dopaminergique, telles que les anti-dépresseurs thymoanaleptiques, potentialisent les effets toxiques de l'amphétamine. Inversement, par leur action anti-dopaminergique, les neuroleptiques peuvent exercer une certaine protection, vis-à-vis de ce phénomène, effet protecteur dont nous avons recherché l'existence pour E.hirta.

## 2.2 Procédure expérimentale

### 2.2.1 Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Janvier), leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le Chapitre A II.

### 2.2.2 Méthode

La technique est inspirée des méthodes de Boissier et coll. (1972) et de Gouret et coll. (1973).

La dexamphétamine (Maxiton<sup>®</sup>, laboratoires Delagrangre, Paris) est administrée par voie I.P., à la dose de 40 mg/kg.

Dix souris ainsi traitées sont placées dans une même cage (24 x 10,5 x 8,5 cm), tandis que dix autres sont installées individuellement dans le même type de cage.

E. hirta et le produit de référence, la chlorpromazine (Largactil<sup>®</sup>, laboratoires Specia, Paris), sont injectés par une voie I.P., en traitement préventif, trente minutes avant la dexamphétamine.

L'extrait végétal est testé aux doses de 200 et 800 mg/kg ; la chlorpromazine est administrée à la dose de 20 mg/kg ; le solvant consiste en NaCl 0,9 %.

Aussitôt l'injection du dérivé amphétaminique, les animaux de chaque lot sont groupés dans une même cage (24 x 10,5 x 8,5cm). La mortalité est relevée 1, 2, 3, 4, 5, 24 et 48 heures après cette injection.

Durant toute la durée du test, la température ambiante est maintenue à 24°C ± 1°C.

### 2.3 Résultats

D'après les résultats présentés dans le tableau 23 , un effet toxique maximal (100 % de mortalité) est obtenu sur les souris groupées, deux heures après l'injection de la dexamphétamine, tandis que les animaux isolés sont tous en vie.

Un effet protecteur important vis-à-vis de la toxicité de groupe est mis en évidence pour une dose de chlorpromazine de 20 mg/kg (20 % de mortalité, au bout de deux heures).

E. hirta, quant à elle, testée aux doses de 200 et 800 mg/kg, n'exerce aucune protection, vis-à-vis de la toxicité de groupe (respectivement 80 et 70 % de mortalité, au bout de deux heures).

Il faut cependant mentionner l'obtention d'une importante toxicité, au bout de 24 heures pour le lot de souris traitées par la dexamphétamine et maintenues isolées (80 % de mortalité). De même, un effet toxique maximal est observé chez les animaux groupés traités par l'extrait végétal (100 % de mortalité).

**TABEAU 23 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE LA CHLORPROMAZINE VIS-A-VIS DE LA TOXICITE DE GROUPE INDUITE PAR LA DEXAMPHETAMINE.**

RELEVES	1h	2h	3h	4h	5h	24h	48h	MORTALITE (%)
LOTS								
DEXAMPHETAMINE 40 mg/kg (10 ani./ cage)	9	1	/	/	/	/	/	100%
DEXAMPHETAMINE 40 mg/kg (1 ani./ cage)	/	/	3	1	/	4	/	80%
CHLORPROMAZINE 20 mg/kg (10 ani./ cage)	1	1	/	/	/	/	/	20%
E HIRTA 200 mg/kg (10 ani./ cage)	6	2	/	/	/	2	/	100%
E HIRTA 800 mg/kg (10 ani./ cage)	6	1	/	/	2	1	/	100%

#### IV - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES STERÉOTYPIES INDUITES PAR UN DERIVE AMPHÉTAMINIQUE, LA DESAMPHÉTAMINE.

##### 3.1 Rappels sur le phénomène des stéréotypies induit par l'amphétamine ou l'apomorphine.

L'amphétamine et l'apomorphine sont réputées pour provoquer, chez l'animal, certains syndromes d'hyperexcitabilité du système nerveux central, appelées stéréotypies. Ces phénomènes consistent en mouvements bucco-lingo-masticateurs, anormaux et répétitifs et résultent de la stimulation directe ou indirecte des récepteurs dopaminergiques centraux.

Les stéréotypies induites par l'apomorphine se traduisent par des mâchonnements, des rongements et des lèchements.

Administrée à la dose de 5 ou 10 mg/kg, l'amphétamine est responsable de l'apparition de mouvements rapides de la tête (hochements, déplacements latéraux et en triangle, reniflements de la sphère buccale (rongements, morsure des parois de la cage, mâchonnements de la litière et léchage) et des pattes antérieures. A plus forte dose, ce comportement s'accompagne d'une hypersalivation.

Si les neuroleptiques et les parasympathomimétiques sont capables d'inhiber les stéréotypies induites par l'amphétamine ou l'apomorphine, des résultats atypiques sont parfois obtenus. Ainsi, la réserpine fait apparaître plus rapidement les stéréotypies qui disparaissent ensuite très vite ; certains neuroleptiques, tels que la chlorpromazine, exercent un antagonisme net lors de la première heure, les stéréotypies apparaissant "à retardement" (Boissier et Simon, 1966 - Simon et Chermat, 1972).

De nombreuses substances sont capables d'augmenter, en intensité et en durée, ces effets amphétaminiques. Parmi celles-ci, citons les anti-dépresseurs, les benzodiazépines, les anti-histaminiques, les bases xanthiques, les anti-parkinsoniens, la nicotine et certains  $\beta$ -bloquants adrénergiques.

Un mécanisme d'action central a pu être proposé pour certains de ces composés (bases xanthiques, anti-histaminiques), d'autres pouvant agir en empêchant le catabolisme hépatique de l'amphétamine.

(Babbini et coll., 1971 - Boissier et coll., 1971 - Simon et Chermat, 1972 - Lippa et coll., 1979 - Treit, 1985 - Rambert et coll., 1986).

Au cours de cette étude, nous nous limiterons à la recherche d'une éventuelle influence d'E. hirta, vis-à-vis des stéréotypes induites par la dexamphétamine.

### **3.2 Procédure expérimentale**

#### **3.2.1 Matériel**

Les expérimentations sont réalisées sur des rats OFA (Iffa-Credo). Leurs caractéristiques et leurs conditions d'élevage sont détaillées dans le Chapitre A II.

#### **3.2.2 Méthode**

La technique utilisée est inspirée des protocoles expérimentaux de Halliwell et coll. (1964), Boissier et coll. (1971), Simon et Chermat (1972), Worms et coll. (1986).

Les produits à tester sont administrés par voie I.P., trente minutes avant l'injection I.P. de la dexamphétamine (Maxiton<sup>®</sup>, laboratoires Delagrangé, Paris). La dose de 5 mg/kg de dexamphétamine a été choisie grâce à une étude préliminaire.

E. hirta est testée aux doses de 100 et 400 mg/kg.

La chlorpromazine (Largactil<sup>®</sup>, laboratoires Specia, Paris), neuroleptique de référence choisi, est administrée aux doses de 5 et 20 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Aussitôt après l'injection de la dexamphétamine, chaque animal est isolé dans une cage individuelle (22 x 16 x 14 cm) contenant de la sciure, pour être observé toutes les 10 minutes, pendant 210 minutes.

L'intensité des stéréotypies est évaluée selon la cotation de Simon (Simon et coll., 1972, 1974) :

- 0 = absence de stéréotypie et de tout mouvement anormal
- 1 = présence de rares mouvements stéréotypés ou d'un reniflement presque continu, la tête du rat étant dirigée vers le haut
- 2 = reniflements intenses avec mouvements saccadés et rapides de la tête, parfois interrompus par de courtes phases de mâchonnements
- 3 = mouvements stéréotypés intenses et continus (déplacements de la tête, mâchonnements ou léchages), souvent accompagnés de mouvements répétés des pattes antérieures contre les parois de la cage.

Pour chaque lot, la somme des cotations individuelles, obtenues par fractions de 10 minutes, peut être calculée, ainsi que le nombre total des stéréotypies observées durant les 210 minutes que dure le test.

Ce total général peut alors être exprimé en pourcentage, par rapport au lot témoin pris comme le 100 %.

### 3.2.3 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques entre le lot témoin et chaque lot traité sont effectuées à l'aide d'un test non paramétrique, le test de Mann-Whitney - Wilcoxon.

### 3.3 Résultats

D'après le tableau 24 et la figure 24, la dexamphétamine provoque l'apparition des stéréotypies, dans les 10 minutes qui suivent son injection (lot témoin). Ces effets atteignent un

maximum, au bout de 70 minutes (total des cotations = 12), pour ensuite diminuer progressivement et disparaître totalement 150 minutes après l'administration du produit.

Les résultats détaillés, obtenus avec la dose de 20 mg/kg de chlorpromazine, ne sont pas rapportés, aucun mouvement stéréotypé n'étant observé. Cette dose de 20 mg/kg antagonise totalement et pendant toute la durée de l'expérimentation, les stéréotypies induites par la dexamphétamine.

A 5 mg/kg, la chlorpromazine antagonise partiellement et significativement les stéréotypies, à la fois en durée et en intensité. En effet, les mouvements stéréotypés n'apparaissent qu'après 40 minutes, atteignent un maximum à 70 minutes (total des cotations = 4), se maintiennent jusqu'à 150 minutes, pour disparaître totalement 160 minutes après l'injection de la dexamphétamine.

E. hirta, quant à elle, n'exerce aucun antagonisme vis-à-vis des effets de la dexamphétamine, aux doses sédatives testées (100 et 400 mg/kg).

Bien au contraire, ces phénomènes sont accrus, en durée et en intensité ; toutefois, cette potentialisation n'est significative qu'avec la dose de 100 mg/kg. Effectivement, les stéréotypies atteignent un maximum dès 40 minutes après l'injection de la dexamphétamine (totaux des cotations, respectivement pour les doses de 100 et 400 mg/kg = 12 et 11) et persistent plus longtemps pour ne disparaître qu'au bout de 210 minutes, dans le cas de la plus faible dose, tandis qu'ils subsistent pour la dose de 400 mg/kg (un rat a continué de manifester de rares mouvements stéréotypés (cotation 1), jusqu'à 250 minutes).

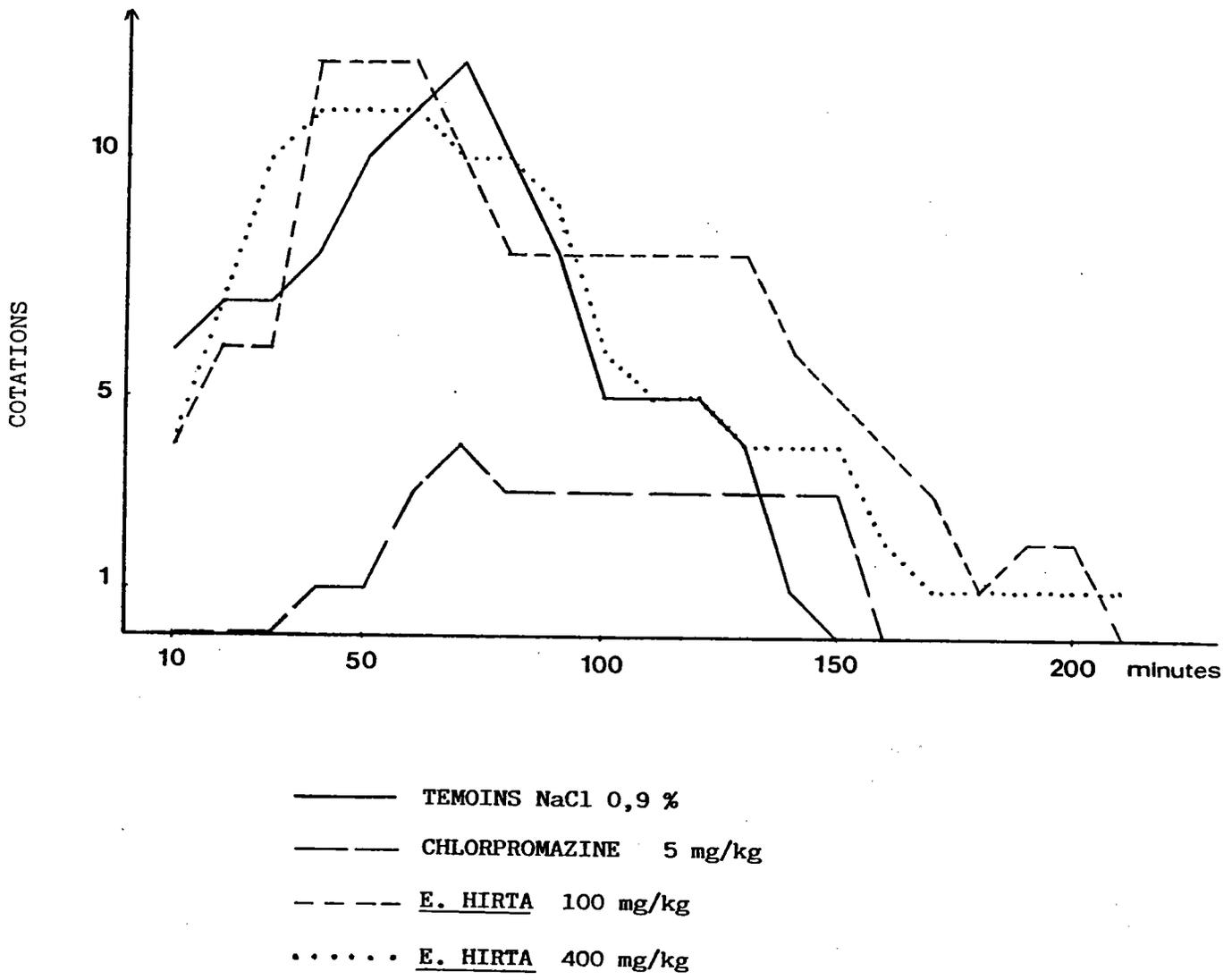
Cet effet potentialisateur est plus important pour la plus faible dose d'E. hirta, soit 100 mg/kg (pourcentages de variation respectivement pour les lots traités par les doses de 100 et 400 mg/kg = 134 % et 119 %).

**TABLEAU 24** : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LES STEREOTYPIES INDUITES PAR LA DEXAMPHETAMINE (5 mg/kg).

LOTS	SOMMES DES COTATIONS INDIVIDUELLES STEREOTYPIQUES (des 4 rats de chaque lot) OBTENUES APRES (minutes)																				TOTAL	% DE	
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	GENERAL	VARIATION
TEMOINS NaCl 0,9% (N=4)	6	7	7	8	10	11	12	10	8	5	5	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	99	100%
CHLORPROMAZINE 5 mg/kg (N=4)	0	0	0	1	1	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	33	33% *
E. HIRTA 100 mg/kg (N=4)	4	6	6	12	12	12	10	8	8	8	8	8	8	6	5	4	3	1	2	2	0	133	134% *
E. HIRTA 400 mg/kg (N=4)	4	7	10	11	11	11	10	10	9	6	5	5	4	4	4	2	1	1	1	1	1	118	119%

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$ .



**FIG. 24 :** INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LES STEREOTYPIES INDUITES PAR LA DEXAMPHETAMINE (5 mg/kg) (sommes des cotations individuelles stéréotypiques pour les quatre rats de chaque lot).

#### IV - 4 RECHERCHE D'UNE ACTIVITE CATALEPTIGENE ET HYPOTHERMIQUE D'E. HIRTA

##### 4.1 Rappel sur l'activité cataleptique

(Boissier et Simon, 1966).

Chez l'homme, l'administration de fortes doses de neuroleptiques, pendant une longue période, est responsable de l'apparition de troubles neurologiques extra-pyramidaux, caractérisés par des tremblements intenses lors de mouvements volontaires.

Ces phénomènes s'expliqueraient par l'exacerbation indirecte de la voie cholinergique des noyaux gris centraux, à la suite de l'inhibition exercée par les neuroleptiques sur la voie dopaminergique nigronéostriatale impliquée dans la motricité volontaire (équilibre constamment maintenu entre ces voies cholinergique et dopaminergique).

Chez l'animal, la catalepsie est très souvent considérée comme l'équivalent de ces troubles neurologiques.

La catalepsie peut se définir comme le syndrome conduisant à une perte de l'initiative spontanée associée à une certaine plasticité.

Ainsi, de faibles doses d'agent cataleptigène induisent une forte réduction de l'activité locomotrice, les animaux restant pratiquement immobiles ; bien qu'ils conservent leur possibilité d'exploration, ils semblent le plus souvent se désintéresser du milieu environnant ; enfin, lors de manipulations, ils sont dociles et reprennent rapidement leur attitude de repos.

A fortes doses, l'agent cataleptigène rend les animaux non agressifs et "plastifiables" en ce sens qu'ils conservent la position qui leur est imposée, même si celle-ci est inconfortable et nécessite un effort musculaire pour son maintien.

De très fortes doses provoquent une alternance de phases de motilité et d'immobilité, cette dernière étant souvent caractérisée par l'impossibilité d'imposer une attitude aux

animaux qui, par ailleurs, réagissent souvent en sens contraire (reculent quand on les pousse...). De telles manipulations entraînent parfois des manifestations agressives. Ces phénomènes sont groupés sous le terme de tasikinésie.

Au cours de cette étude, nous nous limiterons à la recherche d'une activité cataleptique d'E. hirta, par la recherche de ce phénomène de "plasticité" des animaux soumis à différentes postures.

## **4.2 Procédure expérimentale**

### **4.2.1 Matériel**

Les animaux utilisés sont des rats mâles OFA (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le Chapitre A II.

L'expérimentation nécessite un certain nombre de dispositifs conçus au laboratoire :

un pilier en bois de 3 cm de haut ; quatre bouchons en liège de 2,5 cm de haut, placés aux quatre coins d'un rectangle de 8,5 cm de large et 13,5 cm de long ; un système de barres asymétriques constitué par deux tiges métalliques tendues entre deux piliers de 9 cm de haut pour l'une et deux piliers de 3 cm de haut pour la seconde, ces deux tiges étant distantes de 13,5 cm.

### **4.2.2 Méthode**

Chaque animal est soumis à cinq expérimentations différentes, effectuées dans un ordre bien précis :

1) **Croisement des pattes homolatérales** : l'animal est considéré comme cataleptique, s'il accepte de conserver le croisement de ses pattes antérieures avec ses pattes postérieures homolatérales.

2) **Méthode de Wirth** : l'animal doit conserver l'une de ses pattes antérieures sur un pilier de 3 cm de haut, durant au moins 10 secondes.

3) **Méthode du Bouddha** : le rat doit se maintenir dans une position rappelant celle du Bouddha, à savoir, assis sur le train postérieur et le tronc légèrement voûté.

4) **Méthode des quatre bouchons** : l'animal est placé face ventrale dirigée vers le support rectangulaire, chacune de ses pattes reposant sur l'un des quatre bouchons.

5) **Méthode des barres asymétriques** : les pattes antérieures du rat sont placées sur la tige la plus haute (9 cm), les pattes postérieures reposant sur la seconde (3 cm de haut). L'animal doit conserver cette position durant au moins 10 secondes.

Les substances testées sont administrées par voie I.P., trente minutes avant la première appréciation de la catalepsie, l'ensemble des tests étant ensuite effectué d'heure en heure, durant sept heures, puis au bout de 24 heures.

E. hirta est injectée aux doses de 100 et 400 mg/kg.

La chlorpromazine (Largactil<sup>R</sup>, laboratoires Specia, Paris) est administrée à la dose de 20 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Aux cinq expérimentations précédentes, nous avons adjoint la prise de la température rectale, effectuée à l'aide d'un thermomètre à mercure, avant le traitement (To), puis après chaque appréciation de la catalepsie.

Toutefois, en raison du temps limité et du nombre élevé d'animaux manipulés (expérimentation réalisée sur plusieurs extraits végétaux), une seule prise de température a été effectuée pour les relevés de trente minutes et d'une heure.

### 4.2.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les fluctuations de la température rectale, relevées au cours de l'expérimentation, pour chaque lot traité, sont comparées à celles du lot témoin, par le test de Student. Les comparaisons sont effectuées sur les différences entre la température obtenue à chaque relevé et celle relevée avant le traitement (To), pour chaque rat d'un même lot.

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Activité cataleptique

Les résultats sont reportés dans le tableau 25.

Ainsi, après traitement par la dose de 20 mg/kg de chlorpromazine, les animaux réagissent positivement aux cinq tests (méthodes du croisement des pattes homolatérales, du pilier de 3 cm, du Bouddha, des quatre bouchons et des barres asymétriques).

Un effet cataleptique maximal est obtenu trois à quatre heures après l'administration du produit.

Quant à E. hirta, les cinq expérimentations sont constamment négatives pour les animaux traités. Pour cette raison, aucun résultat n'a été retranscrit.

TABLEAU 25 : ACTIVITE CATALEPTIQUE DE LA CHLORPROMAZINE .

: CHLORPROMAZINE :	: NOMBRE D'ANIMAUX REAGISSANT POSITIVEMENT :									
	: 20 mg/kg :	: 30min :	: 1h :	: 2h :	: 3h :	: 4h :	: 5h :	: 6h :	: 7h :	: 24h :
: (N=4) :										
: Croisement :										
: des pattes :	3	4	4	4	3	2	1	1	0	
: homolatérales :										
: Patte antérieure :										
: sur un pilier haut :	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
: de trois cm :										
: Position du :										
: Bouddha :	4	4	4	4	4	4	3	3	0	
: Quatre bouchons :	4	4	4	4	4	4	4	3	0	
: Barres :										
: asymétriques :	1	1	3	3	4	3	2	4	0	

N = nombre d'animaux.

#### 4.3.2 Activité hypothermique

L'influence d'E. hirta et de la chlorpromazine sur la température rectale du rat est présentée dans le tableau 26 et sur la figure 25.

D'après les résultats, E. hirta induit une légère hypothermie, dont le maximum est atteint au bout de deux heures. Toutefois, cet effet n'est significatif qu'avec la dose de 400 mg/kg et uniquement deux heures après son administration (températures moyennes respectives pour les lots traités et témoin = 35°2 et 37° ; chute moyenne de 1°1 par rapport à la température moyenne relevée avant traitement par E. hirta (To)).

Par contre, l'activité hypothermique de la chlorpromazine est bien plus conséquente et devient significative dès le relevé d'une heure (températures moyennes respectives pour les lots traités et témoins : 34°7 et 37°1 ; chute moyenne de 1°8 par rapport à la température moyenne (To) relevée avec traitement par la chlorpromazine). L'effet maximal est obtenu trois heures après l'injection du produit (chute moyenne de 4°3 par rapport à To) et se maintient jusqu'au relevé de cinq heures. Sept heures après son administration, la chlorpromazine exerce encore une activité hypothermique significative (chute moyenne de 2°6 par rapport à To).

**TABLEAU 26 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LA TEMPERATURE RECTALE DU RAT.**

LOTS	TEMPERATURES RECTALES MOYENNES RELEVÉES A									
	To	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	24h	
TEMOINS	36°4	37°1	37°	37°5	37°3	37°7	37°8	37°9	36°4	
NaCl 0,9%	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
(N=4)	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,05	0,5	0,2	
CHLORPROMAZINE	36°5	34°7	32°6	32°2	32°3	32°4	33°8	33°9	37°	
20 mg/kg	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
(N=4)	0,2	0,1	0,4	0,4	0,4	0,2	0,7	0,4	0,1	
		**	***	***	***	***	**	***		
E.HIRTA	36°2	36°1	35°8	36°9	37°	37°7	37°4	37°3	36°2	
100 mg/kg	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
(N=4)	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,05	0,2	0,2	0,2	
E.HIRTA	36°3	35°9	35°2	36°6	36°9	36°8	37°2	37°1	36°6	
400 mg/kg	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
(N=4)	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	
			**			*				

N = nombre d'animaux par lot.

To = température relevée avant l'injection des produits.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

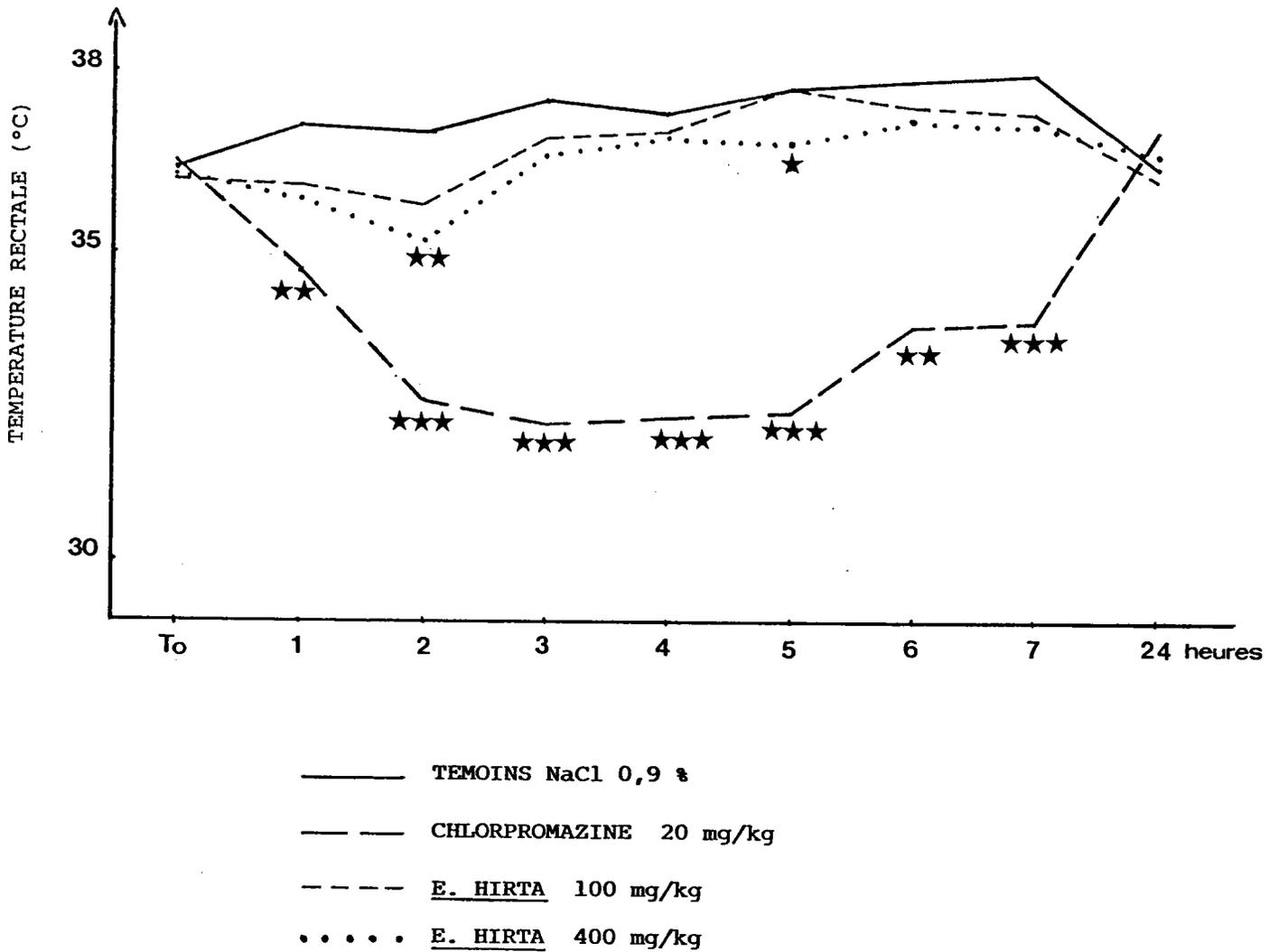


FIG. 25 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE LA CHLORPROMAZINE, SUR LA TEMPERATURE RECTALE (t°) DU RAT.

★p < 0,05 ; ★★p < 0,01 ; ★★★p < 0,001

#### IV - 5 DISCUSSION

La recherche de propriétés neuroleptiques pour E. hirta nous a amené à aborder trois des effets attribués à ces substances psychotropes : l'antagonisme des effets stimulants de l'amphétamine sur les récepteurs dopaminergiques (étude de la toxicité de groupe et des stéréotypies induites par les dérivés amphétaminiques), l'activité cataleptique représentative des effets secondaires extra-pyramidaux et l'action hypothermique.

Notre objectif se limitant à déceler l'existence de telles propriétés, aux doses sédatives d'extrait végétal, seules deux d'entre elles ont été choisies pour chaque test, soient 200 et 800 mg/kg dans l'étude de la toxicité de groupe et 100 et 400 mg/kg dans les autres expérimentations.

Afin d'établir une comparaison entre l'activité d'E. hirta et celle du neuroleptique de référence choisi, la chlorpromazine, celui-ci a été administré à une forte dose sédative, soit 20 mg/kg (DE 50 sédative estimée à 12,5 mg/kg chez la souris et à 8 mg/kg chez le rat, d'après Barnes et Eltherington, 1973). Toutefois, au cours de l'étude des stéréotypies amphétaminiques, la dose de 5 mg/kg a également été testée, en raison de l'antagonisme total exercé par ce neuroleptique sur les mouvements stéréotypés du rat.

Les résultats obtenus au cours de ces différentes expérimentations permettent d'avancer les conclusions suivantes :

\* E. hirta n'exerce aucun effet protecteur vis-à-vis de la toxicité de groupe induite par la dexamphétamine.

\* Aucun antagonisme des mouvements stéréotypés amphétaminiques n'est observé.

En fait, bien plus qu'une simple absence d'antagonisme, E.hirta exerce une certaine activité potentialisatrice, quoique légère et non dose-dépendante (augmentations moyennes respectives par rapport aux témoins, après traitement par les doses d'extrait végétal de 100 et 400 mg/kg = 34 % et 19 %).

Une telle potentialisation des stéréotypies amphétaminiques a pu être mise en évidence pour de nombreuses substances et notamment pour les benzodiazépines et les anti-dépresseurs (Babbini et coll., 1971 - Boissier et coll., 1971, 1972 - Simon et Chermat, 1972 - Lippa et coll., 1979 - Treit, 1985).

Selon certains auteurs (Samanin et coll., 1977), cette potentialisation serait communément attribuée à une stimulation du système dopaminergique. Lippa et ses collaborateurs (1979) envisagent, quant à eux, une relation entre ces effets et l'inhibition de l'hydroxylation in vivo de l'amphétamine en p-hydroxyamphétamine.

Toutefois, cette activité potentialisatrice d'E. hirta reste légère, en comparaison des effets manifestés par d'autres composés, tels que l'imipramine (anti-dépresseur tricyclique) qui, administrée par voie I.P. à raison de 2 mg/kg, potentialise de 87 % les stéréotypies induites par une dose de 4 mg/kg de dexamphétamine, cet effet atteignant 150 % avec la dose de 16 mg/kg d'anti-dépresseur (Simon et Chermat, 1972).

De plus, une activité potentialisatrice nettement supérieure a pu être obtenue avec d'autres extraits végétaux (Xanthoxylum xanthoxyloïdes et Eschscholzia californica) expérimentés dans notre laboratoire. Ainsi, l'administration de doses sédatives, soit 200 et 800 mg/kg, potentialise les stéréotypies respectivement de 68 % et 78 % dans le cas d'Eschscholzia californica et de 69 % et 107 % dans le cas de Xanthoxylum xanthoxyloïdes (Bertrand, 1988 - Rolland, 1988).

\* Aucune activité cataleptique ne peut être attribuée à E. hirta.

Cependant, il eût été intéressant d'envisager l'existence de propriétés anti-cataleptiques, en recherchant une action soit préventive (injection simultanée d'E. hirta et du neuroleptique de référence choisi), soit curative (injection d'E. hirta à des animaux en état de catalepsie), ce qui aurait pu nous apporter de plus amples informations quant au positionnement de l'extrait végétal parmi les substances psychotropes.

Effectivement, si les anti-dépresseurs sont connus pour leurs propriétés anti-cataleptiques, les hypnotiques et les tranquillisants mineurs en sont dépourvus, ainsi que d'effets cataleptigènes (Boissier et Simon, 1966).

\* Enfin, nous avons complété cette recherche de propriétés neuroleptiques par l'étude de l'influence d'E. hirta sur la température rectale du rat. Effectivement, si les anti-dépresseurs et les psychostimulants ne modifient pas ou augmentent légèrement la température centrale, si les tranquillisants mineurs et les hypnotiques ne l'abaissent que modérément et uniquement à fortes doses pour ces derniers composés (Boissier et Simon, 1966), les neuroleptiques sont connus pour leurs propriétés hypothermiques (Deniker et Poirier, 1978 - Lecrubier et coll., 1979).

Cette activité a pu être retrouvée avec le neuroleptique de référence utilisé, la chlorpromazine, administré à la dose de 20 mg/kg, qui provoque une diminution maximale de la température rectale de 4°3 C, effet qui se maintient durant environ quatre heures.

Par contre, E. hirta se révèle beaucoup moins efficace et ne produit qu'une très légère hypothermie transitoire, lorsqu'elle est administrée à la dose de 400 mg/kg (hypothermie maximale et significative uniquement deux heures après l'injection, avec une chute de la température rectale de 1°1 C).

Un tel effet pourrait trouver son explication tout simplement dans l'existence d'un effet dépresseur central précédemment démontrée (Chapitre B I et II).

Aussi, l'ensemble de ces expérimentations nous laisse en droit de rejeter l'hypothèse d'une activité neuroleptique propre pour E. hirta, les propriétés essentielles et caractéristiques de ces psychotropes n'ayant pu être décelées, avec des doses sédatives d'extrait végétal, soit 100, 200, 400 et 800 mg/kg.

Il semble donc que les effets sédatifs précédemment confirmés (Chapitre B II) mettent en jeu des mécanismes d'action n'impliquant pas le système dopaminergique.

Toutefois, deux observations méritent d'être mentionnées : d'une part, l'obtention d'une légère potentialisation des mouvements stéréotypés induits par l'amphétamine et, d'autre part, une légère activité hypothermique se manifestant de façon significative respectivement aux doses sédatives de 100 et 400 mg/kg.

Si le premier phénomène est connu pour diverses substances et notamment pour les benzodiazépines et les anti-dépresseurs tricycliques et IMAO, une activité hypothermique modérée n'est imputable qu'aux tranquillisants mineurs, les anti-dépresseurs ne modifiant pas ou augmentant légèrement la température centrale (Boissier et Simon, 1966).

Ces deux dernières constatations ne peuvent que nous confirmer dans notre volonté de poursuivre et compléter cette étude d'une activité psychotrope pour E. hirta, par la recherche d'éventuelles propriétés anti-dépressives, divers anti-dépresseurs pouvant notamment exercer une certaine activité sédatrice et/ou anxiolytique plus ou moins prononcée, mais également un effet potentialisateur des effets hypnotiques des barbituriques, propriétés précédemment confirmées pour cet extrait végétal.

V

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI - DEPRESSIVES*

## V - 1 INTRODUCTION

(Deniker et Poirier, 1978 - Simon et Colonna, 1979 - Boyer et Moussaoui, 1980 - Puech et coll. - Worms et coll., 1986 - Boschmans et coll., 1987).

### \* Propriétés caractéristiques et effets secondaires.

Appartenant à la classe des psychoanaleptiques, c'est à dire des composés augmentant l'activité mentale, les anti-dépresseurs peuvent être définis comme des agents redresseurs de l'humeur dépressive, cette thymorégulation étant quasi spécifique.

Ces substances n'améliorent pas simplement l'un des symptômes cibles de la dépression, mais sont capables d'agir sur l'ensemble du syndrome dépressif, d'où leur aptitude à inverser l'humeur dépressive en état euphorique.

Aux deux groupes principaux, les **thymoanaleptiques** ou **imipraminiques**, groupe le plus important et le plus utilisé en thérapeutique, et les **thymérétiques** ou **IMAO**, groupe qui n'est pratiquement plus employé en thérapeutique, en raison des effets secondaires importants et des nombreuses incompatibilités médicamenteuses, se sont adjoints, au fil des années, divers autres composés se différenciant par leur structure ou leur mécanisme d'action biochimique et que certains auteurs (Coccaro et Siever, 1985 - Boschmans et coll., 1987) regroupent sous le terme de "**seconde génération d'anti-dépresseurs**".

Généralement, les anti-dépresseurs n'exercent que peu d'effets sur le système nerveux central du sujet normal. Toutefois, certains IMAO peuvent exercer de discrets effets du type amphétaminique apparemment indépendants de l'inhibition de la monoamine oxydase (MAO).

Certains imipraminiques et nouveaux composés réduisent le seuil convulsivant, exercent une action anti-cholinergique centrale, ainsi qu'un effet sédatif plus ou moins important selon la substance. Cet effet sédatif secondaire serait apparemment lié au blocage des récepteurs  $\alpha$ adrénergiques et histaminiques.

Parmi les anti-dépresseurs les plus sédatifs, citons la miansérine et l'amitryptiline.

D'autres composés sont plus "stimulants", tels que l'amineptine, la nomifensine et l'imipramine ; cet effet latéral serait apparemment lié à l'activation du système dopaminergique, mais ne correspondrait pas à l'effet déshinhibiteur commun à tous les anti-dépresseurs.

D'autres substances peuvent présenter une activité intermédiaire à ces effets sédatifs et stimulants (viloxazine).

Divers anti-dépresseurs (miansérine - trazodone...) entrent non seulement dans le traitement des dépressions, mais aussi dans celui de l'anxiété ; ainsi, la miansérine présenterait une efficacité comparable à celle de l'imipramine pour la première indication, et à celle du diazépam pour la seconde (Boschmans et coll., 1987).

#### \* Pharmacocinétique.

Si la pharmacocinétique des anti-dépresseurs thymérétiques (IMAO) est assez mal connue, en raison de l'appréciation difficile de leur présence dans l'organisme d'après leurs effets enzymatiques, celles des imipraminiques est beaucoup moins obscure.

Ainsi, ces anti-dépresseurs sont rapidement et presque totalement résorbés au niveau de l'intestin grêle, par diffusion passive. Leur fixation sur les protéines plasmatiques et surtout sur l'albumine est quantitativement importante (fraction libre inférieure ou égale à 8 % de la concentration plasmatique globale). Ils présentent également une grande affinité tissulaire, notamment pour les tissus les plus vascularisés (coeur, foie, cerveau, reins, poumons).

Après transformations, quantitativement importantes, par les enzymes microsomiales hépatiques, les métabolites obtenus sont éliminés par voie urinaire (95 à 99,5 % de la dose initiale).

Ces transformations hépatiques peuvent, par ailleurs, être modifiées par certaines substances telles que les neuroleptiques qui les inhiberaient partiellement, ou encore le

phénobarbital qui les stimulerait, les benzodiazépines ne semblent pas modifier leur métabolisme.

Il faut également mentionner l'activité inhibitrice partielle de certains IMAO, vis-à-vis de divers systèmes enzymatiques, et notamment sur le système d'oxydation des microsomes hépatiques chargé de la dégradation de nombreux médicaments, cette inhibition expliquant certaines des interactions indésirables imputées à ces anti-dépresseurs.

#### \* Mécanismes d'action.

Malgré l'hétérogénéité de cette classe de psychoanaleptiques, les anti-dépresseurs sont caractérisés par leur **activation commune du système noradrénergique**, mécanisme d'action par lequel ils exerceraient leur effet thérapeutique principal.

Ainsi, certaines substances augmentent la concentration du médiateur dans la fente synaptique, en agissant sur sa libération soit directement (amineptine) soit par blocage des récepteurs  $\downarrow$  pré-synaptiques (miansérine), ou en diminuant sa dégradation soit par inhibition du recaptage (imipraminiques, nomifensine) soit par inhibition de l'enzyme de dégradation, la monoamine oxydase ou MAO (IMAO).

D'autres substances stimulent directement les récepteurs  $\beta$  post-synaptiques (salbutamol, viloxazine).

Une **activation du système dopaminergique** est également observée, essentiellement pour les IMAO et certains autres composés (nomifensine, minaprine, amineptine...), mais aussi, à un degré moindre, pour certains dérivés imipraminiques se traduisant par l'augmentation des effets hypertenseurs des cathécolamines.

En fait, l'action des imipraminiques, au niveau du système sympathique, est relativement complexe, puisqu'ils se comportent comme des sympathomimétiques indirects, à faibles doses, tandis qu'une action adrénolytique périphérique se développe à fortes doses (blocage des récepteurs  $\downarrow$ ) et peut

ainsi expliquer certains effets secondaires, tels que l'hypotension orthostatique.

Un effet sympatholytique peut également être observé dans le cas des IMAO qui, par inhibition du métabolisme normal de la tyramine, sont responsables de sa dégradation, selon une autre voie aboutissant à la formation d'un faux transmetteur pouvant remplacer la noradrénaline.

A ces activations des systèmes noradrénergiques et dopaminergiques, vient s'ajouter celle du **système sérotoninergique**, ces différentes actions pouvant être exercées préférentiellement sur l'un de ces systèmes (exemples de l'imipramine qui agit sur les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques, l'amitriptyline agissant essentiellement sur le second; exemple de la minaprine, composé atypique, qui active les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques).

De plus, certains dérivés imipraminiques, tels que l'imipramine elle-même, exercent des **effets anti-histaminiques, anti-sérotoninergiques périphériques et anti-cholinergiques**, ces derniers étant responsables de divers effets secondaires atropiniques.

La miansérine, l'un des nouveaux anti-dépresseurs de la seconde génération, est également dotée d'activités anti-histaminiques et anti-sérotoninergiques, bien que ces dernières soient plus ou moins contestées (Boschmans et coll., 1987).

#### \* Modèles expérimentaux.

Les effets thérapeutiques des anti-dépresseurs peuvent être mis en parallèle avec diverses activités pharmacologiques observables chez l'animal.

Ainsi, ces psychotropes s'opposent pratiquement point par point aux neuroleptiques et exercent notamment des activités anti-résérpiniques et anti-cataleptiques. Ces composés potentialisent également les effets stimulants de l'amphétamine, tels que les mouvements stéréotypés.

De plus, ils affectent peu l'activité motrice de l'animal et ne sont jamais hypnotiques, mais bien plus, ils potentialisent généralement ces dernières substances psycholeptiques.

Enfin, les anti-dépresseurs modifient peu ou augmentent légèrement la température centrale.

A ces propriétés, vient s'ajouter l'activité anti-cholinergique centrale des imipraminiques, mise en évidence par l'étude de l'antagonisme exercé sur un cholinergique (oxotrémorine...).

La recherche de propriétés anti-dépressives pour E. hirta nous a amené à sélectionner les deux protocoles expérimentaux suivants :

\* d'une part, un test permettant d'étudier l'influence de l'extrait végétal vis-à-vis des effets de la réserpine, grâce à l'évaluation du ptosis des paupières, de l'akinésie et de l'hypothermie réserpiniques.

\* d'autre part, un modèle expérimental permettant de rechercher une action antagoniste vis-à-vis des effets de l'oxotrémorine, grâce à l'évaluation des tremblements, de la salivation et de l'hypothermie cholinergiques.

## V - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES EFFETS DE LA RESERPINE

### 2.1 Rappels sur les effets réserpiniques

La réserpine appartient à la classe des neuroleptiques anti-psychotiques (qui diminuent la fonction dopaminergique), dotés d'effets sédatifs, anti-psychotiques et désinhibiteurs (Deniker et Poirier, 1978).

Son action complexe consiste notamment dans la libération de la noradrénaline ou de la dopamine stockée dans les granules, ces catécholamines subissant alors une désactivation endocellulaire par la MAO. D'autre part, la réserpine empêche tout nouveau stockage d'amines biogènes.

En fait, ce blocage du stockage des catécholamines n'est pas spécifique à ces dernières, mais existe également pour la sérotonine et l'histamine.

Parmi les effets réserpiniques, citons l'activité hypothermique, l'occlusion des paupières ou ptosis, ainsi qu'une akinésie (manque total de mouvement), facilement observables chez la souris.

Selon Bourin et coll. (1983), chacun de ces trois effets serait en rapport avec l'inhibition de certains récepteurs : récepteurs  $\beta$  adrénergiques pour l'hypothermie,  $\alpha$  adrénergiques et/ou sérotoninergiques pour le ptosis, dopaminergiques pour l'akinésie.

Le modèle réserpinique, développé par Askew (1963) après l'observation d'une activité anti-hypertensive chez l'homme (Frize, 1954 - Muller, 1955 - Lemieux et coll., 1956 - Jensen, 1959), a souvent été associé aux maladies dépressives.

Il reste le test le plus employé pour démontrer une activité anti-dépressive chez l'animal (Boissier et coll., 1971, 1972 - Gouret et Thomas, 1973 - Bourin et coll., 1983 - Worms et coll., 1986 - Porsolt et coll., 1987).

## 2.2 Procédure expérimentale

### 2.2.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques, ainsi que les conditions d'élevage, sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

### 2.2.2 Méthode

La réserpine (réserpine cristallisée, laboratoires Sarget, Merignac (33)) est administrée par voie I.P., à la dose de 2,5 mg/kg. La solution est préparée à partir de réserpine cristallisée (50 mg) et d'acide ascorbique (1g) ; le mélange broyé au mortier est additionné d'eau distillée, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 250 ml.

Les produits à tester (plante, produits de référence) sont administrés par voie I.P., quatre heures après la réserpine.

E. hirta est testée aux doses de 100 et 400 mg/kg.

Deux anti-dépresseurs thymoanaleptiques sont utilisés, à la dose de 20 mg/kg : l'imipramine (Tofranil<sup>R</sup>, laboratoires Geigy, Paris 14ème) et l'amitriptyline (chlorhydrate d'amitriptyline, laboratoires Merck Sharp Dhome, Paris 15ème).

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Aussitôt l'injection des produits, chaque animal est placé en cage individuelle (22 x 8,5 x 8 cm) pour faciliter son observation.

Les trois paramètres pris en compte sont toujours relevés dans le même ordre :

\* le ptosis est observé 4 heures après l'injection de la réserpine (juste avant l'administration des produits (To)), de façon à vérifier que tous les animaux sont bien sous effet

réserpinique ; puis 30 minutes et 2 heures après l'injection des substances testées (T 30 minutes et T 2 heures).

Le ptosis de chaque oeil est apprécié selon la cotation de Rubin et coll. (1957) :

- 0 = occlusion des paupières nulle.
- 1 = occlusion des paupières au 1/4
- 2 = occlusion des paupières au 1/2
- 3 = occlusion des paupières au 3/4
- 4 = occlusion totale des paupières.

La cotation totale sur les deux yeux est prise en compte.

\* l'akinésie est observée 4 heures après l'injection de la réserpine (To), puis 30 minutes et 2 heures après l'injection des produits testés (T 30 minutes, T 2 heures).

L'akinésie est considérée comme positive si l'animal est prostré et ne se déplace pas d'une distance au moins égale à la longueur de son corps ; dans le cas contraire, l'akinésie est considérée comme nulle.

Les observations effectuées au temps To permettent d'apprécier l'activité réserpinique et d'éliminer les animaux qui ne seraient pas sous l'effet du neuroleptique (ptosis maximal pour chaque oeil, soit une cotation de 8 au total, akinésie positive).

\* La température rectale est relevée à l'aide d'une sonde chemisée (Thermo-Est, Montigny-les-Metz (57)), juste avant l'injection de la réserpine (T -4h), de façon à éliminer les animaux qui seraient en hyper ou hypothermie en dehors de tout traitement ; puis 4 heures après la réserpine (juste avant l'administration des produits (To)) ; puis 30 minutes et 2 heures après l'injection des produits testés (T 30 minutes, T 2 heures).

Deux protocoles sont réalisés :

\* lors d'un premier essai, le ptosis et l'akinésie sont observés sans que l'animal soit manipulé (méthode décrite par Bourin et coll., 1983).

\* Dans un second essai, ces deux paramètres sont relevés de la même façon (sans manipulation de la souris), mais également quinze secondes après avoir saisi l'animal par la queue et l'avoir redéposé dans sa cage (procédure inspirée de la méthode décrite par Gouret et Thomas, 1973).

Remarque : au cours du premier essai, un lot de dix souris a reçu la plante seule, à la dose de 400 mg/kg, dans le but d'observer son activité propre vis-à-vis des trois paramètres pris en compte.

### 2.2.3 Analyse statistique

L'homogénéité des variances n'étant pas toujours vérifiable par le test de Bartlett, le degré de ptosis des différents lots traités est comparé à celui du lot témoin, par un test non paramétrique, le test de Mann-Whitney - Wilcoxon.

Les pourcentages d'akinésie sont comparés à l'aide du test du  $\chi^2$  modifié.

Concernant l'influence des produits vis-à-vis de l'hypothermie réserpinique, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques sont effectuées sur les différences entre la température relevée 30 minutes ou 2 heures après l'injection des substances et la température obtenue avant cette administration ( $T_0$  = température rendant compte de l'hypothermie réserpinique).

Après vérification de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), l'influence d'E. hirta sur la température normale de la souris est étudiée statistiquement par comparaison entre les températures individuelles relevées 30 minutes ou 2 heures après l'injection de l'extrait végétal et les températures individuelles obtenues avant ce traitement ( $T_0$ ), à l'aide du test de Student.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Observation des animaux non manipulés (protocole 1)

Les résultats concernant le ptosis et l'akinésie réserpiniques sont présentés dans le tableau 27. Ceux relatifs à l'influence des composés sur l'hypothermie réserpinique et sur la température normale de la souris sont reportés dans le tableau 28 et sur la figure 26.

Quatre heures après l'injection de la réserpine, les souris manifestent les caractères liés à l'administration de ce neuroleptique, à savoir un ptosis maximal (cotation 8), une akinésie positive et une hypothermie moyenne de 14 % (chute moyenne de 5°1 par rapport à T -4 heures). Cette chute de température se poursuit tout au long de l'expérimentation (températures moyennes de 31°9 à To, de 31°2 à T 30 minutes, de 30°2 à T 2 heures).

Testée à la dose de 20 mg/kg, l'imipramine antagonise significativement le ptosis induit par la réserpine, mais uniquement 30 minutes après son injection (soit -19 % par rapport aux témoins), l'activité réserpinique reprenant le dessus au bout de 2 heures.

Cet anti-dépresseur thymoanaleptique antagonise également de façon significative l'hypothermie induite par la réserpine, 30 minutes et 2 heures après son injection.

De plus, la prise en compte des fluctuations intra-groupe de la température rectale (lot "imipramine") permet, non seulement de confirmer cet antagonisme, mais également de constater une légère augmentation de la température, dans les 30 minutes qui suivent l'administration de l'imipramine.

Testée à la dose de 20 mg/kg, l'amitriptyline antagonise significativement le ptosis réserpinique, dans les 30 minutes qui suivent son injection ; cette activité se maintenant au bout de 2 heures (-16 % par rapport aux témoins, 30 minutes et 2 heures après l'injection).

Par contre, ce second anti-dépresseur de référence n'inhibe pas de façon significative l'hypothermie réserpinique, bien que la chute continue de la température observée chez les témoins soit plus ou moins bloquée durant les 2 heures qui suivent son injection.

Concernant le troisième paramètre pris en compte, l'akinésie, aucune activité inhibitrice marquée ne peut être avancée pour ces deux anti-dépresseurs.

E. hirta, quant à elle, provoque une très légère réduction du ptosis réserpinique, surtout 30 minutes après son injection, cet effet étant plus important et significatif avec la dose de 400 mg/kg (-4 % et -10 % par rapport aux témoins, respectivement pour les doses de 100 et 400 mg/kg et au bout de 30 minutes). Cette forte dose inhibe également, mais très faiblement et de façon négligeable, l'akinésie observée au bout de 30 minutes.

E. hirta n'affecte pas l'hypothermie réserpinique ; la chute progressive précédemment mentionnée pour les témoins est à nouveau observée.

Administrée seule, à la dose de 400 mg/kg, E. hirta ne provoque aucun ptosis, ni aucune akinésie. Par contre, elle induit une chute significative de la température, 30 minutes après son administration (chute moyenne de 3°C, par rapport à la température relevée à To, soit une réduction de 8 %).

**TABLEAU 27 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE DEUX ANTI-DEPRESSEURS TRICYCLIQUES SUR LE PTOSIS ET L'AKINESIE RESERPINIQUES.**

ANIMAUX NON MANIPULES (PROTOCOLE 1)

RESERPINE (mg/kg) I.P	LOTS (N=10)	PTOSIS MOYEN		NOMBRE TOTAL D'ANIMAUX EN AKINESIE	
		T -4 heures	T 30 minutes	T 2 heures	T 30 minutes
2,5	TEMOIN (NaCl 0,9%)	7,9 ± 0,1	8 ± 0	10	10
2,5	IMIPRAMINE 20 mg/kg	6,4 ± 0,3 **	7,8 ± 0,2	9	8
2,5	AMITRIPTYLINE 20 mg/kg	6,6 ± 0,4 *	6,7 ± 0,4 **	10	10
2,5	E.HIRTA 100 mg/kg	7,6 ± 0,3	8 ± 0	9	9
2,5	E.HIRTA 400 mg/kg	7,1 ± 0,3 *	7,6 ± 0,2	7	10
/	E.HIRTA 400 mg/kg	0,2 ± 0,1	0	0	0

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.

**TABLEAU 28 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE DEUX ANTI-DEPRESSEURS TRICYCLIQUES SUR L'HYPOTHERMIE RESERPINIQUE**

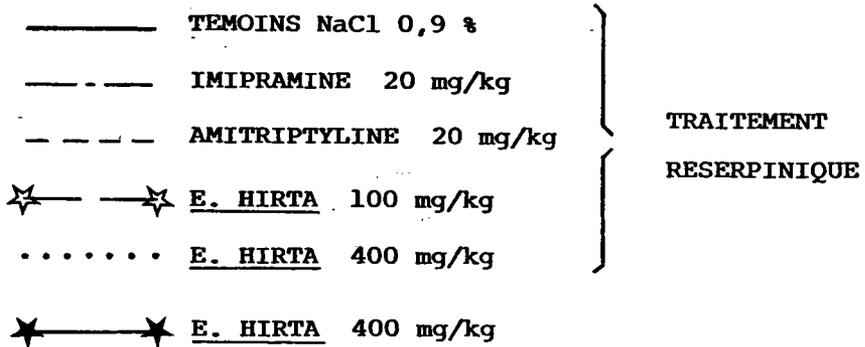
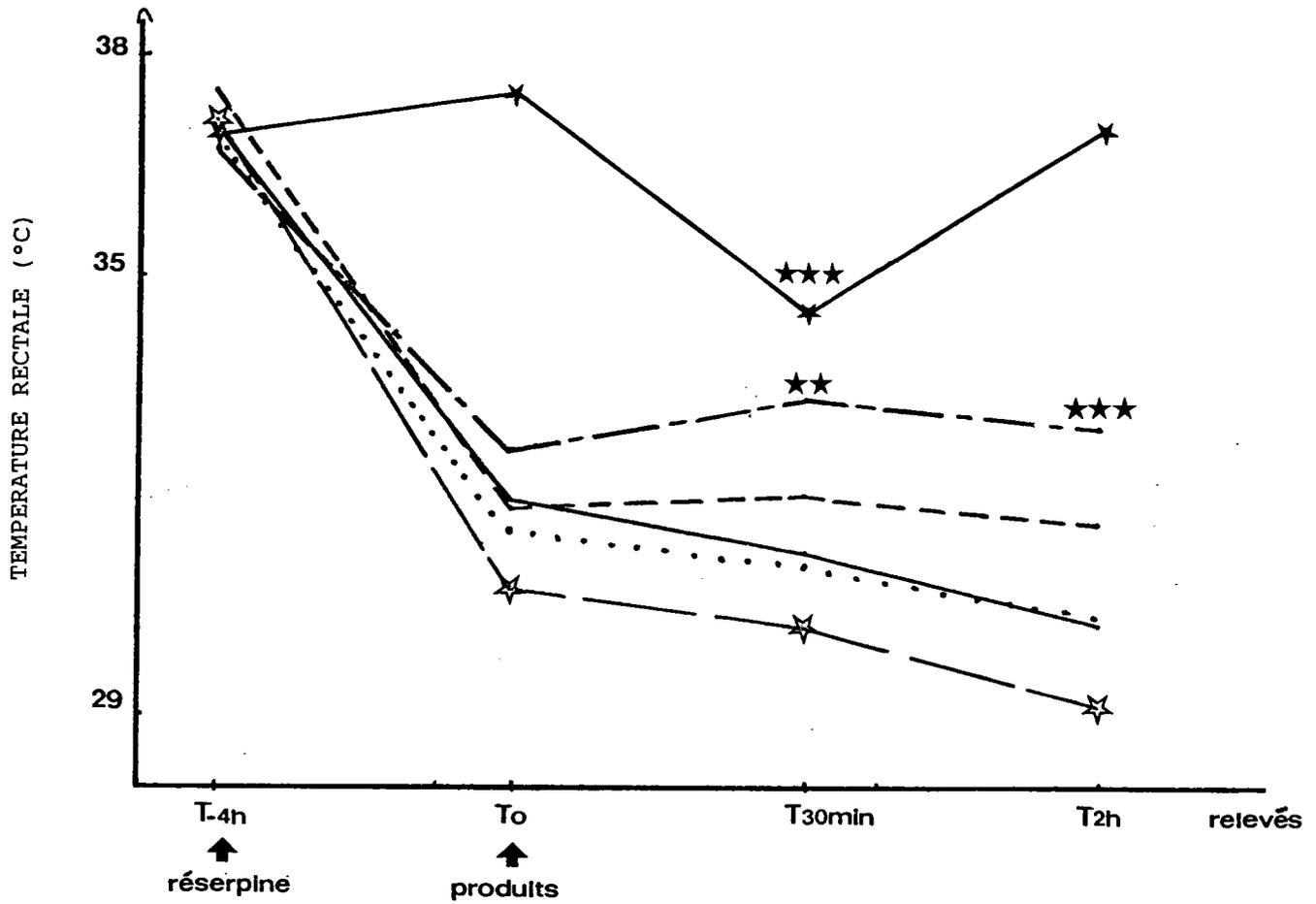
INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA TEMPERATURE NORMALE DE LA SOURIS.

PROTOCOLE 1

LOTS (N=10)	TEMPERATURES MOYENNES RELEVÉES A			
	T -4 heures	T 0	T 30 minutes	T 2 heures
TEMOIN NaCl 0,9 %	37° ± 0,4	31°9 ± 0,4	31°2 ± 0,4	30°2 ± 0,5
IMIPRAMINE 20 mg/kg	36°7 ± 0,1	32°6 ± 0,3	33°3 ± 0,3 **	32°9 ± 0,2 ***
AMITRIPTYLINE 20 mg/kg	37°5 ± 0,3	31°8 ± 0,6	32° ± 0,6	31°6 ± 0,5
E.HIRTA 100 mg/kg	37°1 ± 0,2	30°7 ± 0,4	30°2 ± 0,3	29°1 ± 0,4
E.HIRTA 400 mg/kg	36°9 ± 0,2	31°5 ± 0,4	31° ± 0,4	30°3 ± 0,5
E.HIRTA 400 mg/kg	36°9 ± 0,2	37°5 ± 0,2	34°5 ± 0,2 ***	37° ± 0,4

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



★★p < 0,01 ; ★★★p < 0,001

**FIG. 26 :** INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE DEUX ANTI-DEPRESSEURS TRICYCLIQUES SUR L'HYPOTHERMIE RESERPINIQUE.

INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LA TEMPERATURE NORMALE DE LA SOURIS.

### 2.3.2 Observation des animaux avant et après saisie par la queue (protocole 2)

Les résultats concernant le ptosis et l'akinésie réserpiniques sont reportés dans le tableau 29.

Avant d'être manipulés, les animaux traités par la réserpine seule sont dans un état identique à celui observé lors du premier essai (ptosis moyen maximal, akinésie toujours positive). Cependant, la préhension de la souris par la queue, si elle ne modifie pas l'akinésie, réduit légèrement le ptosis (ptosis moyen de 8 avant saisie de l'animal, ptosis de 7,6 ou 7,7 après saisie).

Testée à 20 mg/kg, l'imipramine antagonise significativement le ptosis réserpinique dans les 30 minutes qui suivent son injection (-21 % par rapport aux témoins), tout comme nous l'avons observé lors du premier essai ; toutefois, cette activité se maintient au bout de 2 heures (-17 % par rapport aux témoins).

Après préhension de l'animal, l'inhibition du ptosis est beaucoup plus importante (ptosis moyens respectifs avant et après saisie de la souris = 6,3 et 4,7, 30 minutes après l'injection de l'anti-dépresseur, soit -38 % par rapport aux témoins ; 6,6 et 5,9 au bout de 2 heures, soit -23 % par rapport aux témoins).

Concernant l'akinésie, si l'imipramine ne manifeste pas d'antagonisme sur l'animal non manipulé (80 - 90 % des souris sont en akinésie), le fait de le saisir par la queue provoque une nette réduction de ce paramètre (50 % des souris restent en akinésie).

L'activité inhibitrice du second anti-dépresseur utilisé, l'amitriptyline, est tout à fait comparable à celle de l'imipramine.

Quant à E. hirta, la légère réduction du ptosis réserpinique, observée lors de la première expérimentation et uniquement 30 minutes après son injection (ptosis moyens respectifs avec les

doses de 100 et 400 mg/kg de 7,6 et 7,1), est à nouveau obtenue, lorsque la souris n'est pas manipulée. Cet effet est identique quelle que soit la dose d'extrait végétal (ptosis moyens respectifs avec les doses de 100 et 400 mg/kg de 7,3 et 7,4 ; soit -9 % et -7 % par rapport aux témoins), mais il ne peut être considéré comme statistiquement significatif.

Après préhension de l'animal, l'inhibition du ptosis est plus importante, notamment avec la dose d'extrait végétal la plus forte, soit 400 mg/kg (ptosis moyens respectifs pour les doses de 100 et 400 mg/kg, 30 minutes après l'injection d'E. hirta de 7 et 6,8, soit -8 % et -10 % par rapport aux témoins). Cet effet, par ailleurs significatif pour la dose de 400 mg/kg, se maintient dans les 2 heures qui suivent l'administration de cette forte dose (-5 % et -12 % respectivement avec E. hirta injectée à 100 et 400 mg/kg).

Tout comme nous l'avons observée lors de la première expérimentation, l'influence d'E. hirta est négligeable sur l'akinésie réserpinique, que ce soit avant ou après préhension de l'animal.

**TABEAU 29 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE DEUX ANTI-DEPRESSEURS TRICYCLIQUES SUR LE PTOSIS ET L'AKINESIE RESERPINIQUES AVANT ET APRES PREHENSION DE L'ANIMAL.**

PROTOCOLE 2

RESERPINE (mg/kg) I.P.	LOTS (N=10)	PTOSIS MOYEN				NOMBRE TOTAL D'ANIMAUX EN AKINESIE			
		T 30 minutes		T 2 heures		T 30 minutes		T 2 heures	
T -4 heures	To	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après
2,5	TEMOIN (NaCl 0,9%)	8±0	7,6±0,3	8±0	7,7±0,2	10	10	10	10
2,5	IMIPRAMINE 20 mg/kg	6,3±0,3 ***	4,7±0,4 ***	6,6±0,4 **	5,9±0,7 *	9	5 **	8	5 **
2,5	AMITRIPTYLINE 20 mg/kg	6,1±0,4 **	4,9±0,4 ***	6,7±0,3 **	5,9±0,3 **	10	5 **	10	5 **
2,5	E.HIRTA 100 mg/kg	7,3±0,3	7±0,3	8±0	7,3±0,3	10	9	10	9
2,5	E.HIRTA 400 mg/kg	7,4±0,3	6,8±0,2 *	7,9±0,1	6,8±0,3 *	9	8	10	10

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.

## V - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES EFFETS DE L'OXOTREMORINE

### 3.1 Rappels sur les effets cholinergiques induits par l'oxotrémorine

Le second test utilisé pour rechercher l'existence de propriétés anti-dépressives est basé sur l'activité anti-cholinergique des anti-dépresseurs tricycliques.

Ainsi, ces composés et tout particulièrement l'amitriptyline, sont des antagonistes spécifiques des récepteurs muscariniques M1, associés à l'adénylcyclase des membranes striatales (Nomura et coll., 1987).

Rappelons que les récepteurs muscariniques, prédominants au niveau des terminaisons post-synaptiques parasympathiques, sont généralement scindés en deux groupes, M1 et M2. Les récepteurs M1, de type excitateur et caractérisés par leur forte affinité pour l'antagoniste pirenzépine, seraient distribués dans divers organes et tissus, ainsi que dans les ganglions. Les récepteurs M2, inhibiteurs, caractérisés par leur forte affinité pour l'antagoniste gallamine et intervenant notamment dans l'inhibition GTP-dépendante de l'adénylcyclase, prédomineraient dans les cellules cardiaques et post-ganglionnaires, ainsi que dans le cervelet. Les deux types de récepteurs co-existeraient dans le cortex et les corps striés (Kaiser et Rzeszotarski, 1987 - Nomura et coll., 1987).

Administrée à dose suffisante, l'oxotrémorine, antagoniste muscarinique, provoque la libération d'acétylcholine se traduisant par des effets centraux comme une hypothermie, ainsi que par certains effets périphériques tels que les tremblements, l'hypersécrétion lacrymale et salivaire (Nordgren et coll., 1987).

Signalons toutefois les travaux de Costa et coll. (1975) qui ont proposé une origine supra-spinale pour ces tremblements, peut-être en relation avec la formation réticulée.

L'expérimentation consiste donc à tenter de modifier les effets

cholinergiques de l'oxotrémorine, par l'administration préventive d'E. hirta.

### **3.2 Procédure expérimentale**

#### **3.2.1 Matériel**

Les animaux utilisés (souris), les conditions d'élevage et les conditions expérimentales sont identiques à celles précédemment mentionnées lors de l'étude de l'influence d'E. hirta sur les effets réserpiniques (paragraphe 2.2.1).

#### **3.2.2 Méthode**

La technique est inspirée de la méthode de Spencer (1966).

Les substances à tester sont administrées par voie I.P., trente minutes avant l'injection de l'oxotrémorine à la dose de 0,5 mg/kg (oxotrémorine à 97 %, laboratoires Aldrich-Europe, Beersse, Belgique) par la même voie.

E. hirta est testée aux doses de 100 et 400 mg/kg.

L'imipramine, anti-dépresseur tricyclique de référence (Tofranil<sup>R</sup>, laboratoires Geigy, Paris 14ème) est injectée à raison de 5 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9%), dans les mêmes conditions.

Aussitôt l'injection de l'oxotrémorine, chaque animal est placé en cage individuelle (22 x 8,5 x 8 cm) pour faciliter son observation.

Les trois premiers paramètres pris en compte, à savoir les tremblements, le larmolement et la salivation, sont relevés 30, 60 et 120 minutes après l'administration de l'oxotrémorine et appréciés selon une cotation établie de 0 à 3 :

0 = absence d'effets cholinergiques

3 = effet maximal

1 et 2 = états intermédiaires.

La température rectale, quant à elle, est prise à l'aide d'une sonde chemisée (Thermo-Est, Montigny-les-Metz (57)), 30 minutes avant l'injection des produits à tester (T -30 minutes), juste avant l'administration de l'oxotrémorine (soit 30 minutes après les produits (To)), puis 30, 60 et 120 minutes après cette seconde injection (T 30 minutes, T 60 minutes et T 120 minutes).

### 3.2.3 Analyse statistique

L'homogénéité des variances n'étant pas toujours vérifiable par les tests de Bartlett, de Cochran ou de Hartley, le degré de tremblement, de larmoiement et de salivation des différents lots traités est comparé à celui du lot témoin par un test non paramétrique, le test de Mann-Whitney - Wilcoxon.

Les comparaisons statistiques concernant les températures sont effectuées à l'aide du test de Student, après avoir vérifié l'homogénéité des variances des différents lots par le test de Bartlett.

Ainsi, l'influence de l'imipramine et d'E. hirta vis-à-vis de l'hypothermie cholinergique (comparaison au lot témoin) est étudiée sur les différences calculées entre la température relevée 30, 60 ou 120 minutes après l'injection de l'oxotrémorine et la température obtenue avant cette injection (To = température obtenue 30 minutes après l'injection des produits).

L'influence des différentes substances testées (NaCl 0,9 %, E. hirta, imipramine) sur la température normale de la souris est étudiée statistiquement par comparaison entre les températures individuelles relevées juste avant leur injection (T -30 minutes) et celles obtenues 30 minutes après cette injection (To = température enregistrée juste avant l'injection de l'oxotrémorine).

Une analyse de variance (ANOVA), effectuée sur les températures individuelles relevées avant tout traitement (T -30 minutes), pour l'ensemble des quatre lots (témoin, imipramine, E. hirta

100 mg/kg et E. hirta 400 mg/kg), permet d'affirmer l'absence de différence significative entre ces différentes températures.

### **3.3 Résultats**

#### **3.3.1 Influence de l'imipramine et d'E. hirta, vis-à-vis des tremblements, du larmolement et de la salivation induits par l'oxotrémorine**

Les résultats sont présentés dans le tableau 30.

L'oxotrémorine, administrée à la dose de 0,5 mg/kg, provoque un effet maximal, vis-à-vis des tremblements et de la salivation, 30 minutes après son injection, l'intensité de ces deux paramètres diminuant ensuite progressivement. Concernant le larmolement, un effet maximal est obtenu au bout de 60 minutes. Cent vingt minutes après l'administration de l'oxotrémorine, son activité, bien qu'amoindrie, subsiste encore.

Dans les 30 minutes qui suivent l'injection de l'oxotrémorine, l'imipramine, testée à la dose de 5 mg/kg, exerce un effet inhibiteur significatif, vis-à-vis des tremblements, du larmolement et de la salivation. Au bout de 120 minutes, les effets de la substance cholinergique ont pratiquement tous disparus, un antagonisme total étant notamment obtenu sur les tremblements.

E. hirta, quant à elle, administrée aux doses de 100 et 400 mg/kg, ne développe aucun antagonisme significatif, vis-à-vis des tremblements, du larmolement et de la salivation induits par l'oxotrémorine, tout au long de l'expérimentation :

Ainsi, 30 minutes après l'injection de ce cholinergique, les effets sont proches de ceux obtenus pour le lot témoin, voire même légèrement augmentés (cas du larmolement, avec les deux doses de plante, et de la salivation, avec la dose de 400 mg/kg). Par la suite, l'activité cholinergique est très légèrement diminuée et notamment avec la plus forte dose d'extrait végétal, mais cet effet reste non significatif.

TABLEAU 30 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'IMIPRAMINE, SUR LES TREMBLEMENTS, LE LARMOIEMENT ET LA SALIVATION INDUITS PAR L'OXOTREMORINE.

LOTS (N=6)	OXOTREMORINE: (mg/kg) IP	TREMBLEMENTS (Moyennes)			LARMOIEMENT (Moyennes)			SALIVATION (Moyennes)		
		To	T30min	T60min	T120min	T30min	T60min	T120min	T30min	T60min
TEMOIN (NaCl 0,9%)	0,5	3±0	2,7±0,2	1,5±0,2	2,7±0,2	3±0	2±0,4	2,7±0,2	2,2±0,4	1,3±0,2
IMIPRAMINE 5 mg/kg	0,5	1,7±0,2 **	1±0,3 **	0 **	1,3±0,3 *	1,7±0,3 *	0,7±0,2 *	1,3±0,2 **	0,8±0,2 *	0,3±0,2 **
E.HIRTA 100 mg/kg	0,5	2,8±0,2	2,5±0,2	0,8±0,2	2,8±0,2	2,7±0,2	1,5±0,3	2,7±0,2	2±0,4	0,8±0,3
E.HIRTA 400 mg/kg	0,5	2,8±0,2	2,2±0,3	0,7±0,3	3±0	2,7±0,2	1±0,3	2,8±0,2	2±0,3	0,8±0,3

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.

### 3.3.2 Influence de l'imipramine et d'E. hirta sur l'hypothermie induite par l'oxotrémorine

Les résultats sont présentés dans le tableau 31 et sur la figure 27.

L'activité hypothermique de l'oxotrémorine se manifeste dans les 30 minutes qui suivent son injection, l'effet maximal étant obtenu au bout de 60 minutes (chute moyenne de 7°4 C, par rapport à la température moyenne relevée avant traitement (To), soit une variation de -20 %).

L'anti-dépresseur de référence, l'imipramine, s'oppose en partie à cette chute de la température et de façon significative, dans les 30 minutes qui suivent l'administration de la substance cholinergique. La température moyenne minimale, relevée au bout de 60 minutes, ne chute que de 4°9 C (-13 % par rapport à To), pour ensuite remonter plus rapidement au bout de 2 heures, en comparaison du lot témoin (respectivement -8 % et -18 % par rapport à To).

De plus, l'imipramine n'influence pas significativement la température normale de la souris (comparaison des températures individuelles relevées avant, soit T -30 minutes, et 30 minutes après l'injection de l'anti-dépresseur, soit To).

E. hirta n'antagonise significativement l'hypothermie cholinergique, qu'à la plus forte dose, soit 400 mg/kg, et seulement 60 et 120 minutes après l'administration de l'oxotrémorine (chutes respectives par rapport à To = 4°8 C et 2°C). La température moyenne maximale est à nouveau enregistrée 60 minutes après l'injection de l'agent cholinergique.

Trente minutes après cette injection, E. hirta réduit la chute moyenne de la température, notamment à la dose de 400 mg/kg (chute de 4°C par rapport à To, contre 5°4 C pour le lot témoin) ; toutefois cet effet reste non significatif.

La comparaison des températures individuelles, relevées avant (T -30 minutes) et 30 minutes après l'injection de la plante (To), permet la mise en évidence d'une activité hypothermique

propre pour E. hirta et significative aux deux doses testées, soit 100 et 400 mg/kg (chute moyenne d'environ 6 % par rapport à la température normale, pour les deux lots traités).

**TABLEAU 31** : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'IMIPRAMINE SUR LA TEMPERATURE NORMALE DE LA SOURIS ET SUR L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR L'OXOTREMORINE.

LOTS (N=6)	TEMPERATURES MOYENNES RELEVÉES A				
	Produits	Oxotremorine			
	T-30 min	To	T 30 min	T 60 min	T120 min
TEMOINS NaCl 0,9 %	37°9±0,2	37°5±0,2	32°±0,4	30°1±0,7	30°7±0,9
IMIPRAMINE 5 mg/kg	38°±0,3	37°5±0,4	35°2±0,2	32°6±0,5	34°5±0,4
			**	*	**
E.HIRTA 100 mg/kg	38°5±0,2	36°3±0,4	31°8±0,4	29°7±0,5	32°2±1,2
		☆☆			
E.HIRTA 400 mg/kg	37°8±0,2	35°5±0,8	31°5±0,3	30°7±0,3	33°5±0,8
				*	**
		☆			

N = nombre d'animaux par lot

Influence par rapport à l'hypothermie cholinergique (comparaison avec le lot témoin) :

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

Influence par rapport à la température basale avant traitement (T -30 minutes) :

☆ p < 0,05 ; ☆☆ p < 0,01

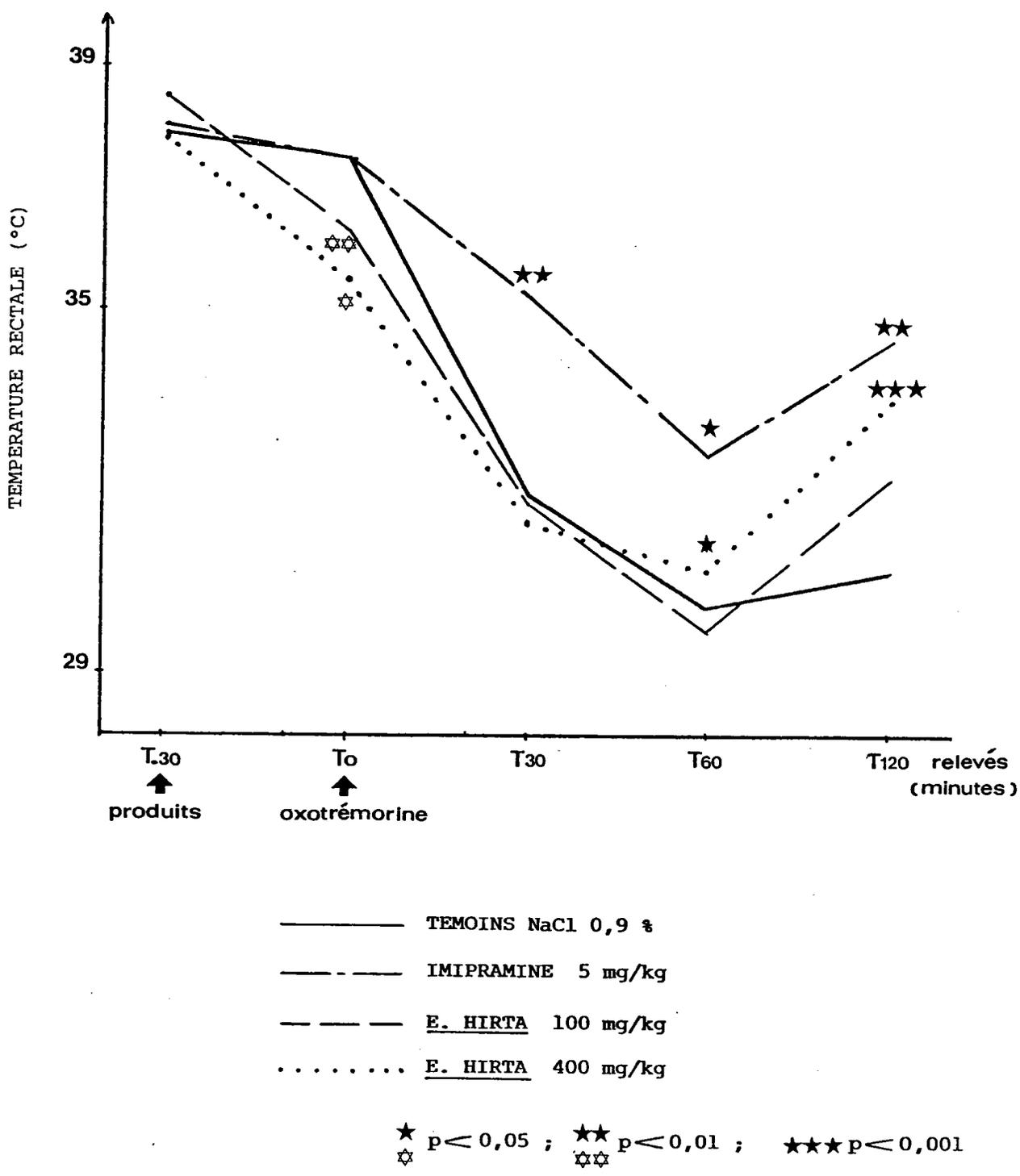


FIG. 27 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'IMIPRAMINE SUR L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR L'OXOTREMORINE (★) ET SUR LA TEMPERATURE NORMALE DE LA SOURIS (☆).

## V - 4 DISCUSSION

La recherche de propriétés anti-dépressives pour E.hirta a pu être menée grâce à l'étude d'effets anti-résérpiniques et anti-cholinergiques, caractéristiques de cette classe de psychotropes.

\* **L'activité anti-résérpinique** a pu être recherchée, grâce à deux procédures expérimentales différentes.

La première, inspirée de la technique de Bourin et coll. (1983), présentait un intérêt certain, notamment en raison du large screening effectué par ces auteurs sur des composés très divers, anti-dépresseurs ou autres ; mais également par la possibilité d'expérimenter simultanément ces diverses substances, dans trois tests différents, permettant de dissocier leurs activités vis-à-vis de l'hypothermie, du ptosis et de l'akinésie résérpiniques et, par là-même, de différencier leur mécanisme d'action vis-à-vis des différents systèmes de neurotransmetteurs concernés (adrénergique, sérotoninergique, dopaminergique).

En effet, selon les auteurs, un antagonisme de l'**hypothermie résérpinique** serait lié à la stimulation directe ou indirecte des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, activité notamment reconnue pour les anti-dépresseurs ; le **ptosis résérpinique** serait, quant à lui, antagonisé par des substances stimulant les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques (non anti-dépresseurs, tels que le 5-hydroxytryptophane, le méthysergide) ou sérotoninergiques (certains anti-dépresseurs, tels que l'imipramine, la nialamide, la viloxazine) ; enfin, l'antagonisme de l'**akinésie** indiquerait une stimulation dopaminergique directe ou indirecte (certains anti-dépresseurs à tendance stimulante, tels que la nomifensine).

Le second protocole, inspiré de la technique de Gouret et Thomas (1973) a été modifié de façon à conserver une certaine correspondance avec le précédent, notamment en ce qui concerne l'ordre d'administration des produits (administration per os des substances, une heure avant l'injection I.P. de la réserpine et réalisation du test quatre heures après celle-ci,

selon la procédure décrite par Gouret et Thomas ; injection I.P. de la réserpine, quatre heures avant celle des substances et réalisation du test trente minutes, puis deux heures après cette seconde injection, selon la procédure inspirée de la technique de Bourin et coll., 1983).

En effet, la méthode de Gouret et Thomas présentait l'inconvénient d'un laps de temps trop important entre l'injection I.P. des produits et la réalisation du test (quatre heures trente minutes). Toutefois, ces auteurs mentionnent une activité moindre des anti-dépresseurs utilisés en thérapeutique, lorsqu'ils sont administrés après la réserpine.

L'intérêt de ce second protocole réside dans la stimulation des animaux, à la suite de leur préhension par la queue. Dans le cas d'une activité réserpinique, les effets caractéristiques (ptosis) sont généralement retrouvés dans les quinze secondes qui suivent, l'akinésie n'étant pas modifiée ; par contre, une activité sédatrice pourrait prêter à confusion, l'animal non dérangé restant alors inactif, les yeux mi-clos.

Selon Gouret et Thomas (1973), quatre heures après son administration I.P., la réserpine n'aurait pas encore atteint son activité maximale, mais serait en phase ascensionnelle, avec notamment un ptosis voisin de 80 % ; l'effet maximum se manifestant aux environs de sept heures. Ceci pourrait expliquer l'observation d'un ptosis sous-maximal, pour certains animaux témoins, après leur préhension.

Concernant l'activité des deux anti-dépresseurs de référence utilisés, l'imipramine, dérivé à tendance "psychostimulante" plus prononcée, et l'amitriptyline, composé plus sédatif, la prise en compte des deux expérimentations met en évidence un antagonisme relativement similaire sur le ptosis et l'akinésie réserpiniques, se développant dans les 30 minutes qui suivent l'injection des produits et se maintenant encore au bout de 2 heures. Toutefois, si le ptosis est antagonisé avant et plus encore après préhension de l'animal, l'akinésie ne l'est qu'après saisie.

Ces deux anti-dépresseurs, s'opposent également à l'hypothermie réserpinique ; cependant, si l'amitriptyline se contente de

bloquer la chute réserpinique, l'imipramine inverse l'évolution de la température, en l'augmentant.

Ainsi, en tenant compte des corrélations établies par Bourin et coll. (1983) entre ces trois activités et les systèmes neurotransmetteurs incriminés, ces deux anti-dépresseurs tricycliques stimuleraient les voies sérotoninergiques (antagonisme du ptosis), dopaminergiques (antagonisme de l'akinésie) et  $\beta$  adrénergiques (antagonisme de l'hypothermie). Cependant, ces constatations ne concordent pas exactement avec les résultats obtenus par les auteurs, lesquels mentionnent un antagonisme induit par l'imipramine, uniquement vis-à-vis du ptosis et de l'hypothermie réserpinique ; l'inefficacité sur l'akinésie pourrait s'expliquer par la non-préhension des animaux, prévue dans la procédure expérimentale, et donc par l'absence de stimulation.

Les résultats obtenus avec E. hirta sont beaucoup plus difficilement interprétables, particulièrement vis-à-vis du ptosis réserpinique. Ainsi, si un très léger antagonisme à la limite de la significativité, est observé, lors du premier essai et uniquement 30 minutes après l'injection de la plus forte dose d'extrait végétal, soit 400 mg/kg, cet effet n'apparaît significatif, au cours de la seconde expérimentation, qu'après préhension de l'animal, mais il se maintient alors 2 heures après l'administration de la plante. Toutefois, une réduction significative du ptosis réserpinique n'en reste pas moins réelle, après préhension de l'animal, bien que cet effet soit très nettement inférieur à celui des deux anti-dépresseurs de référence utilisés (ptosis moyens respectifs obtenus avec l'imipramine, l'amitriptyline et E. hirta testée à 400 mg/kg de 4,7 - 4,9 et 6,8, 30 minutes après les injections de 5,9 - 5,9 et 6,8 au bout de 2 heures).

L'influence d'E. hirta sur l'akinésie et l'hypothermie réserpiniques est beaucoup moins confuse, puisque l'extrait végétal n'antagonise ni l'un ni l'autre.

Ainsi, E. hirta ne semblerait pas stimuler directement ou indirectement les récepteurs dopaminergiques (antagonisme de l'akinésie) et  $\beta$  adrénergiques (antagonisme de l'hypothermie), mais pourrait exercer une certaine influence vis-à-vis des voies  $\alpha$  adrénergiques et/ou sérotoninergiques (antagonisme du ptosis), si l'on se réfère aux corrélations établies par Bourin et coll. (1983).

En fait, cet antagonisme du ptosis réserpinique ne semble pas spécifique des anti-dépresseurs, diverses autres substances testées par ces auteurs ayant manifesté une telle activité ; c'est le cas notamment du 5-hydroxytryptophane, du méthysergide. De plus, l'efficacité des anti-dépresseurs varie d'un composé à l'autre et selon le paramètre pris en compte ; ainsi, si les dérivés imipraminiques et IMAO testés agissent au moins sur le ptosis et l'hypothermie réserpiniques (exception faite de la clomipramine), les composés de la "seconde génération" présentent une activité beaucoup plus hétérogène (efficacité de la nomifensine sur les trois paramètres, de la viloxazine sur le ptosis et l'hypothermie, de la maprotiline sur l'hypothermie ; inefficacité de la miansérine) (Bourin et coll., 1983).

Ces diverses constatations rendent difficile toute conclusion quant à l'existence de propriétés anti-dépressives pour E. hirta.

Des résultats relativement similaires à ceux obtenus avec E. hirta ont pu être observés simultanément sur un autre extrait végétal, Xanthoxylum xanthoxyloïdes (réduction du ptosis réserpinique à la limite de la significativité, bien que ce dernier antagonise également l'akinésie, deux heures après son injection et uniquement après saisie des animaux par la queue, E. hirta restant constamment inefficace (Bertrand, 1988).

Un second extrait végétal, Eschscholzia californica, également testé dans notre laboratoire s'est, quant à lui, révélé

totalelement inactif sur les différents paramètres pris en compte (Rolland, 1988).

\* L'activité anti-cholinergique a pu être étudiée sur les effets cholinergiques centraux (hypothermie) et périphériques (tremblements, larmolement, salivation) de l'oxotrémorine. Ces phénomènes se manifestent dans les 30 minutes qui suivent l'administration de la substance cholinergique, pour atteindre une intensité maximale dès ce moment (tremblements, salivation) ou dans les 60 minutes (larmolement, hypothermie moyenne de 7°4) et subsister encore au bout de 2 heures. Toutefois, les trois premiers paramètres (tremblements, larmolement et salivation) sont enregistrés selon une cotation relativement peu précise, établie de 0 (absence d'effets) à 3 (effet maximal) et soumis à l'appréciation de l'observateur, d'où une certaine subjectivité et une variabilité possible dans les résultats s'ajoutant aux fluctuations liées aux réactions propres de l'animal traité.

Cette activité anti-cholinergique, commune aux dérivés imipraminiques, a pu être vérifiée avec l'imipramine, anti-dépresseur de référence utilisé, dont une dose de 5 mg/kg induit un antagonisme significatif vis-à-vis des effets cholinergiques centraux (hypothermie) et périphériques (tremblements, salivation, larmolement) de l'oxotrémorine, dans les 30 minutes qui suivent l'injection de cet agent cholinergique, réduisant l'hypothermie induite et supprimant totalement ou presque les phénomènes de tremblements, de larmolement et de salivation, au bout de 2 heures.

De telles propriétés ne sont pas reconnues pour les anti-dépresseurs IMAO, ni pour les composés de la nouvelle génération, tels que la chlorimipramine, la nomifensine, l'amineptine, la miansérine et la viloxazine (Puech et coll.).

Comparées à ces effets, des doses sédatives d'E. hirta (100 et 400 mg/kg) n'exercent aucune activité anti-cholinergique significative, vis-à-vis des tremblements, de la salivation et du larmolement. Toutefois, il peut être intéressant de mentionner une très légère réduction des effets cholinergiques, quoique non significative, 60 et 120 minutes après l'administration de l'oxotrémorine.

A cette même période du test, la dose de 400 mg/kg antagonise significativement l'hypothermie cholinergique, d'une manière relativement proche de l'action de l'imipramine : ainsi, 60 minutes après l'injection de l'agent cholinergique, E. hirta et l'imipramine provoquent une chute respective de 4°7 et 4°9 par rapport à To, ces diminutions respectives étant de 2° et 3°, au bout de 120 minutes.

Cependant, les températures moyennes relevées sont toujours plus élevées pour le lot traité par l'imipramine. Une explication possible serait l'action hypothermique propre d'E. hirta, développée 30 minutes après son injection (chute moyenne de 2°3) et donc juste avant l'administration de l'agent cholinergique qui agirait alors sur une température déjà réduite.

La disparition de cet effet hypothermique propre, dans les 60 et 120 minutes qui suivent l'injection de l'oxotrémorine pourrait permettre la manifestation d'un antagonisme significatif d' E. hirta, vis-à-vis des effets hypothermiques cholinergiques.

Le fait que l'action hypothermique propre d'E. hirta n'influence pas l'hypothermie réserpinique et que l'extrait végétal antagonise celle induite par l'oxotrémorine pourrait laisser présager de mécanismes d'action différents.

Une action hypothermique relativement similaire a pu être révélée, au cours de l'étude de l'influence d'E. hirta sur les effets réserpiniques (chute moyenne de 3°C, 30 minutes après l'injection I.P. d'une dose de 400 mg/kg) et permet, par la même occasion, de confirmer l'hypothermie observée chez le rat (Chapitre B IV - 4) quoique moindre (chute moyenne maximale de 1°1, deux heures après l'injection de la dose de 400 mg/kg).

Toutefois, cette activité d'intensité différente chez le rat et la souris n'est pas exceptionnelle, Danneberg et coll. (1986) l'ayant précédemment constatée pour différentes substances. De plus, de tels résultats ont pu être obtenus au cours de travaux effectués dans notre laboratoire, sur un extrait d'Eschscholzia californica (Rolland, 1988).

Une telle dissociation de l'activité exercée par E. hirta sur les effets cholinergiques centraux (hypothermie) et périphériques (tremblements, larmolement et salivation) de l'oxotrémorine, n'est pas exceptionnelle et pourrait trouver son explication dans l'existence de mécanismes d'action différents ou prédominants. Ainsi, les composés anti-cholinergiques utilisés en thérapeutique, qu'ils soient d'origine naturelle (atropine...) ou synthétique (dérivés de la pipéridine, du benzhydrol, des phénothiazines), peuvent exercer une action prédominante sur l'un ou l'autre des deux types de récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques) et donc induire des effets différents. De plus, leurs activités centrales et périphériques peuvent être plus ou moins conséquentes, l'une pouvant prédominer ou exister seule (Rondot et Recondo, 1979 - Boissier et Advenier, 1978).

En fait, cette activité anti-cholinergique n'est pas spécifique des anti-dépresseurs, diverses autres substances s'étant révélées efficaces, parmi lesquelles nous pouvons citer certains neuroleptiques dérivés des phénothiazines (thioridazine, clozapine, profénamine...), qui seraient efficaces sur les tremblements, l'hypertonie et l'hypersialorrhée, mais aussi certains tranquillisants benzodiazépiniques tels que le diazépam, qui s'est révélé efficace vis-à-vis de certains effets cholinergiques périphériques (tremblements et diarrhées) induits par l'oxotrémorine ; par contre, cette benzodiazépine reste inactive sur l'hypersalivation, tandis qu'elle accentue l'hypothermie ; son activité consisterait dans une modulation (réduction) directe ou indirecte (par stimulation gabaergique)

du pool de récepteurs muscariniques fonctionnels du système nerveux central (Nordgren et coll., 1987).

L'absence de toute activité anti-cholinergique pour les deux extraits précédemment cités (Xanthoxylum xanthoxyloïdes et Eschscholzia californica) et testés simultanément avec E. hirta, peuvent constituer une certaine forme de validation des résultats obtenus avec ce dernier extrait.

De l'ensemble des résultats obtenus avec E. hirta et concernant les activités anti-résérpiniques et anti-cholinergiques manifestées par la plupart des anti-dépresseurs, diverses constatations essentielles peuvent être dégagées : Ainsi, si E. hirta, testée à la forte dose sédatrice de 400 mg/kg s'est révélée efficace dans l'antagonisme, quoique léger, du ptosis résérpinique, si cet extrait végétal a pu réduire l'hyperthermie cholinergique, il est toutefois resté inactif vis-à-vis de l'akinésie et de l'hypothermie résérpiniques, mais aussi vis-à-vis des effets cholinergiques périphériques pris en compte (tremblements, salivation, larmolement).

En raison de cette faible efficacité, tant au niveau qualitatif (puissance d'activité nettement inférieure à celle des anti-dépresseurs de référence employés), qu'au niveau quantitatif (nombre de paramètres affectés), en raison du peu de spécificité de ces actions anti-résérpiniques et anti-cholinergiques, il nous est permis de rejeter l'existence de propriétés anti-dépressives suffisamment conséquentes pour justifier le rattachement d'E. hirta à cette classe de psychotropes.

L'activité hypothermique propre manifestée par E. hirta, chez la souris et le rat, ne fait que nous conforter dans cette conclusion, les anti-dépresseurs étant réputés pour ne pas affecter la température centrale ou pour l'augmenter légèrement (Boissier et Simon, 1966).

*VI*

*CONCLUSIONS*

Initialement conçue dans le but de confirmer ou d'infirmer les hypothèses avancées par Cabalion P. (communication personnelle), quant à l'existence d'un effet calmant pour E. hirta, interprété comme étant de type anxiolytique non soporifique, cette recherche de propriétés psychotropes a été menée de façon à étudier non seulement l'existence d'activités sédatives et anxiolytiques, mais également de façon à compléter le profil pharmacologique de cet extrait végétal, par la recherche de propriétés hypnotiques, neuroleptiques et anti-dépressives.

#### Propriétés sédatives

E. hirta présente, chez la souris, une activité sédative révélée par la réduction des activités comportementales de l'animal confronté à diverses situations plus ou moins aversives.

En situation très contraignante (test de l'activimètre, test de l'escalier), cet effet sédatif se manifeste significativement dès la dose de 100 mg/kg, sur l'activité générale de l'animal enregistrée dans l'activimètre (DE 50 de 227 mg/kg (224-230) lorsque la souris est introduite de force dans un milieu inconnu ; DE 50 de 123 mg/kg (120-125) lorsque la souris est laissée dans son milieu familier), sur les redressements effectués (DE 50 de 83 mg/kg (81-84) dans l'activimètre ; DE 50 de 74,7 mg/kg (73,9-75,5) dans l'escalier) et sur les marches montées par la souris (DE 50 de 98,7 mg/kg (97,5-100) dans l'escalier).

Lorsque cet animal territorial n'est pas introduit de force dans un milieu inconnu (test d'exploration d'un milieu nouveau), les effets sédatifs se manifestent significativement dès la dose de 12,5 mg/kg, sur l'activité locomotrice (DE 50 de 45,8 mg/kg (45-46,6)).

L'intensité des effets induits par E. hirta a pu être comparée à celle obtenue avec le clorazébate dipotassique (Tranxène<sup>R</sup>), dans l'activité en situation familière et dans le test de l'escalier.

Ainsi, des effets sédatifs relativement comparables sont obtenus avec les doses de 100 mg/kg d'extrait végétal et de 80 mg/kg de clorazébate dipotassique, sur l'activité générale de la souris (réductions respectives du paramètre de 60 % et 63 %), ainsi que sur les marches montées dans l'escalier (réductions respectives de 53 % et 55 %).

Par contre, administrée à la dose de 100 mg/kg, E. hirta exerce un effet sédatif voisin de celui développé par la dose de 20 mg/kg de clorazébate dipotassique, vis-à-vis des redressements effectués dans l'escalier (réductions respectives de 59 % et 55 %).

### Propriétés anxiolytiques

De légers effets anxiolytiques, à la limite de la significativité, ont pu être décelés après l'administration de faibles doses d'extrait végétal (6,25 - 12,5 et 25 mg/kg).

Ainsi, dans le test de l'escalier, administrée aux doses de 12,5 et 25 mg/kg, E. hirta augmente légèrement les redressements effectués (augmentations respectives de 31 % et 26 %) ; tandis qu'une telle tendance est obtenue sur le nombre de marches montées, avec les doses de 6,25 et 12,5 mg/kg (augmentations respectives de 19 % et 15 %), bien que cet effet ne soit statistiquement significatif qu'avec la plus forte dose.

Dans le test de l'enceinte claire/obscur, la dose de 12,5 mg/kg exerce des effets rappelant l'activité des benzodiazépines (augmentations du temps passé dans l'enceinte claire et du nombre de transitions respectivement de 14 % et de 15 %), quoique statistiquement non significatifs ; tandis que la dose de 25 mg/kg semble à la limite de la sédation (diminution du nombre de transitions de 13 %), bien qu'elle augmente significativement le temps passé dans l'enceinte claire (+33 %)

En fait, l'existence de propriétés psychotropes "calmantes" peut paraître surprenante, en raison de l'absence de telles indications en médecine traditionnelle, et si l'on considère la grande notoriété d'E. hirta.

Toutefois, il est fort possible que seules aient été exploitées les propriétés permettant de traiter les affections les plus fréquentes, ou jugées "prioritaires", celles concernant beaucoup plus la population locale, telles que les dysentéries amibiennes, affections très largement répandues dans toutes les régions tropicales.

En effet, des propriétés calmantes ou sédatives peuvent présenter un intérêt moindre pour ces pays en voie de développement, face aux énormes problèmes soulevés par diverses atteintes, notamment parasitaires.

L'anxiété serait essentiellement un problème de pays industrialisés ; pour s'en persuader, il suffit de considérer l'énorme consommation faite en anxiolytiques et particulièrement en benzodiazépines, substances non dénuées d'effets secondaires plus ou moins néfastes (sommolence, fatigue, vertiges, hypotension, excitation, faiblesse musculaire, baisse de l'attention, amnésie, accoutumance...).

### Propriétés hypnotiques

Administrée à des doses sédatives croissantes et non toxiques (200 à 6400 mg/kg) E. hirta n'exerce aucun effet hypnotique propre.

### Influence vis-à-vis du sommeil barbiturique

E. hirta potentialise significativement le sommeil induit par le pentobarbital à partir de la dose de 400 mg/kg (+85 %) et ceci de façon dose-dépendante.

La DE 50 a pu être estimée à 137,8 mg/kg (135,9-139,8).

Cet extrait végétal induit également le sommeil de souris traitées par une dose infra-hypnotique de pentobarbital, cet effet dose-dépendant se manifestant significativement dès la

dose de 50 mg/kg (+60 % d'endormissement). La DE 50 a pu être estimée à 43,5 mg/kg (43-44,1).

L'intensité de cet effet inducteur peut être comparée à celle du clorazépate dipotassique, les doses d'extrait végétal de 50 et 200 mg/kg pouvant être rapprochées respectivement des doses de 5 et 20 mg/kg de la benzodiazépine de référence (pourcentages d'endormissement de 60 % et 100 %).

E. hirta, testée à la dose de 200 mg/kg, exerce également des activités potentialisatrice et inductrice du sommeil induit par le barbital (pourcentages d'endormissement obtenus respectivement après l'administration de doses infra-hypnotique, soit 150 mg/kg, et hypnotique, soit 200 mg/kg (DE 50), de barbital : 40 % et 100 %).

Ces effets potentialisateurs et inducteurs du sommeil barbiturique s'avèrent reproductibles, quel que soit la période de réalisation des tests (mois ; années, soit 1984 - 1985 - 1986-1987) et quel que soit la date de préparation de l'extrait végétal employé (1984 - 1985 - 1986 - 1987).

L'utilisation de ces deux barbituriques caractérisés par des voies métaboliques différentes (dégradation hépatique du pentobarbital, élimination rénale sous forme inchangée du barbital) nous permet de confirmer un mécanisme d'action central pour E. hirta et donc un effet dépresseur sur le système nerveux central suggéré par la mise en évidence de propriétés sédatives.

### Propriétés neuroleptiques

Administrée aux doses sédatives de 200 et 800 mg/kg, E. hirta n'exerce aucune protection vis-à-vis de la toxicité de groupe induite par la dexamphétamine.

Aux doses sédatives de 100 et 400 mg/kg, l'extrait végétal n'antagonise pas les stéréotypies amphetaminiques, mais les potentialise légèrement (augmentations respectives de 34 % et 19 %), et n'exerce aucune activité cataleptique.

Ces trois activités caractéristiques des neuroleptiques n'étant pas obtenues, nous pouvons donc conclure à l'absence de propriétés neuroleptiques pour E. hirta.

### Propriétés anti-dépressives

Une légère activité anti-dépressive, à la limite de la significativité, peut être constatée pour E. hirta.

Ainsi, administré à la dose sédatrice de 400 mg/kg, l'extrait végétal antagonise significativement le ptosis réserpinique, dans les trente minutes qui suivent son injection (-10 % sur les animaux non manipulés (protocole 1) et sur les animaux saisis par la queue (protocole 2)).

Toutefois, cet effet reste faible en comparaison de l'activité développée par les deux anti-dépresseurs de référence utilisés dans les mêmes conditions, soient l'imipramine et l'amitriptyline (respectivement -19 % et -16 % sur les animaux non manipulés (protocole 1) ; -38 % et -35 % sur les animaux saisis par la queue (protocole 2), ceci au bout de trente minutes).

De plus, E. hirta reste inefficace vis-à-vis de l'akinésie et de l'hypothermie réserpiniques.

Ces résultats pourraient suggérer une action stimulante de l'extrait végétal sur les voies adrénergiques et/ou sérotoninergiques (antagonisme du ptosis) et l'absence d'une telle action sur les voies dopaminergiques (antagonisme de l'akinésie) et  $\beta$  adrénergiques (antagonisme de l'hypothermie), selon les corrélations établies par Bourin et coll. (1983).

Cette même dose d'extrait végétal, soit 400 mg/kg, antagonise également l'hypothermie centrale induite par l'oxotrémorine, 60 et 120 minutes après l'injection de cet agent cholinergique (chutes respectives de 4°8 C et 2°C par rapport à la température enregistrée avant cette injection, la température des témoins chutant respectivement de 7°4 C et 6°8 C et celle des animaux traités par l'imipramine de 4°9 C et 3°C).

Toutefois, E. hirta n'antagonise pas les effets cholinergiques périphériques de l'oxotrémorine (tremblements, larmolement, salivation).

### Influence sur la température corporelle des souris et des rats

L'administration d'une forte dose sédatrice, soit 400 mg/kg, provoque une légère hypothermie transitoire chez la souris et chez le rat.

Cet effet se manifeste significativement chez la souris, dans les trente minutes qui suivent l'injection de l'extrait végétal (chute moyenne de 3°C), pour disparaître au bout de deux heures (Chapitre V - 2).

Chez le rat, une hypothermie inférieure est observée significativement, deux heures après cette injection (chute de 1°1), mais disparaît dans l'heure qui suit (Chapitre IV - 4).

En raison de cette activité modérée et relativement fugace, une action directe sur les centres thermorégulateurs hypothalamiques semble peu probable, mais pourrait s'expliquer par l'effet dépresseur central précédemment proposé pour E. hirta

A la suite de ce screening pharmacologique, visant à cerner l'activité psychotrope d'E. hirta, un certain nombre de résultats pourrait plaider en faveur d'un profil d'activité relativement proche de celui des tranquillisants mineurs benzodiazépiniques, tels que les activités sédatives, potentialisatrices du sommeil barbiturique et hypothermiques modérées, apparemment corrélées à l'effet dépresseur central d'E. hirta, ainsi que les légères propriétés anxiolytiques et potentialisatrices des stéréotypies amphétaminiques.

L'existence d'une légère activité anti-dépressive ne constitue pas nécessairement un obstacle à cette hypothèse, de récents travaux ayant pu déceler de telles propriétés par des composés benzodiazépiniques, tels que l'alprazolam, le triazolam (Kostowski et coll., 1986) et le diazépam (Nordgren et coll., 1987).

Malgré la faible intensité de certains de ces effets, notamment des propriétés anxiolytiques caractéristiques des benzodiazépines, un profil d'activité rappelant celui de ces tranquillisants mineurs n'est pas exclu et mérite d'être recherché, ce que nous nous proposons de faire dans le chapitre suivant de cette étude pharmacologique.

# THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

MENTION PHARMACOGNOSIE

PAR

MARIE CLAIRE LANHERS

*CONTRIBUTION A L'ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE*

*ET*

*ETUDE PHARMACOLOGIQUE D' EUPHORBIA HIRTA L.*

*PROPRIETES PSYCHOTROPES, ANALGESIQUES*

*ANTI-PYRETIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES*

Soutenue le 21 Novembre 1988

### PARTIE II

**EXAMINATEURS:**

M. P. CABALION, Pharmacien responsable unité ORSTOM

M. P. DORFMAN, Directeur de la Recherche des Laboratoires DOLISOS

M. J. FLEURENTIN, Maître de Conférence (Directeur de thèse)

M. R. MISSLIN, Maître de Conférence

M. F. MORTIER, Professeur (Rapporteur)

M. J.M. PELT, Professeur (Président du jury)

M. J.J. SERRANO, Professeur (Rapporteur)



# S O M M A I R E

(Deuxième Partie)

CHAPITRE C : RECHERCHE D'UN PROFIL D'ACTIVITE DE TYPE BENZODIAZEPINIQUE	339
I <u>INTRODUCTION</u>	340
II <u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-CONVULSIVANTES</u>	353
II - 1 L'EPILEPSIE ET LES ANTI-CONVULSIVANTS	354
II - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE	358
II - 3 RESULTATS	359
3.1 <u>Effets convulsivants du pentétrazol</u>	
3.2 <u>Recherche d'effets anti-convulsivants pour E. hirta</u>	361
3.3 <u>Influence du clorazébate dipotassique vis-à-vis des effets du pentétrazol</u>	363
II - 4 DISCUSSION	364
III <u>RECHERCHE DE PROPRIETES MYORELAXANTES</u>	366
III - 1 LES CONTRACTURES MUSCULAIRES ET LES MYORELAXANTS	367
III - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE	370
III - 3 RESULTATS	372
tests de la traction et de la tige tournante	
III - 4 DISCUSSION	374
IV <u>INFLUENCE D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES VIS-A-VIS DES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA</u>	376
IV - 1 QUELQUES GENERALITES SUR LE RO 15-1788	377
IV - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE	379
IV - 3 RESULTATS	382
3.1 <u>Test de l'open-field modifié</u>	
3.2 <u>Test d'exploration d'un milieu nouveau</u>	385
IV - 4 DISCUSSION	388

<b>V</b>	<b><u>INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES</u></b>	<b>391</b>
<b>V - 1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>392</b>
<b>V - 2</b>	<b>PROCEDURE EXPERIMENTALE</b>	<b>394</b>
2.1	<u>Animaux</u>	
2.2	<u>Méthodes</u>	
2.2.1	préparation de l'homogénat d'encéphale	
2.2.2	fractionnement sub-cellulaire de l'homogénat	
2.2.3	contrôle de la pureté des fractions A et B par microscopie électronique	<b>397</b>
2.2.4	contrôle de l'activité ATP asique des fractions A et B	<b>399</b>
2.2.5	détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale	<b>402</b>
2.2.6	étude <u>in vitro</u> de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques	<b>404</b>
<b>V - 3</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>413</b>
3.1	<u>Contrôle de la pureté des fractions A et B par microscopie électronique</u>	
3.2	<u>Contrôle de l'activité ATP asique des fractions A et B</u>	<b>414</b>
3.3	<u>Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale B</u>	<b>416</b>
3.4	<u>Etude <u>in vitro</u> de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques</u>	<b>419</b>
3.4.1	évaluation de la <u>liaison totale</u> du flunitrazépam tritié au niveau de sites récepteurs benzodiazépiniques, ainsi que des <u>liaisons spécifique</u> et <u>non spécifique</u>	
3.4.2	étude du déplacement du flunitrazépam tritié par le diazépam froid	<b>421</b>
3.4.3	évaluation de l'affinité d' <u>E. hirta</u> pour les sites benzodiazépiniques	<b>423</b>
3.4.4	évaluation de l'affinité de <u>Poa sp.</u> pour les sites benzodiazépiniques	<b>426</b>
<b>V - 4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>428</b>
<b>VI</b>	<b><u>CONCLUSIONS</u></b>	<b>432</b>

<b>CHAPITRE D : RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-HISTAMINIQUES, ANALGESIQUES, ANTI-PYRETIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES</b>	<b>436</b>
<b>I     <u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-HISTAMINIQUES</u></b>	<b>439</b>
I - 1     INTRODUCTION	440
I - 2     PROCEDURE EXPERIMENTALE	444
I - 3     RESULTATS	449
3.1 <u>Etude de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye</u>	
3.2 <u>Etude de l'action antagoniste exercée par la dexchlorphéniramine vis-à-vis des contractions histaminiques</u>	451
3.3 <u>Influence d'<u>E. hirta</u> vis-à-vis de la contraction histaminique</u>	
I - 4     DISCUSSION	454
<b>II    <u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANALGESIQUES</u></b>	<b>456</b>
II - 1     INTRODUCTION	457
II - 2 <u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE</u>	465
2.1 <u>Procédure expérimentale</u>	
2.2 <u>Résultats</u>	466
II - 3 <u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> VIS-A-VIS DE LA CHALEUR</u>	470
3.1 <u>Procédure expérimentale</u>	
3.2 <u>Résultats</u>	472
II - 4     DISCUSSION	479
<b>III   <u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-PYRETIQUES</u></b>	<b>485</b>
III - 1     INTRODUCTION	486
III - 2     PROCEDURE EXPERIMENTALE	489
III - 3     RESULTATS	491
III - 4     DISCUSSION	494

<b>IV</b>	<b><u>RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES</u></b>	<b>496</b>
<b>IV - 1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>497</b>
<b>IV - 2</b>	<b>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE</b>	<b>510</b>
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	<b>512</b>
<b>IV - 3</b>	<b>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR L'ADJUVANT DE FREUND</b>	<b>519</b>
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	<b>522</b>
3.2.1	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine sur le poids corporel du rat polyarthritique	
3.2.2	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine vis-à-vis de l'œdème induit par l'adjuvant de Freund	<b>523</b>
3.2.3	influence d' <u>E. hirta</u> et de l'indométacine vis-à-vis de la douleur polyarthritique	<b>525</b>
<b>IV - 4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>526</b>
<b>V</b>	<b><u>RECHERCHE D'UNE TOLERANCE A L'EGARD DES EFFETS PHARMACOLOGIQUES D'<u>E. HIRTA</u></u></b>	<b>532</b>
<b>V - 1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>533</b>
<b>V - 2</b>	<b>INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS SEDATIFS D'<u>E. HIRTA</u>, MIS EN EVIDENCE DANS LE TEST DE L'ACTIVIMETRE</b>	<b>542</b>
2.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
2.2	<u>Résultats</u>	<b>543</b>
<b>V - 3</b>	<b>INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL BARBITURIQUE D'<u>E. HIRTA</u></b>	<b>544</b>
3.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
3.2	<u>Résultats</u>	<b>545</b>
<b>V - 4</b>	<b>INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES D'<u>E. HIRTA</u></b>	<b>546</b>
4.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
4.2	<u>Résultats</u>	<b>547</b>

V - 5	INFLUENCE D'ADMINISTRATIONS JOURNALIERES D' <u>E. HIRTA</u> DURANT SIX OU NEUF JOURS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES	552
5.1	<u>Procédure expérimentale</u>	
5.2	<u>Résultats</u>	
V - 6	DISCUSSION	559
VI	<u>CONCLUSIONS</u>	567
CHAPITRE E :	ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D' <u>E. HIRTA</u> ADMINISTREE PAR VOIE ORALE	576
I	<u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> SUR LES ACTIVITES LOCOMOTRICE ET MANIPULATOIRE DU RAT PLACE EN BOITE A SKINNER</u>	577
I - 1	PROCEDURE EXPERIMENTALE	
I - 2	RESULTATS	578
II	<u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER</u>	580
II - 1	PROCEDURE EXPERIMENTALE	
II - 2	RESULTATS	581
III	<u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL DU PENTOBARBITAL ADMINISTRE A UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE (25 mg/kg)</u>	582
III - 1	PROCEDURE EXPERIMENTALE	
III - 2	RESULTATS	
IV	<u>INFLUENCE D'<u>E. HIRTA</u> VIS-A-VIS DE LA DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE</u>	584
IV - 1	PROCEDURE EXPERIMENTALE	
IV - 2	RESULTATS	585
V	<u>CONCLUSIONS</u>	586
CONCLUSIONS		588
TRAVAUX CITES		I-XXXI

*CHAPITRE C*

*RECHERCHE D'UN PROFIL*

*D'ACTIVITE DE TYPE*

*BENZODIAZEPINIQUE*

*I*

*INTRODUCTION*

Après avoir pu cerner le profil d'activité d'E. hirta par la recherche de diverses activités psychotropes, après avoir démontré notamment l'existence d'un effet déprimeur central pour cet extrait végétal se manifestant en particulier par une activité sédatrice importante et une action potentialisatrice de la narcose barbiturique, ainsi que l'existence de faibles propriétés anxiolytiques, hypothermiques et potentialisatrices des stéréotypies amphétaminiques, propriétés communes aux tranquillisants mineurs benzodiazépines, nous avons décidé d'aborder plus précisément cette classe de psychotropes.

La recherche d'un profil d'activité du type benzodiazépines nous a amené à explorer diverses propriétés secondaires très fréquemment associées aux effets anxiolytiques et sédatifs, quoique peu spécifiques, à savoir les propriétés anti-convulsivantes et myorelaxantes.

A cette recherche complémentaire sur les propriétés pharmacologiques d'E. hirta, nous avons adjoint l'étude des effets de cet extrait végétal au niveau des sites récepteurs benzodiazépines, grâce à la réalisation de techniques in vivo et in vitro, les premières permettant de rechercher l'influence d'un antagoniste des sites récepteurs benzodiazépines (RO 15-1788) sur les effets sédatifs d'E. hirta, les secondes permettant de déceler une éventuelle affinité de l'extrait végétal par ces sites récepteurs.

Avant d'aborder ces différentes expérimentations et les conclusions qui en découlent, quelques rappels pharmacologiques sur les benzodiazépines, et notamment sur les mécanismes d'action actuellement suggérés, sont indispensables pour permettre une meilleure compréhension de leur profil d'activité.

**\* Données actuelles sur les modes d'action des benzodiazépines expliquant leurs principales activités pharmacologiques**

Les benzodiazépines présentent un spectre pharmacologique relativement large, puisqu'à leurs activités anxiolytiques et sédatives essentielles viennent s'adjoindre des effets anti-convulsivants, myorelaxants et parfois hypnotiques et/ou amnésiants (amnésie antérograde), chacune de ces actions pouvant se manifester plus ou moins intensément selon le composé (Costa et Guidotti, 1979 - Koe, 1979 - Palmer et coll., 1980 - Haefely, 1983 - Raffaitin et Cuche, 1983 - Dingemanse et Breimer, 1984 - Richards et Möhler, 1984 - De Carvalho et coll., 1986 - File et Pellow, 1987).

Jusqu'à présent, de très nombreux travaux ont été menés, afin de tenter de relier ces différentes activités pharmacologiques, toutes ou en partie, à certains mécanismes d'action et notamment aux effets de divers neuromédiateurs ou neuromodulateurs.

C'est ainsi que l'acétylcholine, les catécholamines, la sérotonine, le gaba et la glycine pourraient jouer un rôle, dans les effets anxiolytiques, myorelaxants et anti-convulsivants (Costa et Guidotti, 1979).

Si le rôle de l'acétylcholine semble peu probable (Koe, 1979), l'intervention des récepteurs de la glycine a été plus discutée. Ce transmetteur localisé dans le tronc cérébral et la moelle épinière, où les terminaisons glycinergiques représenteraient environ 25 % de toutes les synapses, provoque une inhibition post-synaptique (Costa et coll., 1975).

Selon Young et ses collaborateurs (1974), Snyder et Enna (1975), auteurs mentionnés par Costa et ses collaborateurs (1975), les benzodiazépines pourraient exercer une action mimétique au niveau des récepteurs post-synaptiques de la glycine.

Cette action agoniste a également été proposée par Koe (1979), pour expliquer les effets anxiolytiques et myorelaxants (action

respectivement au niveau des synapses cérébrales et spinales). Lippa et ses collaborateurs (1979), constatant le rôle important de la sérotonine dans la médiation des effets anxiolytiques, évoquent la possibilité d'une fixation des benzodiazépines sur les récepteurs à la glycine, induisant l'inhibition des systèmes sérotoninergiques au niveau du noyau du raphé, directement ou par l'intermédiaire du système cholinergique.

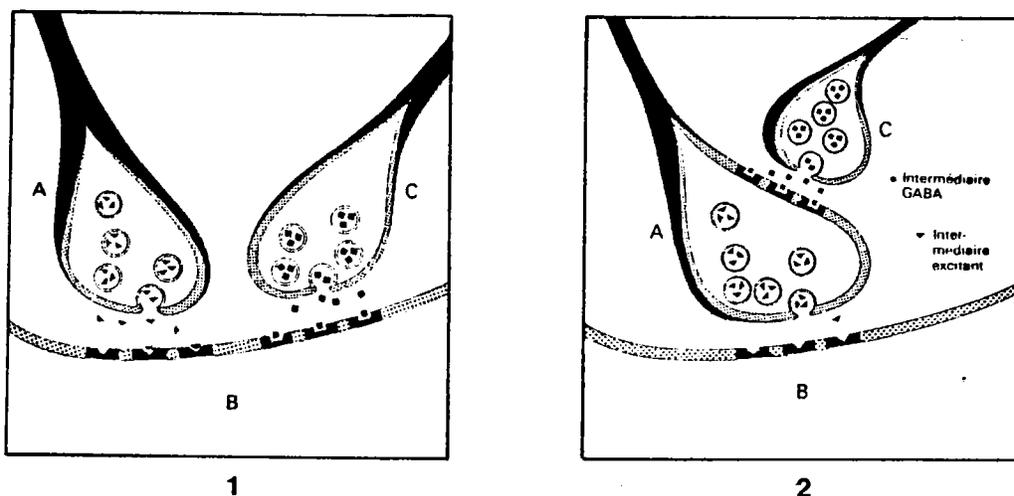
Cependant, ce rôle des récepteurs glycinergiques reste hypothétique (Costa et Guidotti, 1979) et ne paraît pas avoir un impact biologique important (Costa et coll., 1975).

L'hypothèse la plus probable reste l'action facilitatrice des benzodiazépines, sur les mécanismes gabaergiques d'inhibition post-synaptique et peut-être pré-synaptique. (figure 28).

Le premier type d'inhibition intervient au niveau des synapses axo-somatiques réalisées entre les terminaisons nerveuses gabaergiques (C) et le corps cellulaire efférent (B). Libéré des terminaisons pré-synaptiques, le gaba se fixe sur un récepteur spécifique associé à un ionophore chlore (pores sélectivement perméables aux ions chlore), provoquant ainsi l'entrée des anions dans l'élément post-synaptique (B) ; ceci a pour effet d'augmenter la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane neuronale (hyperpolarisation), diminuant de ce fait la probabilité pour qu'un stimulus dépolarisant (A) arrivant à ce neurone puisse engendrer un potentiel d'action.

Dans l'inhibition pré-synaptique, les terminaisons gabaergiques (C) font synapse avec les terminaisons nerveuses excitatrices afférentes (A) qui convergent sur le corps cellulaire efférent (B) (synapses axo-axoniques). Dans ces conditions, le gaba libéré se fixe spécifiquement à son récepteur et favorise la libération du neurotransmetteur pré-synaptique de la fibre nerveuse excitatrice (A).

(Polc et coll., 1975 - Polc et Haefely, 1976 - Costa et Guidotti, 1979 - Haefely et Möhler, 1980 - Laurent, 1980 - Möhler, 1982 - Richards et Möhler, 1984).



A = terminaison nerveuse excitatrice afférente.  
B = corps cellulaire efférent.  
C = terminaison nerveuse inhibitrice gabaergique.

**FIG. 28** : MECANISMES INHIBITEURS POST-SYNAPTIQUE (1) ET PRE-SYNAPTIQUE (2).

Ces mécanismes inhibiteurs pourraient provoquer la diminution du turn-over des catécholamines et de la sérotonine et expliquer ainsi l'action indirecte exercée par les benzodiazépines sur ces autres systèmes de neurotransmetteurs (Costa et coll., 1975 - Haefely, 1983 - Raffaitin et Cuche, 1983 - Thiébot et Soubrié, 1983), qui, par ailleurs, ont pu être impliqués dans certains des effets des benzodiazépines. Ainsi, la diminution de la synthèse et du turn-over de la sérotonine, notamment au niveau du système limbique, est très souvent reliée aux effets anxiolytiques et anti-convulsivants (Koe, 1979 - Lippa et coll., 1979 - Wauquier, 1979 - Muller, 1987) ; tandis que la diminution du turn-over de la norépinéphrine et de la dopamine, notamment au niveau de la formation réticulée, serait impliquée dans les effets sédatifs et myorelaxants (Lippa et coll., 1979 - Wauquier, 1979 - Muller, 1987).

**\* Sites récepteurs benzodiazépiniques et relation avec le système gabaergique**

Une telle activité facilitatrice des benzodiazépines, sur l'inhibition gabaergique, aurait pu s'expliquer tout simplement par la fixation de la substance sur le récepteur gabaergique lui-même. En fait, tous les auteurs pré-cités s'accordent pour infirmer cette hypothèse et considérer l'existence de sites récepteurs spécifiques pour les benzodiazépines, distincts des récepteurs gabaergiques.

La présence de tels sites de fixation, saturables, stéréospécifiques et de haute affinité a été révélée pour la première fois, dans le système nerveux central (Möhler et Okada, 1977 - Squires et Braestrup, 1977).

En fait, selon les auteurs, quatre types de sites de fixation pourraient exister, chez les mammifères :

**le site central**, encore dénommé nanomolaire en raison de la faible concentration en benzodiazépine nécessaire pour le saturer, soit 0,8 picomole de diazépam pour 1 mg de protéine contenu dans le cerveau (Möhler et Okada, 1977). Ce site de fixation serait responsable en grande partie du spectre pharmacologique des benzodiazépines.

**le site central à très haute affinité**, mis en évidence par Ehlert et caractérisé par une faible capacité d'occupation des sites par les benzodiazépines. Sa fonction et son existence restent toutefois à préciser (Morre et Keane, 1983).

**le site micromolaire**, à basse affinité, situé dans le cerveau et auquel se lient des concentrations micromolaires de benzodiazépines. Cette liaison ne serait pas modifiée par le gaba ou le muscimol, mais par le RO 5-4864, agent pro-convulsivant chimiquement apparenté au diazépam (Morre et Keane, 1983 - Pellow et File, 1984). De plus, des anti-convulsivants à structure non benzodiazépinique agiraient à travers ce site de liaison (Mennini et coll., 1984).

le site périphérique, qui n'induit aucune activité psychotrope chez l'animal et est donc, pour cette raison, qualifié de site accepteur et non de récepteur (Haefely, 1983 - Richards et Möhler, 1984 - File et Pellow, 1985). Le diazépam et le chlordiazépoxyde ont une affinité plus faible pour ces sites, en comparaison des sites centraux et à la différence du RO 5-4864 (Pellow et File, 1984).

Selon Richards et Möhler (1984), ces sites périphériques seraient distribués uniformément dans le cerveau, mais en faible densité, excepté dans le nerf olfactif, les couches glomérulaires du bulbe olfactif, l'épendyme, le plexus choroïde et l'épiphyse. Ils ont également été retrouvés dans des cellules non neuronales du système nerveux central (Beaumont et coll., 1983 - Miller et coll., 1987), mais aussi dans les reins en grande quantité et à des taux <sup>\*</sup>plus faibles dans le coeur, les poumons, le foie, suggérant ainsi leur rôle dans la régulation de la contraction cardiaque, de la circulation sanguine dans les vaisseaux coronariens, du volume rénal et dans la différenciation et la méthylation des phospholipides de cellules en culture (Beaumont et coll., 1983).

Selon certains auteurs (Reeves et Schweizer, 1983 - Bidet et Gagnault, 1984 - Richards et Möhler, 1984 - File et coll., 1986 - File et Pellow, 1987), les sites récepteurs centraux pourraient se subdiviser en récepteurs de type I (BZ1), mis en jeu dans les activités anxiolytiques et anti-convulsivantes des benzodiazépines, et de type II (BZ2) impliqués dans la sédation et l'ataxie. Les récepteurs BZ1, post-synaptiques et thermostables seraient plus abondants dans le cervelet et absents du cortex du nouveau-né ; tandis que les récepteurs BZ2, pré-synaptiques et thermostables, seraient plus abondants dans l'hippocampe, prédominants à la naissance et absents du cervelet (Bidet et Gagnault, 1984).

Laurent (1980) mentionne l'existence de deux types de récepteurs, associés à des récepteurs gabaergiques différents et à propriétés pharmacologiques spécifiques.

Par contre, Chiu et Rosenberg (1983) suggèrent l'existence d'une même population de récepteurs centraux, la dissociation BZ1 - BZ2 précédemment envisagée étant alors le résultat de

deux états conformationnels différents, l'un de basse affinité, l'autre de haute affinité, obtenus en fonction de la température (disparition de la multiplicité observée à 0°C, lorsque la température physiologique de 37°C est atteinte).

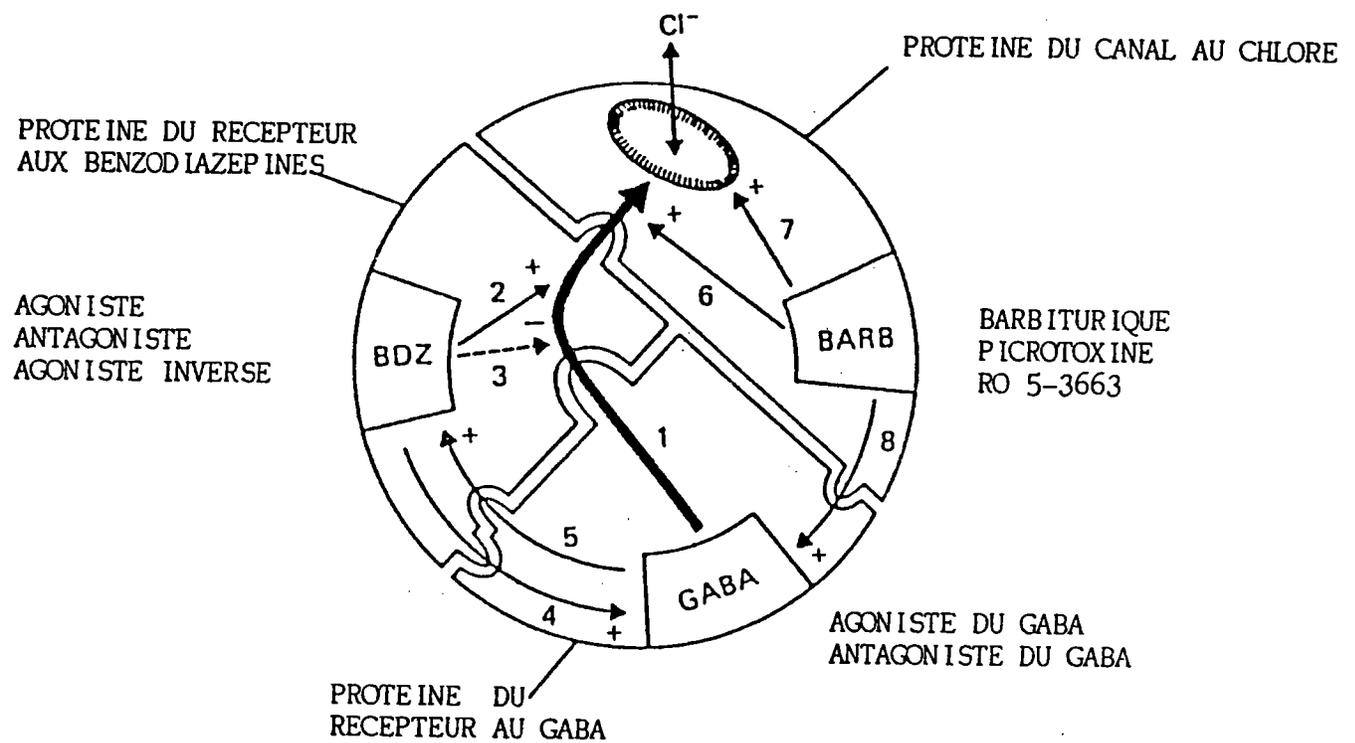
Présents dans tout le système nerveux central, les sites récepteurs benzodiazépiniques ont une distribution très hétérogène. Ainsi, ils sont retrouvés en plus forte densité au niveau du bulbe olfactif (couches glomérulaires et plexiformes), du cortex cérébral, du pallidum ventral, de l'hippocampe et du cervelet, tandis que les régions du thalamus et de la moelle épinière présentent une densité inférieure en récepteurs (Brunaud et Vallee, 1978 - Laurent, 1980 - Palmer et coll., 1980 - Haefely, 1983 - Dingemans et Breimer, 1984 - Richards et Möhler, 1984 - Miller et coll., 1987).

Très souvent, ces sites récepteurs centraux se situent au niveau des zones synaptiques et notamment dans les terminaisons nerveuses utilisant le gaba en tant que neurotransmetteur (Richards et Möhler, 1984). Toutefois, cette localisation ne concernerait qu'environ un tiers des récepteurs benzodiazépiniques (Raffaitin et Cucho, 1983).

Ces récepteurs ont pu également être localisés dans des synapses non gabaergiques (Möhler, 1982 - Thiébot et Soubrié, 1983), Costa et Guidotti (1979) ayant, quant à eux, constaté leur présence sur des cellules gliales renfermant des récepteurs au gaba.

Ainsi donc, l'action facilitatrice des benzodiazépines sur l'inhibition gabaergique pourrait trouver son explication dans l'étroite relation existant entre les récepteurs centraux benzodiazépiniques et les récepteurs au gaba, eux-mêmes couplés à l'ionophore chlore (Costa et Guidotti, 1976, 1979 - Laurent, 1980 - Möhler, 1982 - Polc et coll., 1982 - Muller, 1987).

Parmi les divers modèles hypothétiques proposés, le plus fréquemment rencontré dans la littérature est celui de Polc et ses collaborateurs (1982), lequel suggérerait l'existence d'un complexe protéique constitué de plusieurs sous-unités



**FIG. 29 : COMPLEXE MULTIMOLECULAIRE :**  
**RECEPTEUR GABA - RECEPTEUR AUX BENZODIAZEPINES -**  
**IONOPHORE CHLORE.**  
 MODELE HYPOTHETIQUE SELON POLC ET COLL. (1982)

comportant un canal au chlore et différents sites spécifiques aux benzodiazépines, au gaba, mais aussi aux barbituriques (figure ).

Ce modèle permettrait de rendre compte des différentes interactions des benzodiazépines, des barbituriques et de leurs agonistes ou antagonistes, sur le système de couplage du récepteur au gaba et de l'ionophore chlore.

\* Ainsi, par liaison au site spécifique, le gaba ou ses agonistes induisent un changement conformationnel du récepteur qui déclenche l'ouverture de l'ionophore chlore.

Le récepteur aux benzodiazépines agit en tant qu'unité couplée au complexe "gaba-canal au chlore", modulant la stimulation de l'ionophore chlore (voie 1).

\* Le couplage entre le récepteur au gaba et l'ionophore chlore ne nécessite pas obligatoirement la présence de benzodiazépines ou de leurs agonistes ; cependant, leur fixation sur le site récepteur spécifique facilite la réponse du système gabaergique (voie 2).

Les agonistes inverses des benzodiazépines réduisent la fonction de couplage du récepteur gaba au ionophore chlore (voie 3), tandis que les antagonistes n'agissent pas sur le système, mais bloquent l'accès du récepteur benzodiazépinique. Les benzodiazépines et leurs agonistes augmenteraient l'affinité du récepteur au gaba pour ce neurotransmetteur (Haefely, 1983 ) (voie 4).

A l'inverse, l'activation du récepteur au gaba, par ce neurotransmetteur ou par des agonistes, augmente l'affinité des benzodiazépines pour leur récepteur (voie 5).

Cette modification est à son tour transmise à l'ionophore chlore qui répond en augmentant sa fréquence d'ouverture.

\* Les barbituriques peuvent augmenter l'affinité des benzodiazépines et de leurs agonistes pour leurs récepteurs spécifiques (Miller et coll., 1987).

Ils altèrent également la cinétique de l'activation du gaba sur l'ionophore chlore (Haefely, 1983) (voie 6). A forte dose, ils ouvrent directement le canal aux ions chlore (voie 7). Ils

pourraient aussi augmenter l'affinité du récepteur au gaba, pour son neurotransmetteur ou ses agonistes, en agissant sur des phospholipides particuliers (Johnston et Willow, 1982). Effectivement, d'après Haefely (1985), les lipides constitueraient une fraction importante du complexe multimoléculaire avec des phospholipides, tels que la phosphatidyléthanolamine qui agirait en tant qu'inhibiteur de la fixation du gaba sur son récepteur.

Par ailleurs, l'existence d'une protéine, la gabamoduline, intercalée entre les récepteurs au gaba et aux benzodiazépines, a été proposée par d'autres auteurs (Costa et Guidotti, 1979 - Bidet et Gagnault, 1984). Cette protéine, en l'absence de benzodiazépines, maintiendrait le récepteur au gaba dans un état de basse affinité et donc entraînerait l'ouverture de l'ionophore chlore à basse fréquence. En présence de benzodiazépines, la gabamoduline serait inactivée par phosphorylation, le récepteur au gaba passant alors à l'état de haute affinité et l'ouverture de l'ionophore chlore se faisant à haute fréquence (Bidet et Gagnault, 1984).

#### **\* Recherche d'un ou plusieurs ligands endogènes pour les récepteurs benzodiazépiniques**

La découverte dans le système nerveux central de sites de liaison spécifiques capables de fixer des benzodiazépines, molécules de synthèse, est à l'origine de nombreux travaux effectués dans l'espoir de mettre en évidence l'existence de substances endogènes aptes à se fixer sur ces sites récepteurs et à présenter les propriétés des benzodiazépines.

Ainsi, en 1982, Möhler émet deux hypothèses, quant à l'existence d'un ligand endogène : d'une part, il pourrait s'agir d'un **neuromodulateur** librement diffusable, peut-être un co-transmetteur du gaba et probablement non antagoniste des benzodiazépines. D'autre part, ce ligand pourrait être une **protéine membranaire** adjacente au site benzodiazépinique ; le récepteur aux benzodiazépines représenterait alors une partie d'une interface protéique de l'unité gabaergique, les

benzodiazépines modifiant la dynamique des interactions protéine-protéine et augmentant ainsi la réponse au gaba ; selon la conformation du récepteur au gaba, les sites benzodiazépiniques seraient ou non exposés.

Selon Muller (1987), si un tel ligand existe, il pourrait s'agir plutôt d'un agoniste inverse, probablement un petit peptide bloqué au niveau de l'azote terminal par une structure  $\beta$ -carboline, et qui serait peut-être formé à partir d'un résidu "azote terminal" du tryptophane. Mais son existence n'expliquerait pas totalement l'action au niveau du système nerveux central ; l'auteur envisage la possibilité d'une activation uniquement après certains stimuli spécifiques.

De nombreuses substances ont pu être isolées, notamment à partir des cerveaux de bovins et de rats, et être proposées comme ligands endogènes. Parmi les plus fréquemment mentionnées, citons les bases xanthiques (inosine, hypoxanthine, nicotinamide, méthyl-xanthines telles que la caféine), les  $\beta$ -carboline, mais également des peptides et polypeptides tels que le BCF (benzodiazepine competitive factor) et un précurseur du DBI (diazepam binding inhibitor).

(Möhler, 1982 - Raffaitin et Cuche, 1983 - Thiébot et Soubrié, 1983 - Muller, 1987).

Cependant, aucune de ces substances ne remplit toutes les conditions pour être considérée comme ligand endogène.

Ainsi, les bases xanthiques présentent une faible affinité pour les récepteurs benzodiazépiniques (Möhler, 1982 - Dingemans et Breimer, 1984 - Muller, 1987), affinité qui in vitro n'est ni modifiée par le gaba, ni antagonisée par le RO 15-1788. De plus, si des propriétés du type benzodiazépinique ont pu être révélées, plusieurs actions antagonistes ont également été décelées et reliées à une affinité pour le récepteur de la picrotoxine (Muller, 1987).

Les  $\beta$ -carboline, quant à elles, présentent une forte affinité pour les récepteurs benzodiazépiniques (Thiébot et Soubrié,

1983). Toutefois, ces substances ne seraient pas endogènes, mais se formeraient à partir de précurseurs (indole endogène) au cours de la phase d'extraction (Bidet et Gagnault, 1984 - Muller, 1987).

De plus, il s'agirait plutôt d'agonistes inverses et non de substances à propriétés benzodiazépiniques. C'est ainsi que la  $\beta$ -éthyl,  $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCE) et la méthyl,  $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCM) ont des effets pro-convulsivants et convulsivants antagonisés par le RO 15-1788 (Bidet et Gagnault, 1984) ; la méthylamide- $\beta$ -carboline ( $\beta$ -CCMA) provoquerait des crises de panique (Thiébot et Soubrié, 1983) ; la  $\beta$ -CCM réduirait le temps de séjour des animaux dans un compartiment éclairé (Belzung et coll., 1987) ; enfin, si les benzodiazépines sont réputées amnésiantes, les  $\beta$ -CCM seraient promnésiantes à faibles doses et anxiogènes à des fortes doses (Chapoutier, 1987).

En fait, en l'état actuel de nos connaissances, l'existence de ligands endogènes pour les récepteurs centraux benzodiazépiniques n'a pu être confirmée avec certitude.

#### \* Agonistes - agonistes inverses et antagonistes des benzodiazépines

Si jusqu'à présent cette recherche de ligands endogènes s'est avérée infructueuse, elle a permis de déceler de nombreuses molécules présentant une grande affinité pour les sites récepteurs benzodiazépiniques, mais pouvant développer des propriétés pharmacologiques différentes.

Trois catégories de ligands peuvent être distinguées (Polc et coll., 1982 - Richards et Möhler, 1984 - Bernabé, 1986 - De Deyn et Mac Donald, 1987 - Muller, 1987) :

**les agonistes**, qui augmentent le couplage entre le récepteur au gaba et l'ionophore au chlore et sont dotés de propriétés anxiolytiques, sédatives, anti-convulsivantes et myorelaxantes. Citons le CL 218-872 (triazolopyridazone), le CGS 9896

(pyrazoloquinoline), la zopiclone et la suriclone (cyclopyrrolones), le ZK 93423 (dérivé des  $\beta$ -carbolines).

**les agonistes inverses**, qui diminuent le couplage entre le récepteur au gaba et l'ionophore au chlore et donc s'opposent aux effets des benzodiazépines (certains chlore esters ou amides des  $\beta$ -carbolines-3-carboxylate, tels que le FG 7142, le DMCM).

**les antagonistes**, qui inhibent l'accès au récepteur benzodiazépinique, pour les agonistes et les agonistes inverses. Citons le RO 15-1788 (imidazobenzodiazépine), quoique non dépourvu d'une légère activité intrinsèque agoniste ou agoniste inverse selon la dose, le CGS 8216 (pyrazoloquinoline), certains dérivés des  $\beta$ -carbolines.

De plus, diverses substances se sont révélées dotées de propriétés intermédiaires (Polc et coll., 1982 - Haefely, 1983).

Elles sont définies comme des **agonistes ou antagonistes partiels**. C'est le cas de certaines pyrazoloquinolones (CGS 9895), de certains dérivés des  $\beta$ -carbolines (ZK 91296...), de certaines imidazopyridines (EMD 39-593, EMD 41-717).

Après ces rappels concernant les modes d'action des benzodiazépines, au niveau du système nerveux central, ainsi que les quelques données actuelles sur l'existence hypothétique de ligands endogènes et sur divers types de substances pouvant se lier aux sites récepteurs centraux benzodiazépiniques, nous pouvons aborder la phase expérimentale de cette étude, en recherchant en premier lieu, l'existence de propriétés anti-convulsivantes pour E. hirta.

*II*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI-CONVULSIVANTES*

## II - 1 L'ÉPILEPSIE ET LES ANTI-CONVULSIVANTS

### \* L'épilepsie

(Glasson et Benakis, 1978 - Larousse, 1979 - Chauvel, 1980),

L'épilepsie peut être définie comme une affection chronique d'étiologies diverses, caractérisée par la répétition de crises résultant d'une décharge excessive des neurones cérébraux (crise épileptique), quels que soient les symptômes cliniques ou paracliniques éventuellement associés.

En effet, elle résulterait d'une altération des relations inter-neuronales, un ensemble de neurones du cortex présentant une aptitude anormale à se synchroniser, d'où l'apparition de décharges paroxystiques de potentiels d'action qui se propageraient par des mécanismes synaptiques et non synaptiques. Les mécanismes inhibiteurs resteraient, quant à eux, fonctionnels et s'organiseraient pour limiter l'étendue de l'excitation ils seraient ainsi responsables du passage de la phase tonique à la phase clonique, dans l'évolution de la crise.

Au niveau neurochimique, certaines modifications affectant les substances neurotransmettrices ou supposées telles ont pu être mises en parallèle avec l'apparition de la crise épileptique : ainsi, dans le cortex isolé, le taux d'acétylcholine et l'activité acétylcholinestérasique se trouvent réduits, mais également la concentration tissulaire en monoamines (essentiellement en noradrénaline) ; mais surtout, un certain déséquilibre entre le glutamate (neurotransmetteur excitateur du cortex des mammifères) et le gaba (neurotransmetteur inhibiteur du cortex des mammifères) pourrait représenter un facteur dans la genèse d'une activité épileptique.

En fait, l'épilepsie ne peut être résumée à la simple exclusion fonctionnelle d'un système transmetteur inhibiteur.

**\* Mécanismes d'action proposés pour les substances anti-épileptiques**

En règle générale, les substances augmentant le turn-over des médiateurs excitateurs faciliteraient l'apparition des crises, tandis que les substances bloquant leur neurotransmission tendraient à réduire la susceptibilité aux agents convulsivants ; la situation étant globalement inverse, dans le cas des transmetteurs inhibiteurs.

Si le mécanisme de déclenchement de la crise dans le foyer épileptigène reste inconnu, les mécanismes d'action des substances anti-épileptiques sont mieux connus : ainsi, la plupart auraient peu d'action sur la décharge du foyer, mais bloqueraient la transmission de l'excitation initiale à d'autres structures, agissant donc au niveau des neurones cérébraux normaux ; action qui, par ailleurs, entraînerait une certaine gêne pour le fonctionnement normal de ces neurones et donc des effets centraux indésirables (Glasson et Benakis, 1978 - Larousse, 1979 - Chauvel, 1980).

Certaines substances réduisent le phénomène de potentialisation post-synaptique faisant suite aux stimulations pré-synaptiques rapides et répétées. Cet effet peut s'accompagner d'une stabilisation membranaire, d'une action au niveau des échanges ioniques membranaires, d'une action pré-synaptique au niveau d'une ATPase (Glasson et Benakis, 1978 - Larousse, 1979 - Chauvel, 1980).

Une interférence avec certains neuromédiateurs inhibiteurs ou certains neuromodulateurs est envisageable. Ainsi, dans le cas précis des benzodiazépines, diverses hypothèses plus ou moins tangibles ont été avancées par différents auteurs :

Si File et Pellow (1987) suggèrent une action non limitée à un seul système neuronal, de nombreux travaux penchent en faveur du rôle facilitateur des benzodiazépines sur l'inhibition gabaergique pré- et post-synaptique (Costa et coll., 1975 - Koe, 1979 - Lippa et coll., 1979 - Chauvel, 1980 - Raffaitin et Cuche, 1983 - Haefely, 1983 - Thiébot et Soubrié, 1983 - Muller, 1987).

Cette action est notamment observée au niveau du cortex cérébral et du système limbique (Muller, 1987), mais aussi au niveau du système nigro-striatal où elle pourrait être indirectement responsable de la diminution du turn-over de la dopamine, qui serait ainsi en rapport avec l'activité anti-convulsivante ; relation non envisageable dans le cas de la réduction du turn-over de la norépinéphrine observée dans le cervelet et l'hypothalamus (Costa et coll., 1975).

Selon certains auteurs (Costa et coll., 1975 - Koe, 1979 - Lippa et coll., 1979), les effets anti-convulsivants des benzodiazépines seraient étroitement liés à leur action facilitatrice exercée dans le cervelet, où le système gabaergique influence le taux de GMP cyclique, par l'intermédiaire des cellules de Purkinje ; ainsi, l'activité anti-convulsivante des benzodiazépines serait à mettre en parallèle avec leur aptitude à réduire le taux de GMP cyclique cérébelleux.

Cette hypothèse du rôle facilitateur des benzodiazépines sur la transmission gabaergique, dans la médiation de leur activité anti-convulsivante, est confortée par l'obtention d'une meilleure efficacité vis-à-vis des convulsions induites par des composés pouvant bloquer le récepteur du gaba (picrotoxine, bicuculline) ou diminuer sa synthèse (thiosemicarbazide, acide 3-mercaptopropionique), en comparaison d'autres substances, telles que la strychnine qui bloque le récepteur de la glycine (Costa et coll., 1975 - Lippa et coll., 1979).

#### \* Modèles expérimentaux

La plupart des médicaments anti-convulsivants, actuellement utilisés en thérapeutique (barbituriques, benzodiazépines, hydantoïnes, oxazolidine-diones, succinimides, sulfamides...), sont issus de la recherche pharmacologique expérimentale réalisée sur l'animal (à l'exception du phénobarbital).

Ainsi, certaines substances, actives sur les crises provoquées par le courant électrique, agiraient sur les crises épileptiques généralisées du grand mal ; les composés actifs sur les convulsions induites par divers agents chimiques, tels

que le pentétrazol, le flurotyl ou la strychnine, seraient plus efficaces sur les absences du petit mal. Le phénobarbital et les benzodiazépines sont efficaces sur ces deux types expérimentaux (Larousse, 1979).

Dans le cadre de notre étude, axée sur la recherche d'un profil d'activité du type benzodiazépinique, nous avons choisi de rechercher l'existence de propriétés anti-convulsivantes, caractéristiques de la plupart des benzodiazépines, par la réalisation d'une expérimentation pharmacologique classique : **le test au pentétrazol**, dont les effets convulsivants seraient plus efficacement antagonisés par les benzodiazépines, en comparaison de ceux induits par l'électro-choc (Haefely, 1983).

Cette expérimentation est généralement considérée comme très sensible et sélective, les stimulants, les anti-dépresseurs, les neuroleptiques restant inefficaces vis-à-vis des effets convulsivants du pentétrazol. Toutefois, certains myorelaxants à action centrale, tels que le carisoprodol, la chlorzoxazone, la métaxalone, se sont révélés actifs dans ce test, quoique à un degré moindre (Lippa et coll., 1979 - Treit, 1985).

## II - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

### 2.1 Animaux

Les expérimentations sont réalisées sur des souris Swiss (Césal), dont les caractéristiques sont notifiées dans le paragraphe consacré aux différents animaux utilisés, ainsi qu'aux conditions d'élevage (Chapitre A II).

### 2.2 Méthode

La technique utilisée a été décrite par Chambon et coll. (1984).

L'agent convulsivant employé est le pentylenetétrazol (Cardiazol<sup>®</sup>, laboratoires Aldrich, Europe-Beersse, Belgique) connu pour provoquer, en fonction de la dose, des **convulsions cloniques** (séries de contractions musculaires rapides, plus ou moins régulières, produisant de grands mouvements), suivies de **convulsions toniques** (contractions déterminant une rigidité plus ou moins permanente, interrompue parfois par des secousses), l'aboutissement final pouvant être la mort.

Dans le but de cerner les doses induisant 0,50 et 100 % de mortalité (DL 0 - DL 50 - DL 100), les doses croissantes suivantes sont administrées par voie I.P. : 31,2 - 46,9 - 62,5 - 65 - 70 - 72 - 74 - 75 - 78,1 - 85 - 93,7 - 100 et 125 mg/kg, certaines étant testées à plusieurs reprises afin de déterminer la précision de la méthode (exemple de la dose de 75 mg/kg, pour laquelle quatre essais ont été réalisés).

L'extrait végétal et le produit de référence choisi, le clorazé pate dipotassique (Tranxène<sup>®</sup>, laboratoires Clin-Midy, Paris), sont injectés par voie I.P., trente minutes avant l'agent convulsivant administré aux doses de 75, 85 ou 125 mg/kg.

E. hirta est testée aux doses de 200, 800, 1600 et 3200 mg/kg, les deux doses intermédiaires étant expérimentées à deux ou

trois reprises dans le cas du pentétraazol employé à 75 et 85 mg/kg.

Le clorazébate dipotassique est administré, quant à lui, aux doses de 1, 10, 40 et 80 mg/kg.

Le pourcentage d'animaux manifestant chacun des deux types de convulsions (cloniques et toniques), est pris en compte, ainsi que le pourcentage de mortalité.

## **2.2 Analyse statistique**

Les comparaisons statistiques sont effectuées uniquement dans le cas de l'étude de l'influence d'E. hirta et du clorazébate dipotassique, vis-à-vis des effets de la dose létale de pentétraazol, soit 125 mg/kg.

Les pourcentages d'animaux traités manifestant chacun des deux types de convulsions (cloniques et toniques), ainsi que les pourcentages de mortalité, sont comparés à ceux obtenus avec le lot témoin "pentétraazol", par le test du X<sup>2</sup> corrigé (correction de Yates).

Les temps d'apparition de ces divers phénomènes sont comparés par le test de Newman-Keuls.

## **II - 3 RESULTATS**

### **3.1 Effets convulsivants du pentétraazol**

Les effets convulsivants et léthaux du pentétraazol, reportés dans le tableau 32, permettent de constater une importance généralement supérieure des convulsions cloniques (phase de "pédalage"), premières manifestations de l'activité du pentétraazol, par rapport aux secondes, les convulsions toniques (phase "d'étirement").

Le plus souvent les premiers phénomènes apparaissent très rapidement (en moyenne, 1 à 4 minutes après l'injection de l'agent convulsivant) et ne durent que quelques secondes (en

**TABLEAU 32 : RELATIONS DOSES-EFFETS DU PENTETRAZOL SUR LES CONVULSIONS ET LA MORTALITE CHEZ LA SOURIS .**

DOSES (mg/kg)	CONVULSIONS		MORTALITE (%)
	CLONIQUES (%)	TONIQUES (%)	
31,2	0	0	0
46,9	50	10	0
62,5	90	0	0
65	70	10	10
70	90	10	10
	80	0	0
72	70	20	20
74	70	20	20
75	100	50	50
	80	20	20
	100	10	10
78,1	90	40	40
	100	70	50
85	80	10	10
	0	0	0
93,7	100	70	70
	100	90	80
	80	60	60
100	100	50	50
	100	80	80
125	90	100	100

N = dix souris par lot.

moyenne, 4 à 8 secondes). Les convulsions toniques, lorsqu'elles se manifestent, peuvent apparaître à la suite des premières, ou, très souvent, au bout de quelques minutes (en moyenne, 2 à 8 minutes après les convulsions cloniques ; de durée également très courte (quelques secondes), elles sont généralement suivies par la mort de l'animal.

Le pourcentage de mortalité nous permet de situer la dose létale 0 (DL 0) entre 62,5 et 65 mg/kg, la DL 100 étant de 125 mg/kg.

Cependant, en raison d'importantes fluctuations temporelles observées pour une même dose de pentétrazol, la DL 50 n'a pu être estimée ; citons pour exemple le cas de la dose de 75 mg/kg, pour laquelle quatre essais ont donné quatre pourcentages de mortalité différents, soient 50, 20, 10 et 40 %.

### **3.2 Recherche d'effets anti-convulsivants pour *E. hirta***

Ce manque de reproductibilité est également observé pour les lots traités par *E. hirta* (exemple de la dose d'extrait de 800 mg/kg, dans le cas du pentétrazol administré à 75 mg/kg), (tableau 33).

Une plus grande importance des convulsions cloniques est à nouveau visualisée ; par ailleurs, celles-ci sont pratiquement toujours maximales.

Malgré la variabilité des résultats et quelles que soient les doses de plante testées, aucun antagonisme n'est obtenu vis-à-vis des convulsions cloniques et toniques, ni vis-à-vis du taux de mortalité, induits par les doses de 125, 85 et 75 mg/kg de pentétrazol.

Signalons un retard dans l'apparition des effets (convulsions cloniques, toniques et mortalité) de la dose létale de pentétrazol, soit 125 mg/kg. Ce retard reste faible, notamment sur les premières manifestations (convulsions cloniques) et non dose-dépendant sur les convulsions, contrairement à la mortalité dont l'apparition est d'autant plus retardée que la dose d'extrait végétal administrée est élevée (effet significatif avec la dose de 3200 mg/kg).

**TABEAU 33 : INFLUENCE D'E. HIRTA, VIS-A-VIS DES EFFETS CONVULSIVANTS ET LETHAUX DU PENTRETRAZOL.**

PENTETRAZOL (mg/kg)	E.HIRTA (mg/kg)	CONVULSIONS		MORTALITE
		CLONIQUES	TONIQUES	
125	0	%: 90	100	100
		T: 47 ± 6	164 ± 26	165 ± 25
	200	%: 100	100	100
		T: 53 ± 4	124 ± 29	145 ± 29
	800	%: 100	90	100
		T: 117 ± 22	304 ± 71	284 ± 68
	1600	%: 100	90	100
		T: 103 ± 12	419 ± 153	447 ± 148
	3200	%: 90	100	100
		T: 110 ± 13	332 ± 79	655 ± 144*
85		%: 100	70	70
	800	%: 90	70	70
		%: 100	80	80
		%: 100	30	30
	1600	%: 100	70	70
		%: 100	90	90
75	800	%: 90	70	60
		%: 90	0	0

N = dix souris par lot.

% = pourcentage d'animaux non protégés.

T = temps d'apparition des phénomènes (secondes), après l'injection du pentétrazol (125 mg/kg).

\* p < 0,05.

**3.3 Influence du clorazébate dipotassique vis-à-vis des effets du pentétrazol**

A la différence d'E.hirta, le clorazébate dipotassique (tableau 34) exerce une activité anti-convulsivante, dès la dose de 10 mg/kg et vis-à-vis des effets de la DL 100 de pentétrazol (125 mg/kg) ; le pourcentage d'animaux présentant des convulsions cloniques est réduit (60%), les convulsions toniques, ainsi que l'activité léthale, étant totalement inhibées.

Un antagonisme total est obtenu dès la dose de 40 mg/kg de clorazébate dipotassique.

Cet effet anti-convulsivant se traduit également par un retard conséquent sur l'apparition des convulsions (cloniques et toniques) et de la mortalité. Toutefois, il n'est significatif qu'avec la dose de 10 mg/kg et uniquement vis-à-vis des convulsions cloniques.

**TABLEAU 34 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD), VIS-A-VIS DES EFFETS CONVULSIVANTS ET LETHAUX DU PENTETRAZOL**

PENTETRAZOL (mg/kg)	CD (mg/kg)	CONVULSIONS		MORTALITE
		CLONIQUES	TONIQUES	
	0	%: 90 T: 47 ± 6	%: 100 T: 164 ± 26	%: 100 T: 165 ± 25
	1	%: 90 T: 159 ± 276	%: 70 T: 454 ± 398	%: 70 T: 461 ± 395
125	10	%: 60 T: 242 ± 47 *	%: 0 ***	%: 0 ***
	40	%: 0 ***	%: 0 ***	%: 0 ***
	80	%: 0 ***	%: 0 ***	%: 0 ***
75	1	%: 40	%: 20	%: 20

N = dix souris par lot.

% = pourcentage d'animaux non protégés.

T = temps d'apparition des phénomènes (secondes), après l'injection du pentétrazol (125 mg/kg).

\* p < 0,05 ; \*\*\* p < 0,01.

## II - 4 DISCUSSION

La plupart des anxiolytiques, et tout particulièrement les benzodiazépines, sont dotés de propriétés anti-convulsivantes, propriétés mises à profit dans le traitement des épilepsies. Sur le modèle animal, cette activité est très souvent envisagée vis-à-vis des convulsions induites par l'électro-choc ou divers agents chimiques tels que le pentétraazol.

Dans le cas de ce composé, les expérimentations sont généralement menées avec de fortes doses d'agent convulsivant (souvent 125 mg/kg), provoquant l'apparition des convulsions chez tous les animaux traités. En fait, si certains auteurs (Barnes et Eltherington, 1973) ont pu estimer la dose létale 50 d'une injection intra-péritonéale de pentétraazol, chez la souris, à 92 mg/kg, ainsi que la dose convulsivante utilisée à 40,5 mg/kg, l'existence d'importantes fluctuations dans les effets de ce composé peut expliquer en partie le choix des auteurs pour une dose induisant un effet maximal. De telles variations ont notamment été mentionnées par File et ses collaborateurs (1985) et pourraient être liées au lot de souris, à la température, à la saison...

De telles fluctuations montrent que l'interprétation des résultats obtenus avec E. hirta et le clorazébate dipotassique doit être effectuée vis-à-vis de la dose létale (DL 100) de pentétraazol, soit 125 mg/kg.

Cette étude nous permet ainsi d'affirmer l'absence de propriétés anti-convulsivantes pour E. hirta, aucune des fortes doses sédatives utilisées (200, 800, 1600 et 3200 mg/kg) n'ayant réduit l'importance des convulsions, ni le pourcentage de mortalité induits par l'injection de 125 mg/kg de pentétraazol.

La validité de ces résultats peut être apportée par l'obtention d'une activité anti-convulsivante exercée par le clorazébate dipotassique, benzodiazépine de référence.

Cet effet commençant à se manifester dès la dose de 10 mg/kg, pour atteindre un maximum (antagonisme total des convulsions et de la mortalité) dès 40 mg/kg.

Signalons la dose de 1 mg/kg, donnée comme DE 50 anti-convulsivante, dans le dossier technique consacré à cette benzodiazépine (Sanofi, 1968).

Si une activité anti-convulsivante est caractéristique de la plupart des dérivés benzodiazépiniques thérapeutiquement connus, son absence ne peut constituer à elle seule un facteur d'exclusion d'un profil d'activité de type benzodiazépinique, pour E. hirta

En effet, les mécanismes d'action mis en jeu sont multiples et encore très hypothétiques, bien que de nombreux travaux penchent en faveur du rôle de l'action facilitatrice des benzodiazépines sur la transmission gabaergique (Costa et coll., 1975 - Koe, 1979 - Lipka et coll., 1979 - Raffaitin et Cuche, 1983), cette médiation par le gaba pouvant notamment expliquer l'inhibition du turn-over de la dopamine striatale, exercée par les benzodiazépines et apparemment liée à leur action anti-convulsivante (Costa et coll., 1975).

Aussi, du fait de cette complexité et du peu de données confirmées concernant les mécanismes d'action, il n'est pas exclu que de nouvelles molécules, non encore découvertes, ne puissent présenter un profil d'activité du type benzodiazépinique, avec une certaine variabilité par rapport à celui typiquement attribué aux benzodiazépines connues, quant aux propriétés généralement considérées comme caractéristiques de ces anxiolytiques (sédatives, anxiolytiques, anti-convulsivantes, myorelaxantes...) et/ou quant aux différents mécanismes d'action mis en jeu.

*III*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*MYORELAXANTES*

Après avoir constaté l'existence d'une certaine activité anxiolytique pour E. hirta (Chapitre B II), activité par ailleurs caractéristique et essentielle des benzodiazépines, ainsi que l'absence de propriétés anti-convulsivantes sur un modèle chimique (test au pentétrazol - Chapitre C II), propriétés conférées à la plupart des dérivés benzodiazépiniques thérapeutiquement connus, nous avons envisagé de poursuivre cette recherche d'un profil d'activité du type benzodiazépinique, par l'étude des propriétés myorelaxantes, très souvent associées aux précédentes et se manifestant à de fortes doses.

### III - 1 LES CONTRACTURES MUSCULAIRES ET LES MYORELAXANTS

#### \* Les contractures musculaires

(Deniker et Poirier, 1978 - Bussel et Bergego, 1979)

Les substances myorelaxantes entrent dans le traitement symptomatique des contractures musculaires apparaissant à la suite d'une lésion du système nerveux central ou d'affections ostéo-articulaires. Habituellement, ces contractures sont dues à une décharge anormale du neurone moteur périphérique ou motoneurone  $\alpha$ , dont l'axone innerve toutes les fibres musculaires squelettiques. En fait, cette décharge est secondaire à une hyperactivité de réflexes organisés à l'échelon médullaire segmentaire.

Ainsi, deux grands types de réflexes peuvent être retenus :

**Les réflexes myotatiques** (monosynaptiques, encore appelés "réflexes d'étirement"), les récepteurs concernés étant les transmissions primaires des fuseaux neuro-musculaires, dont la sensibilité est réglée par les motoneurons médullaires  $\gamma$ . De ces fuseaux neuro-musculaires partent des fibres afférentes de gros calibres qui vont exciter directement (sans neurones intermédiaires) les motoneurons  $\alpha$  localisés dans la corne antérieure de la moelle.

**Les réflexes polysynaptiques nociceptifs** (réflexes de flexion, à visée protectrice) sont obtenus par stimulation des fibres nerveuses d'origine cutanée, articulaire ou musculaire de moyen et fin calibre, celles-ci pouvant exciter un réseau médullaire d'interneurones, qui, eux-mêmes, vont activer les motoneurones  $\downarrow$ .

En fait, à ces influences segmentaires viennent s'ajouter, entre autre, deux systèmes de contrôle importants :

- un réseau d'interneurones responsables de l'inhibition présynaptique, par action sur les influx afférents (fibres Ia, afférences d'origine cutanée...).
- les interneurones de Renshaw contrôlant l'activité efférente des motoneurones  $\downarrow$ , après activation par ces derniers.

A ces contrôles vient s'adjoindre celui exercé par divers centres supra-segmentaires, tels que le cortex cérébral et la formation réticulée.

#### \* Mécanismes d'action proposés pour les substances myorelaxantes

Appartenant à des groupes chimiques très différents, les myorelaxants peuvent exercer leur action à des niveaux divers plus ou moins directement sur la fibre musculaire (dantrolène), sur la jonction neuro-musculaire (curarisants), sur les interneurones médullaires (méphénésine, cyclarbamate...), sur la formation réticulée (chlorproéthazine), sur les fibres afférentes (action pré-synaptique du baclofène).

Les benzodiazépines, quant à elles, déprimerait surtout l'activité réticulaire (le système descendant facilitateur ou inhibiteur) directement ou en agissant sur les structures limbiques et entraîneraient ainsi une diminution de l'activité des motoneurones  $\gamma$ . Si certains auteurs (Deniker et Poirier, 1978) mentionnent l'abolition des réflexes polysynaptiques seuls, les réflexes monosynaptiques étant conservés, Bussel et

Bergego (1979) parlent de l'inhibition de ces deux types de réflexes, provoquée par le diazépam et le tétrazépam, à la suite de l'augmentation de l'activité des interneurons transmettant l'inhibition pré-synaptique.

Pour expliquer ces différentes actions, de nombreux auteurs font appel au rôle facilitateur exercé par les benzodiazépines sur l'inhibition gabaergique pré-synaptique (Costa et coll., 1975 - Haefely, 1983 - Thiébot et Soubrié, 1983), et notamment au niveau de la moelle épinière où le système gabaergique diminuerait la stimulation exercée en permanence sur les motoneurons (Raffaitin et Cuche, 1983 - Muller, 1987), mais aussi au niveau du cervelet et de la formation réticulée (Muller, 1987), la participation du tronc cérébral n'étant pas exclue (Raffaitin et Cuche, 1983).

Selon divers auteurs (Koe, 1979 - Raffaitin et Cuche, 1983), l'action agoniste exercée par les benzodiazépines, sur les récepteurs centraux de la glycine (acide aminé inhibiteur intervenant notamment dans le tronc cérébral et la moelle épinière et développant une inhibition post-synaptique) pourrait jouer un rôle, tout au moins partiel, dans la médiation de leur activité myorelaxante ; tandis que d'autres substances myorelaxantes, actives au niveau central, exerceraient des effets négligeables sur ces récepteurs. Toutefois, cette hypothèse impliquant le rôle des récepteurs de la glycine, est rejetée par Costa et ses collaborateurs (1975).

#### \* Modèles expérimentaux

Très souvent, ces propriétés myorelaxantes sont expérimentalement mises en évidence chez l'animal, grâce à deux expérimentations couramment usitées.

La première, le **test de la traction**, permet d'évaluer la force musculaire de l'animal ; tandis que la seconde, le **test de la tige tournante**, met davantage l'accent sur l'initiative motrice et l'équilibration de l'animal.

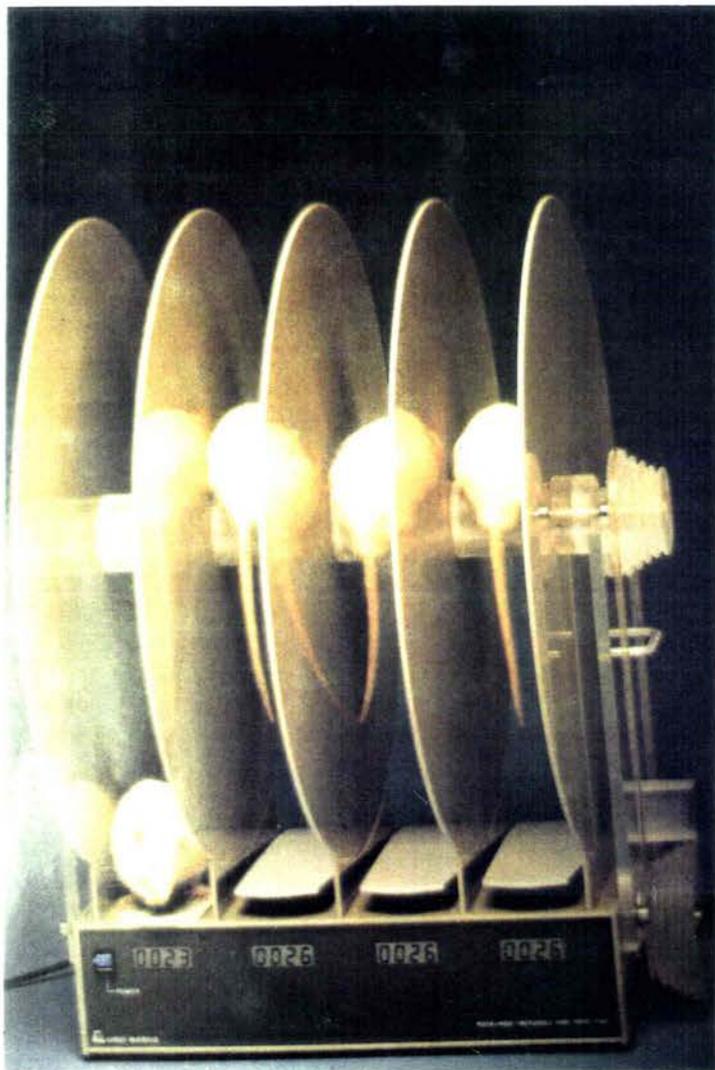


PHOTO 9 : LA TIGE TOURNANTE (ROTA-ROD) .

### III - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

#### 2.1 Matériel

##### 2.1.1 Animaux

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss, élevées au laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg ; leurs caractéristiques, ainsi que les conditions d'élevage, sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

##### 2.1.2 Dispositifs expérimentaux

Deux expérimentations sont retenues pour cette étude, nécessitant les dispositifs suivants :

- l'appareillage utilisé dans le **test de la traction** consiste en une plaque en bois de 30 cm sur 50 cm, sur laquelle sont disposés deux piliers en bois distants de 20 cm et reliés entre eux par un fil tendu de 2 mm de diamètre, placé à une hauteur de 15 cm.

- dans le **test de la tige tournante**, le dispositif consiste en un axe en bois tournant horizontalement à faible vitesse (10 tours/minute), divisé en cinq parties égales de 5 cm chacune par des disques solidaires de la tige, permettant ainsi de soumettre au test cinq souris en même temps (Rota Rod, Ugo Basile, Apelex, Bagneux (92)).

Un compte temps est situé à la base de l'appareil.

#### 2.2 Méthodes

Pour ces deux expérimentations, les produits sont administrés par voie I.P., trente minutes avant le test. E. hirta est testée aux doses de 100, 200, 400 et 800 mg/kg. Le clorazépate dipotassique, produit de référence retenu, est administré aux

doses de 1, 5, 10, 15, 20 et 40 mg/kg. Le solvant consiste en NaCl 0,9 %.

Les expérimentations ont été reproduites une seconde fois, dans le cas de l'extrait végétal et pour les différentes doses testées.

### **2.2.1 Test de la traction**

La technique est inspirée de la méthode de Julou et Courvoisier, décrite par Courvoisier (1956).

Avant tout traitement et au moins une heure avant le test proprement dit, chaque animal est suspendu au fil par ses pattes antérieures ; cette sélection permet d'éliminer toute souris ne pouvant se rétablir sur le fil en moins de cinq secondes, chacune constituant ainsi son propre témoin.

Trente minutes après l'injection des produits, les animaux sélectionnés sont à nouveau soumis au test. Ceux-ci sont considérés atoniques, lorsqu'ils sont incapables d'effectuer un rétablissement en moins de cinq secondes.

### **2.2.2 Test de la tige tournante**

La technique est inspirée des méthodes de Dunham et Miya (1956), de De Carvalho et coll. (1986) et de Kostowski et coll., (1986).

Comme pour le test précédent, une sélection est effectuée avant tout traitement, chaque animal devant se maintenir sur la tige tournante et se déplacer en sens inverse de la rotation de l'axe pendant au moins cinq minutes, chacune des souris sélectionnées constituant ainsi son propre témoin. Durant les premières secondes, il est préférable d'aider l'animal à marcher à l'encontre du mouvement de l'appareil, pour l'aider à s'adapter à sa nouvelle position.

Trente minutes après l'injection des produits, les souris sont à nouveau soumises à ce mouvement contraire, le temps pendant

lequel chaque animal se maintient sur l'axe étant enregistré. Un temps inférieur à cinq minutes (durée totale du test) permet de considéré l'animal comme déséquilibré.

### 2.3 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test du X<sup>2</sup> corrigé (correction de Yates), sur les pourcentages d'animaux atoniques et déséquilibrés, par rapport aux pourcentages "témoins", soit 0 %, déterminés grâce aux sélections initiales des animaux.

Le calcul de l'ED 50, dose efficace induisant un effet myorelaxant chez 50 % des animaux, est effectuée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

## III - 3 RESULTATS

Les pourcentages d'animaux atoniques et déséquilibrés sont présentés dans les tableaux 35 et 36 respectivement pour les lots traités par E. hirta et après traitement par le clorazé-pate dipotassique .

D'après les résultats obtenus, E. hirta ne provoque aucune atonie significative, aux différentes doses testées dans le test de la traction.

Par contre, dans le test de la tige tournante, l'extrait végétal induit un déséquilibre des animaux, significatif dès la dose de 200 mg/kg (50 % d'animaux sont déséquilibrés). Toutefois, cet effet n'est apparemment pas dose-dépendant, puisque les doses de 400 et 800 mg/kg entraînent respectivement le déséquilibre de 40 et 60 % des animaux.

Le clorazé-pate dipotassique, quant à lui, est responsable d'une atonie significative et maximale dès la dose de 10 mg/kg (100 % des animaux sont atoniques), les doses inférieures testées, soient 1 et 5 mg/kg, restant inefficaces (respectivement 0 % et

30 % d'animaux atoniques).

Dans le test de la tige tournante, ce produit de référence augmente de façon dose-dépendante le nombre d'animaux déséquilibrés. Cet effet devient significatif, dès la dose de 10 mg/kg (60 % des animaux sont déséquilibrés), pour atteindre son maximum dès la dose de 20 mg/kg (100 % d'animaux déséquilibrés). Dans cette seconde expérimentation, la DE 50 est estimée à 7,1 mg/kg (7-7,2).

**TABLEAU 35 : RECHERCHE D'UNE ACTIVITE MYORELAXANTE POUR E.HIRTA DANS LES TESTS DE LA TRACTION (ATONIE) ET DE LA TIGE TOURNANTE (DESEQUILIBRE).**

PARAMETRES	LOTS	TEMOINS (N=80)	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)							
			100		200		400		800	
			ESSAI 1 (N=10)	ESSAI 2 (N=10)	ESSAI 1 (N=10)	ESSAI 2 (N=10)	ESSAI 1 (N=10)	ESSAI 2 (N=10)	ESSAI 1 (N=10)	ESSAI 2 (n=10)
POURCENTAGE D'ANIMAUX ATONIQUES		0	10	10	0	10	30	0	20	10
POURCENTAGE D'ANIMAUX DESEQUILIBRES		0	0	10	50	50	40	40	60	60
					***	***	*	*	***	***

**TABLEAU 36 : RECHERCHE D'UNE ACTIVITE MYORELAXANTE POUR LE CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE DANS LES TESTS DE LA TRACTION (ATONIE) ET DE LA TIGE TOURNANTE (DESEQUILIBRE).**

PARAMETRES	LOTS	TEMOINS (N=60)	CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (mg/kg)						
			1 (N=10)	5 (N=10)	10 (N=10)	15 (N=10)	20 (N=10)	40 (N=10)	
POURCENTAGE D'ANIMAUX ATONIQUES		0	0	30	100	100	100	90	
POURCENTAGE D'ANIMAUX DESEQUILIBRES		0	10	20	60	80	100	100	
					**	***	***	***	

N = nombre d'animaux par lot

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.

### III - 4 DISCUSSION

Très couramment employés pour la recherche de propriétés myorelaxantes, les tests de la traction et de la tige tournante présentent une certaine complémentarité : ainsi, le premier permet d'évaluer la force musculaire de l'animal, nécessaire à son rétablissement sur la barre ; tandis que le second met davantage l'accent sur son initiative motrice et son équilibration, lui permettant de se maintenir sur un axe tournant à vitesse lente et constante.

L'efficacité de la benzodiazépine de référence, le clorazébate dipotassique, a effectivement pu être confirmée dans ces deux expérimentations. Toutefois, si cet effet myorelaxant dose-dépendant s'installe progressivement dans le cas de l'initiative motrice et de l'équilibration de l'animal, il semble se manifester beaucoup plus brusquement, vis-à-vis de sa force musculaire (respectivement 0 % et 30 % d'animaux atoniques avec les doses anxiolytiques et 1 et 5 mg/kg - 100 % d'animaux atoniques dès la dose de 10 mg/kg).

Les résultats obtenus concordent tout à fait avec les valeurs de DE 50 du clorazébate dipotassique, données dans le dossier technique consacré à cette benzodiazépine (test de la tige tournante : DE 50 de 7,5 mg/kg ; test de la traction : DE 50 de 10 mg/kg) (Sanofi, 1968).

Par contre, l'activité de doses sédatives d'E. hirta se révèle différente de celle développée par ce produit de référence. Ainsi, des effets dissociés sont observés dans ces deux expérimentations, l'extrait végétal réduisant significativement l'équilibration et l'initiative de la souris, tout en restant inefficace vis-à-vis de sa force musculaire.

Cependant, cet effet inhibiteur n'est pas dose-dépendant, puisqu'il se manifeste significativement dès la dose de 200 mg/kg (déséquilibre de 50 % des animaux) pour ce maintenir quasiment identique aux doses supérieures testées, soient 400 et 800 mg/kg.

En fait, selon certains auteurs (Treit, 1985), les tests myorelaxants actuels et couramment employés seraient peu sélectifs pour les anxiolytiques. Ce serait notamment le cas du test de la tige tournante, divers composés dépresseurs centraux tels que les neuroleptiques pouvant être responsables d'une perte de l'équilibration.

Pour toutes ces raisons (faible sélectivité des tests, différenciation des effets myorelaxants d'E. hirta et d'une benzodiazépine de référence, absence de relation effet-dose pour l'extrait végétal), l'activité d'E. hirta ne paraît pas pouvoir être identifiée à l'action myorelaxante caractéristique des benzodiazépines.

L'inhibition de l'initiative motrice et de l'équilibration de l'animal, observée après l'administration de fortes doses sédatives de plante, pourrait tout simplement trouver son explication dans son action dépressive centrale, précédemment mise en évidence (Chapitre B I et II).

*IV*

*INFLUENCE D'UN ANTAGONISTE*

*DES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES*

*VIS-A-VIS DES EFFETS SEDATIFS*

*D' E. HIRTA*

Les études précédentes (II et III) nous ayant conduit à constater l'absence de propriétés secondaires, très généralement considérées comme caractéristiques des benzodiazépines (propriétés anti-convulsivantes et myorelaxantes), nous avons pensé aborder et compléter cette recherche d'un profil d'activité de type benzodiazépinique, en nous intéressant plus particulièrement aux interactions pouvant se produire au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques.

Aussi, dans un premier temps, avons-nous envisagé l'influence in vivo d'un antagoniste des benzodiazépines, vis-à-vis des effets sédatifs d'E. hirta.

#### IV - 1 QUELQUES GENERALITES SUR LE RO 15-1788

Le RO 15-1788 est une imidazodiazépine, connue pour son antagonisme sélectif exercé vis-à-vis de la plupart des actions comportementales des benzodiazépines (Bonetti et coll., 1982 - File et coll., 1982 - Haefely, 1983), mais également vis-à-vis des effets des agonistes inverses, tels que certaines  $\beta$ -carbolines ( $\beta$ -CCE...). Le mécanisme d'action actuellement proposé est une fixation au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques centraux, son affinité pour les sites accepteurs périphériques étant faible (Haefely, 1983 - File et Pellow, 1985 - Stolerman et coll., 1986) ou nulle (Hunkeler et coll., 1981).

La découverte d'une distribution des sites de liaison du RO 15-1788, dans le système nerveux central, identique à celle des benzodiazépines conforte ce mécanisme d'action hypothétique (Richards et coll., 1982).

Si le RO 15-1788 antagonise les effets pharmacologiques des benzodiazépines, il peut également antagoniser la diminution des catécholamines induite par ces anxiolytiques (Duka et coll., 1986).

Si pendant longtemps, ce composé a été considéré comme un antagoniste pur, c'est-à-dire une substance bloquant simplement

les récepteurs, sans provoquer de changement conformationnel efficace, ni affecter la transmission gabaergique (Polc et coll., 1982 - Haefely, 1983 - Richards et Möhler, 1984), de nombreux travaux ont fait apparaître récemment une légère activité intrinsèque pour ce composé (Weiss et coll., 1985 - De Carvalho et coll., 1986).

Selon le modèle expérimental utilisé et en fonction de l'activité comportementale, selon la dose administrée, le RO 15-1788 pourrait se comporter comme un **agoniste** (Bidet et Gagnault, 1984 - Barret et coll., 1985 - Duka et coll., 1986 - File et coll., 1986 - Stolerman et coll., 1986 - De Deyn et Mac Donald, 1987 - Muller, 1987), ou comme un **agoniste inverse** et présenter notamment une certaine action anxiogène (File et coll., 1982 - Duka et coll., 1986 - File et coll., 1986 - Muller, 1987), cette seconde activité se manifestant avec de plus fortes doses de substances.

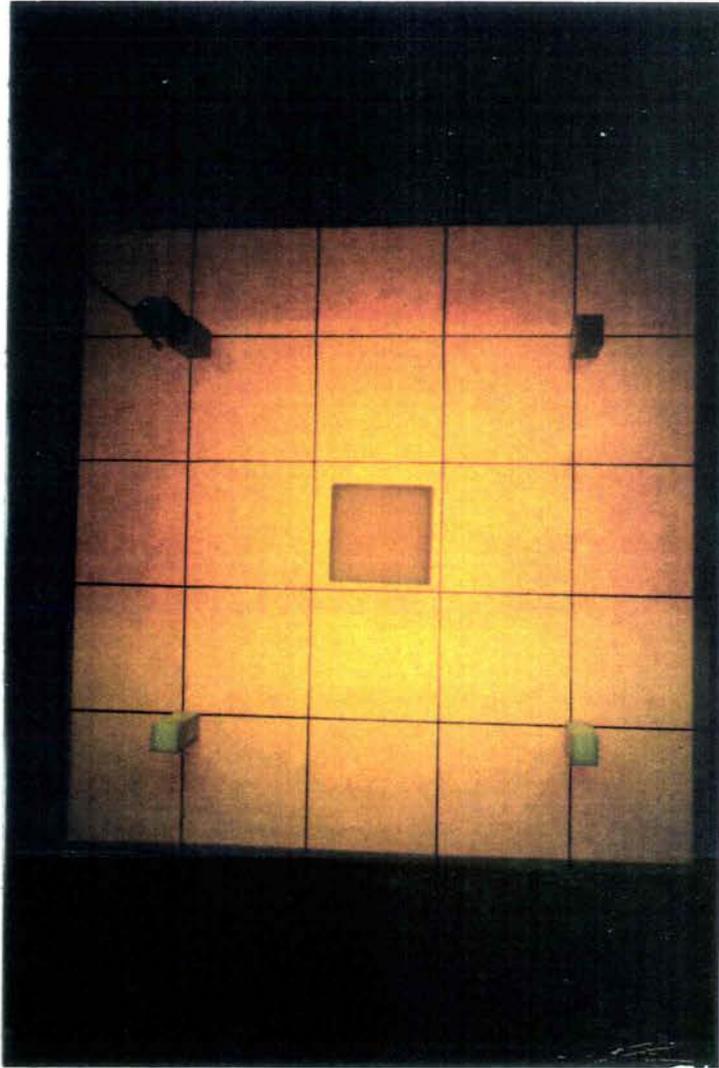


PHOTO 8 : L'OPEN-FIELD.

## IV - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

### 2.1 Matériel

#### 2.1.1 Animaux

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss, élevées au laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg et dont les caractéristiques sont détaillées dans le paragraphe consacré aux différents animaux utilisés, ainsi qu'aux conditions d'élevage (Chapitre A II).

#### 2.1.2 Dispositifs expérimentaux

Deux expérimentations différentes sont réalisées, nécessitant des dispositifs différents:

\* le test de l'open-field modifié, pour lequel est employée une enceinte carrée (50 x 50 x 40 cm), divisée en 25 carreaux égaux (10 x 10 cm), dont quatre d'entre eux portent chacun une colonnette (2 x 2 x 6 cm) ; au centre, se trouve une plateforme (8,5 cm de long - 2,5 cm de haut). L'appareil est éclairé par une lampe à incandescence blanche (100 W) située sous la plateforme centrale. Le plancher de l'enceinte consiste en une plaque de verre translucide.

\* le test d'exploration d'un milieu nouveau, dont le dispositif expérimental a précédemment été décrit lors de la recherche de propriétés sédatives (Chapitre B I - 4.1.1).

### 2.2 Méthodes

#### 2.2.1 Test de l'open-field modifié

La technique utilisée a été imaginée par Hall (1934).

Les produits sont administrés par voie I.P., trente minutes avant le test.

E. hirta est testée à la dose de 400 mg/kg ; le RO 15-1788, fourni gracieusement par les laboratoires Hofmann Laroche (Bâle), est utilisé à la dose de 10 mg/kg ; un troisième lot d'animaux reçoit le mélange "E. hirta - RO 15-1788". Cette imidazodiazépine n'étant solubilisée qu'en présence de Tween 80 (Prolabo, Paris), une goutte de ce produit est ajoutée au solvant (H<sub>2</sub>O distillée) utilisé pour les trois lots traités, soit (E. hirta - RO - mélange E. hirta/RO), et pour le lot témoin.

Trente minutes après l'injection des produits, l'animal est déposé au niveau d'un carré, dans un coin de l'appareil. Son comportement est étudié durant cinq minutes grâce à l'enregistrement des quatre paramètres suivants :

- locomotion (nombre d'unités quadrillées traversées) = **L**
- redressements effectués contre les parois = **redressements I**
- redressements effectués contre la plateforme centrale et les colonnettes = **redressements II**
- traversées de la plateforme centrale = **T**.

### 2.2.2 Exploration d'un milieu nouveau

La méthode a été décrite chez le rat par Hugues (1965), et adaptée aux souris par Misslin et Ropartz (1981, 1982, 1983).

Vingt quatre heures avant le test, les animaux sont isolés dans le compartiment familier (CF) de l'enceinte qui contient de la sciure et reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté.

Au moment du test, chaque animal est exposé au compartiment nouveau (CN) par l'escamotage des portes-guillottes séparant les deux compartiments de l'enceinte. Son comportement est alors observé durant dix minutes, grâce à l'enregistrement des neuf paramètres suivants :

- Locomotion dans le milieu familier (LF) et dans le milieu nouveau (LN), déterminées respectivement par le nombre d'unités franchies dans le compartiment familier ou dans le compartiment nouveau

- Locomotion totale (L = LF + LN)

- Préférence néotique (PN = préférence de l'animal pour le milieu nouveau).

- Redressements effectués dans le compartiment familial (RF) et dans le compartiment nouveau (RN).

- Comportements autoplastiques (toiletage, prise de nourriture).

- Evitements effectués par l'animal avant sa première entrée dans le milieu nouveau et caractérisés par le passage incomplet suivi d'un recul et du retour dans le milieu familial).

- Temps de latence précédant la première entrée dans le compartiment nouveau.

Les produits sont administrés par voie I.P., trente minutes avant le test.

E. hirta est testée à la dose de 100 mg/kg ; le RO 15-1788 est utilisé à la dose de 10 mg/kg ; un troisième lot d'animaux reçoit le mélange "extrait végétal - RO 15-1788". Chaque préparation est dissoute dans de l'eau distillée additionnée d'une goutte de Tween 80, cette dernière solution étant administrée seule aux témoins.

### 2.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett et réalisation d'une analyse de variance (ANOVA) sur l'ensemble des lots traités et témoins, les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide du test de Newman-Keuls.

## IV - 3 RESULTATS

### 3.1. Test de l'open-field modifié

Les résultats présentés sur la figure 30 et dans le tableau 37 permettent de constater une réduction importante et significative des quatre paramètres pris en compte (locomotion, redressements I et II, passages au centre), après injection d'E. hirta à la dose de 400 mg/kg.

Si une diminution, de plus de la moitié par rapport à la valeur moyenne des témoins (-57 %), est obtenue sur la locomotion, cet effet est encore plus marqué vis-à-vis des redressements (I et II) et des passages sur la plateforme centrale (chutes respectives de 86, 88 et 90 %).

Ceci confirme les effets sédatifs d'E. hirta.

Un effet similaire est observé, après administration du mélange "E. hirta - RO 15-1788", quoique très légèrement supérieur, dans le cas des redressements II (chute de 99 %) et des passages au centre totalement supprimés.

Toutefois, ces différences entre les lots traités par l'extrait végétal seul ou par le mélange ne sont pas statistiquement significatives.

Ainsi, le RO 15-1788 n'antagonise pas les effets d'E. hirta sur le comportement de la souris placée dans l'open-field.

**TABLEAU 37 : INFLUENCE DU RO 15-1788, VIS-A-VIS DES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA, SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'OPEN-FIELD.**

**TEMOIN (N=10)**

PARAMETRES	LOCOMOTION	REDRESSEMENTS I (parois)	REDRESSEMENTS II (colonnettes et plateforme)	PASSAGES AU CENTRE
MOYENNE	125,2	21,3	21,8	3
ECART-TYPE REDUIT	10,2	2	1,9	0,9

**E.HIRTA 400 mg/kg (N=10)**

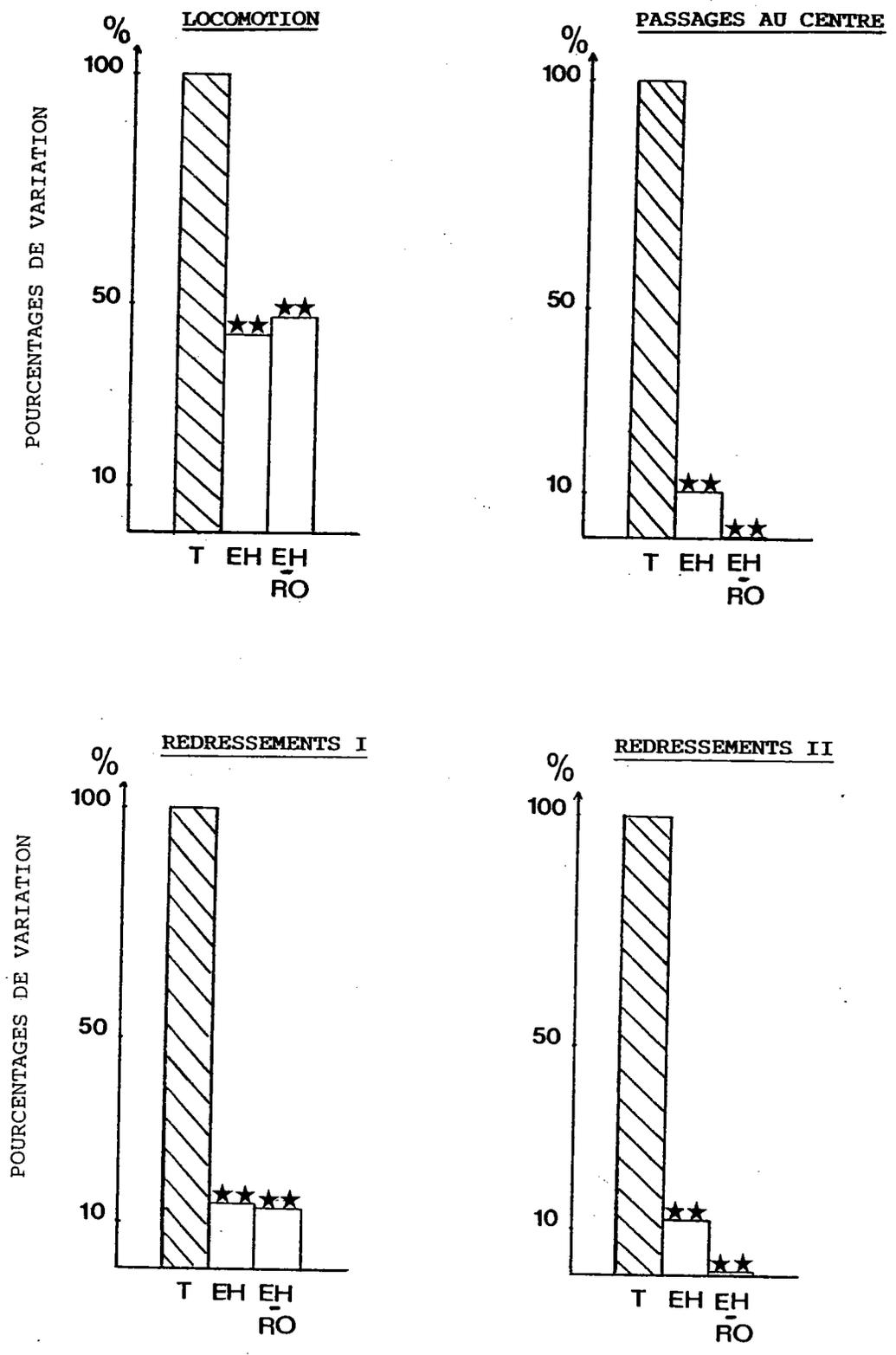
MOYENNE	53,4 **	2,9 **	2,7 **	0,3 **
ECART-TYPE REDUIT	11,5	1,7	1,5	0,2
% PAR RAPPORT AU TEMOIN	-57%	-86%	-88%	-90%

**E.HIRTA 400 mg/kg - RO 15-1788 10 mg/kg (N=10)**

MOYENNE	57,3 **	2,8 **	0,2 **	0 **
ECART-TYPE REDUIT	5	0,5	0,1	0
% PAR RAPPORT AU TEMOIN	-54%	-87%	-99%	-100%

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,01$ .



T : TEMOINS H<sub>2</sub>O DISTILLEE  
EH : E. HIRTA 400 mg/kg  
EH-RO : MELANGE " EH 400 mg/kg - RO 15-1788 10 mg/kg "

★★ p < 0,01

**FIG. 30** : INFLUENCE DU RO 15-1788 SUR LES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA, DANS LE TEST DE L'OPEN FIELD.

### 3.2 Test d'exploration d'un milieu nouveau

Les résultats présentés sur la figure 31 et dans le tableau 38 mettent en évidence l'activité inhibitrice, importante et significative, exercée par E. hirta vis-à-vis des locomotions totale, dans le familier et dans le nouveau (chutes respectives par rapport aux témoins de 59 %, 55 % et 61 %), de la préférence néotique (-51 %), des redressements effectués dans le familier et dans le nouveau (chutes respectives de 79 % et 67 %), ainsi que des comportements autoplastiques (-87 %). La réduction du nombre moyen d'évitements, bien que de 52 % par rapport aux témoins, n'est pas statistiquement significative. Le temps de latence, quant à lui, est augmenté, mais pas de façon significative (+131 %).

L'administration du mélange "E. hirta - RO 15-1788" provoque une réduction similaire à celle induite par l'extrait végétal seul, vis-à-vis de la préférence néotique (-54 %) et des évitements (-51 %). Cet effet est plus important, si l'on considère les locomotions totale, dans le familier et dans le nouveau (chutes respectives de 77 %, 77 % et 78 %), ainsi que les redressements effectués dans le familier et dans le nouveau (chutes respectives de 91 % et 90 %). Par contre, le mélange "E. hirta - RO 15-1788" affecte moins les comportements autoplastiques, la chute de 50 % par rapport aux témoins n'étant pas significative.

Comme dans le cas d'un traitement par l'extrait végétal seul, le mélange "E. hirta - RO 15-1788" augmente de façon non significative le temps de latence, quoique cet effet soit plus faible (+114 %).

Toutefois ces différences entre les lots traités par l'extrait végétal seul ou par le mélange ne sont pas statistiquement significatives.

Ainsi, le RO 15-1788 n'antagonise pas les effets d'E. hirta sur le comportement de la souris sollicitée pour l'exploration non forcée d'un milieu nouveau.

**TABLEAU 38 : INFLUENCE DU RO 15-1788, VIS-A-VIS DES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA, SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS SOLLICITEE POUR L'EXPLORATION NON FORCEE D'UN MILIEU NOUVEAU.**

TEMOIN (N=10)

PARAMETRES	LOCOMOTION			PREFERENCE	REDRESSEMENTS		COMPOR-	TEMENTS	EVITEMENTS	TEMPS DE
	TOTALE	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	NEOTIQUE (secondes)	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	AUTOPLAS-	TIQUES		LATENCE (secondes)
MOYENNE	108,5	45,7	62,8	375,9	10,6	41,3	0,8		7,1	110,7
ECART-TYPE										
REDUIT	10,7	5,1	6,5	21,8	2,5	5,6	0,2		1,7	25,3

E. HIRTA 400 mg/kg (N=10)

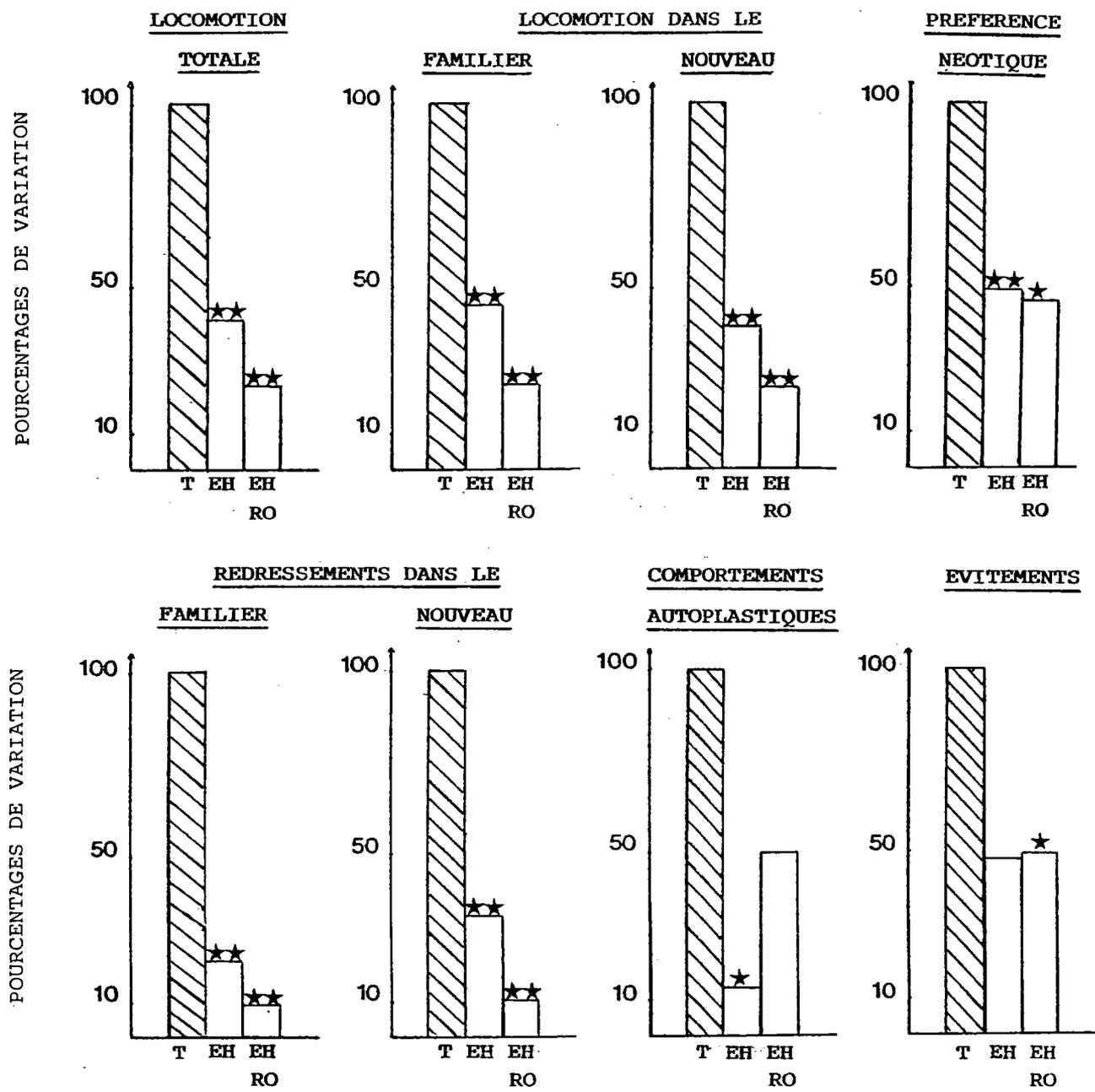
PARAMETRES	LOCOMOTION			PREFERENCE	REDRESSEMENTS		COMPOR-	TEMENTS	EVITEMENTS	TEMPS DE
	TOTALE	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	NEOTIQUE (secondes)	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	AUTOPLAS-	TIQUES		LATENCE (secondes)
MOYENNE	44,8	20,4	24,4	184,9	2,2	13,6	0,1		3,4	256,1
	**	**	**	**	**	**	*			
ECART-TYPE										
REDUIT	10,7	4,4	6,7	48,5	1,1	6,2	0,1		0,9	63,5
% PAR RAPPORT AU TEMOIN	-59%	-55%	-61%	-51%	-79%	-67%	-87%		-52%	+131%

E. HIRTA 400 mg/kg - RO 15-1788 10 mg/kg (N=10)

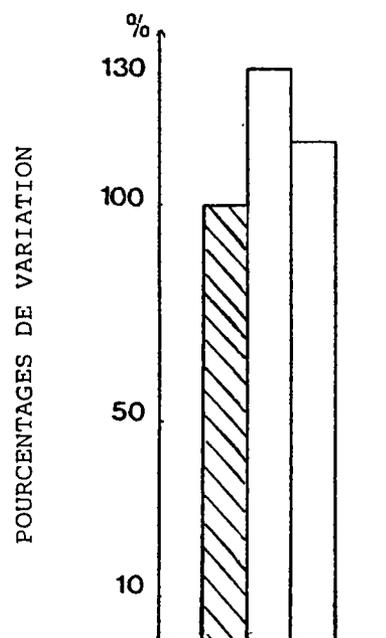
PARAMETRES	LOCOMOTION			PREFERENCE	REDRESSEMENTS		COMPOR-	TEMENTS	EVITEMENTS	TEMPS DE
	TOTALE	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	NEOTIQUE (secondes)	DANS LE FAMILIER	DANS LE NOUVEAU	AUTOPLAS-	TIQUES		LATENCE (secondes)
MOYENNE	24,6	10,7	13,9	172	0,9	4,3	0,4		3,5	237,2
	**	**	**	*	**	**	*			
ECART-TYPE										
REDUIT	5,1	1,9	4,1	62,7	0,3	1,4	0,2		1,1	71,5
% PAR RAPPORT AU TEMOIN	-77%	-77%	-78%	-54%	-91%	-90%	-50%		-51%	+114%

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.



TEMPS DE LATENCE



T = TEMOINS H<sub>2</sub>O DISTILLEE  
 EH = E. HIRTA 100 mg/kg  
 EH RO = " E. HIRTA 100 mg/kg - RO 15 1788  
 10 mg/kg "

★ p < 0,05;    ★★ p < 0,01

**FIG. 31 :** INFLUENCE DU RO 15-1788 SUR LES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA, DANS LE TEST D'EXPLORATION D'UN MILIEU NOUVEAU.  
 (pourcentages de variation par rapport aux témoins)

#### IV - 4 DISCUSSION

La réalisation de ces deux expérimentations (tests de l'open-field et d'exploration d'un milieu nouveau) nous a permis de vérifier l'activité sédatrice d'E. hirta précédemment mise en évidence dans trois tests pharmacologiques, dont deux contraignants (activité test et test de l'escalier) et un troisième d'exploration libre (test d'exploration d'un milieu nouveau), à nouveau utilisé dans cette recherche d'un antagonisme des effets de l'extrait végétal par le RO 15-1788. Le second test envisagé, quant à lui contraignant (test de l'open-field modifié) est très fréquemment employé lors du screening de substances psychotropes. Le caractère très anxiogène de cette dernière expérimentation peut expliquer le choix d'une plus forte dose de plante, soit 400 mg/kg, en comparaison de celle retenue pour le test d'exploration d'un milieu nouveau (100 mg/kg) ; en effet, comme nous l'avons précédemment observé (Chapitre B I), l'apparition d'un effet sédatif nécessite des doses de plantes supérieures, lorsque la situation imposée à l'animal crée un certain stress.

Au niveau expérimental, cette activité sédatrice s'est traduite par l'augmentation, quoique non significative, du temps mis par l'animal avant de pénétrer pour la première fois dans le compartiment nouveau ou temps de latence (test d'exploration d'un milieu nouveau) et par la réduction de tous les autres paramètres pris en compte (activité locomotrice, redressements effectués contre les parois, contre les colonnettes et la plateforme centrale, passages au centre, dans l'open-field ; activités locomotrices totale, dans le familier et dans le nouveau, redressements effectués dans le familier et dans le nouveau, préférence pour ce nouveau milieu, comportements autoplastiques, évitements, enregistrés dans le test d'exploration d'un milieu nouveau).

L'obtention d'une activité sédatrice suffisamment conséquente étant confirmée pour E. hirta, notre objectif était d'envisager l'influence d'un antagoniste des récepteurs benzodiazépiniques sur ces effets sédatifs. Ainsi, aucun antagonisme n'a pu être visualisé sur l'activité de l'extrait végétal. Plus encore, celle-ci s'est avérée "renforcée" sur certains paramètres (redressements contre les colonnettes et la plateforme centrale, passages au centre dans le test de l'open-field ; locomotions totale, dans le familier et dans le nouveau, redressements dans le familier et dans le nouveau, dans le test d'exploration d'un milieu nouveau), quoique ce phénomène ne soit pas statistiquement significatif (pas de différences entre le lot traité par l'extrait végétal seul et celui recevant le mélange "E. hirta - RO 15-1788").

Cette dernière constatation peut paraître relativement étonnante, si l'on se remémore l'existence d'une activité intrinsèque pour le RO 15-1788 mentionnée par divers auteurs (cités en 1), activité qui serait du type agoniste ou agoniste inverse, selon les doses considérées. Par ailleurs, une telle activité agoniste a pu être obtenue dans le test de l'open-field modifié, par Belzung et ses collaborateurs (1987), les quatre paramètres pris en compte (locomotion, redressements I et II, passages au centre) étant significativement augmentés par rapport aux valeurs témoins, après administration intrapéritonéale de la même dose de RO 15-1788 utilisée dans notre expérimentation (10 mg/kg).

Les résultats obtenus avec E. hirta, dans les tests de l'open-field et d'exploration d'un milieu nouveau peuvent être validés par ceux obtenus avec une benzodiazépine de référence, le midazolam, expérimentée au cours de précédentes études pharmacologiques (Rolland, 1988). Effectivement, les effets sédatifs de ce dérivé benzodiazépinique, testé à la dose de 2 mg/kg dans le test de l'open-field, sont totalement antagonisés par une dose de 10 mg/kg de RO 15-1788.

L'absence d'antagonisme in vivo des effets sédatifs d'E. hirta, par le RO 15-1788, laisse donc présager d'un mécanisme d'action différent de celui des benzodiazépines.

Une études in vitro, au niveau des récepteurs benzodiazépiniques devrait apporter plus de précision sur les mécanismes d'action mis en jeu et sur l'affinité de l'extrait d'E. hirta mis directement en présence des récepteurs concernés.

V

*INFLUENCE D' E. HIRTA SUR*

*LES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES*

## V - 1 INTRODUCTION

Les expérimentations précédemment réalisées, dans le cadre de la recherche d'un profil d'activité du type benzodiazépique, nous ont permis d'avancer un certain nombre de constatations nous inclinant à présager de mécanismes d'action différents pour E. hirta.

En effet, des propriétés anti-convulsivantes vis-à-vis des convulsions induites par le pentétrazol, caractéristiques de la plupart des dérivés benzodiazépiques, n'ont pu être révélées pour cet extrait végétal. De plus, si une certaine activité myorelaxante a pu être décelée aux doses sédatives de 200, 400 et 800 mg/kg, cet effet non dose-dépendant ne se manifeste que dans le test de la tige tournante, peu spécifique des benzodiazépines. Enfin, les effets sédatifs d'E. hirta n'ont pu être antagonisés par le RO 15-1788, imidazodiazépine connue pour son antagonisme vis-à-vis de la plupart des effets pharmacologiques des benzodiazépines.

C'est pourquoi il nous est apparu judicieux de compléter ces expérimentations in vivo, par la réalisation d'une technique in vitro permettant d'évaluer le caractère spécifique de la liaison des benzodiazépines avec leur récepteur.

Nous avons tenté d'adapter ce modèle, à l'étude des extraits végétaux, modèle par ailleurs largement employé au cours des screenings visant à démontrer l'affinité spécifique de nouvelles molécules pour les sites récepteurs benzodiazépiques. Toutefois, s'il présente l'intérêt de permettre un affinage du mode d'action, son inconvénient majeur réside dans l'introduction de très nombreuses molécules issues de la complexité de l'extrait végétal.

La méthode employée a été mise au point, dans notre laboratoire, par Bernabé (1986) et repose sur l'isolement d'une fraction enrichie en membranes neuronales, par fractionnement sub-cellulaire d'un homogénat d'encéphale de rat. La fraction ainsi isolée renferme les terminaisons pré et

post-synaptiques formant des particules ou synaptosomes, dans lesquelles sont conservées intactes les principales structures de la synapse.

Cette fraction synaptosomale est alors utilisée pour évaluer l'affinité d'une benzodiazépine de référence (diazépam) ou de l'extrait végétal, pour les sites récepteurs spécifiques des benzodiazépines, par l'étude de leur influence vis-à-vis d'un ligand marqué (flunitrazépam tritié) lié aux sites récepteurs spécifiques et non spécifiques.

L'interférence entre les effets d'E. hirta et du diazépam non marqué, vis-à-vis de la liaison du flunitrazépam tritié, est également étudiée.

Afin de valider les résultats obtenus, l'influence d'un extrait hydro-alcoolique de Poa sp., sur la fixation du flunitrazépam tritié, est aussi recherchée. En effet, cet extrait végétal est dénué de toute activité pharmacologique psychotrope ; et donc, théoriquement, celui-ci ne devrait pas influencer la liaison de la benzodiazépine marquée, ni l'action d'une benzodiazépine froide (diazépam), vis-à-vis de cette liaison. Cet extrait de Poa sp. nous servira donc de témoin négatif.

Au cours de cette étude, la pureté et la richesse de la fraction synaptosomale, en membranes plasmiques, est contrôlée par microscopie électronique, mais aussi par étude de l'activité d'une enzyme membranaire, l'adénosine triphosphatase (ATPase).

De plus, en raison de la qualité variable de la fraction synaptosomale, obtenue d'un homogénat d'encéphale à l'autre, notamment en ce qui concerne sa teneur en protéines, la concentration protéique de chaque fraction synaptosomale employée est déterminée et permet d'homogénéiser les résultats obtenus d'une expérimentation à l'autre, par leur expression rapportée au mg de protéines de la fraction considérée.

## V - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

### 2.1 Animaux

Il s'agit de rats femelles Whistar (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées au paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

### 2.2 Méthodes

#### 2.2.1 Préparation de l'homogénat d'encéphale

La technique utilisée est celle de Gray et Whittaker (1962), modifiée par Whittaker et coll. (1964).

L'animal est sacrifié par décapitation et l'encéphale entier est prélevé le plus rapidement possible. L'ensemble de ces opérations est effectué à une température inférieure à 4°C, afin de réduire l'activité des enzymes libérées.

Après pesée, le cerveau est placé dans une solution de saccharose glacée, isotonique au plasma et de concentration 0,32 M, pour être ensuite homogénéisé (homogénéisateur de Potter et Elvejem, type A) à 1200 tours/minute. L'homogénat recueilli est ajusté à une concentration de 10 % (P/V), à l'aide de saccharose 0,32 M.

#### 2.2.2 Fractionnement sub-cellulaire de l'homogénat

La méthode de fractionnement choisie est inspirée de celle décrite par Gray et Whittaker (1962), modifiée par Whittaker et coll. (1964).

Le principe de ce fractionnement consiste en centrifugations successives, à vitesses croissantes, (ultracentrifugeuse Kontron TG50 réfrigérée) permettant l'élimination progressive de divers organites cellulaires et l'obtention finale d'une suspension membranaire purifiée contenant les "synptosomes"

homogénat d'encéphale à 10 % dans  
une solution de saccharose à 0,32 M.

centrifugation à 1000 g,  
pendant 10 min.

culot (noyaux, débris cellulaires  
grands fragments de myéline)

surnageant

centrifugation à 17000 g  
pendant 55 min.

culot

(fraction mitochondriale brute :  
mitochondries - petits fragments  
de myéline - synaptosomes -  
quelques microsomes).

surnageant

(microsomes - ribosomes -  
fraction post-microsomale)

- remise en suspension dans 3 ml de saccharose 0,32 M
- dépôt sur un gradient de densité discontinu au saccharose  
(1,2 - 0,8 et 0,32 M).
- centrifugation à 53500 g, pendant 2 heures.

interface des couches

0,32 - 0,8 M

Fraction A

(fragments de myéline)

interface des couches

0,8 - 1,2 M

Fraction B

(Fraction synaptosomale)

culot dans du saccharose

1,2 M

Fraction C

(mitochondries)

- dilution dans un même volume d'eau  
distillée glacée (→ concentration en  
saccharose d'environ 0,45 M).
- centrifugation à  $10^5$  g, pendant 1 heure

culot remis en suspension dans une  
solution de tampon TRIS (50 mM),  
ajustée avec HCl 1N à un pH de 7,4 à  
0°C.

**FIG. 32 :** TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE L'HOMOGENAT  
D'ENCEPHALE DE RAT.

(terminaisons pré-synaptiques détachées du neurone, sous forme de particules renfermant toutes les principales structures de la synapse).

Le déroulement des opérations, présenté sur la figure 32, est le suivant :

\* L'homogénat est soumis à une première centrifugation (1000 g, pendant 10 minutes), permettant l'élimination d'un culot riche en organites (noyaux) et débris cellulaires, ainsi qu'en grands fragments de myéline.

\* Le surnageant, recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur réfrigérée, est centrifugé à 17000 g, pendant 55 minutes.

Cette opération permet de récupérer la fraction mitochondriale brute, dans le culot de centrifugation, fraction contenant des mitochondries, des petits fragments de myéline, des synaptosomes et quelques microsomes.

Le surnageant, quant à lui, renferme les microsomes (mélanges de fragments de saccules du réticulum endoplasmique, de ribosomes et de lambeaux de membranes d'autres organites), les ribosomes et la fraction post-microsomale presque exclusivement constituée de ribosomes.

\* Le culot contenant la fraction mitochondriale brute est remis en suspension dans 3 ml d'une solution glacée de saccharose 0,32 M, à l'aide d'une pipette Pasteur réfrigérée, puis est déposé sur un gradient de densité discontinu au saccharose préparé à l'aide de solutions glacées 0,8 M et 1,2 M, à raison de 5 ml pour chaque solution (figure 33).

L'ensemble est alors centrifugé à 53500 g, pendant 2 heures.

Cette troisième centrifugation permet la séparation de trois fractions (figure 33) :

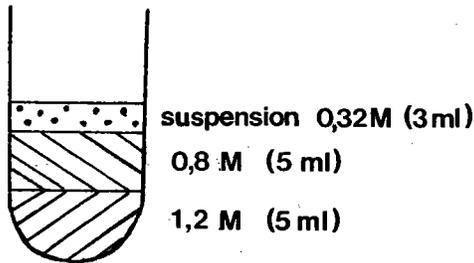
- **Fraction A**, obtenue à l'interface des couches de saccharose à 0,32 M et 0,8 M et renfermant des fragments de myéline, avec éventuellement quelques synaptosomes.

- **Fraction B**, obtenue à l'interface des couches de saccharose

à 0,8 M et 1,2 M et renfermant les terminaisons nerveuses (fraction synaptosomale).

- **Fraction C**, formant le culot de centrifugation et regroupant les mitochondries.

Avant centrifugation



Après centrifugation

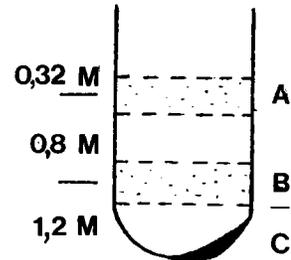


FIG. 33 : ASPECT DU GRADIENT DE DENSITE DISCONTINU EN SACCHAROSE.

\* Chacune des fractions A et B est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur réfrigérée, puis diluée dans de l'eau distillée glacée, afin d'atteindre une concentration en saccharose d'environ 0,45 M.

Une quatrième centrifugation est alors effectuée à 10 g, pendant une heure, et permet de récupérer un culot contenant la fraction A ou B.

Chaque culot est ensuite remis en suspension, à l'aide d'une pipette Pasteur réfrigérée, dans une solution de tampon TRIS (50 mM) (Tris hydroxy-méthyl-aminométhane, Merck, Darmstadt), ajustée à un pH de 7,4 à 0°C, avec une solution HCl 1 N.

Le volume final (6,75 ml) est adapté à la concentration protéique, choisie de façon à réaliser un maximum d'essais, tout en conservant une liaison spécifique acceptable (Bernabé, 1986).

\* La suspension ainsi obtenue est congelée à -20°C, jusqu'à son utilisation.

Remarque : La plupart des manipulations (remises en suspension, prélèvements des solutions, réalisation du gradient de saccharose et des dilutions) sont réalisées à 0°C, avec des instruments réfrigérés.

### 2.2.3 Contrôle de la pureté des fractions A et B par microscopie électronique

Les analyses portent sur les culots non congelés, obtenus après la dernière centrifugation ( $10^5$  g, pendant une heure) effectuée au cours du fractionnement sub-cellulaire de l'homogénat.

Les échantillons vont subir successivement les étapes de fixation, déshydratation, imprégnation, inclusion et coloration, nécessaires à toute observation en microscopie électronique.

Toutes ces opérations sont réalisées à des températures variant de 0 à 4°C.

#### \* Fixation

Chaque culot est remis en suspension dans un mélange fixateur (glutaraldéhyde 1,54 % - formaldéhyde 1,54 %).

Chaque suspension est ensuite diluée dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M, de pH compris entre 7,2 et 7,4, et est agitée à intervalles réguliers.

Au bout de trente minutes, l'excédent de mélange fixateur (surnageant) est éliminé par centrifugation à 6000 tours par minute, pendant dix minutes (centrifugeuse E 61 Jacan, Paris).

Le culot, contenant la fraction A ou B, est soumis à un lavage de cinq minutes, en présence de tampon cacodylate de sodium 0,1 M.

Une deuxième centrifugation permet d'éliminer le tampon (surnageant).

Le culot est alors mis au contact d'acide osmique à 1 % dilué dans du tampon cacodylate de sodium, pendant une heure, la préparation étant agitée à intervalles réguliers.

Une troisième centrifugation permet d'éliminer l'excédent d'acide osmique (surnageant).

Le culot obtenu est soumis à deux lavages successifs de cinq minutes, en présence de tampon cacodylate de sodium 0,1 M.

#### **\* Deshydratation**

L'échantillon précédemment fixé est déshydraté par passage dans différents bains d'alcool successifs : alcool à 30°, à 50°, à 70°, chacun d'une durée de cinq minutes ; puis alcool à 95° (deux bains successifs de cinq minutes chacun) et finalement alcool à 100° (trois bains successifs de dix minutes chacun).

Les étapes suivantes sont effectuées au laboratoire de Biologie Moléculaire du Développement de Nancy, dirigé par le professeur Dauca (communication personnelle de P. Lehr et J.M. Keller).

#### **\* Imprégnation**

L'échantillon déshydraté est imprégné successivement à l'oxyde de propylène (deux imprégnations successives de dix minutes chacune), puis au mélange "oxyde de propylène - araldite epon" (3-1 V/V) durant trois heures et enfin au mélange "oxyde de propylène - araldite epon" (1-1 V/V) durant six heures.

#### **\* Inclusion**

L'échantillon imprégné est inclus dans l'araldite epon (araldite MCY 212 (5 ml) - epikote 812 (6,25 ml) - DDSA (15 ml) - DMP 30 (1ml)), successivement pendant 12 heures à la température du laboratoire, puis 12 heures à 38°C et 48 heures à 60°C.

Le mélange, ainsi polymérisé et refroidi, est malaxé pendant dix minutes.

Les coupes sont effectuées à l'ultra-microtome (Reichard OMV2).

### \* Coloration

Les coupes sont ensuite colorées par un mélange d'acétate d'uranyle à 5 % dilué dans l'eau bidistillée et l'alcool à 90° (1-1 V/V), pendant dix minutes.

Trois lavages successifs sont réalisés, le premier dans l'acide acétique à 1 % dilué dans l'alcool à 50°, les deux suivants dans l'eau distillée.

Les coupes sont alors mises au contact d'une solution de citrate de plomb, pendant vingt minutes.

Deux derniers lavages sont réalisés dans l'eau distillée.

### \* Séchage

Les coupes colorées sont séchées sur papier filtre, pendant au moins deux heures.

Les échantillons ainsi préparés sont observés au microscope électronique (microscope électronique Siemens Zeiss EM 9 S2).

#### 2.2.4 Contrôle de l'activité ATPasique des fractions A et B

Le contrôle de l'activité enzymatique repose sur le dosage des ions phosphates inorganiques libérés au cours de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, réaction catalysée par l'ATPase Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> dépendante, en présence d'ions Mg<sup>2+</sup> :  $ATP \rightleftharpoons ADP + H_3PO_4$ . Par réaction avec du molybdate, en présence d'un mélange acide et d'un agent réducteur, l'orthophosphate forme un complexe phosphomolybdate, de coloration bleue proportionnelle à la concentration en ions PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, se prêtant à un dosage colorimétrique.

La méthode choisie (Baginsky et coll., 1967), décrite par Férard (1986), consiste à doser deux activités enzymatiques différentes : d'une part, l'activité de l'ATPase dépendante du magnésium peut être évaluée par incorporation au milieu réactionnel d'ouabaine, glycoside cardiaque inhibant sélecti-

vement la pompe à sodium et bloquant par conséquent l'ATPase  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  dépendante sans affecter l'ATPase  $\text{Mg}^{2+}$  dépendante ; d'autre part, le dosage de l'activité globale de ces deux enzymes permet, par différence, d'estimer l'activité de l'ATPase  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  dépendante.

Les fractions A et B diluées dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C) sont analysées, mais également l'homogénat d'encéphale à 10 % obtenu avant fractionnement sub-cellulaire, ces trois préparations ayant été congelées pendant 24 heures, avant leur utilisation.

**\* Essai 1 : évaluation de l'activité ATPase Mg dépendante**

Le mélange suivant est réalisé :

50  $\mu\text{l}$  de solution NaCl (2 M/l) et KCl (0,2 M/l)

50  $\mu\text{l}$  de solution  $\text{MgCl}_2$  (60 mM/l)

100  $\mu\text{l}$  d'ouabaine (10 mM/l) (ouabaine cristallisée, Boehringer Mannheim), diluée extemporanément dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C)

500  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C)

100  $\mu\text{l}$  de préparation membranaire à analyser.

**\* Essai 2 : évaluation de l'activité globale des deux ATPases**

50  $\mu\text{l}$  de solution NaCl (2 M/l) et KCl (0,2 M/l)

50  $\mu\text{l}$  de solution  $\text{MgCl}_2$  (60 mM/l)

600  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C)

100  $\mu\text{l}$  de la préparation à analyser

**\* Essai 3 : témoin**

50  $\mu\text{l}$  de solution NaCl (2 M/l) et KCl (0,2 M/l)

50  $\mu\text{l}$  de solution  $\text{MgCl}_2$  (60 mM/l)

100  $\mu\text{l}$  d'ouabaine (10 mM/l), diluée extemporanément dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C)

500  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C).

La réaction est déclenchée par addition de 200  $\mu$ l d'ATP disodique (ATP disodique cristallisé 15 mM/l, Boehringer, Mannheim) dilué extemporanément dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 à 37°C).

Le mélange est alors incubé à 37°C, dans un bain-marie agité, pendant dix minutes.

La réaction est stoppée par addition de 1 ml du mélange "acide L<sup>+</sup> ascorbique (0,4 g) - acide trichloroacétique à 20 % (10 ml)" réalisé extemporanément, à la température de la glace.

Afin d'homogénéiser les volumes respectifs des trois échantillons, 100  $\mu$ l de fraction à analyser sont ajoutés dans l'essai témoin (3).

Les protéines précipitées par l'acide trichloroacétique sont éliminées par centrifugation (ultracentrifugeuse Kontron TG 50 réfrigérée) à 4000 tours/minute, pendant cinq minutes dans des plots réfrigérés.

#### **Dosage du phosphore inorganique**

Un ml du surnageant, précédemment obtenu après centrifugation et contenant l'orthophosphate, est additionné de 0,5 ml d'heptamolybdate d'ammonium à 1 % (p/v) (Prolabo).

Après agitation, l'excédent d'heptamolybdate (non complexé avec l'orthophosphate) est piégé par l'addition de 1 ml d'un mélange à base de metarséniate de sodium à 2 % (Merck, Darmstadt) dilué dans la moitié du volume final d'eau distillée, de citrate trisodique à 2 % (Merck, Darmstadt) et d'acide acétique à 2 % (Prolabo).

La préparation est alors laissée au repos à la température de la pièce, pendant dix minutes.

La densité optique (DO) est lue à 847 nm, par rapport au témoin (essai 3) (spectrophotomètre Uvikon 810/820, Kontron). Chaque mesure (homogénat, fraction A et fraction B) est dupliquée.

Parallèlement à ces opérations, une gamme étalon est réalisée, à partir d'une solution mère de phosphate de potassium ( $K_2HPO_4$

3 H<sub>2</sub>O, Merck, Darmstadt) : solution à 0,4 mM/l obtenue à partir d'une solution à 20 mM/l)

: GAMME ETALON :	SOLUTION MERE	H <sub>2</sub> O distillée:
: (µmole/ml) :	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,4 mM/l) +	(ml) :
: 0,08 :	0,2 ml	0,8 :
: 0,16 :	0,4 ml	0,6 :
: 0,24 :	0,6 ml	0,4 :
: 0,32 :	0,8 ml	0,2 :
: 0,40 :	1 ml	0 :

Un ml du mélange "acide ascorbique - acide trichloroacétique froid" est ajouté à chaque concentration de la gamme étalon.

La préparation est alors laissée au repos pendant cinq minutes, puis 1 ml de chaque solution est prélevé et additionné de 0,5 ml d'heptamolybdate d'ammonium, puis de 1 ml du mélange "citrate arséniate".

Après dix minutes de repos, à la température de la pièce, la densité optique est lue à 847 nm, par rapport au témoin.

### 2.2.5 Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale

La qualité de la fraction synaptosomale (B) obtenue varie d'une expérimentation à l'autre, notamment sa teneur en protéines. Aussi, afin d'homogénéiser les résultats, la radioactivité mesurée est rapportée au mg de protéines de la fraction considérée.

Cette teneur en protéines est estimée selon la technique de Lowry et coll. (1951) modifiée par Miller (1959). Le principe en est le suivant :

En milieu alcalin, les protéines réagissent avec le réactif au phénol de Folin et Ciocalteu, en présence d'ions Cu<sup>2+</sup>, pour former un complexe de coloration bleutée, proportionnelle à la

concentration protéique et se prêtant à un dosage colorimétrique.

Les mesures sont effectuées sur des triplicats.

Chaque échantillon contient 0,1 ml de la fraction protéique à tester, diluée au 1/10 dans de l'eau distillée ; 0,4 ml de soude normale (NaOH 1 N) et 0,5 ml d'eau distillée.

Un ml d'un réactif tartro-cuivrique préparé extemporanément est ajouté à chaque préparation, ce réactif contient 20 ml d'une solution de carbonate disodique à 10 % (Prolabo), 1,8 ml d'une solution de tartrate de sodium à 1 % (Prolabo) et 0,2 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 5 % (Prolabo).

Après agitation, puis mise au repos pendant dix minutes, 3 ml de réactif de Folin Ciocalteu (Prolabo), dilué extemporanément 11 fois dans de l'eau distillée, sont ajoutés.

Les échantillons sont à nouveau agités, puis placés au bain-marie à 50°C pendant dix minutes exactement et sous agitation continue.

Ceux-ci sont alors laissés au repos pendant dix minutes, à la température de la pièce et à l'obscurité.

La densité optique est lue à 500 nm (spectrophotomètre Kontron Uvikon 810).

Les témoins de lecture servant au réglage de l'auto-zéro du spectrophotomètre contiennent 0,5 ml de NaOH 1 N et 0,5 ml d'eau distillée.

Une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère d'albumine de plasma de boeuf diluée dans du NaCl 0,15 M (1 mg/10 ml), aux concentrations de 10, 20, 30, 40 et 50 µg/ml.

: GAMME	: SOLUTION MERE	: NaOH 1N	: H2O DISTILLEE	:
: ETALON	: ALBUMINE 0,15M	:	:	:
: (µg/ml)	: (ml)	: (ml)	: (ml)	:
: 10	: 0,1	: 0,5	: 0,4	:
: 20	: 0,2	: 0,5	: 0,3	:
: 30	: 0,3	: 0,5	: 0,2	:
: 40	: 0,4	: 0,5	: 0,1	:
: 50	: 0,5	: 0,5	: 0	:

### 2.2.6 Etude in vitro de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques

La technique utilisée est celle de Braestrup et Squires (1977).

Le principe de cette étude consiste dans le déplacement d'une benzodiazépine marquée de ses sites récepteurs spécifiques, sous l'action de différentes concentrations d'une benzodiazépine non marquée (froide) ou de l'extrait végétal.

L'expérimentation se déroule en quatre étapes successives:

#### \* Incubation

La fraction synaptosomale est mise à incuber dans des piluliers en verre d'une contenance de 12 ml (Prolabo), en présence de flunitrazépan tritié (New-England Nuclear, Dupont de Nemours, Paris), après agitation, pendant 90 minutes et à la température de la glace.

Le volume de fraction synaptosomale introduit dans chaque essai (0,250 ml) a été sélectionné, lors d'études précédemment réalisées pour la mise au point de la technique (Bernabé, 1986), de telle façon que la concentration protéique de chaque essai soit comprise entre 0,7 et 0,915 mg, concentration permettant l'obtention d'une liaison spécifique acceptable (90 à 96 %) et en accord avec la littérature.

Selon les essais (détaillés ultérieurement), le milieu d'incubation peut ou non contenir une concentration donnée de diazépam froid (diazépam cristallisé, laboratoires Roche, Neuilly sur Seine) et/ou d'extrait végétal.

#### \* Filtration

Après 90 minutes d'incubation, le milieu est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur réfrigérée, puis filtré sous vide (filtre Whatman GF/F, en fibre de verre D25, Descharmes, Heillecourt (54)).

Le pilulier d'incubation est rincé deux fois avec 1 ml de tampon Tris-HCl réfrigéré et de pH 7,4 (Merck, Darmstadt), tandis que le filtre est ensuite rincé trois fois avec 5 ml de ce même tampon.

Ainsi, la molécule marquée, fixée sur les sites récepteurs spécifiques et non spécifiques, est récupérée sur le filtre, l'excédent de flunitrazépam tritié se retrouvant dans le filtrat.

#### **\* Séchage**

Le filtre est ensuite séché, sous une lampe à incandescence blanche (100 W), pendant vingt minutes.

#### **\* Détermination de la radio-activité retenue par le filtre**

Après séchage, le filtre est introduit dans une fiole de comptage (Kontron, St Quentin en Yvelines (78)), contenant 10 ml d'instagel (Packard, Rungis (94)).

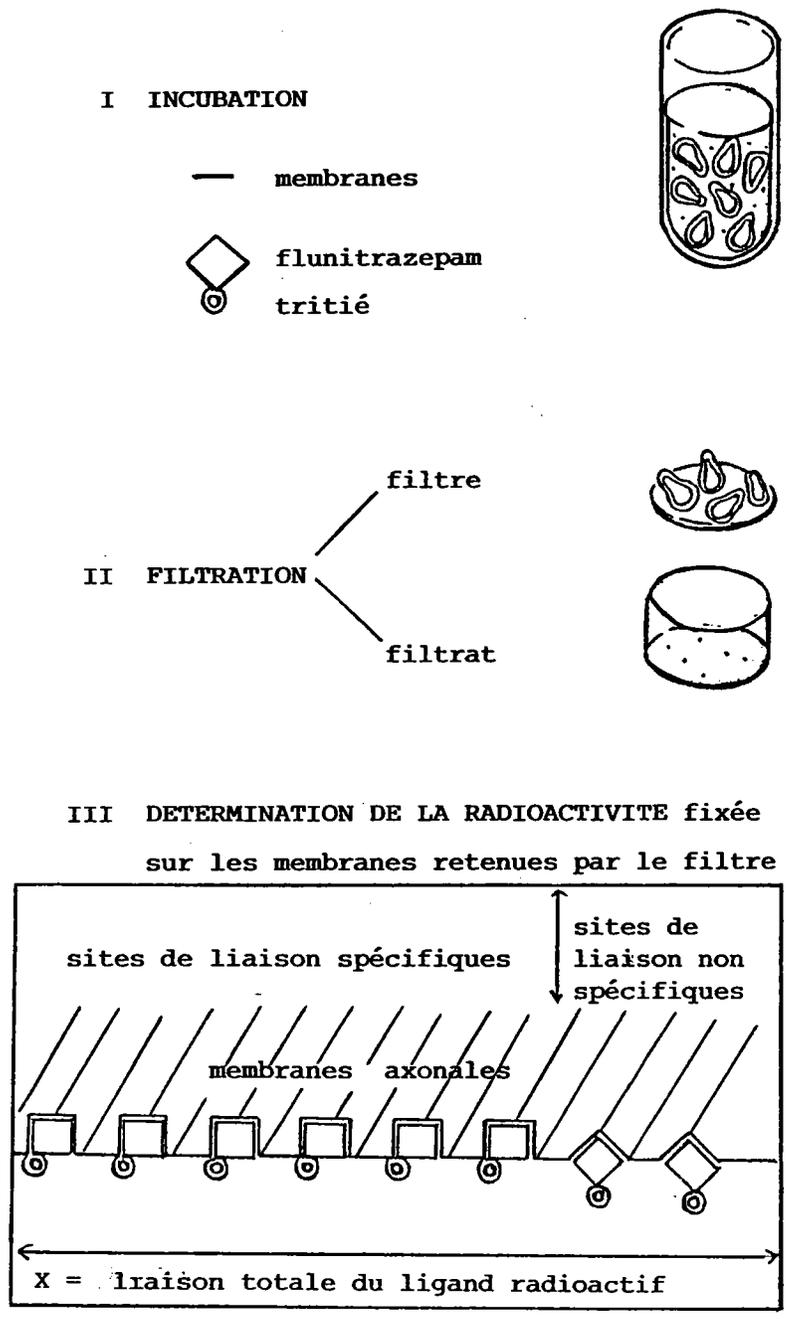
Le comptage de la radio-activité (compteur à scintillation LKB Minibeta 1211, Wallac Oy, Finlande) est effectué 24 à 48 heures après l'immersion du filtre dans l'instagel, la fiole étant laissée à la température de la pièce.

#### **2.2.6.1 Etude du déplacement d'une benzodiazépine marquée (flunitrazépam tritié) de ses sites récepteurs spécifiques, par une benzodiazépine froide (diazépam)**

Deux expérimentations sont réalisées :

#### **Essai 1 : Caractérisation des sites de fixation spécifiques et non spécifiques, contenus dans la fraction synaptosomale (liaison totale)**

En présence des membranes synaptosomales, le flunitrazépam tritié, ajouté à faible concentration, se fixe au niveau des sites récepteurs spécifiques et non spécifiques aux benzodiazépines (figure 34).



**FIG. 34 :** CARACTERISATION DES SITES DE LIAISON SPECIFIQUES ET NON SPECIFIQUES (essai I).

La radio-activité mesurée rend compte de cette liaison totale.

Les quatre étapes précédemment détaillées (incubation, filtration, séchage, comptage radio-actif) sont réalisées sur un milieu contenant :

- 0,250 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée
- 1,550 ml de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4 à 0°C)
- 0,2 ml de flunitrazéпам tritié (0,2 pM/essai)

Chaque échantillon, d'un volume total de 2 ml, est réalisé en trois ou quatre exemplaires.

### Essai 2 : Caractérisation des sites de fixation spécifiques aux benzodiazépines

En présence des membranes synaptosomales marquées par le flunitrazéпам tritié fixé au niveau des sites récepteurs spécifiques et non spécifiques, le diazéпам froid ajouté en excès ( $0,5 \cdot 10^{-2}$  mg/essai) dans le milieu d'incubation déplace la benzodiazépine marquée de tous les sites spécifiques (figure 35)

La radio-activité mesurée permet d'évaluer la **liaison non spécifique**. Par différence avec la radio-activité obtenue lors du premier essai (liaison totale), la **liaison au niveau des sites récepteurs spécifiques** peut être déterminée.

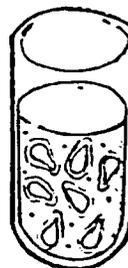
Par variation des concentrations en ligand froid, le flunitrazéпам tritié est plus ou moins déplacé des sites récepteurs spécifiques. Ceci nous permet d'établir une relation entre la concentration en ligand froid et le pourcentage de ligand marqué fixé, définie par le rapport suivant :

$$\text{radio-activité mesurée} / \text{liaison spécifique} \times 100$$

La CI 50, concentration en ligand froid déplaçant 50 % du ligand marqué, peut ainsi être évaluée, selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

I INCUBATION

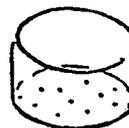
- membranes
- ◇ flunitrazepam tritié
- diazepam non marqué



II FILTRATION

filtre

filtrat



III DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE fixée sur les membranes retenues par le filtre

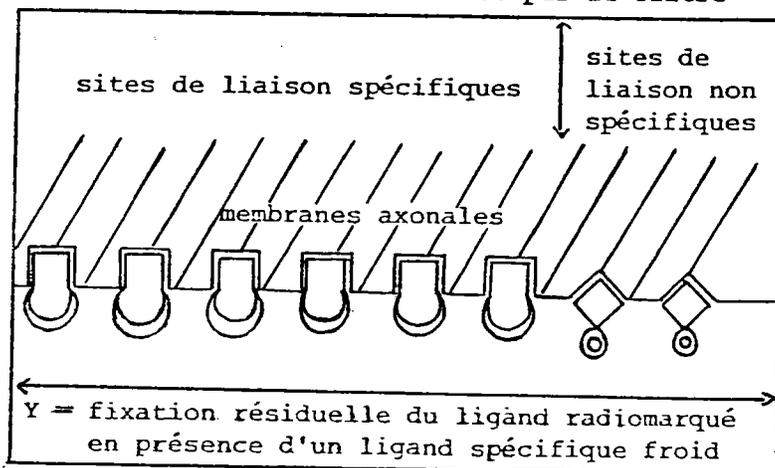


FIG. 35 : CARACTERISATION DES SITES DE LIAISON SPECIFIQUES (essai II).

Les quatre étapes précédemment détaillées (incubation, filtration, séchage, comptage radio-actif) sont réalisées sur un milieu contenant :

- 0,250 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée
- 1,350 ml de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4 à 0°C)
- 0,2 ml d'une solution de diazépam de concentration donnée ( $0,5 \cdot 10^{-2}$  -  $0,5 \cdot 10^{-3}$  -  $10^{-4}$  -  $0,5 \cdot 10^{-4}$  -  $10^{-5}$  -  $0,5 \cdot 10^{-5}$  -  $10^{-6}$   $0,5 \cdot 10^{-6}$  mg/essai), obtenue par dissolution du diazépam pur cristallisé dans du HCl 1 N, puis dilution dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4 à 0°C) jusqu'à l'obtention d'une solution mère  $10^{-6}$  M.
- 0,2 ml de flunitrazépam tritié (0,2 pM/essai).

Chaque échantillon, d'un volume final de 2 ml, est réalisé en trois ou quatre exemplaires.

#### 2.2.6.2 Etude de l'influence d'E. hirta sur les sites récepteurs benzodiazépiniques

\* Influence d'E. hirta vis-à-vis de la fixation du flunitrazépam tritié au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques (expérimentation A)

La procédure expérimentale est identique à celle de l'essai 2 précédemment détaillé (paragraphe 2.2.6.1).

L'extrait végétal, dissous dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4 à 0°C), est ajouté en remplacement de la benzodiazépine froide, à différentes doses.

Pour chaque dose d'extrait testée, le flunitrazépam tritié fixé est évalué en pourcentage de liaison spécifique selon le rapport suivant :

**radio-activité mesurée / liaison spécifique x 100**

C'est pourquoi, il est nécessaire d'évaluer les liaisons totale (essai 1) et non spécifique (essai 2, avec le diazépam froid en excès).

La dose d'extrait initialement choisie, soit 0,4 mg de plante sèche (correspondant à 0,04 mg de lyophilisat), a été déterminée par extrapolation, à partir des équivalences évaluées pour le diazépam et concernant les doses utilisées couramment in vivo (3 mg/kg) et in vitro (CI 50 = 7,4 mM, soit 2,11 µg) ; d'où un facteur de  $10^3$  entre les tests in vivo et in vitro.

La dose sédatrice déterminée in vivo pour E. hirta est de 400 mg/kg ; d'où le choix d'une dose de 0,4 mg de plante sèche pour les essais in vitro. Les doses de 0,025 et 0,0125 mg correspondent aux doses anxiolytiques (25 et 12,5 mg/kg) déterminées in vivo.

Les quatre étapes précédemment détaillées (incubation, filtration, séchage, comptage radio-actif) sont réalisées sur un milieu contenant :

- 0,250 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée.
- X ml de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4 à 0°C)
- Y ml d'extrait végétal testé aux doses de 40 - 20 - 4 - 2 - 1 - 0,8 - 0,4 - 0,04 - 0,025 ou 0,0125 mg de plante sèche/essai (correspondant respectivement à 4 - 2 - 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,08 - 0,04 - 0,004 -  $2,6 \cdot 10^{-3}$  et  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mg de lyophilisat/essai), préparées à partir d'une solution mère de 400 mg de plante sèche dissous dans 10 ml de tampon Tris-HCl. Le volume Y varie selon la dose d'extrait considérée, mais reste toujours inférieur ou égal à 1 ml.
- 0,2 ml de flunitrazépam tritié (0,2 pM/essai).

Chaque échantillon, d'un volume final de 2 ml, est réalisé en trois exemplaires.

\* Influence d'E. hirta vis-à-vis de l'action exercée par le diazépam froid, sur le déplacement du flunitrazépam tritié des sites récepteurs benzodiazépiniques (expérimentation B)

Le diazépam froid déplace le ligand marqué de tous ou une partie des sites récepteurs spécifiques aux benzodiazépines,

selon qu'il est ajouté en excès ou non.

L'addition d'extrait végétal permet d'étudier son influence vis-à-vis de ce déplacement et donc d'envisager une éventuelle compétition entre E. hirta et le diazépam froid pour l'occupation des sites récepteurs.

Cette expérimentation ne diffère de la précédente (A) que par l'addition supplémentaire, au milieu d'incubation, de 0,2 ml de diazépam froid à une concentration donnée.

Le volume X de tampon Tris-HCl est ajusté de façon à obtenir un volume final de 2 ml pour chaque essai.

Deux types d'expérimentations sont réalisés :

D'une part, l'influence d'une dose d'extrait végétal de 0,4 mg (exprimée en mg de lyophilisat) est envisagée, vis-à-vis du déplacement occasionné par le diazépam ajouté en excès ( $0,5 \cdot 10^2$  mg/essai) ; d'autre part, les effets de l'association "E. hirta 4 mg (lyophilisat) - diazépam  $10^{-5}$  mg sont étudiés sur le taux de fixation du flunitrazépam tritié.

#### 2.2.6.3 Influence de Poa sp. sur les sites récepteurs benzodiazépiniques

La procédure expérimentale est identique à celle employée pour E. hirta (2.2.6.2 A et B).

L'extrait de Poa sp., est testé à la dose de 40 mg de plante sèche (soit 5,7 mg de lyophilisat).

Toutefois, dans le cas de l'association "Poa sp. - diazépam" (expérimentation B), cette benzodiazépine froide n'est employée qu'à  $10^{-5}$  mg.

#### 2.2.6.4 Remarques

L'influence de différents paramètres sur le comptage de la radio-activité doit être prise en considération. C'est le cas de l'interaction éventuelle de l'instagel seul, du filtre seul (non traité) et du filtre soumis aux étapes successives

d'incubation (en l'absence de ligand marqué), de filtration, de séchage et de comptage.

Pour ce faire, différents échantillons sont réalisés et soumis au comptage :

- échantillon contenant 10 ml d'instagel
- échantillon contenant 10 ml d'instagel et un filtre non traité
- échantillon contenant 10 ml d'instagel et un filtre traité.

Ce dernier essai permet d'évaluer le bruit de fond efficace de l'appareil (compris entre 50 et 70 cpm selon les expérimentations), valeur qui doit être retranchée de chaque mesure radio-active.

La qualité du flunitrazépan tritié est contrôlée par comptage d'un échantillon tripliqué contenant 10 ul de solution radio-active et 10 ml d'instagel (compris entre 6000 et 10000 cpm selon les expérimentations).

## V - 3 RESULTATS

### 3.1 Contrôle de la pureté des fractions A et B, par microscopie électronique

Les commentaires accompagnant les électronographies ont été aimablement fournis par le professeur Delorme de l'Université de Lille, par l'intermédiaire de P. Lehr (Centre des Sciences de l'Environnement de Metz).

La photo 10 représente l'électronographie de la fraction A. Les éléments stratifiés (y), visibles sur cette photographie, permettent de conclure à la présence de fragments de myéline. De plus, la présence d'éléments non identifiés, accompagnant la myéline, est à signaler.

Ces conclusions sont en accord avec celles de Gray et Whittaker (1962) et de Whittaker et coll. (1964).

La photo 11 représente l'électronographie de la fraction synaptosomale B.

Trois synaptosomes (s) sont nettement reconnaissables, avec leur membrane plasmique (m) et les vésicules synaptiques (v), d'autres apparaissant de façon plus floue.

La présence de quelques mitochondries et lysosomes n'est pas exclue, mais reste compatible avec les observations de Gray et Whittaker (1962). Toutefois, sur les électronographies présentées par ces auteurs, l'épaisseur des coupes ne permet pas de quantifier cette contamination mitochondriale.

L'examen de ces deux électronographies nous permet donc de confirmer la présence des synaptosomes dans la fraction B, la fraction A renfermant essentiellement de la myéline.

Cette étude microscopique ayant porté sur plusieurs échantillons prélevés à partir des fractions A et B, nous pouvons confirmer l'absence de contamination d'une fraction sur l'autre, ainsi que la reproductibilité du prélèvement de la fraction synaptosomale B, utilisée pour l'expérimentation in vitro.

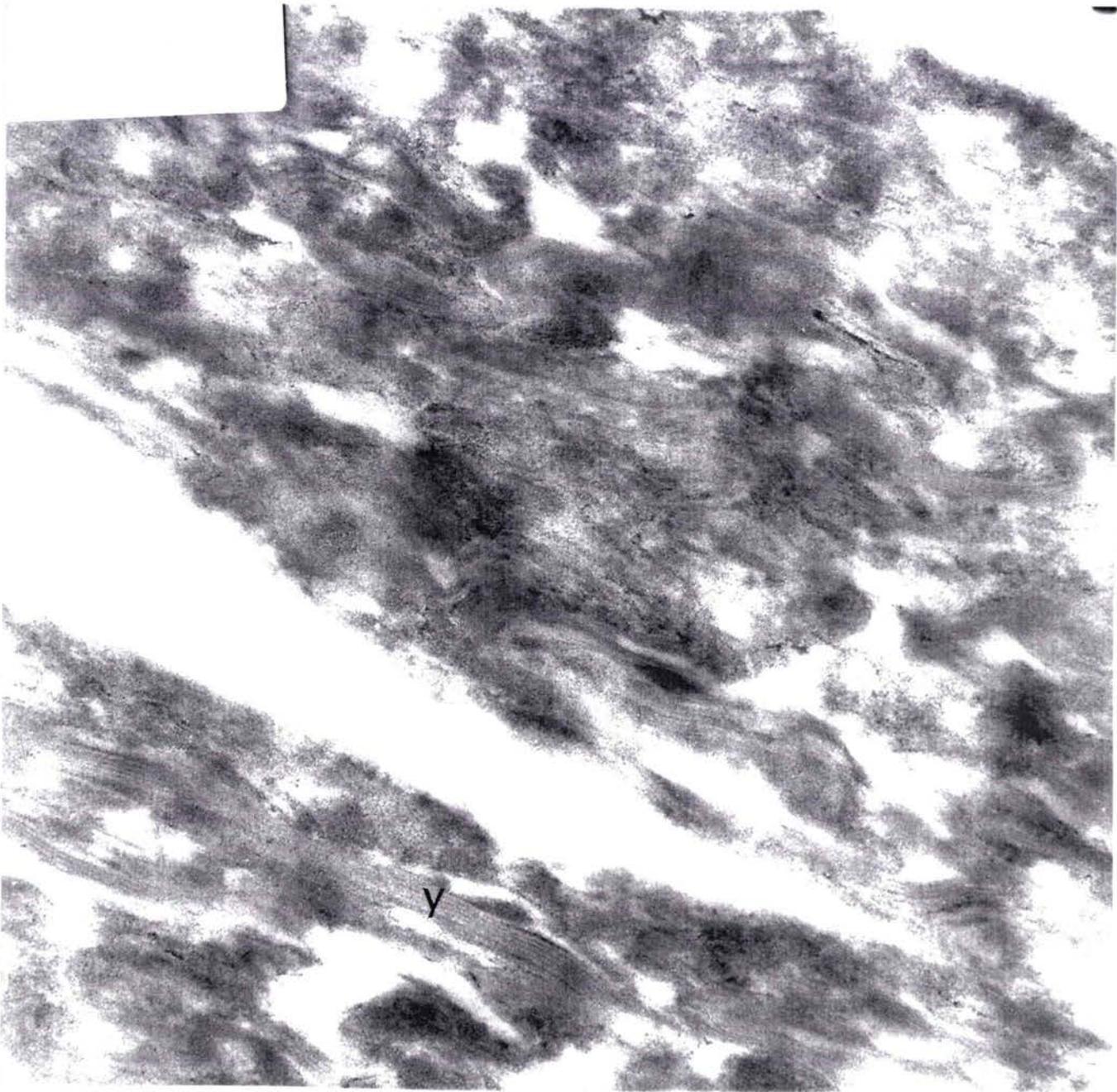


PHOTO 10 : ELECTRONOGRAPHIE DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE A.

G = x 28000

Y = FRAGMENTS DE MYELINE

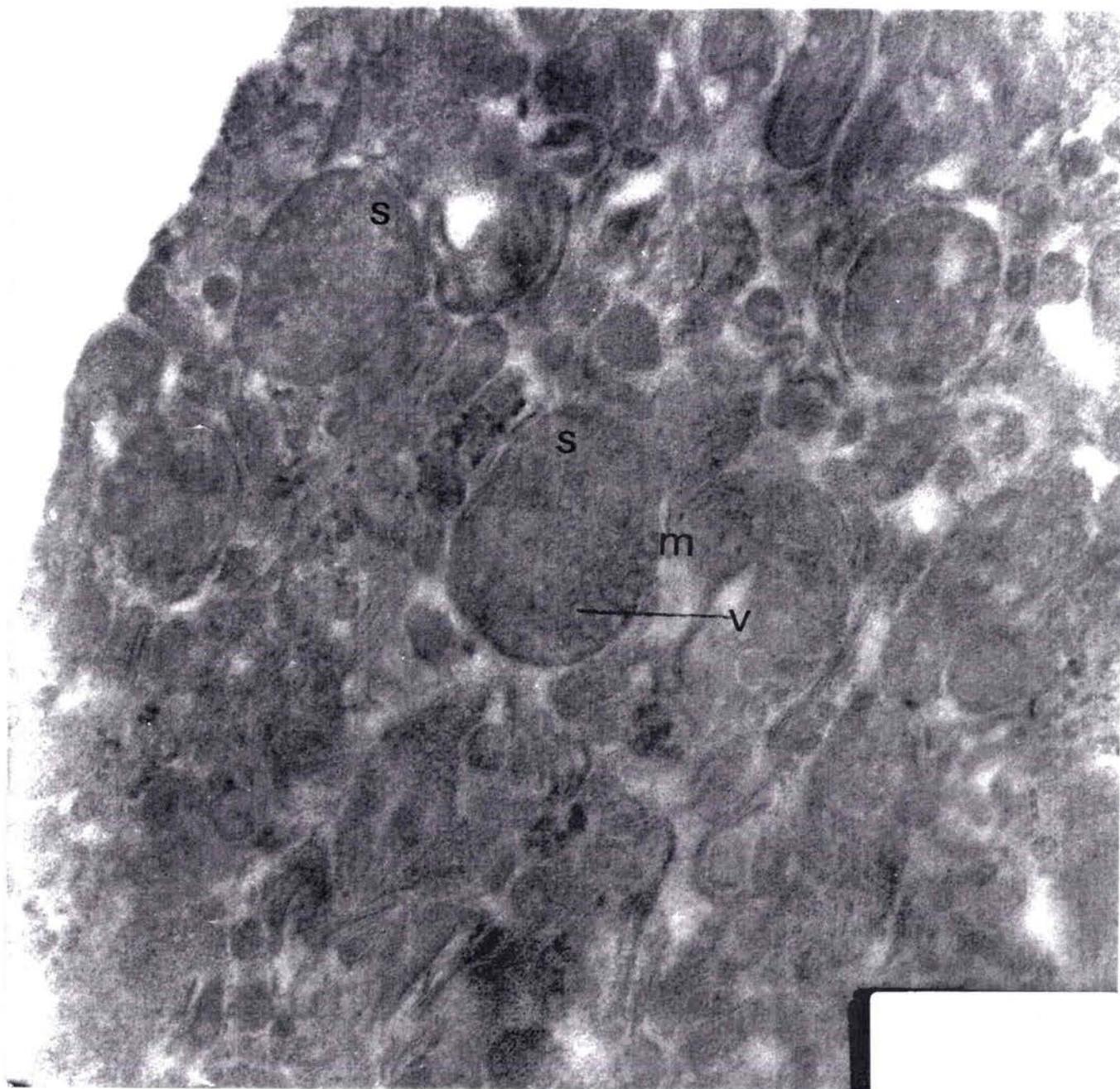


PHOTO 11 : ELECTRONOGRAPHIE DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE B.

G = x 84000

S = SYNAPTOSOMES

m = MEMBRANE PLASMIQUE

V = VESICULE SYNAPTIQUE

### 3.2 Contrôle de l'activité ATPasique des fractions A et B

#### Réalisation de la gamme étalon

La figure 36 , représentant l'évolution de la densité optique (DO) en fonction de la concentration en ions phosphates inorganiques ( $\mu\text{M/ml}$ ), permet d'établir une relation linéaire correcte, définie par l'équation suivante

$$Y = 4970 X + 22 \quad (r = 0,999).$$

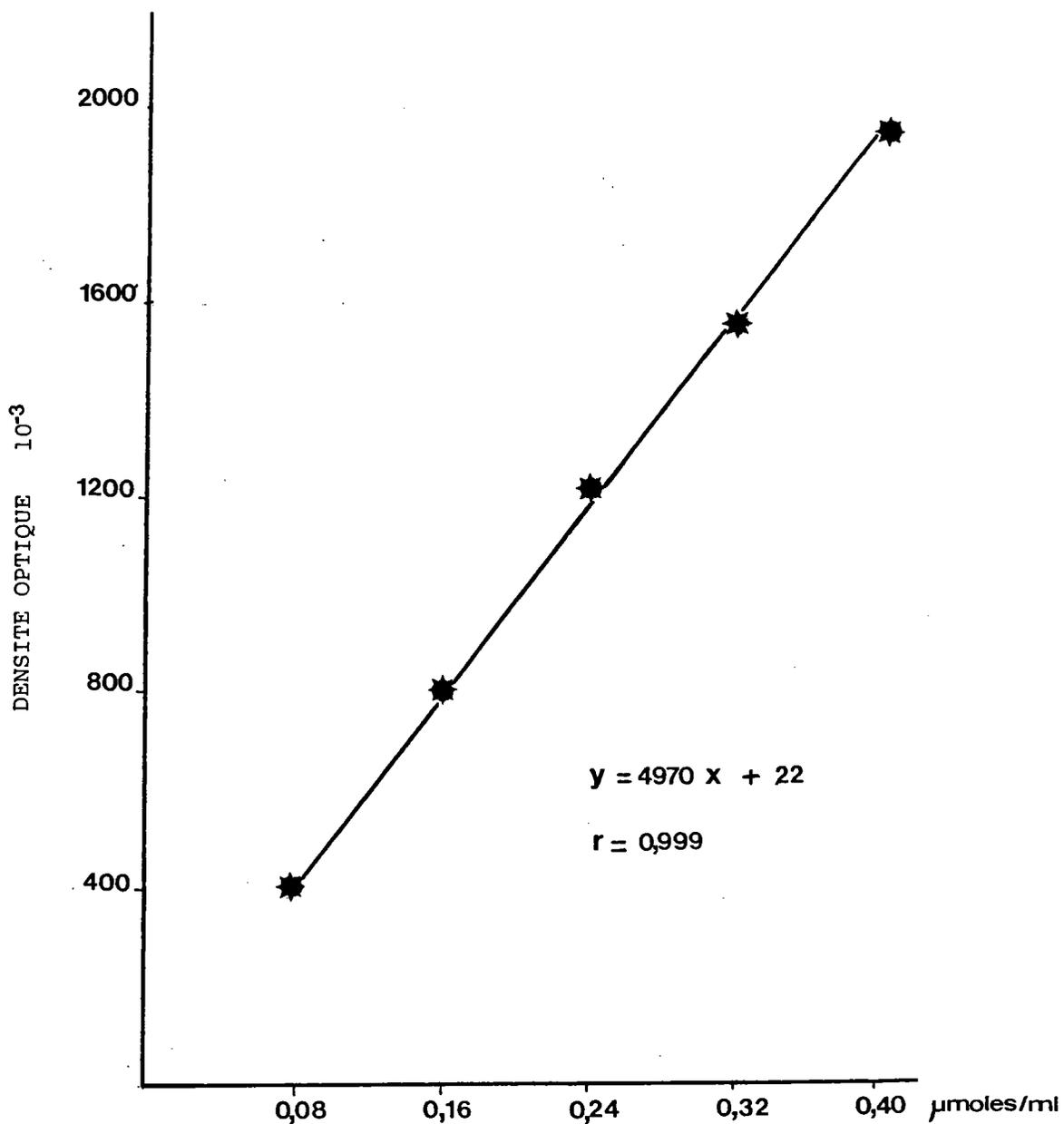
#### Evaluation de l'activité ATPasique des fractions A et B, par rapport à l'homogénat

Les résultats, présentés dans le tableau 39 et exprimés en  $\mu\text{moles}$  de phosphate inorganique libéré (Pi) par heure et par mg de protéines, révèlent un enrichissement conséquent de la fraction synaptosomale B en membranes plasmiques, en comparaison de la fraction A et de l'homogénat.

**TABLEAU 39** : ACTIVITE DE L'ATPase  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  DEPENDANTE DES FRACTIONS A ET B, PAR RAPPORT A L'HOMOGENAT.

PREPARATIONS MEMBRANAIRES	ACTIVITE ATPasique ( $\mu\text{moles Pi/mg}$ de protéines/heure) (N=2)
HOMOGENAT	$0,49 \pm 0,02$
FRACTION A	$2,37 \pm 0,33$
FRACTION B	$6,35 \pm 0,42$

N = nombre d'échantillons réalisés pour chaque préparation membranaire.



**FIG. 36 :** GAMME ETALON DU DOSAGE DES IONS PHOSPHATES  
INORGANQUES DANS L'EVALUATION DE L'ACTIVITE  
ATP ASIQUE .

### 3.3 Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale B

L'ensemble de ces expérimentations in vitro a nécessité l'isolement de quatre fractions synaptosomales B : fractions 1, 2, 3 et 4.

La teneur en protéines des quatre premières fractions a pu être évaluée en même temps. Aussi, deux gammes étalon ont été réalisées : l'une (1) correspondant aux trois premières fractions B, la seconde (2) effectuée lors du dosage protéique de la quatrième fraction B.

La figure 37, représentant l'évolution de la densité optique (Y) en fonction de la concentration en protéines ( $\mu\text{g/ml}$ ), permet d'établir une relation linéaire correcte, pour chacune des deux gammes étalon, définies par les équations respectives suivantes :

$$Y_1 = 0,0029 X_1 + 0,0006 \quad (r = 0,999)$$

$$Y_2 = 2,1367 X_2 - 1,367 \quad (r = 0,999)$$

#### **Evaluation de la concentration protéique de chaque fraction B**

L'équation caractérisant la gamme étalon considérée permet de calculer la concentration protéique X ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la fraction aliquote utilisée pour le dosage (gamme étalon (1) pour les fractions 1, 2 et 3 ; gamme étalon (2) pour la fraction 4)

La concentration protéique C (mg/ml) de la fraction synaptosomale B considérée peut ainsi être évaluée, selon le rapport :

$$C = X / 10 \text{ mg/ml.}$$

Chaque essai réalisé contenant 0,250 ml de fraction synaptosomale, la quantité de protéine contenue dans chacun d'entre eux ( $C_e$ ) peut être calculée selon la formule :

$$C_e = C \times 0,250 \text{ mg/essai}$$

**TABLEAU 40** : DOSAGE DES PROTEINES CONTENUES DANS LES DIFFÉRENTES FRACTIONS SYNAPTOSOMALES ISOLEES.

FRACTIONS B	DO.10 <sup>-3</sup> ± Es: (N=3)	X (µg/ml)	C (mg/ml)	Ce (mg/essai)
1	102 ± 1	35,2	3,5	0,875
2	94 ± 0,6	32,4	3,2	0,800
3	106 ± 0,6	36,5	3,6	0,900
4	81 ± 1	38,5	3,8	0,950

N = nombre d'échantillons

Les résultats présentés dans le tableau 40 sont en accord avec les travaux effectués par Bernabé (1986), lesquels mettaient en évidence une concentration protéique moyenne de  $3,21 \pm 0,37$  mg/ml de fraction, obtenue après dosage de 15 fractions synaptosomales différentes.

Ainsi, nous pouvons conclure à une bonne reproductibilité de la concentration protéique de la fraction synaptosomale isolée pour chaque expérimentation.

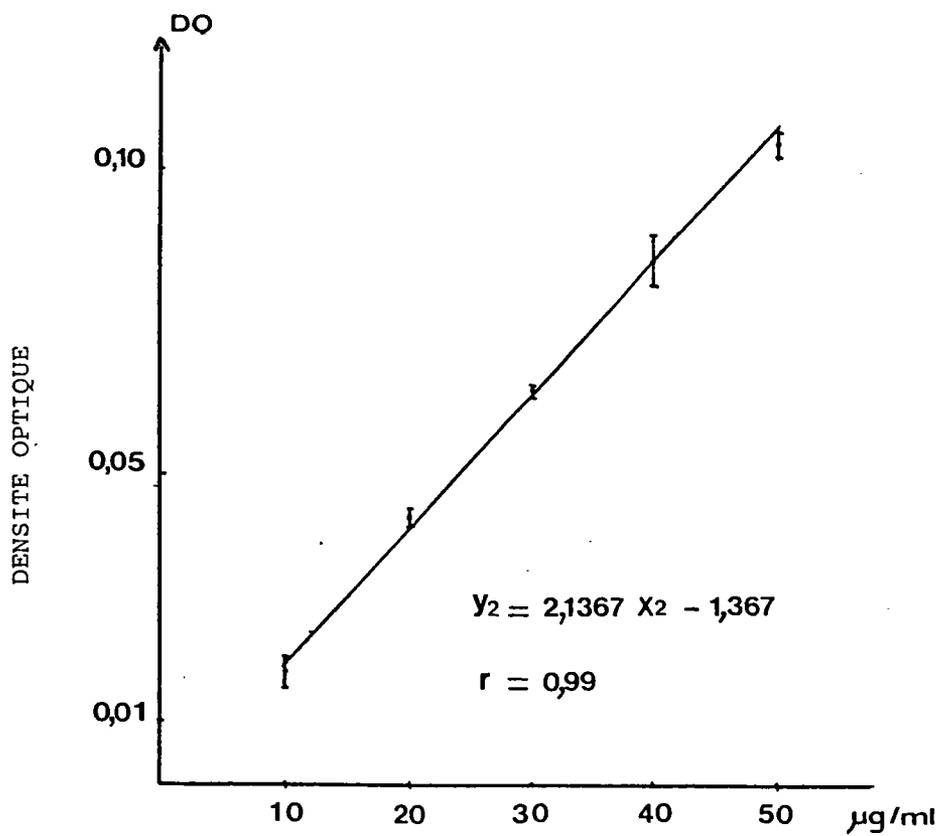
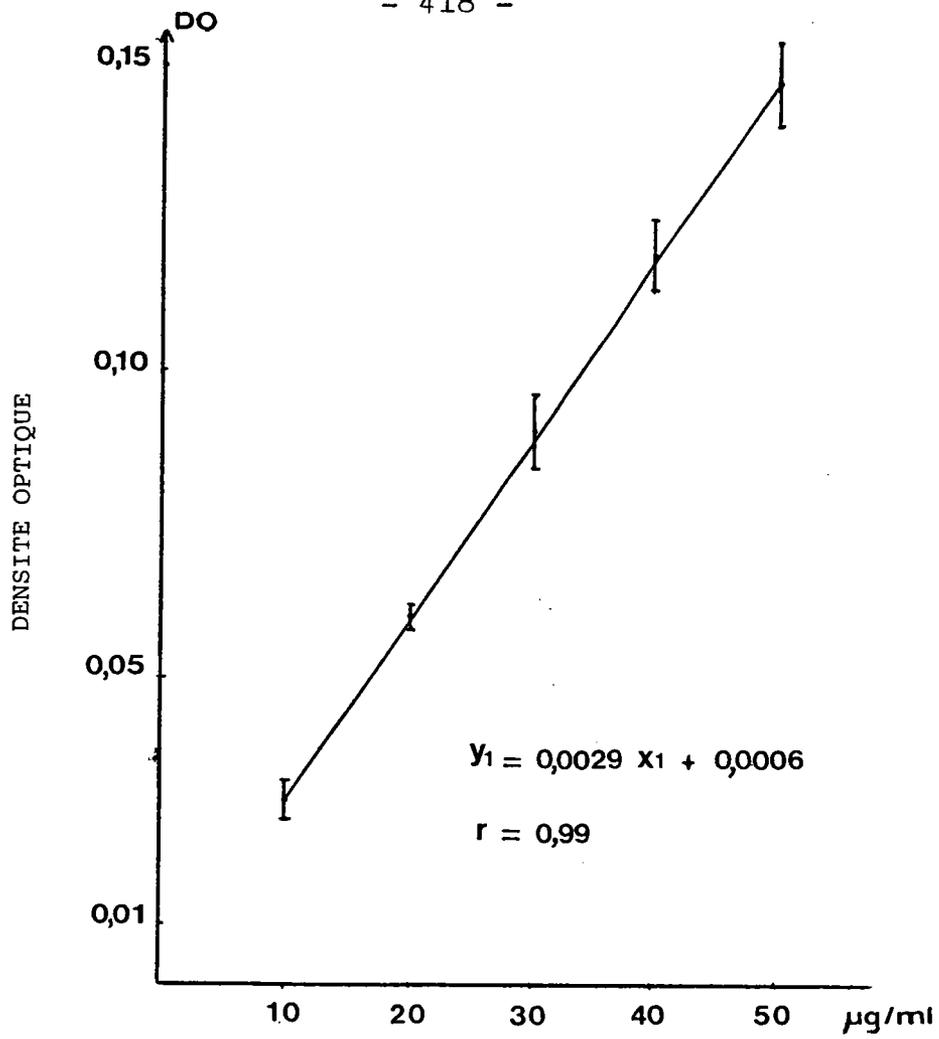


FIG. 37 : GAMMES ETALON DU DOSAGE DES PROTEINES.

### **3.4 Etudes in vitro de la liaison sur les récepteurs benzodiazépiniques**

#### **3.4.1 Evaluation de la liaison totale du flunitrazéпам tritié, au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques, ainsi que des liaisons spécifiques et non spécifique**

Chacune des quatre expérimentations réalisées in vitro, visant à étudier l'influence d'une benzodiazépine froide (diazéпам), ou d'un extrait végétal (E. hirta - Poa sp.), vis-à-vis de la fixation d'une benzodiazépine marquée (flunitrazéпам tritié) au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques, nécessite avant tout l'évaluation des liaisons totale, spécifique et non spécifique de cette molécule marquée.

##### **3.4.1.1 Evaluation de la fixation du flunitrazéпам tritié sur tous les sites récepteurs benzodiazépiniques (liaison totale)**

La quantification de cette **liaison totale** (fixation sur les sites récepteurs spécifiques et non spécifiques) est rendue possible, par la mise en incubation d'une concentration constante en flunitrazéпам tritié (0,2 pM/essai), en présence d'un volume constant (0,250 ml) de fraction synaptosomale définie par sa teneur en protéines (essai 1 détaillé dans le paragraphe "méthode" 2.2.6).

Les résultats, obtenus pour chacune des quatre fractions synaptosomales isolées, sont regroupés dans le tableau 41. Dans un souci d'homogénéité et afin de pouvoir comparer les différentes expérimentations, les taux moyens de radio-activité, obtenus à partir du comptage de trois ou quatre échantillons par essai et exprimés en coups par minute (cpm), sont rapportés au mg de protéines (taux de radio-activité en cpm / Ce).

Pour un même essai, seules sont conservées les valeurs radio-actives brutes (exprimées en cpm), obtenues sur les trois ou quatre échantillons et ne différant pas de plus de 10 % entre elles.

**3.4.1.2 Evaluation de la fixation du flunitrazépam tritié sur les sites récepteurs spécifiques (liaison spécifique) et sur les sites récepteurs non spécifiques (liaison non spécifique)**

La quantification de la **liaison non spécifique** est rendue possible par l'addition, dans le milieu d'incubation, d'une quantité excédentaire ( $0,5 \cdot 10^{-2}$  mg/essai) de diazépam froid (essai 2 détaillé dans le paragraphe "méthode" 2.2.6).

En effet, dans ces conditions, cette benzodiazépine froide déplace le flunitrazépam tritié, et donc la radio-activité, de tous les sites récepteurs spécifiques.

La radio-activité résiduelle rend compte des sites récepteurs non spécifiques aux benzodiazépines.

La **liaison spécifique**, quant à elle, est évaluée grâce à la différence : liaison totale - liaison non spécifique.

**TABLEAU 41 : EVALUATION DES LIAISONS TOTALE, NON SPECIFIQUE ET SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE.**

FRACTIONS	LIAISON		LIAISON NON SPECIFIQUE		LIAISON SPECIFIQUE	
	TOTALE	(LNS)	(LNS)	(LS)	(LS)	(LS)
B	(cpm/mg de protéines)	cpm/mg de protéines	pourcentage (LNS/LSx100)	cpm/mg de protéines	pourcentage LS=100-LNS%	
1	29.384	1014	3,6	28.370	96,4	
2	19.957	1394	7,5	18.563	92,5	
3	14.113	1099	8,4	13.014	91,6	
4	16.204	1258	8,4	14.946	91,6	

Ces résultats rendent compte de l'importante variabilité observée entre les différentes expérimentations, réalisées à des époques différentes, sur des fractions synaptosomales isolées également à des moments différents et conservées, sous forme congelée ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), pendant un temps variable (deux à sept jours), jusqu'à leur utilisation.

Si cette variabilité affecte peu la liaison non spécifique, elle se manifeste de façon plus conséquente sur la liaison spécifique.

Toutefois, les quatre pourcentages de liaison spécifique, relativement homogènes, pour les fractions 2, 3 et 4, restent acceptables et sont en accord avec la littérature qui accepte généralement une liaison spécifique variant de 90 à 96 % (Möhler et Okada, 1977 - Marangos et coll., 1979 - Lippa et coll., 1985).

#### **3.4.2 Etude du déplacement du flunitrazéпам tritié par le diazépam froid**

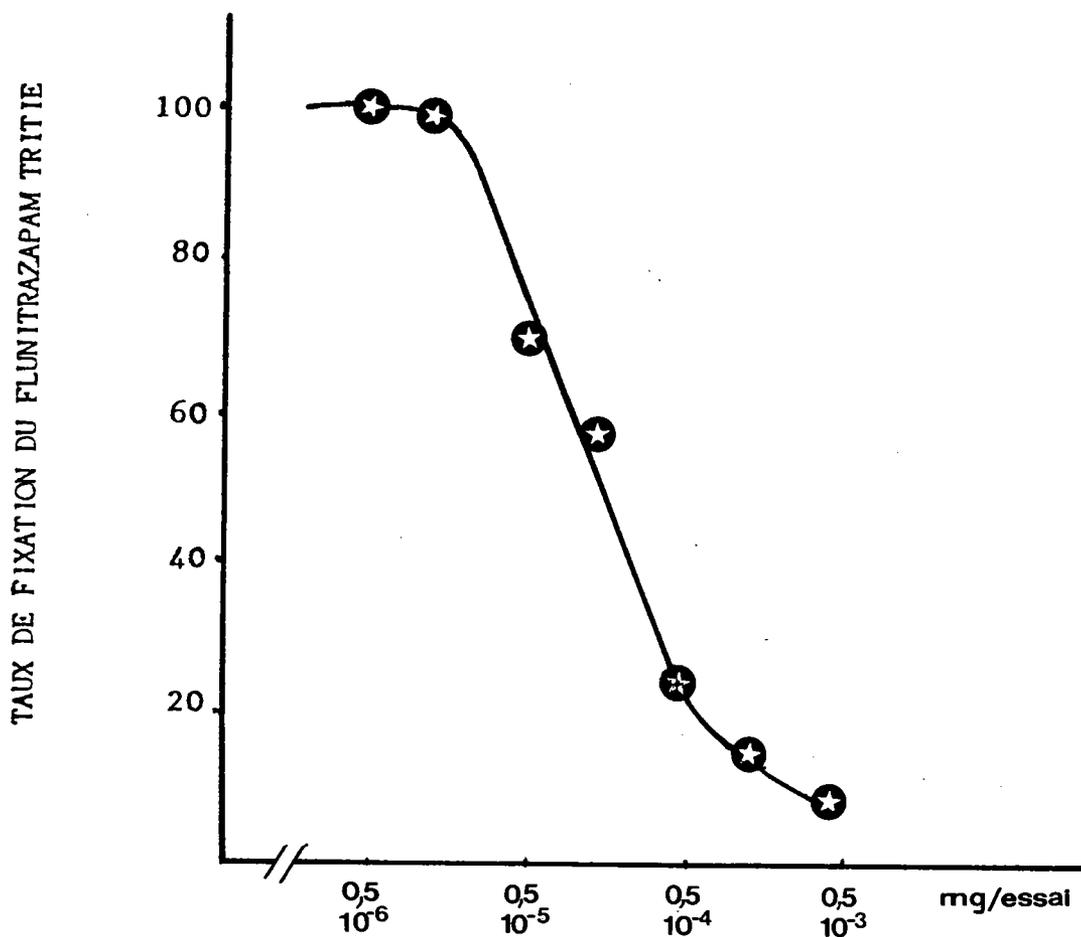
Cette expérimentation est réalisée sur la fraction synaptosomale 1.

Par variation des concentrations en ligand froid (diazépam), le flunitrazéпам tritié est plus ou moins déplacé des sites récepteurs spécifiques.

Ainsi, une relation effet-dose de nature sigmoïde (figure 38 ) peut être établie.

D'après les résultats reportés dans le tableau 42 , le ligand froid déplace le flunitrazéпам, à partir de la concentration de  $10^{-6}$  mg/essai, ce déplacement atteignant 96 % à la concentration de  $0,5 \cdot 10^{-3}$  mg/essai.

L'ED 50 du diazépam froid, calculée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949), est de  $1,33 \cdot 10^{-5}$  mg ( $1,26 \cdot 10^{-5}$  -  $1,40 \cdot 10^{-5}$  ), au risque de 5 %.



**FIG. 38 :** INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DIAZEPAM NON MARQUE SUR LA LIAISON DU FLUNITRAZEPAM TRITIE SUR LES SITES SPECIFIQUES DES BENZO-DIAZEPINES DES MEMBRANES SYNAPTOSOMALES DE CERVEAU DE RATS WISTAR.

**TABLEAU 42** : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DIAZEPAM FROID, SUR LA LIAISON DU FLUNITRAZEPAM AUX SITES RECEPTEURS SPECIFIQUES.

CONCENTRATION EN DIAZEPAM (mg/essai)	LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE (cpm/mg de protéines)	% de la liaison spécifique
$0,5 \cdot 10^{-3}$	1658	5,8
$10^{-4}$	3965	14
$0,5 \cdot 10^{-4}$	6064	21,4
$10^{-5}$	15911	56,1
$0,5 \cdot 10^{-5}$	19767	69,7
$10^{-6}$	28466	100,3
$0,5 \cdot 10^{-6}$	28429	100,2

**3.4.3 Evaluation de l'affinité d'E. hirta pour les récepteurs benzodiazépiniques**

**3.4.3.1 Influence d'E. hirta sur la fixation du flunitrazépam tritié**

Pour cette étude, deux expérimentations sont réalisées, nécessitant chacune une fraction synaptosomale donnée (fractions 2 et 3). Les liaisons totale, spécifique et non spécifique du flunitrazépam tritié, évaluées pour chacune de ces deux fractions, sont indiquées dans le tableau 41.

D'après les résultats obtenus pour ces deux expérimentations et reportés dans le tableau 43, l'extrait d'E. hirta n'influence pas la fixation du flunitrazépam tritié, sur les sites récepteurs benzodiazépiniques. Le faible déplacement, observé avec les plus fortes doses d'extrait végétal (2 et 4 mg de lyophilisat/essai), reste négligeable (déplacement induit par la plus forte dose, soit 4 mg de lyophilisat,

**TABEAU 43** : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'E. HIRTA SUR LA FRACTION DU FLUNITRAZEPAM TRITIE.

E. HIRTA (mg de lyophilisat par essai)	LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE			
	EXPERIMENTATION 1 (fraction 2)		EXPERIMENTATION 2 (fraction 3)	
	cpm/mg de protéines	% de la liaison spécifique	cpm/mg de protéines	% de la liaison spécifique
4	13.662	73,6	10.432	80,2
2	15.910	85,7	11.314	86,9
0,4	19.170	103,3	14.490	111,3
0,2	20.142	108,5	14.412	110,7
0,1	20.271	109,2	14.109	108,4
0,08	20.297	109,3	14.412	110,7
0,04	20.691	111,5	14.697	112,9
0,004	18.870	101,6	14.537	111,7
$2,6 \cdot 10^{-3}$	19.781	106,6	14.251	117,2
$1,3 \cdot 10^{-3}$	19.357	104,3	14.050	108

variant entre 19,8 % et 26,4 %).

3.4.3.2 Influence d'*E. hirta* vis-à-vis de l'action exercée par le diazépam froid, sur la liaison du flunitrazépam tritié, au niveau des sites récepteurs benzodiazépiniques

Pour cette étude, deux expérimentations sont réalisées :

- d'une part, *E. hirta* est utilisée à la dose de 0,4 mg de lyophilisat/essai, tandis que le diazépam froid est ajouté en excès ( $0,5 \cdot 10^{-2}$  mg/essai) au milieu d'incubation.

Dans ce cas, la fraction synaptosomale 3 (F3) est employée.

- d'autre part, *E. hirta* est utilisée à la dose de 4 mg de lyophilisat/essai, tandis que le diazépam est ajouté au milieu d'incubation à une concentration précédemment déterminée comme pouvant déplacer 43,9 % du flunitrazépam tritié soit  $10^{-5}$  mg (paragraphe 3.4.2).

Cette seconde expérimentation est réalisée sur la fraction synaptosomale 4 (F4).

Les liaisons totale, spécifique et non spécifique de chacune de ces deux fractions sont indiquées dans le tableau 41.

D'après les résultats présentés dans le tableau 44, l'extrait d'*E. hirta* n'influence pas le déplacement du ligand marqué des sites récepteurs spécifiques, occasionné par le diazépam froid ajouté en excès au milieu d'incubation (déplacements respectifs dûs au diazépam seul, et à l'association "*E. hirta*-diazépam" : 91,6 % et 90,9 %).

Toutefois, testée à la dose de 4 mg de lyophilisat, *E. hirta* induit un déplacement du flunitrazépam tritié de 35,8 %, effet supérieur à celui précédemment obtenu (paragraphe 3.4.3.1).

De plus, l'association "*E. hirta* 4 mg - diazépam  $10^{-5}$  mg" accentue le déplacement du ligand marqué, en comparaison de l'effet dû au diazépam seul (déplacements respectifs obtenus avec le diazépam seul et l'association "*E. hirta* - diazépam" de 43,5 % et 65,8 %).

**TABLEAU 44** : INFLUENCE D'E. HIRTA, DU DIAZEPAM ET DE L'ASSOCIATION "E. HIRTA - DIAZEPAM", SUR LA FIXATION DU FLUNITRAZEPAM TRITIÉ, AU NIVEAU DES SITES RECEPTEURS SPECIFIQUES.

ESSAIS		LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIÉ	
	cpm/mg de protéines	% de la liaison spécifique totale	
DIAZEPAM $0,5 \cdot 10^{-2}$ mg	1099	8,4	F3
E. HIRTA 0,4 mg (lyophilisat)	14490	111,3	
DIAZEPAM $0,5 \cdot 10^{-2}$ mg			
E. HIRTA 0,4 mg (lyophilisat)	1191	9,1	
DIAZEPAM $10^{-5}$ mg	8446	56,5	F4
E. HIRTA 4 mg (lyophilisat)	9603	64,2	
DIAZEPAM $10^{-5}$ mg			
E. HIRTA 4 mg (lyophilisat)	5106	34,2	

#### 3.4.4 Evaluation de l'affinité de Poa sp. pour les sites récepteurs benzodiazépiniques

La fraction synaptosomale 4 a été utilisée pour cette étude. Les liaisons totale, spécifique et non-spécifique du flunitrazépam tritié, évaluées pour cette fraction, sont reportées dans le tableau 41.

D'après les résultats présentés dans le tableau 45, l'extrait de Poa sp., utilisé à une forte dose (5,7 mg de lyophilisat/essai), déplace le flunitrazépam tritié des sites récepteurs benzodiazépiniques (déplacement de 54,9 %).

L'association de l'extrait végétal au diazépam ( $10^{-5}$  mg/essai) accentue le déplacement du ligand marqué, en comparaison de l'effet dû au diazépam seul (déplacements respectifs dûs au diazépam seul et à l'association "Poa sp. - diazépam" : 43,5 % et 68,5 %).

**TABLEAU 45** : INFLUENCE DE POA sp., DU DIAZEPAM ET DE L'ASSOCIATION "POA sp. - DIAZEPAM", SUR LA FIXATION DU FLUNITRAZEPAM TRITIE, AU NIVEAU DES SITES RECEPTEURS SPECIFIQUES.

ESSAIS	LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE	
	cpm/mg de protéines	% de la liaison spécifique
DIAZEPAM 10 <sup>-5</sup> mg	8446	56,5
POA sp. 5,7 mg (lyophilisat)	6744	45,1
DIAZEPAM 10 <sup>-5</sup> mg POA sp 5,7 mg	4714	31,5

#### V - 4 DISCUSSION

Cette technique in vitro, très couramment employée pour l'évaluation de l'affinité des molécules pures, vis-à-vis des sites récepteurs benzodiazépiniques, nous est apparue très séduisante, du fait de cette approche plus directe des interactions possibles au niveau des récepteurs, mais aussi en raison de sa fiabilité et de sa reproductibilité, constatées lors de la mise au point de la méthode (Bernabé, 1986).

Au cours de notre étude, le contrôle de la fraction synaptosomale isolée, par microscopie électronique et par évaluation de l'activité ATPasique membranaire, ainsi que la vérification de la qualité des fractions employées, par dosage de leur teneur en protéines, ont pu confirmer la qualité satisfaisante de la fraction obtenue et la bonne reproductibilité dans la technique d'isolement des membranes synaptosomales.

Toutefois, la technique in vitro proprement dite semble sujette à beaucoup plus de variabilité ; phénomène que nous avons pu constater lors de l'évaluation des liaisons totale, spécifique et non-spécifique des quatre fractions synaptosomales utilisées (paragraphe 3.4.1).

Ainsi, si une constance relative peut être mentionnée, quant à la liaison non spécifique, des variations nettement plus importantes sont obtenues, dans l'évaluation de la liaison spécifique, d'une expérimentation à l'autre, et donc d'une fraction synaptosomale à l'autre. Cependant, les valeurs obtenues restent acceptables et en accord avec celles généralement admises et comprises entre 90 et 96 % (Bernabé, 1986).

En fait, aucune explication précise n'a pu être avancée, sur cette variabilité, de nombreux paramètres entrant en ligne de compte. C'est notamment le cas de la durée de congélation des membranes à -20°C, qui varie de deux à sept jours, dans nos expérimentations, l'idéal étant de ne pas dépasser quatre jours, une diminution du pourcentage de liaison spécifique se

manifestant dès neuf jours de congélation (Bernabé, 1986). La température joue également un rôle important. Ainsi, Möhler et Okada (1977) ont pu constater une liaison spécifique optimale à 4°C, l'affinité du flunitrazépam tritié étant de six à dix fois plus faible à 37°C ; par contre, la liaison non spécifique ne serait pas affectée entre 4 et 40°C. De ces explications, peut transparaître l'influence possible de températures ambiantes excessives (expérimentations durant les fortes chaleurs estivales).

Si cette étude in vitro donne de bons résultats sur des molécules pures, le fait d'utiliser un extrait végétal complexe pose d'autres problèmes, et notamment lors de la filtration du milieu d'incubation, qui se voit plus ou moins ralentie et ceci d'autant plus que la quantité d'extrait ajoutée est élevée (doses de 2 et 4 mg de lyophilisat, soit respectivement 20 et 40 mg de plante sèche).

Il est fortement probable que l'apport de molécules inactives, constituant une part importante de notre extrait végétal, gêne la filtration et même finisse par obstruer le filtre. Or, une filtration trop lente peut être responsable d'un relargage du flunitrazépam tritié (Braestrup et Squires, 1977 - Möhler et Okada, 1977) et donc d'une réduction de la liaison spécifique. Ces faits pourraient ainsi expliquer le faible déplacement de la benzodiazépine marquée de ses sites récepteurs spécifiques, déplacement occasionné par les plus fortes doses d'extrait végétal testées, soit 2 et 4 mg de lyophilisat (pourcentages moyens respectifs de déplacement, obtenus sur deux ou trois expérimentations : 13,7 % et 27,3 %), de plus faibles quantités d'extrait d'E. hirta restant totalement inefficaces.

Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus avec un extrait de Poa sp., dénué de toute activité pharmacologique psychotrope, qui induit également à forte dose (5,7 mg de lyophilisat, soit 40 mg de plante sèche), un déplacement de

l'ordre de 54,9 %, forte dose qui, par ailleurs, entrave fortement la filtration.

Ces résultats sont corroborés par l'étude de l'association de ces deux extraits végétaux (E. hirta 4 mg et Poa sp. 5,7 mg, soit 40 mg de plante sèche dans chaque cas), avec une concentration en diazépam de 10 mg induisant un déplacement du flunitrazépam marqué d'environ 43,5 %. En effet, ces associations potentialisent l'action du diazépam seul (déplacements respectifs pour les associations "E. hirta - diazépam" et "Poa sp. - diazépam" : 65,8 % et 68,5 %).

Des résultats similaires ont pu être obtenus avec un autre extrait végétal testé dans notre laboratoire, Eschscholzia californica qui déplace le flunitrazépam tritié, avec de fortes doses (supérieures à 1 mg de lyophilisat/essai, soit 10 mg de plante sèche), de plus faibles doses restant inefficaces ; d'autre part, des problèmes de filtration, nettement plus importants en comparaison d'E. hirta, sont observés et pourraient expliquer ce déplacement de la benzodiazépine marquée.

Or, des études précédemment menées (Rolland, 1988) ont révélé l'antagonisme plus ou moins complet des effets anxiolytiques et sédatifs de cet extrait végétal, par le RO 15-1788, ceci laissant présager des mécanismes d'action de type benzodiazépinique.

Aussi, d'après toutes ces données, il apparaît impossible de conclure à une quelconque affinité d'E. hirta pour les sites récepteurs benzodiazépiniques, et ceci d'autant plus que les fortes quantités d'extrait utilisées, occasionnant un léger déplacement du flunitrazépam tritié (2 et 4 mg de lyophilisat, soit 20 et 40 mg de plante sèche) , sont très largement supérieures aux doses sédatives actives in vivo (extrapolation d'une forte dose sédatif in vivo, soit 400 mg de plante

sèche/kg, à une dose utilisable in vitro, soit 0,4 mg de plante sèche/essai, à partir des équivalences évaluées pour le diazépam).

En fait, cette technique, in vitro ne semble pas du tout adaptée à l'étude de complexes moléculaires, tels que des extraits végétaux, mais nécessiterait leur purification par divers fractionnements devant aboutir à l'isolement d'un groupe chimique présumé actif, ou tout ou moins, à l'élimination d'un certain nombre de molécules inactives et donc à la concentration en substances actives.

*VI*

*CONCLUSIONS*

La recherche d'un profil d'activité du type benzodiazépinique nous a amené à compléter l'étude des propriétés pharmacologiques caractéristiques de ces tranquillisants mineurs (activités anxiolytiques et sédatives) précédemment abordées ; d'une part, par la recherche de certains effets secondaires, anti-convulsivants et myorelaxants, très fréquemment associées aux effets principaux, et d'autre part, par la recherche d'une éventuelle affinité d'E. hirta pour les sites récepteurs benzodiazépiniques (techniques in vivo et in vitro).

Les différentes expérimentations réalisées permettent d'avancer un certain nombre de conclusions :

\* Aucune activité anti-convulsivante n'a pu être décelée pour E. hirta, vis-à-vis des effets induits par le penté-  
trazol.

\* Si un effet myorelaxant se manifeste aux doses sédatives de 200, 400 et 800 mg/kg, celui-ci n'est pas dose-dépendant et n'affecte que l'initiative motrice et l'équilibration de la souris (test de la tige tournante) ; l'animal conserve sa force musculaire (test de la traction).

Un tel effet dissocié est également obtenu avec les neuroleptiques et pourrait trouver son explication tout simplement dans l'action dépressive centrale exercée par E. hirta

\* Les effets sédatifs d'E. hirta ne sont pas antagonisés par le RO 15-1788, antagoniste sélectif des sites récepteurs benzodiazépiniques, capable de supprimer la plupart des actions pharmacologiques des dérivés benzodiazépiniques (technique in vivo).

\* Ces résultats in vivo sont corroborés par l'absence d'une quelconque affinité d'E. hirta pour ces sites récepteurs, mise

en évidence grâce à la technique in vitro.

Toutefois, une certaine réserve doit être émise pour cette dernière expérimentation, en raison des problèmes rencontrés au cours de sa réalisation et occasionnés par l'utilisation d'un extrait végétal riche en molécules actives et inactives. Cette technique, mise au point pour l'étude de molécules pures, ne semble pas du tout adaptée à l'étude de tels complexes moléculaires, mais nécessiterait de travailler sur des fractions purifiées.

Malgré ces divers problèmes, l'ensemble des résultats obtenus ne nous permet pas de confirmer l'existence d'un profil d'activité du type benzodiazépinique pour E. hirta.

Trop peu de faits sont en faveur d'un rapprochement avec ce groupe de tranquillisants mineurs. Les quelques propriétés communes décelées (actions sédatrice, anxiolytique, potentialisatrice des barbituriques et des stéréotypies amphétaminiques, hypothermique modérée et myorelaxante) ne sont généralement pas spécifiques des benzodiazépines et sont souvent insuffisamment conséquentes.

En fait, à ce stade de notre étude, l'activité majeure décelée pour E. hirta reste son action sédatrice, en rapport avec ses propriétés dépressives centrales.

Toutefois, de tels effets ne sont pas uniquement conférés aux quatre grandes classes de psychotropes précédemment abordées, à savoir les hypnotiques, les neuroleptiques, les anti-dépresseurs et les tranquillisants mineurs benzodiazépiniques. C'est ainsi, que divers composés, actifs au niveau du système nerveux central et dotés de propriétés anti-histaminiques ou analgésiques peuvent également exercer des effets sédatifs plus ou moins marqués.

Aussi, nous est-il apparu nécessaire de rechercher l'existence de propriétés anti-histaminiques et/ou analgésiques pour E. hirta.

De plus, nous en sommes venus à prospecter le domaine des anti-pyrétiques et des anti-inflammatoires, propriétés fréquemment associées à une activité analgésique, ainsi que le problème de la tolérance, particulièrement spectaculaire dans le cas des analgésiques centraux appartenant à la famille des opiacés.

L'ensemble de ces travaux fait l'objet de la troisième partie de cette étude pharmacologique.

*CHAPITRE D*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI-HISTAMINIQUES , ANALGESIQUES*

*ANTI-PYRETIQUES ET*

*ANTI-INFLAMMATOIRES*

Les deux premières parties de cette étude pharmacologique réalisée sur E. hirta nous ont permis, d'une part, de déceler un certain nombre d'activités plus ou moins marquées et notamment un effet dépresseur central, ainsi que de légères activités anti-dépressives et anxiolytiques, et d'autre part, de rejeter l'hypothèse d'un rattachement de cet extrait végétal à l'une des quatre classes de psychotropes abordées, à savoir les hypnotiques, les neuroleptiques, les anti-dépresseurs et les tranquillisants mineurs benzodiazépiniques, de par l'absence de propriétés caractéristiques essentielles ou secondaires suffisamment marquées.

Nous avons donc décidé de rechercher l'existence de propriétés anti-histaminiques et analgésiques, pour tenter d'expliquer les effets sédatifs importants initialement démontrés pour E. hirta.

En fait, l'intérêt porté aux effets anti-histaminiques est conforté par les nombreuses études précédemment réalisées par divers auteurs (Hazleton et Hellerman, 1948 - Hellerman et Hazleton, 1950 - Hallet et Parks, 1953 - Feng et coll., 1962 - Dhar et coll., 1968 - El Naggar et coll., 1978), lesquels ont pu révéler l'existence d'une certaine activité anti-histaminique, pour divers extraits alcooliques et hydro-alcooliques d'E. hirta. De tels effets relaxants, mais aussi préventifs, ont pu être obtenus sur différents organes isolés, tels que l'iléon, l'utérus et la trachée de cobaye (cinquième partie - section A).

Enfin, la recherche d'une activité analgésique nous a amené à étudier l'existence éventuelle de propriétés anti-pyrétiques et anti-inflammatoires.

Effectivement, très souvent, bien que classées dans l'un de ces trois groupes, en raison de leurs propriétés essentielles les plus utilisées en thérapeutique, certaines substances peuvent présenter deux ou trois de ces activités. Ainsi, le paracétamol et l'acétylsalicylate de lysine font partie des analgésiques

mineurs, mais sont également dotés d'une certaine activité anti-pyrétique, à laquelle vient s'adjoindre un effet anti-inflammatoire dans le cas du second composé considéré. Autre exemple représentatif, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont connus pour leur activité analgésique.

Aussi, dans un premier temps, nous tenterons de mettre en évidence l'existence de **propriétés anti-histaminiques**, pour l'extrait aqueux d'E. hirta, sur le modèle de l'iléon isolé de cobaye.

Puis, nous rechercherons l'existence d'éventuelles **propriétés analgésiques** centrales et/ou périphériques, par la réalisation de tests couramment utilisés, les tests du writhing et de la plaque chauffante.

Nous poursuivrons cette étude en abordant le domaine des **anti-pyrétiques**, grâce au modèle de l'hyperthermie induite par la levure, puis en recherchant une **activité anti-inflammatoire** pour E. hirta, par la réalisation de deux expérimentations différentes, l'une faisant appel aux propriétés inflammatoires de la carragénine, l'autre étant basée sur le modèle polyarthritique.

Pour conclure cette troisième partie expérimentale, l'influence d'administrations intra-péritonéales répétées d'extrait végétal sera abordée, dans le but de déceler une éventuelle **tolérance** vis-à-vis des effets pharmacologiques précédemment décelés (sédatifs, inducteurs du sommeil barbiturique et analgésiques), phénomène notamment rapporté pour les analgésiques centraux morphiniques.

*I*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI - HISTAMINIQUES*

## I - 1 INTRODUCTION

(Schmitt, 1973 - Wright, 1973 - Reuse, 1978 - Advenier, 1979 - Barker, 1981, 1982, 1983, 1985).

### \* L'histamine

L'histamine, amine biogène naturelle issue de la décarboxylation de l'histidine, est essentiellement contenue dans les mastocytes tissulaires et dans les basophiles circulants où elle se trouve fixée en un complexe à une protéine et à l'héparine. Sa libération sous forme inactive, au sein de structures granulaires endocytologiques, est assurée plus particulièrement par les mastocytes de la capsule hépatique, au cours des réactions d'hypersensibilité (réactions antigène - anticorps), mais aussi à l'occasion de phénomènes physiques (irritation de la peau, variations thermiques cutanées...), ou sous l'action de facteurs chimiques (venins, toxines, médicaments du type morphine ou anti-histaminique, réactifs pharmacologiques...).

A cette libération, vient s'adjoindre celle d'autres substances préformées ou synthétisées lors du conflit antigène - anticorps, telles que le SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) et l'ECFA (eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis) intervenant dans le processus d'anaphylaxie, les kinines, mais également les prostaglandines et leurs précurseurs, ainsi que le PAF, facteur d'activation plaquettaire intervenant notamment dans les phénomènes inflammatoires.

Les effets de ces substances viennent s'ajouter à ceux de l'histamine, qui sont par ailleurs relativement variés. Ainsi, ce composé agit sur le système cardio-vasculaire en provoquant, en particulier, une hypotension et une vasodilatation artérielles systémiques, une vénoconstriction, une dilatation des capillaires et l'augmentation de leur perméabilité. Ces modifications hémodynamiques seraient en partie responsables de phénomènes de tachycardie et d'une diminution du débit cardiaque.

L'histamine est également connue pour augmenter les sécrétions salivaires et médullo-surrénaliennes, mais surtout gastriques. Son action sur le système nerveux central reste hypothétique (régulation de l'activité nerveuse globale du télencéphale, contribution au contrôle et à l'alternance des états de veille et de sommeil, effets végétatifs du type hypertension, hypothermie, anorexie). Si la distribution de l'histamine dans le cerveau semble hétérogène (plus grande richesse dans la région hypothalamique), la présence de sites récepteurs H1 et H2 dans le tissu nerveux est incontestable, uniquement au niveau des mastocytes des gaines conjonctives et non dans les neurones. En fait, son effet principal consiste dans la constriction de la musculature lisse (bronches, intestin).

#### \* Les substances anti-histaminiques

Ces divers effets histaminiques peuvent être antagonisés par différentes substances. Ainsi, deux grands groupes de composés anti-histaminiques sont actuellement distingués : les anti-histaminiques H1 et H2, qui agiraient sur des récepteurs différents.

Si les seconds (anti H2) s'opposent essentiellement à l'augmentation de la sécrétion gastrique, par réduction des sécrétions acides, mais aussi peptiques, les premiers, encore appelés anti-histaminiques classiques, s'opposent principalement aux effets de l'histamine sur le muscle lisse (bronches, intestin) et sur les vaisseaux périphériques. Cependant, ces composés sont indiqués essentiellement en tant que **médicaments symptomatiques d'un certain nombre de manifestations allergiques**, notamment au niveau de la peau et des muqueuses, telles que les pollinoses ou les urticaires histaminiques ; cette action purement symptomatique ne s'oppose qu'aux effets de l'histamine libérée, la réaction antigène - anticorps n'étant pas modifiée.

A côté de cet antagonisme des effets H1 de l'histamine, ces anti-histaminiques H1 engendrent une **dépression du système**

**nerveux central** se manifestant le plus fréquemment par un effet sédatif important ; toutefois, des phénomènes de dépersonnalisation, de fatigue, une diminution des réflexes, ainsi qu'un malaise général confus peuvent également apparaître.

Certains anti-histaminiques seraient ainsi prescrits, seuls ou en association, comme inducteurs du sommeil et tranquillisants mineurs. Parfois, les effets centraux sont caractérisés par une incoordination motrice et par des vertiges.

L'importance de cette action centrale serait sans rapport avec l'activité anti-histaminique.

De plus, presque tous les anti-histaminiques sont dotés de **propriétés anti-cholinergiques**, à l'origine d'effets digestifs (tarissements des sécrétions salivaires, gastriques et intestinales, ralentissement du transit), bronchiques (diminution du volume, épaissement des sécrétions), urogénitaux (difficultés de la miction, impuissance) et oculaires (troubles de l'accommodation). Leur action anti-parkinsonienne serait liée à ces propriétés anti-cholinergiques.

Enfin, une **activité anti-sérotoninergique** est également mentionnée pour ces composés, ainsi que des **propriétés histaminolibératrices** pour certains.

#### **\* Mécanismes d'action des anti-histaminiques H1**

De structure relativement homogène et caractérisée par la présence constante de l'enchaînement - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - N< retrouvé dans d'autres familles pharmacologiques telles que les neuroleptiques phénothiaziniques, ces anti-histaminiques H1 exercent leur action en se fixant au niveau des récepteurs histaminiques H1 et en empêchant ainsi l'accès de l'histamine ; il s'agit d'un antagonisme compétitif qui pourrait expliquer, en partie, leur plus grande efficacité lorsqu'ils sont administrés en traitement préventif.

La puissance et la spécificité de leur antagonisme varient selon les effets histaminiques, l'activité la plus importante se manifestant au niveau de la musculature lisse et notamment

sur l'intestin qui présente des sites récepteurs histaminiques H1 et H2 dont l'activation peut induire des contractions (Barker, 1981).

En fait, l'intestin est normalement animé de mouvements rythmiques lents se propageant sur toute sa longueur. Son innervation intrinsèque est constituée de plexus nerveux (Meissner et Auerbach), tandis que son innervation extrinsèque neurovégétative dérive du rameau nerveux du nerf splénique et du nerf pneumogastrique (Wright, 1973). Les influx nerveux en provenance des fibres sympathiques et parasympathiques sont transmis respectivement par la noradrénaline et l'acétylcholine chacun de ces médiateurs présente des sites récepteurs spécifiques ( $\beta$  adrénergiques, cholinergiques), au niveau de l'intestin ; l'action de la noradrénaline sur les récepteurs  $\beta$ , impliqués dans les effets inhibiteurs, provoque une relaxation musculaire, tandis que l'acétylcholine est responsable d'une contraction, par action sur les récepteurs cholinergiques.

L'enregistrement des réponses de l'intestin aux différentes substances est possible sur l'organe isolé (technique in vitro). Toutefois, l'intensité de la réponse varie selon l'espèce animale choisie et le fragment intestinal utilisé. L'iléon terminal isolé de cobaye, et plus précisément la partie terminale de l'intestin grêle, constitue une préparation classique, très sensible à un certain nombre d'agonistes tels que l'histamine et l'acétylcholine, mais également riche en récepteurs H1 et H2 (Barker, 1981, 1982, 1983, 1985).

Aussi, avons-nous choisi ce modèle, afin de rechercher l'existence de propriétés anti-histaminiques, pour l'extrait aqueux d'E. hirta.

## I - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

### 2.1 Animaux

Les animaux utilisés sont des cobayes mâles (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont décrites au paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

### 2.2 Méthodes

#### 2.2.1 Prélèvement et mise en place du fragment d'iléon dans la cuve d'expérimentation

La technique de l'action in vitro de différentes substances sur la contraction de l'iléon de cobaye a été décrite par Barker (1981), selon la méthode de Magnus. Sa mise au point, dans notre laboratoire et pour les extraits végétaux a été réalisée par Soulimani (1987).

Après anesthésie de l'animal par injection S.C. de pentobarbital sodique (laboratoires Clin-Midy, St Jean de la Ruelle (45)) à la dose de 0,3 ml pour 100 g de poids corporel et ouverture de la cavité abdominale, un fragment d'environ 4 cm d'intestin grêle est prélevé dans sa portion terminale (avant le caecum).

Ce fragment d'iléon est ensuite fixé par ses deux extrémités ligaturées, dans une cuve à organe isolé, d'une contenance de 20 ml et reliée à un bain-marie thermostaté, à un dispositif d'oxygénation et de brassage, ainsi qu'à un dispositif de remplissage et de vidange. La cuve est constamment remplie de liquide physiologique (tyrode) additionné d'atropine (1 mg/ml), à raison de 1 ml d'atropine pour 2 litres de tyrode. L'atropine bloque les récepteurs à l'acétylcholine et permet l'enregistrement des contractions histaminiques seules. Cette solution physiologique est maintenue à une température de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  et est oxygénée en continu, à raison d'une bulle par seconde.

L'extrémité supérieure de l'organe est reliée à un capteur (Narco Bio-Systems, F 60) qui transmet les variations du muscle (variations de la longueur) à un amplificateur (Narco Bio-Systems 7113), lui-même relié à un inscripteur (physiographe Narco Bio-Systems).

La technique isométrique envisagée est très sensible et permet de visualiser les contractions de faibles amplitudes, telles que les contractions spontanées.

L'iléon est laissé au repos, dans la solution physiologique, pendant environ trente minutes, de façon à stabiliser ces contractions spontanées.

Au moment du test, la substance étudiée est ajoutée dans la cuve sous un volume constant de 0,1 ml. Deux minutes plus tard, l'agoniste (histamine) est ajouté au bain, sous ce même volume constant de 0,1 ml et à une dose correspondant à la dose efficace 100 (DE 100).

Après chaque essai, l'organe est lavé à trois reprises avec la solution physiologique de tyrode.

Chaque expérience est répliquée trois fois, le muscle étant laissé au repos entre chaque essai, pendant au moins trois minutes.

L'intensité de la réponse pouvant dépendre de la fraction d'intestin isolé, la réalisation de plusieurs expériences d'agonisme et d'antagonisme est nécessaire, afin de vérifier le bon fonctionnement du fragment isolé avant chaque expérience.

### **2.2.2 Préparation des solutions**

#### **Solution de tyrode**

Cette solution doit maintenir l'iléon dans un environnement ionique légèrement alcalin, propre au fonctionnement des systèmes physiologiques, et lui apporter une source énergétique (glucose) indispensable aux échanges.

Sa composition est la suivante : NaCl (40g) - KCl (3,80g) - CaCl<sub>2</sub> (1g) - MgCl<sub>2</sub> (0,5g) - NaHCO<sub>3</sub> (5g) - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25g) - glucose (5g), pour un volume final de 5 litres obtenu par addition d'eau distillée.

Pour 2 litres de tyrode, 1 ml d'atropine, soit 1 mg, est ajouté (sulfate d'atropine, laboratoires Aguettant, Lyon).

### **Solution d'histamine**

A partir d'une solution mère concentrée à  $5 \cdot 10^{-3}$  M/l et par dilution dans la tyrode, six solutions de concentration différente sont préparées :

H1 =  $2 \cdot 10^{-3}$  M/l ; H2 =  $2 \cdot 10^{-4}$  M/l ; H3 =  $2 \cdot 10^{-5}$  M/l ;  
H4 =  $2 \cdot 10^{-6}$  M/l ; H5 =  $2 \cdot 10^{-7}$  M/l et H6 =  $2 \cdot 10^{-8}$  M/l.

### **Solution de dexchlorphéniramine (Polaramine<sup>®</sup>)**

Cinq solutions de concentration différente sont préparées, à partir d'une solution mère concentrée à 5 g/l et par dilution dans la tyrode :

P1 = 5 mg/l ; P2 =  $5 \cdot 10^{-1}$  mg/l ; P3 =  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/l ;  
P4 =  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/l ; P5 =  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/l.

### **Extrait végétal**

Six solutions de concentration différente sont préparées, par dissolution du lyophilisat dans la solution de tyrode :

$5 \cdot 10^3$  ;  $10^4$  ;  $2 \cdot 10^4$  ;  $4 \cdot 10^4$  ;  $10^5$  ;  $2 \cdot 10^5$  mg de plante sèche/l.

#### **2.2.3 Réalisation chronologique de l'expérimentation**

Cette expérimentation est réalisée en trois étapes successives  
- Une courbe effet-dose de l'action de l'histamine sur l'iléon de cobaye doit être établie en premier lieu, afin de vérifier le bon fonctionnement de notre modèle expérimental.

- Dans un deuxième temps, l'action d'un antagoniste spécifique des récepteurs histaminiques, la dexchlorphéniramine (Polaramine<sup>R</sup>), est étudiée vis-à-vis des contractions histaminiques. Cette deuxième étude doit nous permettre d'évaluer la concentration en Polaramine nécessaire pour réduire de 50 % la contraction histaminique (CI 50).

- Enfin, nous avons étudié l'influence d'E. hirta, vis-à-vis des contractions induites par l'histamine.

#### 2.2.3.1 Etude de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye

Avant d'envisager la relation effet-dose de l'histamine, l'iléon est sensibilisé par addition de 0,1 ml de la solution histaminique la plus concentrée H1 ( $2 \cdot 10^{-3}$  M/l, soit une concentration histaminique dans la cuve de  $10^{-5}$  M/l).

Plusieurs essais sont ainsi réalisés, jusqu'à l'obtention de trois contractions successives identiques.

Entre chaque essai, l'iléon est lavé à trois reprises avec la solution physiologique, puis laissé au repos pendant trois minutes.

La relation effet-dose est établie à l'aide des six solutions histaminiques précédemment préparées (paragraphe 2.2.2), en ajoutant dans le bain 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

Les concentrations histaminiques ajoutées dans la cuve sont donc:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M/l.

La courbe effet-dose permet de déterminer la concentration sensible (CS), à partir de laquelle apparaît la première contraction, mais aussi la concentration induisant un effet maximal (CE 100). La concentration nécessaire à l'apparition d'une contraction réduite de moitié par rapport à l'effet maximal (CE 50) est évaluée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### 2.2.3.2 Influence d'un antagoniste spécifique des récepteurs histaminiques, la dexchlorphéniramine (Polaramine<sup>R</sup>)

Avant d'envisager l'influence de la dexchlorphéniramine vis-à-vis de la contraction histaminique, la quantité d'histamine suffisante pour provoquer un effet maximal (CE 100) est à nouveau déterminée, l'expérience étant renouvelée jusqu'à l'obtention de trois contractions de même amplitude.

L'action de la dexchlorphéniramine est ensuite étudiée par l'addition de concentrations croissantes de cet antagoniste, préventivement à l'ajout de l'agoniste (histamine), et ceci jusqu'à l'obtention d'une inhibition totale des effets histaminiques.

Pour chaque essai, 0,1 ml de la concentration considérée est ajouté dans la cuve, deux minutes avant l'apport de la concentration histaminique induisant une contraction maximale (CE 100).

Les concentrations en antagoniste, obtenues à partir des cinq solutions précédemment préparées (paragraphe 2.2.2) et présentes dans la cuve, sont les suivantes :  $2,5 \cdot 10^5$  -  $2,5 \cdot 10^4$  -  $2,5 \cdot 10^3$  -  $2,5 \cdot 10^2$  et  $2,5 \cdot 10^1$  mg/l.

La sensibilité du muscle à l'histamine est régulièrement vérifiée, par addition d'une dose maximale d'agoniste.

La concentration en antagoniste, nécessaire pour réduire de moitié l'amplitude des contractions (CI 50), est évaluée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

### 2.2.3.3 Influence d'E. hirta vis-à-vis des contractions histaminiques

La procédure expérimentale utilisée est identique à celle employée pour la dexchlorphéniramine.

Chacune des solutions d'extrait végétal précédemment préparées (paragraphe 2.2.2) est testée sous un volume de 0,1 ml, ajouté

deux minutes avant l'apport de la concentration histaminique induisant une contraction maximale (CE 100).

Les concentrations ajoutées dans la cuve sont les suivantes : 25 - 50 - 100 - 200 - 500 et 1000 mg de plante sèche/l.

### I - 3 RESULTATS

#### 3.1 Etude de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye

Les pourcentages de contraction de l'iléon de cobaye, obtenus en fonction de la concentration histaminique présente dans la cuve (M/l) sont reportés dans le tableau 46 et sur la figure 39.

La relation effet-dose de l'histamine, apparemment de nature michaelienne, permet de mettre en évidence l'existence de sites récepteurs spécifiques pour cette substance.

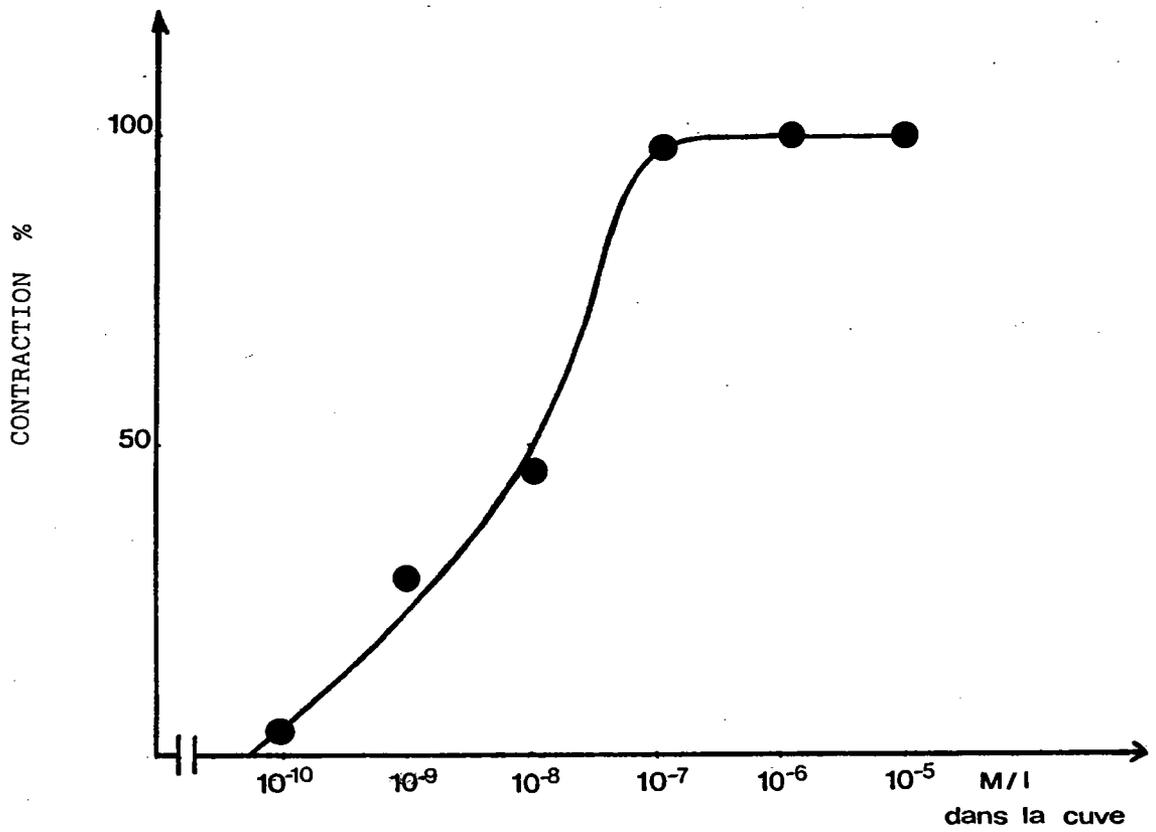
Ainsi, la concentration sensible (CS), à partir de laquelle apparaît la première contraction, peut être estimée à  $10^{-10}$  M/l, l'histamine occupant les premiers sites récepteurs.

Dès la concentration de  $10^{-7}$  M/l, tous les sites récepteurs sont occupés, ce qui se traduit par l'apparition d'un plateau d'amplitude maximale, l'intensité des contractions n'augmentant plus ; cette concentration histaminique peut être considérée comme la CE 100.

La CE 50 est estimée à  $6,22 \cdot 10^{-9}$  M/l ( $5,84 \cdot 10^{-9}$  -  $6,63 \cdot 10^{-9}$ ).

TABLEAU 46 : ACTION DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON DE COBAYE.

CONCENTRATION EN HISTAMINE DANS LA CUVE (M/l)	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
POURCENTAGE DE CONTRACTION	3	29	45	97	100	100



**FIG. 39 :** INFLUENCE DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON  
ISOLE DE COBAYE.

### 3.2 Etude de l'action antagoniste exercée par la dexchlorphéniramine vis-à-vis des contractions histaminiques

Les pourcentages d'inhibition de la contraction histaminique, obtenus en fonction de la concentration en dexchlorphéniramine présente dans la cuve (mg/l), sont reportés dans le tableau 47 et sur la figure 40 .

Ces pourcentages sont calculés selon la formule :

$$100 - \text{pourcentage de contraction.}$$

La concentration en antagoniste qui inhibe 50 % de la contraction histaminique normale (DE 100) est estimée à  $2,75 \cdot 10^{-3}$  mg/l ( $2,40 \cdot 10^{-3} - 3,12 \cdot 10^{-3}$ ).

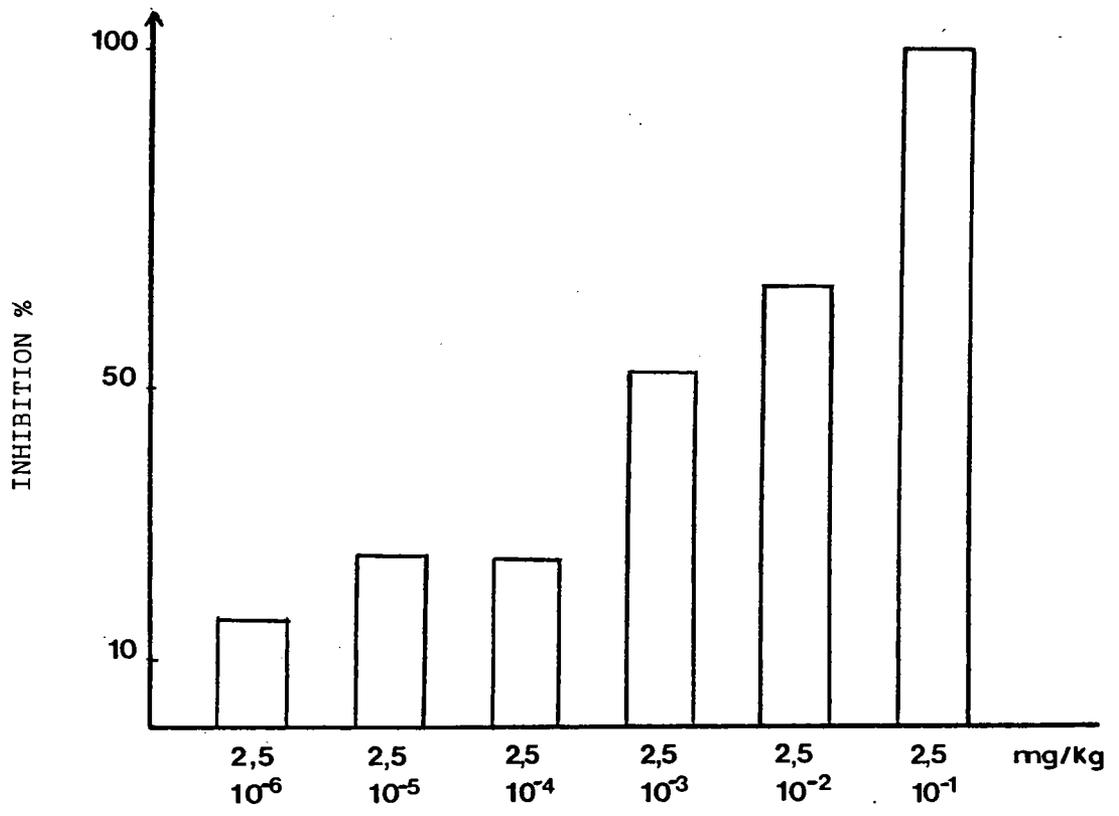
**TABLEAU 47** : EFFET ANTI-HISTAMINIQUE DE LA DEXCHLORPHENIRAMINE (DCP) SUR L'ILEON DE COBAYE.

CONCENTRATION EN	:	:	:	:	:	:	:
DCP DANS LA CUVE	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	:
(mg/l)	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	:
POURCENTAGE DE	:	:	:	:	:	:	:
CONTRACTION	84	74	75	47,5	35	0	:
POURCENTAGE	:	:	:	:	:	:	:
D'INHIBITION	16	26	25	52,5	65	100	:

### 3.3 Influence d'E. hirta, vis-à-vis de la contraction histaminique

Le tableau 48 présente les pourcentages de contraction de l'iléon de cobaye, obtenus après l'addition de différentes concentrations en extrait végétal, préventivement à l'apport de la CE 100 histaminique.

Ainsi, une réduction négligeable de la contraction histaminique maximale peut être signalée aux concentrations comprises entre 25 et 500 mg/l.



**FIG. 40:** EFFET ANTIHISTAMINIQUE DE LA DEXCHLORPHENIRAMINE SUR L'ILEON DE COBAYE.



#### I - 4 DISCUSSION

Dans les conditions expérimentales choisies pour cette étude et aux fortes doses introduites dans la cuve (25 à 1000 mg/l), l'extrait aqueux d'E. hirta n'exerce aucun antagonisme préventif, à l'encontre des contractions maximales de l'iléon de cobaye, induites par l'histamine.

Ainsi, cet extrait aqueux ne semble présenter aucune affinité pour les récepteurs histaminiques de l'iléon de cobaye.

En fait, cette absence d'activité anti-histaminique n'est pas tout à fait incompatible avec les résultats obtenus par divers auteurs, lors d'expérimentations antérieures. Ainsi, si un effet anti-histaminique a pu être observé sur différents organes isolés (iléon, utérus, trachée de cobaye), seuls les extraits alcooliques ou hydro-alcooliques se sont révélés réellement efficaces, des extraits aqueux étant beaucoup moins actifs (Hazleton et Hellerman, 1948 - Hallet et Parks, 1953) ou totalement dénués d'effets et ceci, non seulement vis-à-vis des contractions histaminiques de l'iléon de cobaye, mais aussi vis-à-vis de celles induites par l'acétylcholine, le chlorure de baryum ou la nicotine (Feng et coll., 1962), à la différence des extraits alcooliques ou hydro-alcooliques qui antagonisent les effets spasmogènes de ces trois dernières substances, sur les iléons de souris et de cobaye (Hellerman et Hazleton, 1950 Feng et coll., 1962 - Dhar et coll., 1968).

L'ensemble de ces résultats ont enclin Hazleton et Hellerman (1948, 1950) à envisager une action typiquement spasmolytique et dépressive directe sur la musculature lisse, plutôt que des effets anti-histaminiques spécifiques pour E. hirta. Ainsi, E. hirta exercerait une action différente de celle des anti-histaminiques et anti-spasmodiques du type atropine, mais similaire à celle développée par l'adrénaline et l'amino-phylline.

De plus, deux principes ont pu être isolés et caractérisés, l'un comme étant responsable d'une activité stimulante

(contraction de l'iléon), le second responsable de l'action relaxante (Hazleton et Hellerman, 1948 - Hallet et Parks, 1953).

Toutefois, ces deux principes seraient solubles dans l'eau, ce qui peut paraître étonnant si l'on se remémore la faible efficacité des extraits aqueux testés.

El Naggar et ses collaborateurs (1978) ont pu identifier les deux substances concernées : la première serait la choline à effet stimulant ; la seconde, l'acide shikimique, serait responsable de l'action relaxante.

La confirmation de ces différentes observations, et notamment de l'activité anti-histaminique d'un extrait alcoolique ou hydro-alcoolique d'E. hirta, apparaît tout à fait intéressante et pourrait faire l'objet d'une prochaine étude.

Cependant, il n'en reste pas moins que l'absence d'effets anti-histaminiques, de la part de l'extrait végétal aqueux et dans les conditions expérimentales envisagées, nous laisse en droit de rejeter l'hypothèse initiale concernant l'explication de propriétés sédatives centrales de ce même extrait par un antagonisme des récepteurs histaminiques.

*II*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANALGESIQUES*

## II - 1 INTRODUCTION

### \* La douleur et ses principales voies de transmissions

(Wright, 1973 - Benoist et Misset, 1979 - Guerin et coll., 1979 Besson et Le Bars, 1980 - Cuche et Roux, 1980 - Privat, 1980).

La douleur est souvent définie comme une expérience sensorielle désagréable, distincte des autres modalités sensorielles comme le tact, le chaud ou le froid. Résultant généralement de lésions tissulaires ou cellulaires, elle constitue un symptôme, le premier signal d'un phénomène pathologique. Par son intensité et sa durée, elle peut devenir un véritable syndrome, retentissant sur les grandes fonctions organiques et capable à lui seul d'aggraver l'état du malade (Wright, 1973 - Benoist et Misset, 1979).

Si l'origine de presque tous les types de douleur doit être recherchée au niveau des structures périphériques, cette sensation est largement modifiée au niveau du système nerveux central.

Diverses théories ont pu être proposées, quant à l'apparition de la douleur et aux circuits empruntés (Wright, 1973).

De nombreuses structures peuvent être impliquées, la transmission des messages nociceptifs étant soumise à divers contrôles, notamment d'origines segmentaire et supra-spinale. Ainsi, résultant de la mise en jeu de terminaisons libres amyéliniques formant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires et dans les parois viscérales, les stimuli nociceptifs sont transmis à la moelle épinière par les fibres A $\delta$  peu myélinisées et C amyéliniques des nerfs périphériques, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions spinaux les premières interviennent dans la douleur dite rapide (tolérable et relativement bien localisée), les secondes intéressant la douleur dite lente (intense et diffuse).

Au niveau spinal, les "neurones relais" de la **substance gélatineuse de Rolando** (région dorsale de la corne dorsale)

sont alors activés. Ces neurones peuvent recevoir des influx véhiculés par des fibres fines d'origine cutanée, mais également d'origine viscérale ou musculaire (convergence viscéro-somatique), pouvant ainsi expliquer le phénomène de douleur projetée. Cette région spinale est particulièrement riche en récepteurs morphiniques et en substances P, considérée comme l'un des neurotransmetteurs essentiels de la sensibilité douloureuse au niveau médullaire ; cette substance est également retrouvée dans les couches 4 et 5 de Rexed (cornes postérieures de la moelle épinière), dans les nerfs sensitifs amyéliniques, dans les projections spinales des fibres sérotoninergiques originaires du raphé, dans de nombreuses régions cérébrales, mais aussi dans le système nerveux sympathique, dans le plexus de la paroi intestinale et dans certaines cellules de l'épithélium intestinal (Privat, 1980).

Certains "neurones relais" se projettent vers l'encéphale, formant ainsi diverses voies ascendantes : la **voie spino-thalamique**, qui aboutit à différents noyaux du thalamus (complexe ventrobasal postérieur, noyaux intralaminaires médians) ; la **voie spino-réticulaire**, qui aboutit aux formations réticulées bulbaire, pontique et mésencéphalique ; le **faisceau spino-cervico-thalamique**, qui se projette au niveau du noyau cervical latéral et qui constitue un noyau relais pour des neurones dont les terminaisons axoniques vont activer certaines structures thalamiques médianes telles que le complexe ventrobasal postérieur.

A ces divers circuits, viennent s'adjoindre des **systèmes de contrôle descendants**, permanents, originaires du tronc cérébral et plus particulièrement des régions péri-ventriculaires de la substance grise péri-aqueducule et des noyaux du raphé.

En fait, les formations centrales impliquées dans les phénomènes douloureux sont nombreuses ; il s'agit essentiellement du thalamus (noyau associatif permettant la prise de conscience des messages nociceptifs), des formations limbiques et amygdaliennes qui règlent les réponses comportementales, de l'hypothalamus, de la substance réticulée du tronc cérébral, du

cortex pariétal et du cortex frontal qui joue un rôle fondamental dans la réaction affective à la douleur.

### \* Les médicaments antalgiques

(Schmitt, 1973 - Reuse, 1978 - Brouilhet et Giroud, 1978 - Schorderet et coll., 1978 - Benoist et Misset, 1979 - Famaey, 1983).

Les médicaments antalgiques, destinés à faire disparaître le symptôme "douleur" sont répartis en deux catégories : les **analgésiques morphiniques et non morphiniques**.

Les premiers, représentés par les opiacés et leurs dérivés, sont dotés de diverses propriétés psychotropes plus ou moins marquées selon les composés et notamment d'un effet dépresseur central caractérisé, en particulier, par une certaine indifférence aux sensations désagréables, physiques ou psychiques (action anxiolytique de la morphine) et généralement associé à un effet sédatif ; cet état correspond à l'action psychodysleptique de ces substances. Parfois, un certain effet excitant peut être observé.

Ces composés, encore appelés **analgésiques centraux**, exercent une activité antalgique sélective au niveau de nombreux sites du système nerveux central, les autres sensations (discrimination tactile, audition, vision) n'étant pas affectées aux doses thérapeutiques et l'état conscient étant préservé.

Les mécanismes d'action des dérivés morphiniques ont fait l'objet de nombreux travaux, qui ont permis de révéler l'existence de multiples sites centraux. Ainsi, ces composés exercent une action médullaire directe, plus particulièrement sur le groupe cellulaire de la couche V de Rexed de la corne dorsale, groupe qui est à l'origine des voies spino-cervico-thalamiques et spino-thalamiques de la douleur.

Au niveau du tronc cérébral, le principal site d'action de la morphine a pu être localisé dans le plancher du quatrième ventricule (partie dorsale de la formation réticulée bul-

baire) ; une action a pu être également envisagée sur des structures entourant l'aqueduc de Sylvius et notamment sur les noyaux du raphé riches en corps cellulaires sérotoninergiques. La morphine pourrait agir indirectement en renforçant ces systèmes de contrôle inhibiteur.

Enfin, des actions directes ont été proposées sur certains centres diencéphaliques et corticaux (noyaux intralaminaires et associatifs du thalamus, cortex frontal, formations limbiques et amygdaliennes).

la seconde catégorie d'antalgiques est représentée par des composés chimiquement très différents (salicylés, dérivés du para-aminophénol et de la pyrazolone, glafénine, floctafénine, clométacine), qui sont dépourvus d'action psychotrope et qui agissent en partie localement, au siège du stimulus douloureux, d'où leur nom d'**analgésiques périphériques**.

Une telle action antalgique principalement d'origine périphérique a pu être démontrée par Lim et ses collaborateurs (1964) et par Ferreira et Vane en 1974 (mentionnés par Benoist et Misset, 1979). Ainsi, selon ces auteurs, les dérivés salicylés exerceraient leur effet antalgique modéré, par l'intermédiaire de leur activité inhibitrice sur la synthèse des prostaglandines (plus particulièrement les prostaglandines E1), substances qui contribueraient à la douleur inflammatoire en sensibilisant les terminaisons nerveuses afférentes à l'action algogène d'autres médiateurs libérés dans le foyer inflammatoire, tels que la bradykinine ou l'histamine.

Cependant, une telle action procédant uniquement d'une libération locale des facteurs de l'inflammation ne peut à elle seule rendre compte des effets analgésiques de ses composés, la douleur ne constituant qu'un des symptômes de l'inflammation (cas de certains dérivés du para-aminophénol pratiquement dépourvus de propriétés anti-inflammatoires). Une action centrale, quoique secondaire, a souvent été proposée, notamment au niveau de l'hypothalamus.

\* Récepteurs aux opiacés et ligands endogènes

Le concept de récepteur morphinique a pu être suggéré par diverses constatations et notamment par les relations existant entre les structures chimiques et l'activité analgésique, mais aussi par la découverte de substances antagonistes spécifiques de structure très voisine de celle des morphiniques, telles que la naloxone.

De très nombreux travaux ont ainsi été réalisés sur des extraits cérébraux, hypophysaires, mais également sur le vaisseau efférent de la souris et l'iléon de cobaye, et ont permis la découverte de divers types de récepteurs, en fonction de leur distribution préférentielle, de leurs agonistes et antagonistes spécifiques. Ainsi, quatre grandes classes principales peuvent être distinguées : les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$ , K et  $\epsilon$ , la morphine agissant sélectivement sur les premiers.

(Pert et coll., 1976 - Lord et coll., 1977 - Dehen, 1979 - Roques, 1980 - Rossier et Chapouthier, 1982 - Holtt, 1986 - Oguri et coll., 1987 - Yaksh, 1987).

La présence dans l'organisme de tels sites spécialisés et leur répartition préférentielle dans le névraxe, au niveau des zones de transmission et d'intégration de la douleur telles que la substance gélatineuse de Rolando, la substance grise péri-aqueducule, le thalamus médian, le système limbique, ont suggéré l'existence d'un ou plusieurs ligands endogènes pouvant moduler l'activité de ces récepteurs dans le sens d'un effet morphinomimétique.

C'est ainsi que plusieurs peptides, pouvant jouer un rôle modulateur de la sensation douloureuse ou de neurotransmetteur, ont pu être isolés en particulier à partir d'extraits hypophysaires et ont été retrouvés non seulement dans le système nerveux central, mais aussi dans le système nerveux périphérique et certains tissus non nerveux (tractus gastro-intestinal, pancréas, certains types cellulaires des gonades, système immunitaire, plasma...).

Ces endomorphines peuvent être séparées en deux grands groupes

issus de précurseurs différents, les **enképhalines** (Met et Leu enképhalines) et les **endorphines** ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -endorphines), auxquels il faut ajouter un troisième groupe de peptiques opioïdes, représenté par les **dynorphines** A et B et les  $\alpha$  et  $\beta$  **néo-endorphines**.

les **enképhalines** (pentapeptides) seraient obtenues à partir d'une pro-enképhaline A, dans les proportions de six Met-enképhalines pour une Leu-enképhaline, cette dernière pouvant également être obtenue par clivage d'un autre précurseur, la pro-enképhaline B ou pro-dynorphine, dans certaines régions cérébrales telles que la substance noire.

Ces peptides seraient largement répandus dans tout le système nerveux central et dans la moelle épinière. Ils sont rapidement métabolisés par des enzymes tissulaires (aminopeptidases, endopeptidases) et présentent une affinité préférentielle pour les récepteurs  $\delta$ .

Ce précurseur commun, la pro-enképhaline A, peut aussi donner naissance à des peptides de séquence amino-acide plus longue, tels que le peptide E et ses dérivés, agonistes des récepteurs  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\epsilon$ , ou le peptide F dépourvu d'affinité préférentielle pour l'un ou l'autre des récepteurs.

les **endorphines** ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -endorphines, constituées respectivement de 16, 31 et 17 acides aminés) seraient issues de la proopiomélanocortine (POMC), précurseur commun à diverses hormones adrénocorticotropes (ACTH) et mélanotropes (MSH).

La  $\beta$ -endorphine, peptide le plus actif, est plus particulièrement obtenue à partir de la séquence " $\beta$ -lipotropine" du précurseur, tandis que les endorphines  $\alpha$  et  $\gamma$  consisteraient en fait en artéfacts produits par action enzymatique sur la  $\beta$ -lipotropine durant son extraction (Hughes, 1978).

Ces peptides sont retrouvés en forte concentration, non seulement dans le lobe hypophysaire intermédiaire, mais aussi dans la substance grise péri-aqueducule et dans le système limbique, régions impliquées dans le contrôle de la douleur. Les endorphines présentent une affinité pour les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ .

La pro-enképhaline B, ou pro-dynorphine, peut donner naissance non seulement à la Leu-enképhaline, mais aussi à divers autres peptides à séquence amino-acide plus longue, tels que les **dynorphines A et B**, les  $\alpha$  et  $\beta$  **néo-endorphines**.

Préférentiellement localisés dans le lobe hypophysaire antérieur, dans la substance noire (pars reticulata), dans l'hippocampe et le pallidum ventral, ces peptides sont parfois co-localisés avec la vasopressine (noyaux supra-optiques et para-ventriculaires de l'hypothalamus).

Ils présentent une forte affinité pour les récepteurs K, qui interviennent notamment dans la médiation des effets anti-nociceptifs de la moelle épinière

(Lord et coll., 1977 - Hughes, 1978 - Dehen, 1979 - Besson et Le Bars, 1980 - Cuche et Roux, 1980 - Guillemin, 1980 - Roques, 1980 - Rossier, 1980 - Rossier et Chapouthier, 1982 - Ruckebusch et Bueno, 1983 - Holtt, 1986 - Patey et Rossier, 1986 - Turner, 1987).

**\* Recherche d'une activité analgésique centrale ou périphérique grâce au modèle animal**

Si la sensation douloureuse reste très subjective, sa nature et son intensité pouvant être perçues différemment d'un individu à l'autre, l'expérimentation animale n'explore, quant à elle, que des phénomènes objectifs, sous la forme de modifications de réflexes plus ou moins élaborés et finalisés (réactions de fuite, de retrait, léchage, cris...), à la suite de l'application de divers stimuli nociceptifs de nature électrique (stimulation électrique de certaines régions cutanées, de la pulpe dentaire...), chimique (injection d'agents algogènes tels que la bradykinine, la phénylbutazone, l'acide acétique...), ou thermique (stimulation par la chaleur radiante ou de contact). Ainsi, l'ensemble de tests pharmacologiques couramment utilisés permet d'étudier un comportement en réponse à un stimulus, connu pour être ressenti comme douloureux chez l'homme, plutôt que la douleur proprement dite (Reuse, 1978 - Benoist et Misset, 1979).

Si les analgésiques centraux sont capables d'exercer leur activité, vis-à-vis de stimuli algogènes électriques, chimiques ou thermiques, les analgésiques périphériques ne sont efficaces que lors de l'injection de substances chimiques nociceptives.

Aussi, la recherche de propriétés analgésiques centrales ou périphériques pour E. hirta nous a enclin à sélectionner deux tests pharmacologiques permettant de dissocier ces deux types d'effets : le **test du writhing**, basé sur l'induction de la douleur par injection I.P. d'acide acétique, qui induit chez l'animal des contorsions et des contractions abdominales, et le **test de la plaque chauffante** qui permet de quantifier l'effet analgésique de la substance étudiée, vis-à-vis d'une douleur occasionnée par la chaleur.

Afin de déterminer la nature morphinomimétique ou non des effets obtenus avec E. hirta, nous avons complété cette étude par la recherche d'une influence d'un antagoniste morphinique pur, la naloxone, vis-à-vis de ces effets analgésiques. Cette substance est effectivement connue pour exercer un antagonisme spécifique et compétitif, en dehors de toute activité agoniste intrinsèque (Benoist et Misset, 1979 - Ruckebusch et Bueno, 1983).

## II - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA, VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE (test du writhing)

Le test du writhing permet de mettre en évidence l'activité des analgésiques majeurs du type morphine et mineurs du type aspirine.

### 2.1 Procédure expérimentale

#### 2.1.1 Animaux

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

#### 2.1.2 Méthode

La technique utilisée est inspirée de la méthode de Siegmund (1957).

Les substances testées sont administrées par voie I.P., trente minutes avant l'agent algique.

E. hirta est employée aux doses de 12,5 - 20 - 25 - 50 - 100 - 200 et 400 mg/kg.

Quatre produits de référence sont testés : le clorazébate dipotassique CD (Tranxène<sup>®</sup>, laboratoires Clin-Midy, Paris), à raison de 40 mg/kg ; l'acétylsalicylate de lysine ASL (Aspégic<sup>®</sup>, laboratoires Synthelabo France, Paris), à la dose de 68 mg/kg ; le paracétamol P (Pro-Dafalgan<sup>®</sup>, laboratoires Upsa, Rueil-Malmaison (92)), à la dose de 68 mg/kg ; le sulfate de morphine M, à raison de 1,15 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Trente minutes après l'administration des produits, l'agent algique (acide acétique à 1,2 %) est injecté par voie I.P. (acide acétique Rectapur 99-100 %, Prolabo, Paris).

Les animaux sont aussitôt placés en cage individuelle (24 x 11 x 10 cm), pour être observés durant trente minutes. Le paramètre pris en compte est le nombre total de contorsions et/ou d'étirements des pattes postérieures, permettant de calculer, pour chaque lot traité, le pourcentage de protection par rapport au lot témoin, selon le rapport :

$$\frac{\text{valeur moyenne témoin} - \text{valeur moyenne traité} \times 100}{\text{valeur moyenne témoin}}$$

### 2.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances, par le test de Bartlett, une analyse de variance (ANOVA) est effectuée sur l'ensemble des lots témoin et traités. Ceux-ci sont ensuite comparés par un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

La DE 50, dose efficace réduisant de 50 % les manifestations douloureuses, est évaluée selon la méthode de Lichtfield et Wilcoxon (1949).

## 2.2 Résultats

D'après les résultats présentés dans le tableau 49 et sur la figure 41, E. hirta réduit significativement le nombre de contorsions et d'étirements induits par l'injection d'acide acétique 1,2 %, dès la dose de 20 mg/kg (pourcentage de protection par rapport au lot témoin : 54 %). Cet effet est dose-dépendant, le pourcentage de protection obtenu avec la plus forte dose testée, soit 400 mg/kg, étant de 88 %.

La réalisation de deux traitements, par une dose de 100 mg/kg, à plusieurs mois d'intervalle permet de constater la bonne reproductibilité des résultats obtenus (pourcentages de protection obtenus pour chacun de ces deux tests : 80 % et 78 %).

La reproductibilité de cette expérimentation a pu être constatée également dans le cas d'animaux ne recevant que l'agent algique (résultats non reportés).

La DE 50 est estimée à 25 mg/kg (24,4-25,4).

**TABLEAU 49** : INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR INDUITE PAR L'ACIDE ACETIQUE.

LOTS	TEMOIN (N=40)	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)							
		12,5 (N=10)	20 (N=10)	25 (N=10)	50 (N=10)	100 (N=10)	200 (N=10)	400 (N=10)	
MOYENNE	50,4	41,1	23,3	18	19,7	11,3	10,3	6,6	5,8
CUMULEE			**	**	**	**	**	**	**
ECART-TYPE REDUIT	5,2	5,7	4,6	1,5	1,6	2,2	2,2	1	1,8
% DE VARIATION		-18%	-54%	-64%	-61%	-78%	-80%	-87%	-88%

N = nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01

Les résultats obtenus avec les produits de référence sont présentés dans le tableau 50 et sur la figure 42.

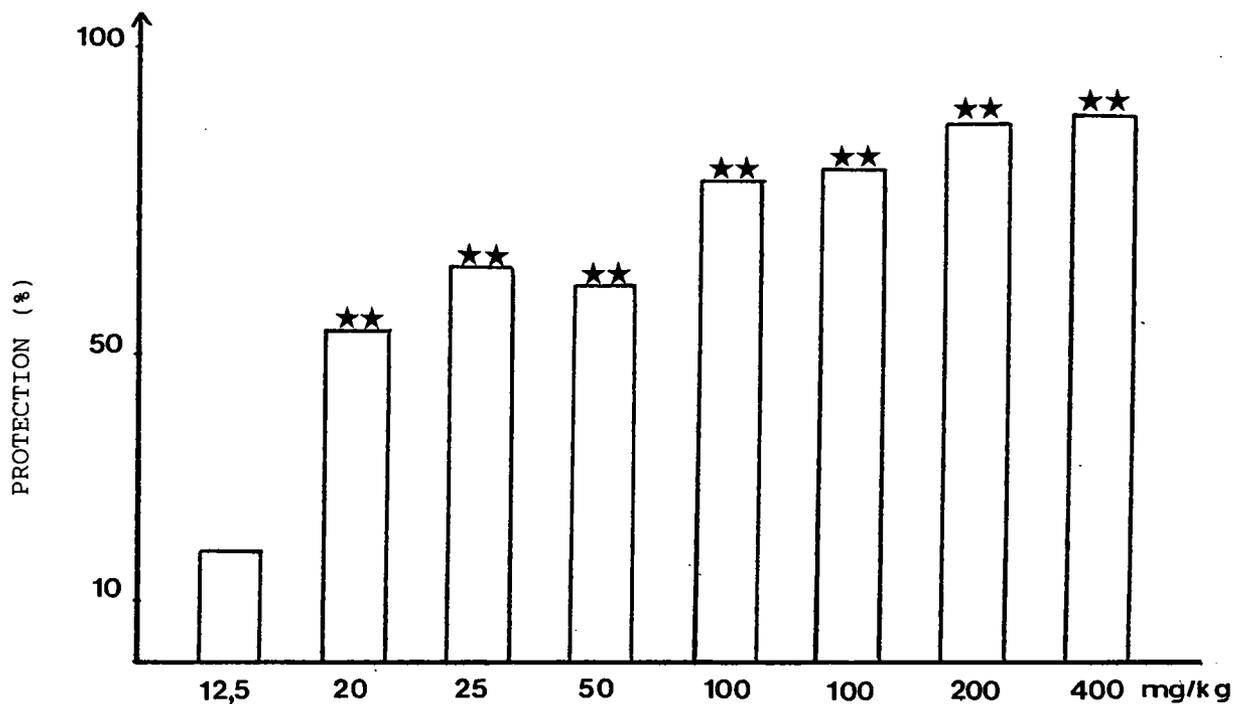
Si le clorazébate dipotassique (CD), administré à la dose de 40 mg/kg, ne réduit que très légèrement et de façon non significative le nombre de manifestations douloureuses (pourcentage de protection par rapport au lot témoin de 24 %), les trois analgésiques de référence employés, à savoir l'acétylsalicylate de lysine (ASL) et le paracétamol (P), deux analgésiques mineurs, ainsi que le sulfate de morphine (M), analgésique majeur, exercent un effet protecteur important et significatif, en réduisant de plus de 50 % les phénomènes douloureux (pourcentages de protection respectifs : 59 %, 60 % et 68 %).

**TABLEAU 50** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD), DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE (ASL), DU PARACETAMOL (P) ET DU SULFATE DE MORPHINE (M), VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR INDUITE PAR L'ACIDE ACETIQUE.

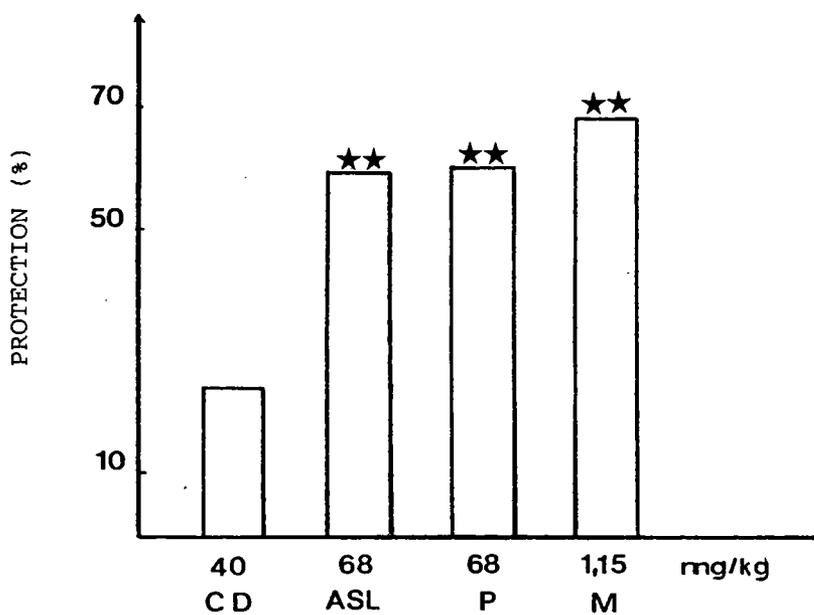
LOTS	TEMOIN (N=10)	CD 40 mg/kg (N=10)	ASL 68 mg/kg (N=10)	P 68 mg/kg (N=10)	M 1,15 mg/kg (N=10)
MOYENNE	50,4	38,5	20,8	20	16,4
ECART-TYPE	5,2	4,5	4,4	4,5	4,7
% DE VARIATION		-24%	-59%	-60%	-68%

N = nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01



**FIG. 41** : INFLUENCE D'E. HIRTA, VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR INDUITE PAR L'ACIDE ACETIQUE.



**FIG. 42** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD), DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE (ASL), DU PARACETAMOL (P) ET DU SULFATE DE MORPHINE (M), VIS-A-VIS D'UNE DOULEUR INDUITE PAR L'ACIDE ACETIQUE.

\*\*p < 0,01

## II - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE LA CHALEUR (test de la plaque chauffante)

Le test de la plaque chauffante permet de mettre en évidence l'activité des analgésiques majeurs uniquement.

### 3.1 Procédure expérimentale

#### 3.1.1 Animaux

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en un bain-marie (SBK 25D, Salvis, Lausanne) chauffé et contenant un récipient en verre, dans lequel est déposé l'animal au moment du test. La température au niveau de ce récipient, soit  $56^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , est choisie de telle façon que la réaction de l'animal soit obtenue aux environs de cinq secondes, réaction caractérisée par le léchage des pattes antérieures ou par un saut de l'animal pour tenter de s'échapper.

#### 3.1.2 Méthodes

La méthode utilisée est inspirée de celle de Janssen et Jageneau, décrite par Boissier et coll. (1956).

##### 3.1.2.1 Influence d'E. hirta , vis-à-vis de la chaleur

Avant tout traitement, chaque animal est soumis au test, à deux reprises, dans un intervalle de dix minutes, de façon à déterminer le temps de réaction individuel. La moyenne de ces deux valeurs constitue le temps de réaction individuel avant traitement.

Les substances à tester sont administrées par voie I.P., trente minutes avant le test proprement dit.

E. hirta est injectée aux doses de 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200

et 400 mg/kg.

Quatre produits de référence sont utilisés : le clorazépate dipotassique CD (Tranxène<sup>®</sup>, laboratoires Clin-Midy, Paris), aux doses de 20 et 40 mg/kg ; l'acétylsalicylate de lysine ASL (Aspegic<sup>®</sup>, laboratoires Synthelabo France, Paris), à raison de 68 mg/kg ; le paracétamol P (Pro-Dafalgan<sup>®</sup>, laboratoires Upsa, Reuil-Malmaison (92)), à raison de 68 mg/kg ; le sulfate de morphine M, aux doses de 1,15 - 2,30 - 4,60 et 9,20 mg/kg.

Le solvant consiste en NaCl 0,9 %.

Trente minutes après l'injection des produits, chaque animal est placé dans le récipient en verre du bain-marie ; son temps de réaction est alors évalué une seule fois et constitue le temps de réaction individuel après traitement.

Pour chaque lot traité, les temps moyens de réaction (T) avant et après traitement peuvent ainsi être calculés et permettre de déterminer un pourcentage de variation du seuil douloureux, selon le rapport :

$$\frac{\text{T avant traitement} - \text{T après traitement}}{\text{T avant traitement}} \times 100$$

Pour chaque lot traité, le nombre d'animaux présentant une analgésie positive est également déterminé ; l'analgésie est considérée comme positive, si le temps de réaction individuel après traitement a au moins doublé, par rapport au temps de réaction individuel estimé avant traitement.

### 3.1.2.2 Influence d'un antagoniste des sites récepteurs morphiniques, la naloxone, vis-à-vis des effets analgésiques d'E. hirta

Le principe de cette expérimentation est rigoureusement identique à celui détaillé dans le paragraphe précédent (3.1.2.1), la seule différence portant sur les produits injectés.

Ainsi, la naloxone N (Narcan<sup>®</sup>, laboratoires Siba-Geigy, Bâle) est injectée par voie sous-cutanée, à raison de 1 mg/kg, 15 minutes avant l'injection I.P. des produits à tester, et donc

45 minutes avant le test.

Les produits testés sont E. hirta, utilisée à la dose de 200 mg/kg, et le sulfate de morphine M à 10 mg/kg. Pour E. hirta, deux essais sont réalisés. Un lot d'animaux reçoit le solvant (NaCl 0,9 %) dans les mêmes conditions et constitue le lot témoin "naloxone".

Le pourcentage de variation du seuil douloureux, ainsi que le nombre d'animaux présentant une analgésie positive, sont calculés pour chaque lot traité.

### 3.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances, par le test de Bartlett, de Cochran ou Hartley, les comparaisons statistiques sont effectuées, pour chaque lot traité, sur les temps de réaction avant et après traitement, par le test de Student. La DE 50, pour E. hirta et le sulfate de morphine, dose efficace induisant une analgésie positive chez 50 % des animaux, est évaluée selon la méthode de Lichtfield et Wilcoxon (1949).

### 3.2 Résultats

D'après les résultats présentés dans le tableau 51 et sur la figure 43, E. hirta augmente significativement le temps de réaction de la souris vis-à-vis de la chaleur, dès la dose de 25 mg/kg (pourcentage de variation du temps de réaction par rapport au temps relevé avant traitement : 51 %). Cet effet est dose-dépendant, le pourcentage de variation du temps de réaction, calculé par rapport au temps relevé avant traitement, étant de 126 %, avec la dose de 400 mg/kg. La DE 50 est estimée à 141 mg/kg (138,6-143,5).

TABLEAU 51 : INFLUENCE d'E. HIRTA VIS-A-VIS DE LA CHALEUR.

		EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)											
LOTS		12,5 (N=10)		25 (N=10)		50 (N=10)		100 (N=10)		200 (N=10)		400 (N=10)	
		avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:
MOYENNE	(secondes)	4,4	5,4	5,5	8,3	4,9	7,1	5,1	9	5	9,8	4,6	10,4
					**		*		***		***		***
ECART-TYPE	REDUIT	0,3	0,4	0,4	0,9	0,4	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,2	0,9
% DE	VARIATION		23%		51%		45%		77%		96%		126%
% ANALGESIE	POSITIVE		10%		30%		20%		40%		55%		70%

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.

Les résultats obtenus avec les produits de référence sont présentés dans le tableau 52 et sur la figure 44.

Si les deux analgésiques mineurs utilisés, l'acétylsalicylate de lysine (ASL) et le paracétamol (P), n'exercent aucune protection vis-à-vis de la chaleur (pourcentages de variation respectifs de -11 % et -4 %), l'administration de doses relativement fortes de clorzébate dipotassique (CD), soit 20 et 40 mg/kg, augmente significativement le temps de réaction des animaux ; toutefois, cet effet n'est pas corrélé avec la dose (pourcentages de variation respectifs : 43 % et 35 %).

Tout comme dans le cas d'E. hirta, une relation dose-effet est obtenue avec le sulfate de morphine (M), un effet protecteur significatif se manifestant dès la dose de 2,30 mg/kg (pourcentage de variation de 40 %).

Le pourcentage maximal d'analgésie positive, obtenu avec la plus forte dose de sulfate de morphine n'étant que de 40 %, la DE 50 n'a pu être estimée.

Les effets de la naloxone, administrée par voie sous-cutanée à la dose de 1 mg/kg, sur l'activité analgésique d'E. hirta ou du sulfate de morphine, injectés 15 minutes après cet antagoniste morphinique, sont reportés dans le tableau 53 et sur la figure 45 .

D'après les résultats obtenus, la naloxone, dépourvue de tout effet protecteur propre vis-à-vis de la chaleur (pourcentage de variation du lot témoin "naloxone" : -11 %), supprime totalement ou presque les effets analgésiques du sulfate de morphine (pourcentage de variation de + 12 %) et d'E. hirta (pourcentage de variation dans chacun des deux essais : -2 % et + 8 %).

**TABLEAU 52** : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD), DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE (ASL),  
DU PARACETAMOL (P) ET DU SULFATE DU MORPHINE (M), VIS-A-VIS DE LA CHALEUR.

LOTS	CD (mg/kg)		ASL (mg/kg)		P (mg/kg)		M (mg/kg)									
	20 (N=10)	40 (N=10)	68 (N=10)	68 (N=10)	1,15 (N=10)	2,30 (N=10)	4,60 (N=10)	9,20 (N=10)	18,40 (N=10)	27,60 (N=10)	36,80 (N=10)	46,00 (N=10)				
	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:	avant:	après:
MOYENNE (secondes)	4,9	7	4,8	6,5	5,3	4,7	5	4,8	4,5	5,4	4	5,6	5	7,3	5,1	9,4
ECART-TYPE REDUIT	0,3	0,6	0,1	0,7	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,6	0,1	0,3	0,2	0,7	0,3	0,7
% DE VARIATION		+43%		+35%		-11%		-4%		+20%		+40%		+46%		+84%
% ANALGESIE POSITIVE		20%		10%		0%		0%		10%		0%		10%		40%

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

475 -

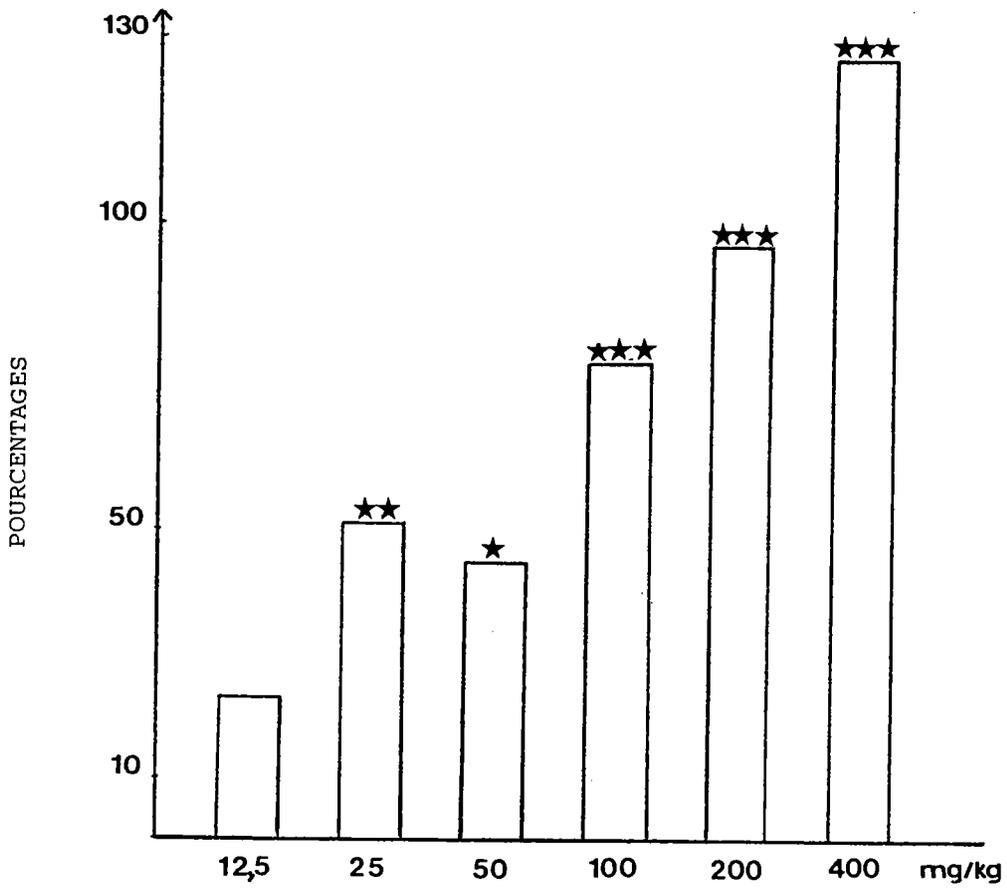


FIG. 43 : INFLUENCE D'E. HIRTA, VIS A VIS DE LA CHALEUR.

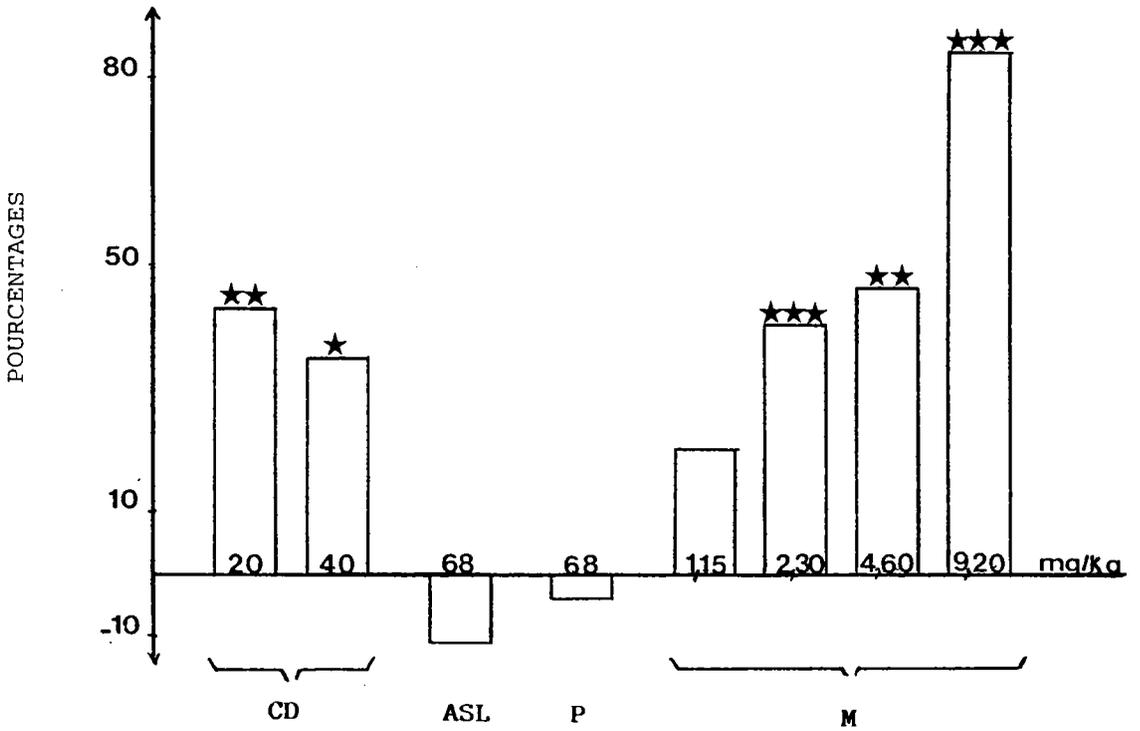


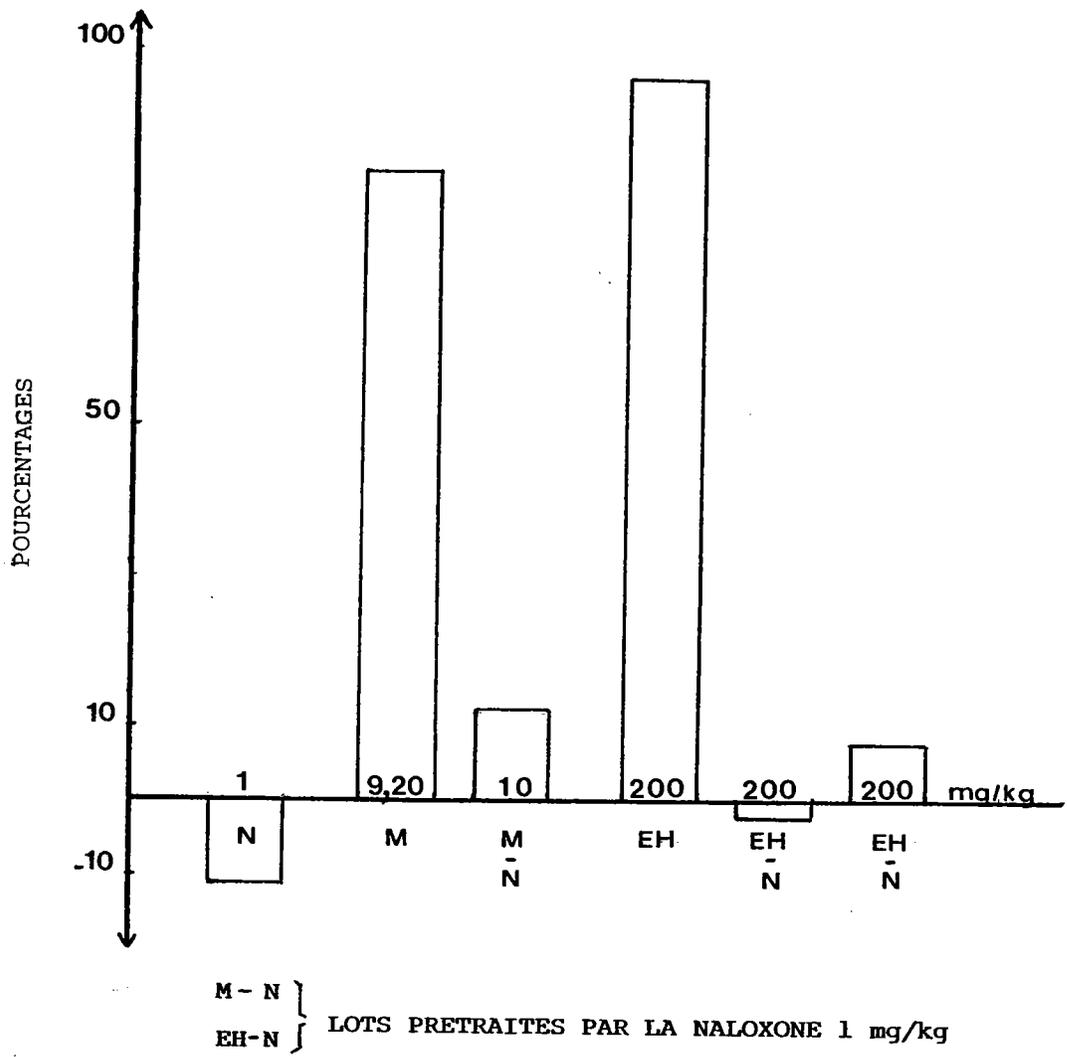
FIG. 44 : INFLUENCE DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (CD), DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE (ASL), DU PARACETAMOL (P), ET DU SULFATE DE MORPHINE (M), VIS-A-VIS DE LA CHALEUR.

★ p < 0,05 ; ★★ p < 0,01 ; ★★★ p < 0,001

**TABLEAU 53** : INFLUENCE DE LA NALOXONE (1 mg/kg) VIS-A-VIS DES EFFETS ANALGESIQUES DU SULFATE DE MORPHINE (M) ET D' E. HIRTA.

LOTS	TEMOIN		M		E. HIRTA			
	NALOXONE		10 mg/kg		200 mg/kg			
	(N=10)		(N=10)		(N=10)		(N=10)	
	avant:	après	avant:	après	avant:	après	avant:	après
MOYENNE	5,3	4,7	4,9	5,5	5,3	5,2	4,8	5,2
ECART-TYPE	0,3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4
REDUIT								
% DE VARIATION		-11%		+12%		-2%		+8%
% ANALGESIE POSITIVE		0%		0%		0%		0%

N = nombre d'animaux par lot.



**FIG. 45 :** INFLUENCE DE LA NALOXONE (N) ADMINISTREE A 1 mg/kg, VIS-A-VIS DES EFFETS ANALGESIQUES DU SULFATE DE MORPHINE (M) ET D'E. HIRTA (EH).

## II - 4 DISCUSSION

L'objectif initial de cette étude était la mise en évidence de propriétés analgésiques centrales d'un extrait aqueux d'E. hirta, propriétés qui auraient pu justifier en grande partie l'effet dépresseur central précédemment obtenu et se manifestant notamment par une activité sédatrice importante (Chapitre B I).

Effectivement, les analgésiques centraux du type morphine sont connus pour agir directement au niveau du système nerveux central, sur de multiples sites d'action en relation avec les différentes structures impliquées dans les phénomènes douloureux.

Du fait de cette action centrale, l'effet antalgique peut se développer à l'encontre de douleurs induites aussi bien par des facteurs chimiques (agents algiques tels que la phénylbenzoquinone, l'acide acétique), électriques, que mécaniques (action de la chaleur...). Ainsi, ces composés sont actifs dans les tests du writhing et de la plaque chauffante.

A l'inverse, les antalgiques mineurs du type aspirine exercent une action principalement d'origine périphérique, au niveau même du stimulus douloureux, et agissent en cas de douleurs associées à une lésion tissulaire, bien qu'une action centrale soit également probable. Ces composés sont inactifs dans le test de la plaque chauffante.

Ces notions ont pu être vérifiées expérimentalement, au cours de notre étude. Ainsi, si les deux analgésiques mineurs employés, l'**acétylsalicylate de lysine** et le **paracétamol**, se révèlent actifs vis-à-vis de la douleur induite par l'acide acétique (pourcentages de protection respectifs : 59 % et 60 %) ils restent inefficaces vis-à-vis de celle occasionnée par la chaleur.

Concernant l'analgésique majeur de référence, notre choix s'est porté sur le **sulfate de morphine**. Si la DE 50 est estimée à 2,3 mg/kg dans la littérature (Barnes et Eltherington, 1973), l'intensité des effets varie selon le test considéré et pour

une même dose de produit, une efficacité nettement supérieure étant obtenue dans le test du writhing. Ainsi, administré à la dose de 1,15 mg/kg, le sulfate de morphine réduit de 68 % l'effet douloureux induit par l'acide acétique, mais n'augmente le seuil de la douleur due à la chaleur que de 20 %. Une protection proche de 50 % n'est obtenue qu'avec la dose de 4,6 mg/kg.

L'étude de l'influence du **clorazépate dipotassique**, sur les effets algiques de l'acide acétique et de la chaleur, nous a paru judicieux, en raison de l'utilisation de ce dérivé benzodiazépinique lors des recherches précédemment menées (recherche de propriétés sédatives, anxiolytiques, potentialisatrices du sommeil barbiturique, anti-convulsivantes et myorelaxantes - Chapitres B et C). Ce composé n'étant pas connu pour développer des effets analgésiques conséquents, nous avons voulu vérifier si un effet sédatif suffisamment marqué pouvait à lui seul engendrer une certaine protection vis-à-vis de la douleur, phénomène également envisageable pour l'extrait aqueux d'E. hirta.

C'est ainsi qu'un tel effet, cependant très faible et statistiquement négligeable, est observé vis-à-vis d'une douleur occasionnée par l'acide acétique (protection de 24 %, après injection d'une dose de 40 mg/kg) ; par contre, une protection plus importante est obtenue vis-à-vis de la chaleur (augmentation du temps de réaction de l'animal à la chaleur de 43 % et de 35 %, après injection respective des doses de 20 et de 40 mg/kg).

En raison de cette dissociation des effets (protection uniquement vis-à-vis de la chaleur) qui, par ailleurs, ne sont pas corrélés avec la dose de produit administrée, une activité analgésique proprement dite ne peut être retenue pour le clorazépate dipotassique. L'action dépressive centrale induite par de fortes doses sédatives pourrait expliquer la réduction de la sensibilité de la souris à la chaleur.

Qu'en est-il d'E. hirta, également dotée d'une activité dépressive centrale?

En fait, cet extrait végétal présente un profil d'activité tout

à fait différent de celui obtenu avec le clorazépate dipotasique et se révèle efficace dans les deux expérimentations réalisées et de façon dose-dépendante.

Comme dans le cas du sulfate de morphine, une efficacité légèrement supérieure semble transparaître dans le test du writhing. Cependant, cette différence est moins flagrante et les doses efficaces, diminuant la réponse de l'animal face à la douleur induite par l'acide acétique et augmentant son temps de réaction vis-à-vis de la chaleur d'environ 50 %, sont très proches (20 mg/kg dans le test du writhing et 25 mg/kg dans le test de la plaque chauffante).

L'estimation de la DE 50, dans le test de la plaque chauffante, basée sur le nombre d'analgésies positives, s'avère infiniment plus sévère, quant à l'efficacité analgésique d'E. hirta, mais aussi de sulfate de morphine.

Ainsi, cette dose est évaluée à 141 mg/kg pour E. hirta, alors qu'administré à la dose de 100 mg/kg l'extrait végétal diminue la sensibilité de la souris de 77 %. Concernant l'analgésique majeur de référence, cette DE 50 n'a pu être évaluée, la plus forte dose testée, soit 9,20 mg/kg, ne provoquant que 40 % d'analgésie positive.

Divers rapprochements, quant à l'intensité des effets analgésiques d'E. hirta et des antalgiques de référence, peuvent être effectués selon le test considéré.

Ainsi, dans le cas de la douleur induite par l'acide acétique, une dose d'extrait végétal de 50 mg/kg aurait une efficacité proche de celle obtenue avec les deux analgésiques mineurs (acétylsalicylate de lysine et paracétamol) administrés à la dose de 68 mg/kg, mais son action serait légèrement inférieure à l'activité analgésique développée par une dose de 1,15 mg/kg de sulfate de morphine.

Par contre, cette même dose d'extrait végétal réduirait la sensibilité de l'animal à la chaleur, de façon similaire à la dose de 4,6 mg/kg de sulfate de morphine.

Ces divers résultats laisseraient présager d'un profil d'activité de type morphinique, pour l'extrait aqueux d'E. hirta, qui exercerait donc des effets analgésiques centraux ; résultats qui, par ailleurs, infirment ceux précédemment obtenus par Dhar et ses collaborateurs (1968), lesquels constataient l'absence d'effets analgésiques dans les tests de Haffner (douleur occasionnée par le pincement de la queue) et de la plaque chauffante. Toutefois, il est important de préciser que ces travaux ont été effectués sur un extrait alcoolique et non aqueux comme dans notre étude ; de plus, ces travaux consistent en un vaste screening pharmacologique réalisé sur 250 espèces végétales ; enfin, les auteurs ne donnent aucune précision sur les protocoles expérimentaux, les dose d'extraits utilisées...

De telles différences dans les activités de ces deux types de préparations ne sont pas exceptionnelles et ont été précédemment mentionnées, lors de la recherche de propriétés anti-histaminiques (inefficacité de l'extrait aqueux, activité anti-histaminique de divers extraits alcooliques ou hydro-alcooliques) (Chapitre D I).

Cette hypothèse d'une activité analgésique centrale est confortée par l'obtention d'un antagonisme des effets analgésiques d'E. hirta vis-à-vis de la chaleur, par l'administration de naloxone, antagoniste spécifique entrant en compétition avec les dérivés morphiniques, pour l'occupation des sites récepteurs concernés.

L'étude de l'action d'E. hirta au niveau des récepteurs aux opiacés, par la réalisation d'une technique in vitro (notamment sur l'iléon isolé de cobaye ou sur des extraits de cerveau) pourrait apporter de plus amples informations, quant à l'hypothèse d'un profil d'activité de type morphinique. La recherche d'une éventuelle affinité pour les sites récepteurs  $\mu$ , sur lesquels agirait sélectivement la morphine, mais également pour les autres sites récepteurs aux endomorphines ( $\delta$ ,  $\kappa$  et  $\epsilon$ ), pourrait présenter un intérêt certain et faire l'objet d'une prochaine étude.

Cette confirmation de l'existence de propriétés analgésiques centrales pour E. hirta permet également de valoriser certaines des indications traditionnelles couramment mises à profit dans diverses contrées tropicales et sub-tropicales (deuxième partie, section A).

Ainsi, E. hirta est employée pour apaiser les douleurs caractéristiques de la dysentérie chronique (consommation d'une décoction d'E. hirta associée à d'autres plantes), ou celles liées aux fissurations anales apparaissant à la suite de diarrhées répétitives (décoction de plante entière utilisée en bain de siège). Cette plante entre également dans le traitement des dysménorrhées, en association avec d'autres plantes (usage interne), ou des varices douloureuses (usage externe). Enfin, les cendres de la plante entière sont utilisées en application pour calmer les céphalées.

Parmi les nombreuses substances, destinées initialement à la thérapeutique analgésique, rares sont celles dotées de telles propriétés pratiquement pures. Citons le cas de la glafénine, pour laquelle des activités anti-inflammatoires et anti-pyrétiques, démontrées expérimentalement, ne semblent pas intervenir en clinique, aux doses analgésiques ; la clomé-tacine, isomère de l'indométacine, est également utilisée en thérapeutique comme analgésique dépourvu des propriétés anti-inflammatoires caractéristiques de son isomère.

Très fréquemment, l'activité analgésique est associée à des propriétés anti-pyrétiques et/ou anti-inflammatoires, plus ou moins conséquentes selon les substances. Ainsi, les salicylates sont considérés comme le type de médicament analgésique, anti-pyrétique et anti-inflammatoire. Il en va de même de certains dérivés de la pyrazolone (phénazone, aminophénazone), qui toutefois présentent une activité anti-inflammatoire de très faible intensité, tandis que les dérivés du para-aminophénol (phénacétine, paracétamol) en sont pratiquement dépourvus. Autre dérivé de la pyrazolone, la phénylbutazone, n'exerce, quant à elle, qu'une faible activité analgésique et

est essentiellement employée par son action anti-inflammatoire.

La morphine elle-même est connue pour altérer le fonctionnement du centre thermorégulateur de l'hypothalamus. Elle peut induire divers phénomènes caractéristiques de la thermolyse (sudation, vasodilatation) et engendrer une hypothermie à fortes doses, effet également obtenu avec E. hirta, au cours des expérimentations précédemment menées sur la recherche de propriétés neuroleptiques (Chapitre IV - 4) et anti-dépressives (Chapitre V - 3), bien que les mécanismes d'action impliqués demeurent inconnus.

De plus, Gyires et ses collaborateurs (1985) ont obtenu une certaine activité anti-inflammatoire pour cet analgésique majeur, sur le modèle de l'oedème induit par la carragénine. Selon les auteurs, cet effet pourrait s'expliquer partiellement par l'inhibition de la libération de bradykinine, l'un des médiateurs impliqué dans la phase vasculaire du processus inflammatoire (Schmitt, 1973 - Reuse, 1978 - Benoist et Misset, 1979).

C'est pourquoi, la mise en évidence de propriétés analgésiques pour l'extrait aqueux d'E. hirta nous a tout naturellement conduit à rechercher l'existence d'éventuels effets anti-pyrétiques, puis anti-inflammatoires.

*III*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI - PYRETIQUES*

### III - 1 INTRODUCTION

(Schmitt, 1973 - Wright, 1973 - Brouilhet et Giroud, 1978 - Schorderet et coll., 1978 - Benoist et Misset, 1979 - Famaey, 1983).

#### \* Mécanismes thermorégulateurs

Les organismes homéothermes sont capables de maintenir leur température centrale constante malgré les larges variations thermiques ambiantes, grâce à la modification de la température cutanée. Les effecteurs assurant la production et la perte de chaleur sont contrôlés par l'hypothalamus, qui est informé de l'état thermique de la surface corporelle par les afférences provenant des récepteurs thermiques de la peau, la détection des variations de la température du sang étant rendue possible grâce à des récepteurs situés dans le courant circulatoire. Ainsi, la région postérieure de ce centre thermorégulateur intervient en réponse à un abaissement de la température corporelle, sa stimulation augmentant l'activité sympathique et entraînant notamment une vasoconstriction et des frissons ; tandis que l'hypothalamus antérieur (aire pré-optique) peut être considéré comme le centre répondant à l'élévation de la température corporelle et dont la stimulation met en action les mécanismes qui jouent un rôle dans la thermolyse (halètement, sudation, vasodilatation...).

De par ses connexions étroites avec cet important relais sensitif qu'est le thalamus, connexions permettant la réception des influx afférents, de par ces efférences aux systèmes nerveux somatique et autonome, l'hypothalamus peut ainsi modifier l'activité des muscles, des glandes, la circulation cutanée, la sécrétion sudorale et la ventilation pulmonaire.

#### \* La fièvre

La fièvre peut être définie comme l'élévation de la température centrale, liée à l'augmentation de la production de chaleur et la diminution simultanée de la perte de chaleur ; elle provoque

notamment une augmentation du métabolisme par accélération des oxydations organiques.

Ce phénomène résulte d'une perturbation des centres thermorégulateurs hypothalamiques, sous l'action de substances dites pyrogènes, d'origine bactérienne (endotoxines des bactéries Gram négatif), mais également trouvées dans les tissus des mammifères. Ces pyrogènes bactériens semblent agir en liaison avec les leucocytes polynucléaires pour produire des pyrogènes endogènes (interleukines I), responsables de l'augmentation de la production des prostaglandines E, au niveau des capillaires et des artérioles cérébraux, qui exerceraient une action directe sur l'hypothalamus.

#### \* Mécanismes d'action des substances anti-pyrétiques

Les médicaments capables de s'opposer à cette hyperthermie sont appelés anti-pyrétiques. Très généralement, ces composés sont également dotés d'une certaine activité analgésique et/ou anti-inflammatoire plus ou moins développée, comme cela est le cas des salicylates, des dérivés du para-aminophénol (phénacétine, paracétamol), de la pyrazolone (phénazone, aminophénazone, noraminophénazone) et de l'acide anthranilique (acide méfénamique, acide niflurique).

Les mécanismes d'action mis en jeu au cours de cette activité anti-pyrétique ont plus particulièrement été étudiés dans le cas des salicylates et des dérivés du para-aminophénol. Ainsi, de par leur efficacité sélective à l'égard des fièvres déclenchées par les pyrogènes, ces composés agiraient indirectement sur les noyaux hypothalamiques impliqués dans la thermolyse (aire pré-optique), par inhibition de la synthèse des prostaglandines ; toutefois, ils restent inactifs sur les prostaglandines préformées et n'abaissent la température que chez les sujets fébriles, la température normale n'étant pratiquement pas modifiée. Cette action anti-pyrétique résulte d'un accroissement de la thermolyse par vasodilatation périphérique et sudation, sans inhibition de la thermogenèse.

Dans le cas de la morphine, la perturbation du fonctionnement du centre thermorégulateur de l'hypothalamus se fait direc-

tement, par action au niveau des systèmes de contrôles, sans l'intermédiaire des prostaglandines dont la synthèse ne serait pas augmentée par cet analgésique central, certains auteurs en mentionnant même la stimulation (Gyires et coll., 1985).

**\* Modèle expérimental**

Dans le but de rechercher l'existence de propriétés anti-pyrétiques pour E. hirta, nous avons choisi de mener cette étude sur le modèle de l'hyperthermie à la levure, très fréquemment utilisé.

Chez le rat, les effets de cet agent pyrogène se manifestent dans la deuxième heure qui suit son injection sous-cutanée, pour atteindre un maximum vers la quatrième heure et se stabiliser jusqu'à la trente-sixième heure.

### III - 2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

#### 2.1 Animaux

Les animaux utilisés sont des rats mâles OFA (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées au paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

#### 2.2 Méthode

La technique est inspirée de la méthode décrite par Rouveix (1980).

La veille de l'expérimentation, une heure avant la prise de la température rectale (T), à l'aide d'un thermomètre à mercure, les animaux sont mis à la diète solide.

Seuls sont conservés pour le test les animaux dont la température rectale est comprise entre 37°5 et 38°5 C.

Environ une heure après le relevé de la température normale de l'animal (T), tous les animaux, sauf ceux du lot témoin normothermique, reçoivent une injection inter-scapulaire sous-cutanée d'une suspension de levure, à raison de 10 ml/kg, soit une dose de 2 g de levure/kg.

Cette suspension est obtenue par broyage à froid, dans un mortier, de 20 g de superlevure Gayelord Hauser Torula (DIEPAL SA, Villefranche sur Saône (69)), dans 80 ml de NaCl 0,9 %, le volume final étant complété à 100 ml.

Seize heures après l'injection de levure, la température des animaux est à nouveau mesurée (To).

Seuls sont conservés pour le test les animaux dont la température rectale est comprise entre 36°5 et 37°5 C, pour le lot témoin normothermique, et entre 38°5 et 39°5 C, pour les animaux ayant reçu l'injection de levure (lots hyperthermiques).

Si cela s'avère nécessaire, les animaux hyperthermiques sont à nouveau répartis, de façon à homogénéiser les températures

entre les différents lots.

Les produits étudiés sont ensuite administrés aux animaux hyperthermiques, par injection I.P.

L'extrait végétal est testé aux doses de 100 et 400 mg/kg.

Le produit de référence utilisé est l'acétylsalicylate de lysine **ASL** (Aspégic<sup>®</sup>, laboratoires Synthelabo France, Paris), à la dose de 200 mg/kg.

Les animaux témoins normothermiques (pas d'injection de levure) et hyperthermiques (injection de levure) reçoivent le solvant, NaCl 0,9 %, dans les mêmes conditions.

La température rectale des animaux est ensuite mesurée 30 minutes, puis 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 heures après l'injection des produits.

Les résultats sont exprimés en variations moyennes de la température, afin de supprimer les fluctuations individuelles observées au cours de la journée.

Ces variations sont calculées à partir des températures moyennes obtenues pour chaque lot, aux différents relevés, et par différence avec la température moyenne normale du rat relevée avant l'injection des produits ( $T_0$  des rats normothermiques).

### **2.3 Analyse statistique**

Après vérification de l'homogénéité des variances par les tests de Cochran et Hartley, les différences de températures calculées par rapport à  $T_0$ , pour le lot normothermique et les lots hyperthermiques traités par E. hirta ou l'acétylsalicylate de lysine, sont comparées aux différences de températures calculées par rapport à  $T_0$ , pour le lot témoin hyperthermique, par le test de Student.

### III - 3 RESULTATS

Les résultats sont présentés dans le tableau 54 et sur la figure 46 .

Seize heures après son injection, la levure induit une hyperthermie significative, qui se maintient durant toute la durée de l'expérimentation (soit sept heures).

Administrée aux doses de 100 et 400 mg/kg, E. hirta inhibe fortement et de façon significative l'hyperthermie induite par la levure, dans les trente minutes qui suivent son administration.

Tout au long de l'expérimentation, cet effet reste plus important pour la plus forte dose d'extrait végétal testée, soit 400 mg/kg, laquelle ramène la température moyenne à des valeurs relativement proches de celles obtenues pour le lot témoin normothermique et ceci durant les cinq premières heures qui suivent son administration.

L'inhibition maximale est obtenue une heure après son injection (chutes respectives par rapport à la température moyenne des rats en hyperthermie et après injection des doses de 100 et 400 mg/kg : 1°7 et 1°9 C).

Par la suite, la température réaugmente progressivement ; toutefois, l'écart entre les températures moyennes du lot témoin hyperthermique et de chaque lot traité par E. hirta reste significatif cinq et six heures après l'injection respective des doses de 100 et 400 mg/kg d'extrait végétal.

Le produit de référence utilisé, l'acétylsalicylate de lysine, présente un profil d'inhibition de la température rectale relativement similaire à celui obtenu pour E. hirta, mais plus marqué : ainsi, un effet maximal est obtenu une heure après son injection (chute de 2°5 C, par rapport à la température moyenne des rats en hyperthermie). La température remonte ensuite progressivement pour se stabiliser au bout de cinq heures,

l'effet inhibiteur de l'acétylsalicylate de lysine restant encore significatif (chute de 1°2 C, par rapport à la température moyenne des rats en hyperthermie).

**TABLEAU 54 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE VIS-A-VIS DE L'HYPERTHERMIE INDUITE PAR LA LEVURE.**

LOTS	TEMPERATURES RECTALES MOYENNES (°C) RELEVÉES PAR									
	T	To	T30mn	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h
TEMOINS NORMOTHERMIQUES	37°8	37°	38°	37°9	37°6	37°7	38°1	37°9	37°8	37°8
(N=4)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,06	0,09	0,05	0,07	0,08	0,13	0,05	0,09	0,13	0,08
		***	***	***	***	***	***	***	***	***
TEMOINS HYPERTHERMIQUES	38°1	39°3	39°4	39°4	39°5	39°4	39°3	39°3	39°2	39°3
(N=4)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,07	0,07	0,07	0,05	0,05	0,06	0,08	0,05	0,06	0,07
E.HIRTA 100 mg/kg	38°	39°3	38°2	37°7	38°5	38°3	38°6	38°9	39°	39°1
(N=4)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,17	0,11	0,29	0,24	0,08	0,07	0,14	0,11	0,06	0,05
			**	***	***	***	**	*		
E.HIRTA 400 mg/kg	38°	39°3	37°9	37°5	37°7	37°7	37°9	38°	38°4	38°5
(N=4)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,07	0,07	0,33	0,32	0,54	0,33	0,05	0,16	0,22	0,33
			**	**	*	**	***	***	*	
ASL 200 mg/kg	38°	39°2	37°3	36°9	37°3	37°5	37°9	38°1	38°1	38°1
(N=4)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,07	0,14	0,25	0,18	0,12	0,04	0,04	0,18	0,08	0,04
			***	***	***	***	***	***	***	***

↑            ↑  
 levure      produits

N = nombre d'animaux par lot

Comparaisons statistiques par rapport aux témoins hyperthermiques : \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

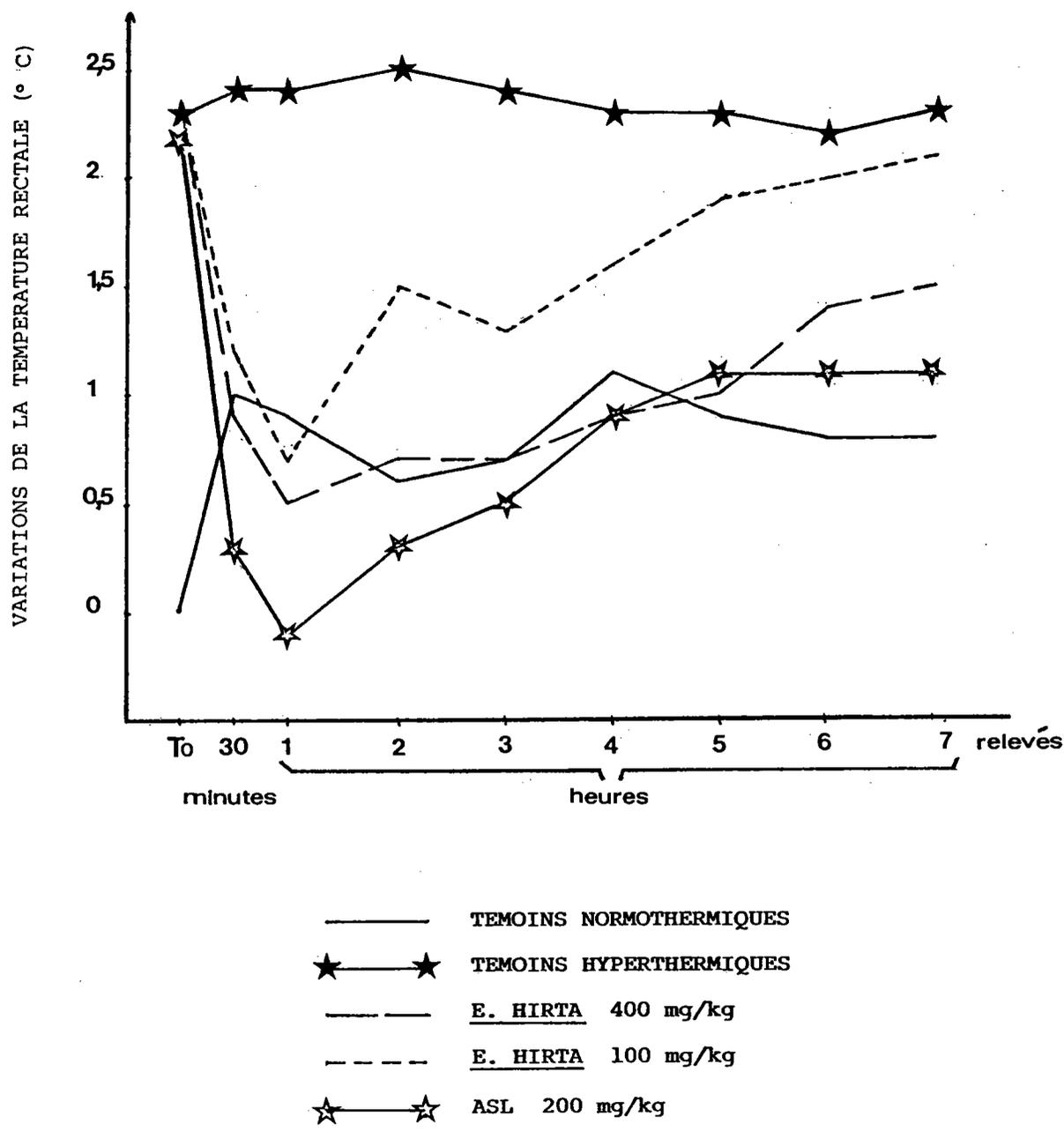


FIG. 46 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'ACETYLSALICYLATE DE LYSINE (ASL), VIS-A-VIS DE L'HYPERTHERMIE INDUITE PAR LA LEVURE.

### III - 4 DISCUSSION

Cette expérimentation basée sur l'induction d'une hyperthermie par injection inter-scapulaire d'un agent pyrogène, en l'occurrence une suspension de levures *Torula* tuées nous a donc permis de déceler une activité anti-pyrétique pour l'extrait végétal, administré aux doses sédatives de 100 et 400 mg/kg, effet d'autant plus prononcé que la dose est forte.

Le profil d'activité d'E. hirta est, par ailleurs, relativement proche de celui obtenu avec la substance de référence, l'acétylsalicylate de lysine, administrée à la dose de 200 mg/kg. En effet, la température rectale chute brutalement dans la première heure qui suit l'injection des produits testés, pour ensuite réaugmenter progressivement dans les six heures qui suivent.

Toutefois, quelques divergences sont à mentionner, notamment en ce qui concerne l'intensité des effets obtenus, nettement plus marqués dans le cas de l'acétylsalicylate de lysine qui induit une chute maximale de 2°5 C, E. hirta ne baissant la température que de 1°7 C et 1°9 C, lorsqu'elle est administrée aux doses respectives de 100 et 400 mg/kg. De plus, si une heure après son injection l'extrait végétal antagonise totalement l'hyperthermie induite par la levure, en ramenant la température rectale à des valeurs proches de la température normale (37°7 C et 37°5 C, respectivement par les doses de 100 et 400 mg/kg), le produit de référence est responsable d'une chute beaucoup plus conséquente, nettement en deçà de la température normale (température rectale moyenne de 36°9 C). Enfin, tandis que l'activité anti-pyrétique d'E. hirta tend à s'estomper progressivement, tout en restant significative cinq à six heures après son administration, les effets pyrogènes de la levure reprenant petit à petit le dessus, l'activité de l'acétylsalicylate de lysine persiste durant toute l'expérimentation, la température rectale se stabilisant à 38°1 C, dans les cinq heures qui suivent son injection.

En fait, la dose élevée d'acétylsalicylate de lysine utilisée, soit 200 mg/kg, explique l'importance de l'activité anti-pyrétique obtenue. Ainsi, dans cette même expérimentation,

Rouveix (1980) a pu estimer la dose efficace 50 à 70 mg/kg, après administration orale.

La confirmation expérimentale d'une activité anti-pyrétique pour E. hirta permet, par la même occasion, de valoriser son utilisation en médecine traditionnelle, en tant que fébrifuge (deuxième partie, section A).

En effet, la plante est réputée pour de telles propriétés, dans diverses contrées tropicales et sub-tropicales, où les parties aériennes, les feuilles, mais aussi la plante entière peuvent être diversement employées (décoction, bains, inhalation de la fumée...).

Après avoir démontré l'existence de propriétés analgésiques centrales, de type morphinomimétique, et de propriétés anti-pyrétiques pour l'extrait aqueux d'E. hirta, il nous est apparu indispensable de compléter ce profil d'activité par la recherche d'éventuelles propriétés anti-inflammatoires. Effectivement, ces trois types d'activités sont fréquemment associés, comme c'est le cas pour les salicylés, dont les usages thérapeutiques concernent ces trois indications.

*IV*

*RECHERCHE DE PROPRIETES*

*ANTI - INFLAMMATOIRES*

## IV - 1 INTRODUCTION

### \* La réaction inflammatoire

(Wright, 1973 - Lioté, 1987).

L'inflammation peut être définie comme l'ensemble des réponses cellulaires et humorales à une lésion tissulaire d'origine mécanique, chimique, néoplasique, allergique ou infectieuse. Cette réaction physiologique se déroule dans tous les tissus ou organes et est habituellement réversible. Elle constitue en fait un mécanisme protecteur permettant la restauration de la fonction normale, par la mise en jeu des vaisseaux sanguins, des leucocytes, du plasma, des terminaisons nerveuses sensibles, en association avec la libération de constituants cellulaires normaux.

Dans certaines conditions, elle peut être perturbée et conduire à un état inflammatoire chronique dont la polyarthrite rhumatoïde est un exemple.

Du point de vue macroscopique, l'inflammation aiguë est souvent caractérisée par les cinq symptômes suivants : rougeur, tuméfaction, chaleur, douleur et perte de fonction.

Cette réaction inflammatoire n'est pas isolée, mais intervient avec d'autres processus homéostatiques tels que la coagulation, la fibrinolyse, la fibrinogenèse, le métabolisme du collagène, les réactions immunitaires, hormonales et cellulaires.

Très schématiquement, trois phases successives se chevauchant plus ou moins peuvent être distinguées : les phases vasculaire, cellulaire et de réparation.

**La phase vasculaire**, quasi immédiate, est caractérisée par l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Plus précisément, la lésion occasionnée induit une vasoconstriction artériolaire brève et transitoire, suivie d'une vasodilatation prolongée, initiée par la libération d'histamine ou de sérotonine, à la suite de la dégranulation des polynucléaires basophiles et des mastocytes tissulaires. L'histamine possède non seulement une

activité pro-inflammatoire par son action vasodilatatrice, mais également une action anti-inflammatoire par le biais de récepteurs H2 situés sur les polynucléaires et les lymphocytes dont elle inhibe le chimiotactisme et l'action phagocytaire. Quant à la sérotonine, sa libération des plaquettes sanguines peut se traduire, chez les mammifères, par de la douleur, surtout en présence de bradykinine.

Cette vasodilatation serait ensuite maintenue par des substances à action plus lente ou plus prolongée, telles que les kinines plasmatiques très algogènes (notamment la bradykinine) formées à partir d'une  $\alpha$ -2 globuline (kininogène), certaines fractions du complément (C3a, C5a), certaines prostaglandines (PGE2, PGD2, PGI2) et leucotriènes (LTB4), ces deux derniers types de médiateurs jouant un rôle central dans l'inflammation).

La contraction des cellules endothéliales, notamment au niveau des veinules post-capillaires, induit une extravasation de plasma et la formation d'un oedème interstitiel.

A cette première étape fait suite une **phase cellulaire**, caractérisée par deux vagues cellulaires successives, les polynucléaires neutrophiles, puis les monocytes.

Les premiers sont attirés par diverses substances chimiotactiques libérées ou activées, comme la fraction C5a du complément, le collagène, le fibrinogène et ses produits de dégradation, le leucotriène LTB4. Après adhérence à l'épithélium lésé, ils traversent la paroi vasculaire par diapédèse et passent dans les espaces tissulaires.

Les monocytes circulants sont également attirés par chimiotactisme et se transforment en macrophages à action phagocytaire très supérieure à celle des polynucléaires neutrophiles.

Le stade inflammatoire chronique est caractérisé par un infiltrat mononucléé comportant des macrophages et des lymphocytes, à point de départ péri-vasculaire. Plusieurs processus sont associés, et notamment la stimulation de la synthèse d'anti-corps et d'immuns complexes circulants, la présence d'une nécrose tissulaire et d'une fibrose plus ou moins marquées, l'existence de microthromboses et d'une prolifération

capillaire.

**La troisième phase, dite de réparation s'intègre en fait à la deuxième étape, par l'action des macrophages qui participent à l'activation des fibroblastes et d'une synthèse de collagène pouvant donner naissance à un tissu fibreux de remplacement.**

La réaction inflammatoire s'accompagne d'une synthèse de protéines plasmatiques, qui traversent la paroi vasculaire par un mécanisme passif et ceci généralement avant la migration leucocytaire.

Une seconde source hépatocytaire peut intervenir secondairement, le foie synthétisant massivement et simultanément certaines protéines de la phase aiguë remplissant des rôles divers, telles que l' $\alpha$ -1-antitrypsine, l'orosomucoïde (reconstituant tissulaire), l'haptoglobine, le fibrinogène intervenant dans la coagulation, la protéine C réactive qui active le complément, la céruléoplasmine, la SAA (protéine circulante).

#### \* Médiateurs de l'inflammation

(Wright, 1973 - Giroud et Brouilhet, 1978 - Blotman et coll., 1983 - Houlihan et Saunders, 1986 - Tsurumi et coll., 1986a, b, c, e - Handley et coll., 1987 - Parkin, 1987).

Divers types cellulaires interviennent en tant que protagonistes de la réaction inflammatoire, parmi lesquels nous pouvons mentionner :

**Les polynucléaires neutrophiles, impliqués dans la phase cellulaire de la réaction inflammatoire.**

**Les lymphocytes, notamment ceux de type T, des anomalies lymphocytaires ayant été caractérisées au cours de la polyarthrite rhumatoïde (présence du facteur rhumatoïde, modifications de la réponse des lymphocytes aux mitogènes, augmen-**

tation des lymphocytes T dans le liquide synovial, réduction de leur nombre dans le sang, perturbations de leur activité fonctionnelle dans la cytotoxicité anticorps dépendante).

Les lymphocytes T induisent la réaction inflammatoire, en particulier par l'intermédiaire des lymphokines qu'ils sécrètent, telles que le facteur d'augmentation de la perméabilité vasculaire, les facteurs chimiotactiques vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles, les facteurs inhibant la migration et stimulant la phagocytose des macrophages, les facteurs mitogéniques assurant le recrutement des lymphocytes non sensibilisés et induisant l'hyperplasie de la couche bordante de la synoviale, le facteur procoagulant qui induit la coagulation dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins et qui favorise la formation de fibrine (puissant facteur chimiotactique pour les polynucléaires neutrophiles).

**Les monocytes - macrophages**, qui jouent un rôle essentiel dans la phagocytose des particules étrangères et dans la genèse des lésions inflammatoires, par leurs nombreuses sécrétions enzymatiques, et qui participent directement à la réponse immune en induisant notamment la prolifération des lymphocytes T, la captation de l'antigène et le transfert d'informations aux lymphocytes, ainsi qu'aux interactions entre lymphocytes T et B.

Ces cellules peuvent sécréter diverses substances et notamment des enzymes (lysozyme, activateur du plasminogène, collagénase, élastase, angiotensine convertase, différentes hydrolases acides), des radicaux libres, certaines fractions du complément, des facteurs de coagulation, des lipides bio-actifs (prostaglandines, leucotriènes, PAF), la fibronectine (substance chimiotactique et d'adhésion cellulaire essentielle dans le recrutement cellulaire et la fibrinogénèse), mais également des monokines (interleukine I, tumor necrosis factor), des hormones polypeptidiques impliquées dans l'adhésion des polynucléaires et des monocytes aux cellules endothéliales, dans l'induction d'une activité cytotoxique et anti-microbienne, dans la production de radicaux libres et dans la stimulation d'une activité pro-coagulante d'origine macrophagique ou endothéliale.

**Les thrombocytes** ou plaquettes sanguines, impliqués dans la coagulation et qui libèrent notamment des prostaglandines, le PAF acéther, le fibrinogène, la fibronectine, des facteurs plaquettaires et de coagulation, des enzymes de dégradation, la  $\beta$  - thromboglobuline, ainsi qu'un facteur de croissance (PDGF) chimiotactique pour les fibroblastes, les polynucléaires et les monocytes, inducteur d'adhésion et d'agrégation cellulaires et stimulant la production de radicaux libres et la libération d'enzymes lysosomiales.

L'adhésion des plaquettes entre elles et aux cellules endothéliales serait essentielle dans la thrombose artérielle.

**Les mastocytes**, le plus souvent localisés à proximité des parois des petits vaisseaux sanguins, dont ils peuvent remplacer l'endothélium et qui sont riches en granules d'héparine, parfois combinée à l'histamine.

**Différentes cellules cibles**, telles que les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, les cellules endothéliales. Ces dernières, situées à l'interface entre le sang et les tissus inflammés constituent une cible privilégiée ; l'adhésion des leucocytes et des monocytes dépend des glycoprotéines de surface régulées par des monokines. Les cellules endothéliales sont également impliquées dans l'activation de la coagulation in situ, la présentation de l'antigène et la prolifération capillaire pouvant accompagner une synovite.

De nombreuses substances chimiques interviennent dans la médiation de l'inflammation.

A côté de l'histamine et de la sérotonine, libérées essentiellement par les mastocytes, de bradykinines plasmatiques, substances intervenant au cours de la phase vasculaire, il faut mentionner le rôle central joué par les icosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes) et le PAF acéther.

Ces lipides bio-actifs, produits par différentes cellules (leucocytes, lymphocytes, macrophages, thrombocytes...), sont obtenus respectivement à partir de l'acide arachidonique et du

lyso-PAF estérifiés dans les phospholipides membranaires et libérés sous l'action d'une phospholipase A2 elle-même régulée par la lipocortine ou lipomoduline.

Sous l'action d'une cyclooxygénase, l'acide arachidonique peut conduire aux prostaglandines de la série 2 (PGD2, PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGI2) ou au thromboxane A2 (TxA2).

Sous l'action d'une lipooxygénase, cet acide gras polyinsaturé donne naissance aux leucotriènes de la série 4 (LTA4, LTC4, LTD4, LTE4 et surtout LTB4).

Le lyso-PAF, quant à lui, substrat d'une acétyl-transférase, conduit au PAF-acéther.

**Les prostaglandines** présenteraient des activités pro-inflammatoires en phase aiguë, mais anti-inflammatoires en phase chronique. Leurs actions variées et parfois opposées peuvent dépendre directement du type de prostaglandines impliqué, ou des nucléotides cycliques (AMP cyclique notamment) par lesquels elles agissent. Ainsi, les PGE2 et PGI2 sont vasodilatatrices, les PGF2 et le TxA2 étant vasoconstricteurs ; les PGI2 diminuent l'adhésion plaquettaire et cellulaire à l'endothélium, à l'inverse du TxA2.

Synthétisées par diverses cellules, elles agissent sur de nombreux systèmes cellulaires tels que les lymphocytes, par inhibition de différentes fonctions (mitogenèse, synthèse des lymphokines...), ainsi que les macrophages, par modification de leur action cytotoxique et de leur état fonctionnel (modification de l'étalement, de l'adhésion, de la migration cellulaire) et par modulation de la phagocytose, mais aussi les fibroblastes et les chondrocytes.

L'un de leurs rôles essentiels semble être le contrôle des synthèses enzymatiques, en particulier des collagénases, par ces diverses cellules.

Les équilibres physiologiques dans les systèmes de rétroaction "lymphocytes - prostaglandines - macrophages" et "macrophages - prostaglandines - collagénases" jouent un rôle important dans la limitation de la réponse inflammatoire.

**Les leucotriènes**, libérés notamment par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, seraient dotés de propriétés

pro-inflammatoires. Le LTB<sub>4</sub> occupe une place de choix, par ses actions chimiotactiques pour les polynucléaires et sa capacité à induire leur agrégation et leur adhésion aux cellules endothéliales, avant de favoriser leur migration péri-vasculaire. Il potentialiserait les effets d'autres médiateurs (histamine, kinines, C5a...) et entraînerait la dégranulation de ces leucocytes, ainsi que la libération d'enzymes lysosomiales.

**Le PAF acéther** est un agrégant plaquettaire. Tout comme le LTB<sub>4</sub>, il présente une action chimiotactique pour les polynucléaires et stimule la sécrétion enzymatique, la formation de radicaux libres et la dégranulation des basophiles.

A côté de ces lipides bio-actifs, essentiels dans les processus inflammatoires, il faut ajouter le rôle de **radicaux libres oxygénés**, cytotoxiques, produits au cours de la phagocytose par les polynucléaires et les macrophages et responsables de lésions cellulaires, de dénaturations de l'ADN.

**Les fractions C3a et C5a du complément** interviennent également dans les modifications de la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme, l'agrégation des polynucléaires et sur la libération des enzymes lysosomiales.

Enfin, les **cytokines**, en particulier l'interleukine I, jouent un rôle non négligeable, non seulement dans l'activation des lymphocytes (facteurs de différenciation et de croissance cellulaires), mais aussi dans la régulation des phénomènes de prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales.

#### \* Anti-inflammatoires

(Brouilhet et Giroud, 1978 - Ryckewaert, 1978 - Schorderet et coll., 1978 - Benoist et Misset, 1979 - Famaey, 1983 - Lioté, 1987).

Sous le terme inflammation peuvent être regroupées de nombreuses affections très diverses, depuis les plus bénignes telles que l'entorse simple, aux plus malignes telles que le

cancer, en passant par certaines affections des sphères dermatologique, néphrologique, neurologique, ophtalmologique, otorhinolaryngologique, stomatologique, urologique et rhumatologique.

Un tel éventail d'atteintes peut expliquer le grand nombre de médicaments anti-inflammatoires couramment utilisés, leur spectre d'activité ne couvrant pas le plus souvent (exception faite des glucocorticoïdes) l'ensemble de ces indications ; c'est ainsi que l'utilisation des sels d'or et de la D-pénicillamine est exclusivement limitée à la polyarthrite rhumatoïde.

Cette limitation dans l'efficacité des différents médicaments concerne également les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), destinés à réduire ou abolir les manifestations cliniques de l'inflammation aiguë.

Parmi les médicaments utilisés, nous retrouvons les salicylés, les pyrazolés (phénylbutazone, oxyphenbutazone...), les dérivés de l'indol (indométacine...), les propioniques (kétoprofène, naproxène, ibuprofène...), les anthraniliques (acides flufénamique et méfénamique), les phénothiaziniques (acides métiazinique et protizinique).

Si leurs indications thérapeutiques sont extrêmement étendues, la plus courante reste la rhumatologie, bien que cette thérapeutique ne soit que symptomatique (réduction de l'inflammation articulaire, sans action sur la cause).

Généralement, les AINS sont essentiellement actifs dans les processus inflammatoires aigus et ont peu ou pas d'effet sur les phénomènes prolifératifs (incapacité à prévenir ou faire rétrocéder les destructions tissulaires secondaires à l'inflammation proliférative).

De plus, leur pouvoir anti-inflammatoire est très variable d'un composé à l'autre, tant au niveau des types d'inflammations traitées, qu'au niveau de l'intensité des effets (faible efficacité des dérivés phénothiaziniques et anthraniliques).

Divers mécanismes ont pu être invoqués, à la suite d'expérimentations in vivo et in vitro ; toutefois, l'extrapolation à

l'homme reste souvent délicate.

Parmi les processus apparemment dominants, citons l'**action inhibitrice des anti-inflammatoires sur la cyclooxygénase**, enzyme clé de la synthèse des prostaglandines.

Cependant, d'autres mécanismes pourraient intervenir, tels que l'inhibition des capacités de phagocytose, des activités enzymatiques, de la formation de radicaux libres et de la migration des polynucléaires et des macrophages (adhésion aux cellules endothéliales, migration, diapédèse, chimiotactisme...).

Le mode d'action des AINS est en fait très complexe. S'ils sont efficaces sur les phénomènes inflammatoires précoces, notamment par inhibition de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et diminution de la migration des polynucléaires et des monocytes-macrophages, leur pouvoir anti-inflammatoire reste limité sur les phénomènes tardifs, en particulier sur le tissu de granulation dont ils ne peuvent empêcher la formation.

Néanmoins, leur action sur le métabolisme des dérivés de l'acide arachidonique semble la plus importante, du fait de ses importantes conséquences cliniques.

Ainsi, les AINS sont largement utilisés comme **anti-agrégants plaquettaires**, action pouvant s'expliquer en partie par l'inhibition, dans les plaquettes, de la conversion de l'acide arachidonique en TxA<sub>2</sub>, mais surtout par l'inactivation de la cyclooxygénase qui ne peut alors être régénérée que grâce à la production de nouvelles plaquettes. Cette inactivation enzymatique, complexe et variable selon le type d'AINS, serait rendue possible par la fixation de la substance au niveau des sites catalytique et supplémentaire de l'enzyme.

Cependant, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines ne peut, à elle seule, expliquer toutes les propriétés des AINS. C'est ainsi que le découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale pourrait être impliqué, par perte des réserves énergétiques (ATP) nécessaires à l'organisation de l'inflammation.

L'action stabilisatrice sur les membranes lysosomiales, observable après accumulation locale des AINS, pourrait jouer un rôle en empêchant la libération d'enzymes contribuant à auto-entretenir le phénomène inflammatoire.

Le déplacement de polypeptiques naturellement anti-inflammatoires de leur liaison aux protéines plasmatiques a pu être évoqué comme mode d'action possible.

Enfin, diverses autres propriétés biochimiques sont susceptibles d'intervenir, telles que la perturbation du métabolisme des glucides, des lipides, du collagène, des protéines, des acides nucléiques, ainsi que l'inhibition des effets de certains autres médiateurs de l'inflammation (histamine, bradykinine).

#### \* Modèles expérimentaux

La recherche de propriétés anti-inflammatoires peut être menée à l'aide de diverses techniques basées sur des processus aigus ou chroniques, générés par l'injection de divers agents inflammatoires.

Dans le type d'inflammation aiguë, les méthodes les plus couramment usitées consistent à induire un oedème localisé, par injection d'un agent phlogistique tel que la levure de brewer, la formaline, le dextran, l'albumine d'oeuf, le kaolin ou la carragénine, dans la région sub-plantaire d'une des pattes postérieures de l'animal.

L'influence des substances testées, sur l'évolution de l'oedème ainsi provoqué, au cours des heures qui suivent, permet d'apprécier leur action anti-inflammatoire, par mesure du volume de la patte.

Nous avons sélectionné l'une de ces techniques utilisant la carragénine comme agent phlogistique, en raison de sa simplicité d'exécution, de sa reproductibilité et de la rapidité d'apparition des effets (développement de l'oedème dans les trente minutes qui suivent l'injection, obtention d'un effet maximal au bout de trois ou quatre heures).

L'inflammation aiguë induite par cet agent est caractérisée par les phases vasculaire, cellulaire et de réparation, au cours desquelles interviennent les différentes cellules et substances

précédemment présentées. En particulier, Blotman et ses collaborateurs (1983) ont pu constater une importante libération de prostaglandines ; Bonta (1983), quant à lui, a pu observer l'augmentation progressive des macrophages au dépend des granulocytes, au cours de la croissance du granulome et parallèlement à celle du tissu inflammatoire.

**L'inflammation chronique**, dont la polyarthrite rhumatoïde est un exemple, peut être notamment envisagée à l'aide de modèles faisant intervenir une réponse immunologique généralisée aux constituants de l'agent inflammatoire, qui très souvent consiste en une suspension de *Mycobacterium butyricum* tués (adjuvant de Freund), injectée parfois dans la région sub-plantaire d'une des pattes postérieures de l'animal (méthode de Newbould, 1963), plus souvent dans la partie basale de la queue du rat (Kameyama et coll., 1985 - Okuyama et Aihara, 1985 - Coderre et Wall, 1987 - Sauvaire et coll., 1987).

Dans ce dernier cas, l'inflammation primaire se développe en quelques heures, au niveau même de l'injection, pour se propager en de multiples points, les premiers signes visibles se manifestant vers le dixième jour. L'inflammation la plus sévère affecte les jointures des pattes postérieures, au niveau desquelles se développe un oedème péri-articulaire, l'effet maximal étant obtenu vers le vingtième jour. La queue est également le siège d'un oedème radial segmentaire ; elle devient de moins en moins mobile, s'écaille et son extrémité se nécrose. L'animal perd du poids, son poil devient rugueux ; il peut manifester des comportements d'auto-mutilation (lésions cutanées en différents endroits).

L'inflammation se propage également dans les yeux, les oreilles, le nez, le pénis. Des destructions osseuses, des atteintes des tendons, une perte de cartilage peuvent se développer, à la suite de l'infiltration de leucocytes dans la synovie. Enfin, les nodules lymphatiques augmentent de taille, le métabolisme hépatique se trouve perturbé et d'importantes modifications chimiques tissulaires et sanguines se produisent. L'ensembles de ces phénomènes se développe progressivement en

quatre à six semaines.

Ainsi, l'arthrite induite par l'adjuvant de Freund s'accompagne d'une grave atteinte systémique généralisée affectant de nombreux systèmes tels que le sang, le foie, les systèmes immunitaire et lymphatique, la peau et probablement le système nerveux central (Coderre et Wall, 1987).

Ce modèle expérimental permet de détecter l'activité anti-inflammatoire de nombreux composés potentiellement utilisables dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde humaine (Newbould, 1963).

Toutefois, si les médicaments de la polyarthrite réduisent l'inflammation articulaire, ils n'agissent pas sur la cause et très souvent ne permettent qu'une rémission temporaire, plus ou moins prolongée selon le composé.

Selon le degré pathologique, certains AINS peuvent se révéler efficaces (aspirine, indométacine, phénylbutazone, fénamates, dérivés de l'acide propionique) associés ou non à des anti-paludéens de synthèse. Dans de nombreux cas, ces médications insuffisantes obligent à prescrire d'autres substances telles que les sels d'or, la D-pénicillamide ou les cortisoniques et, dans de rares cas, des immunosuppresseurs (Ryckewaert, 1978).

Nous avons choisi ce modèle de l'oedème induit par l'adjuvant de Freund en nous limitant toutefois au suivi de l'évolution de l'inflammation, par mesure du volume des pattes postérieures.

Durant cette expérimentation, le poids des animaux a pu être contrôlé à trois reprises (aux septième, quatorzième et vingt-huitième jours après l'injection de l'adjuvant).

Enfin, il est important de se rappeler qu'un tissu enflammé est rendu hyperalgique par abaissement de son seuil douloureux.

C'est pourquoi nous avons complété cette expérimentation, par l'évaluation de la sensibilité des animaux polyarthritiques à la douleur occasionnée par une pression (test de Randall et Selitto) et ceci une seule fois au cours de l'expérimentation (au quinzième jour qui suit l'injection de l'adjuvant).

Ces deux modèles expérimentaux (tests à la carragénine et à l'adjuvant de Freund) doivent nous permettre de couvrir le domaine des AINS, mais également d'aborder celui d'anti-inflammatoires plus puissants, pouvant agir sur les phases précoces et tardives de l'inflammation.

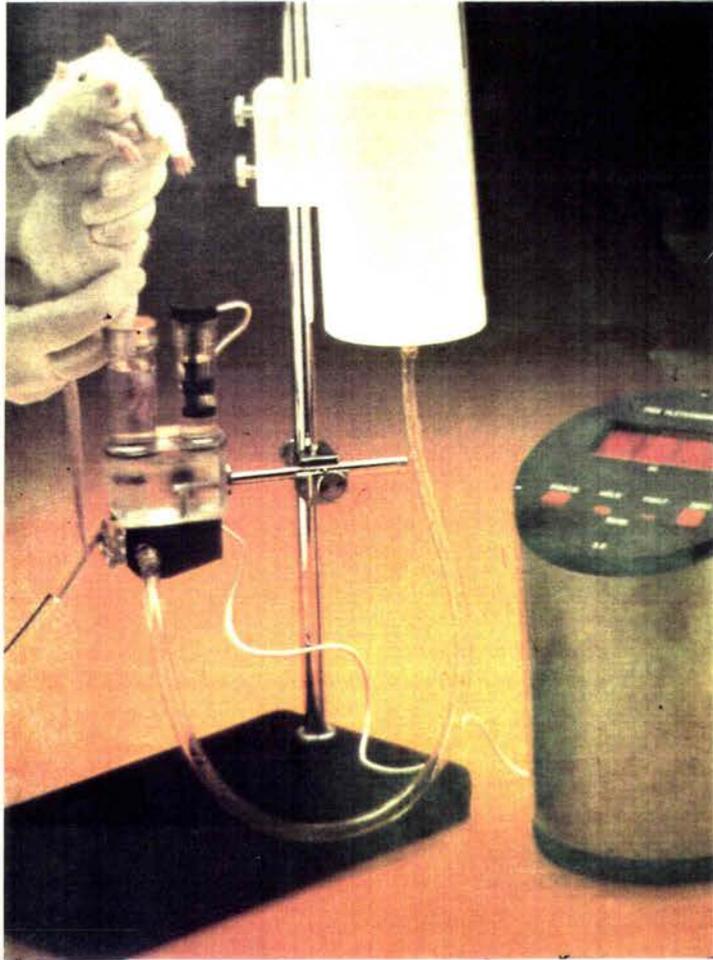


PHOTO 12 : LE PLETHYSMOMETRE.

## IV - 2 INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE

### 2.1 Procédure expérimentale

#### 2.1.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des rats mâles OFA (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées au paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en un pléthysmomètre électrique (pléthysmomètre 7150, Ugo Basile, Apelex, Bagneux (92)) et permet de mesurer le volume de la patte du rat, lorsque celle-ci est plongée dans une cellule en plexiglas de 18 mm de diamètre, contenant une solution d'eau distillée additionnée de NaCl (0,4 g/l) et d'un agent mouillant (Imbibente BBC97, Ornano, Milan), à raison de 5 ml/l.

Cette cellule est elle-même en communication avec un tube en plexiglas, contenant un transducteur qui permet de déterminer la conductance entre deux électrodes "platine - iridium", dites électrodes de niveau, logées dans la partie supérieure du tube. La conductance est linéairement proportionnelle au niveau de l'eau, mais elle est également influencée par sa conductivité ; c'est pourquoi, deux électrodes dites de compensation, uniquement sensibles à ce dernier paramètre, sont en permanence immergées dans la solution mouillante.

Un circuit électronique sophistiqué, après correction de la mesure due aux électrodes de niveau, génère un signal proportionnel au niveau seul de la solution et donc au volume déplacé par la patte du rat.

#### 2.1.2 Méthode

La technique utilisée est inspirée de la méthode décrite par Winter et coll. (1962).

Avant le test proprement dit, le volume de la patte postérieure droite de chaque animal est mesuré, par immersion dans la

cellule contenant la solution mouillante, jusqu'au niveau de la malléole latérale.

Chaque mesure est répliquée trois ou quatre fois au minimum, de façon à obtenir trois ou quatre valeurs ne différant pas de plus de 4% (précision de l'appareillage) et permettant ainsi de calculer un volume moyen pour chaque animal ( $V_0$ ).

Les produits à tester sont ensuite administrés par voie I.P..

E. hirta est injectée aux doses de 50, 100 et 200 mg/kg.

Le produit de référence utilisé est l'indométacine (Indocid<sup>R</sup>, laboratoires Merck Sharp et Dohme-Chibret, Paris), aux doses de 2,5 - 5 et 10 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Trente minutes après l'injection des produits, chaque animal reçoit, dans la patte postérieure droite, une injection sub-plantaire d'une suspension de carragénine à 1 %, à raison de 0,05 ml/rat (Carragénine  $\lambda$ , type IV, laboratoires Sigma, St Louis, U.S.A.).

Le volume de la patte postérieure droite est à nouveau mesuré 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 heures après l'injection de l'agent inflammatoire.

Chaque mesure est répliquée trois ou quatre fois au minimum ; les valeurs retenues ne diffèrent pas de plus de 4 % et permettent de calculer un volume moyen pour chaque animal et à chaque relevé.

L'importance et l'évolution de l'œdème peuvent être estimées par détermination des pourcentages moyens de variation, calculés à partir des volumes moyens mesurés aux différents relevés, après l'injection de la carragénine, et par comparaison au volume moyen obtenu avant ce traitement.

L'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évolution peuvent être estimées par détermination des pourcentages moyens d'inhibition de l'œdème, calculés aux différents relevés, à partir des différences obtenues entre les

volumes moyens mesurés avant (Vo) et après (Vt) l'injection de la carragénine et selon le rapport suivant :

$$\frac{(Vt-Vo)_{\text{témoin}} - (Vt-Vo)_{\text{traité}} \times 100}{(Vt-Vo)_{\text{témoin}}}$$

### 2.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques entre les lots témoins et traités sont effectuées à l'aide du test de Student, sur les différences individuelles calculées entre les volumes mesurés avant et après l'injection de la carragénine.

Une analyse de variance, réalisée sur les volumes individuels mesurés avant traitement (Vo), démontre l'absence de différences significatives entre les différents lots témoin et traités.

## 2.2 Résultats

Les volumes moyens des pattes postérieures droites des animaux témoins et traités, obtenus aux différents relevés, sont reportés dans le tableau 55.

Les pourcentages d'oedème, calculés pour chaque lot témoin et traité, aux différents relevés (pourcentages de variation par rapport au volume moyen obtenu avant traitement), sont reportés sur la figure 47.

Les pourcentages d'inhibition de l'oedème, obtenus pour les lots traités et aux différents relevés, sont présentés dans le tableau 56 et sur la figure 48.

L'injection de 0,05 ml de carragénine à 1 %, dans la patte postérieure droite du rat, provoque une inflammation visible dans les trente minutes qui suivent cette injection (pourcentage d'oedème de 21,6 %), l'oedème augmentant progressivement et atteignant une intensité maximale au bout de quatre heures (pourcentage d'oedème de 67,2 %). Celui-ci régresse ensuite, mais ne disparaît pas totalement, vingt-quatre heures après

l'administration de l'agent inflammatoire (pourcentage d'oedème de 21,6 %).

Administré en préventif, le produit de référence choisi, l'indométacine, réduit l'oedème de façon progressive et dose-dépendante, avec une inflammation maximale au bout de quatre heures, significativement diminuée par rapport aux témoins (pourcentages d'oedème de 29,8 % - 34,8 % et 48,1 %, respectivement pour les lots traités par les doses d'indométacine de 10, 5 et 2,5 mg/kg).

Vingt-quatre heures après l'injection de la carragénine, une légère inflammation subsiste, inversement proportionnelle à la dose d'indométacine (pourcentages d'oedème obtenus respectivement avec les doses de 10, 5 et 2,5 mg/kg : 8,5 % - 11,1 % et 14,3 %).

Le calcul des pourcentages d'inhibition permet de retrouver, bien évidemment, cette relation effet-dose. Toutefois, l'inhibition maximale est obtenue deux à quatre heures après l'injection de l'agent inflammatoire (pourcentages d'inhibition de 58,5 % - 47,8 % et 32,8 %, respectivement pour les lots traités par les doses de 10, 5 et 2,5 mg/kg).

De plus, cet effet inhibiteur se manifeste significativement et de façon conséquente, dans les trente minutes qui suivent l'injection de la carragénine, pour les deux plus fortes doses, soit 10 et 5 mg/kg (pourcentages d'inhibition respectifs de 48,3 % et 37,9 %), mais seulement au bout de deux heures, dans le cas de la dose de 2,5 mg/kg (pourcentage d'inhibition de 32,8 %).

En fait, cette action protectrice augmente légèrement jusqu'à trois heures (effet maximal), se maintient relativement stable jusqu'à cinq heures, pour ensuite chuter légèrement au bout de six heures, où les pourcentages d'inhibition sont significatifs et assez proches de ceux obtenus à trente minutes (45,9 % - 41,9 % et 29,7 %, respectivement pour les lots traités par les doses de 10, 5 et 2,5 mg/kg).

Vingt-quatre heures après l'injection de la carragénine, l'action inhibitrice reste significative et même supérieure à

celle obtenue au relevé de trois heures (pourcentages d'inhibition de 58,6 % - 48,3 % et 34,5 %, respectivement pour les doses de 10, 5 et 2,5 mg/kg).

E. hirta réduit également de façon progressive et dose-dépendante l'oedème induit par la carragénine. Une inflammation maximale, réduite par rapport aux témoins, est obtenue au bout de quatre heures, dans le cas d'un prétraitement par les doses de 100 et 50 mg/kg (pourcentages d'oedème respectifs de 52,2 % et 58,1 %) et seulement cinq heures après l'injection de l'agent inflammatoire, pour la dose de 200 mg/kg (pourcentage d'oedème de 36,5 %) qui semble provoquer un certain retard dans le développement de l'oedème.

Vingt-quatre heures après l'injection de la carragénine, une légère inflammation subsiste, inversement proportionnelle à la dose (pourcentages d'oedème respectifs, pour les doses de 200, 100 et 50 mg/kg de 9,5 % - 12,3 % et 14 %).

Cependant, cet effet protecteur ne se manifeste significativement qu'au bout de deux heures et uniquement après traitement par les deux plus fortes doses d'extrait végétal, soit 200 et 100 mg/kg ; ces doses provoquent une inhibition maximale, respectivement trois et deux heures après l'injection de la carragénine (pourcentages d'inhibition de 59,8% et 25,9 %). Toutefois, cette action régresse très rapidement, tout en restant néanmoins significative au bout de six heures (pourcentages d'inhibition respectifs de 33,8 % et 17,6 %).

A 50 mg/kg, le profil d'activité d'E. hirta diffère. Effectivement, dès trente minutes, une action protectrice proche de l'effet maximal, quoique non significative, se développe et se maintient jusqu'à deux heures (pourcentage maximal d'inhibition de 25,9 %), pour ensuite chuter rapidement.

Aux trois doses d'extrait végétal testées et vingt-quatre heures après l'injection de la carragénine, une action inhibitrice significative est observée (pourcentage d'inhibition respectifs obtenus avec les doses de 200, 100 et 50 mg/kg de 55,2 % - 41,4 % et 34,5 %).

**TABEAU 55 : INFLUENCE D'E. HIRTA, ET DE L'INDOMETACINE SUR L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE, AU NIVEAU DE LA PATTE POSTERIEURE DROITE DU RAT (volumes moyens de la patte).**

LOTS	VOLUMES MOYENS (ml) obtenus aux relevés suivants									
	T-30mn	T30mn	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h	
TEMOIN (NaCl 0,9%) (N=13)	1,34 ± 0,02	1,63 ± 0,04	1,76 ± 0,05	1,92 ± 0,05	2,16 ± 0,07	2,24 ± 0,04	2,17 ± 0,05	2,08 ± 0,05	1,63 ± 0,03	
INDOMETACINE 10 mg/kg (N=10)	1,41 ± 0,03	1,56 ± 0,04	1,62 ± 0,04	1,66 ± 0,04	1,75 ± 0,05	1,83 ± 0,06	1,77 ± 0,05	1,81 ± 0,05	1,53 ± 0,04	
INDOMETACINE 5 mg/kg (N=10)	1,35 ± 0,02	1,53 ± 0,04	1,61 ± 0,04	1,68 ± 0,05	1,78 ± 0,06	1,82 ± 0,08	1,81 ± 0,06	1,78 ± 0,06	1,50 ± 0,04	
INDOMETACINE 2,5 mg/kg (N=10)	1,33 ± 0,02	1,54 ± 0,04	1,63 ± 0,04	1,72 ± 0,05	1,91 ± 0,06	1,97 ± 0,06	1,89 ± 0,06	1,85 ± 0,05	1,52 ± 0,03	
E.HIRTA 200 mg/kg (N=10)	1,37 ± 0,02	1,66 ± 0,06	1,70 ± 0,05	1,63 ± 0,04	1,70 ± 0,05	1,80 ± 0,03	1,87 ± 0,03	1,86 ± 0,03	1,50 ± 0,02	
E.HIRTA 100 mg/kg (N=10)	1,38 ± 0,04	1,70 ± 0,05	1,79 ± 0,04	1,81 ± 0,06	1,99 ± 0,08	2,10 ± 0,06	2,07 ± 0,05	1,99 ± 0,06	1,55 ± 0,04	
E.HIRTA 50 mg/kg (N=10)	1,36 ± 0,03	1,58 ± 0,04	1,69 ± 0,05	1,79 ± 0,08	2,05 ± 0,06	2,15 ± 0,04	2,08 ± 0,05	1,99 ± 0,04	1,55 ± 0,03	

↑  
T<sub>0</sub>

N = nombre d'animaux par lot.

T<sub>0</sub> = Temps d'injection de la carragenine

T-30mn = Temps d'injection des produits à tester

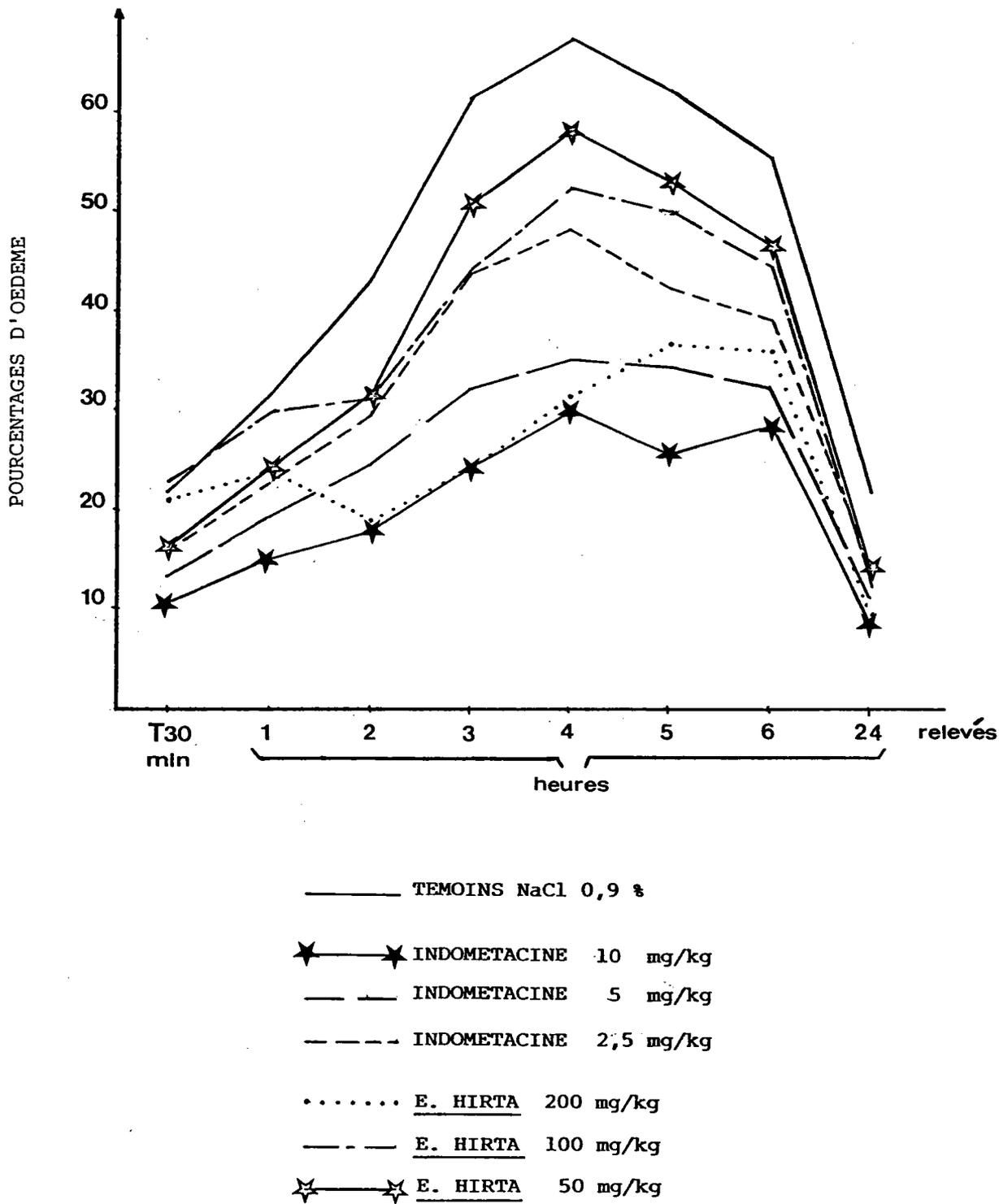


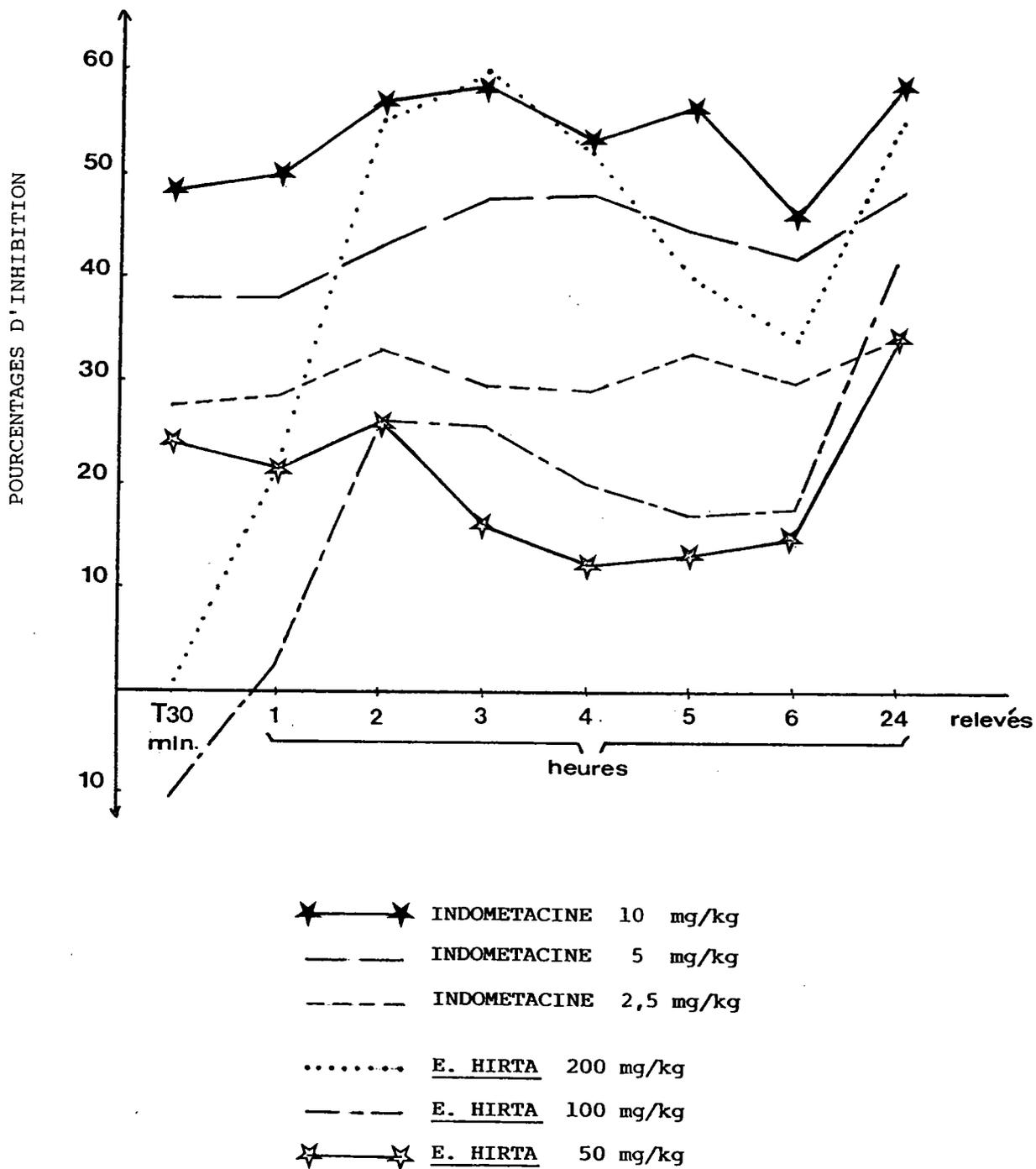
FIG. 47 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE, VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE.

**TABLEAU 56 : ACTIVITE INHIBITRICE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE, SUR L'OEDEME INDUIT PAR INJECTION SUBPLANTAIRE DE CARRAGENINE.**

LOTS	POURCENTAGES D'INHIBITION calculés aux relevés suivants							
	30min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h
INDOMETACINE 10 mg/kg (N=10)	48,3 **	50 **	56,9 ***	58,5 ***	53,3 ***	56,6 ***	45,9 ***	58,6 ***
INDOMETACINE 5 mg/kg (N=10)	37,9 *	38,1 *	43,1 ***	47,6 ***	47,8 ***	44,6 ***	41,9 ***	48,3 **
INDOMETACINE 2,5 mg/kg (N=10)	27,6	28,6	32,8 **	29,3 **	28,9 ***	32,5 ***	29,7 **	34,5 **
E.HIRTA 200 mg/kg (N=10)	0	21,4	55,2 ***	59,8 ***	52,2 ***	39,8 ***	33,8 ***	55,2 ***
E.HIRTA 100 mg/kg (N=10)	-10,3	2,4	25,9 *	25,6 *	20 **	16,9 **	17,6 *	41,4 **
E.HIRTA 50 mg/kg (N=10)	24,1	21,4	25,9	15,8	12,2	13,2	14,9	34,5 *

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**FIG. 48 :** INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE, VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE.

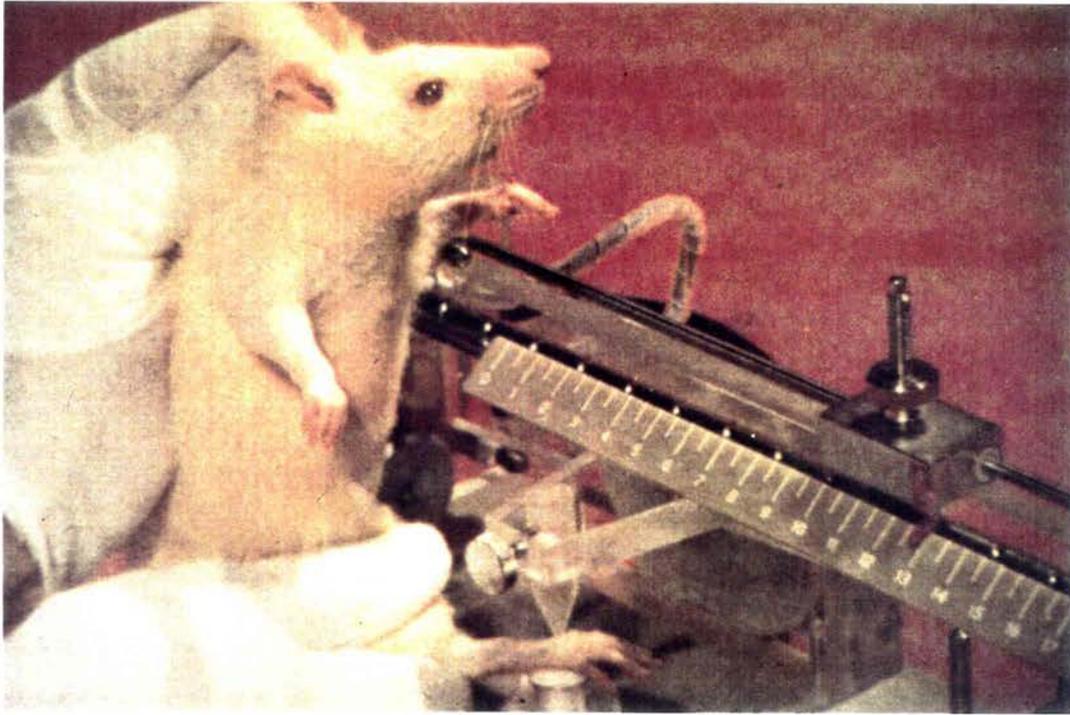


PHOTO 13 : L'ANALGESIMETRE (TEST DE RANDALL ET SELITTO).

## IV - 3 INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR L'ADJUVANT DE FREUND

### 3.1 Procédure expérimentale

#### 3.1.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar polyarthritiques (Iffa-Credo).

Deux dispositifs expérimentaux sont employés :

le pléthysmomètre, précédemment décrit lors des expérimentations portant sur l'inflammation induite par la carragénine (paragraphe 2.1.1), qui permet de suivre l'évolution de l'œdème, par mesure du volume des pattes postérieures de l'animal.

l'analgésimètre à pression (Ugo Basil, référence 7200, Apelex, Bagneux (92)), qui permet de déterminer le seuil douloureux, vis-à-vis d'une force exercée au niveau de la patte postérieure droite du rat, par l'intermédiaire d'un cône (P) en téflon.

L'augmentation, à vitesse constante, de la pression ainsi exercée est rendue possible par l'actionnement d'une pédale et est indiquée par le déplacement d'un curseur le long d'une échelle graduée en grammes (g x 10).

Cette échelle peut être multipliée par 2, 3 ou 4, grâce à l'addition de 1, 2 ou 3 disques, au niveau W de l'appareil (pour une valeur de 12 sur l'échelle graduée, soit 120 g, l'addition d'un disque correspondra à 240 g, deux disques donnant la valeur de 360 g).

Le relâchement de la pédale arrête le déplacement du curseur.

#### 3.1.2 Méthodes

L'expérimentation débute dès la réception des animaux, soit au septième jour de l'injection de l'adjuvant (J7).

Avant l'administration I.P. des produits à tester, le volume

des pattes postérieures droite et gauche de chaque animal est mesuré par immersion dans la cellule du pléthysmomètre, jusqu'au niveau de la malléole latérale.

Chaque mesure est répliquée de façon à obtenir deux ou trois valeurs ne différant pas de plus de 4 % et permettant de calculer un volume moyen pour chaque patte (Vd, Vg).

Le traitement chronique débute aussitôt ce premier relevé et se déroule de la façon suivante :

Chaque produit est injecté par voie I.P., deux fois par jour (matin et soir) et pendant une durée totale de quatorze jours (J20).

L'indométacine (Indocid<sup>R</sup>, laboratoires Merck Sharp et Dohme-Chibret, Paris) est testée journallement à 1,5 mg/kg (soit 0,75 mg/kg, à chaque traitement). E. hirta est injectée aux doses journalières de 200 et 400 mg/kg (soit respectivement 100 et 200 mg/kg, à chaque traitement). Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Au cours de ce traitement, le volume des pattes droite et gauche de chaque animal est à nouveau mesuré, aux différentes périodes suivantes :

Une heure après la première injection (J7\*), puis aux jours J8, J10, J14, J17 et J20.

Chaque mesure est répliquée de façon à obtenir deux ou trois valeurs ne différant pas de plus de 4 % et permettant de calculer un volume moyen pour chaque patte (Vd et Vg).

Pour chaque animal, la moyenne des volumes Vd et Vg est calculée et permet de déterminer un volume moyen (V).

Le test de Randall et Selitto (analgésimètre à pression) n'est réalisé qu'une seule fois, en cours de traitement, au jour J15. Pour chaque rat, le seuil douloureux est déterminé par application du cône en téflon sur le métatarse du quatrième doigt de la patte postérieure droite de l'animal, cette dernière reposant sur une embase en téflon.

Le déplacement du curseur, et donc l'application d'une force d'intensité croissante, est stoppé dès que l'animal manifeste une sensation douloureuse (cri ou retrait de la patte).

Ce test n'est effectué que sur une patte et est répliqué le moins possible, de façon à éviter l'habituation du rat à la procédure, celui-ci réagissant alors non plus à la douleur mais aux signes annonçant l'application d'un stimulus douloureux (simple préhension, placement de la patte sur l'embase, apposition non douloureuse du cône...).

Pour chaque animal, le poids supporté est évalué en grammes.

Au cours de cette expérimentation, le poids corporel des animaux est également suivi, par pesée aux jours J7 (début du test), J14 et enfin J28 (soit huit jours après l'arrêt du traitement chronique).

### **3.1.3 Analyse statistique**

#### **Plethysmomètre**

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Cochran, les comparaisons statistiques entre les lots témoin et traités sont effectuées sur les volumes individuels (V), à l'aide du test de Student.

#### **Analgésimètre à pression**

L'homogénéité des variances n'étant pas vérifiée, les comparaisons statistiques entre les lots témoin et traités sont effectuées à l'aide d'un test non paramétrique, le test de Mann-Whitney - Wilcoxon.

#### **Poids corporel**

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett et après mise en évidence de l'absence de différences significatives (ANOVA) entre les poids corporels mesurés avant tout traitement (J7), pour l'ensemble des animaux, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Student.

### 3.2 Résultats

#### 3.2.1 Influence d'E. hirta et de l'indométacine sur le poids corporel du rat polyarthritique

D'après les résultats présentés dans le tableau 57, l'administration d'indométacine en traitement chronique, à la dose journalière de 1,5 mg/kg, induit une augmentation significative de la prise pondérale, en comparaison du lot témoin ; cet effet est obtenu non seulement au cours du traitement (à J14, soit au septième jour du traitement), mais également huit jours après son interruption (à J28) (pourcentages de variation respectifs de 7 % et 14 %).

Par contre, aux doses journalières de 200 et 400 mg/kg, E. hirta n'améliore pas la prise pondérale des animaux, en comparaison des témoins, diminuant même très légèrement et de façon non significative ce paramètre ; cette réduction est, par ailleurs, plus importante avec la plus faible dose d'extrait végétal (pourcentages de variation déterminés respectivement à J14 et J28 de -3 % et -6 % avec la dose de 200 mg/kg et de -2 % et -1 % avec la dose de 400 mg/kg).

**TABLEAU 57 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE SUR LE POIDS CORPOREL DU RAT POLYARTHRIQUE.**

LOTS	POIDS MOYENS RELEVES A		
	J7	J14	J28
TEMOIN			
NaCl 0,9% (N=11)	194,8 ± 2,4	216 ± 3,9	241,1 ± 5,1
INDOMETACINE			
1,5 mg/kg (N=11)	195,3 ± 3,6	230,4 ± 4,6	275,3 ± 7,4
E. HIRTA			
200 mg/kg (N=11)	194,7 ± 2,3	208,7 ± 4,2	225,6 ± 11,2
E. HIRTA			
400 mg/kg (N=11)	195,4 ± 1,8	212,3 ± 4,6	238,4 ± 10,9

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.

### 3.2.2 Influence d'E. hirta et de l'indométacine vis-à-vis de l'oedème induit par l'adjuvant de Freund (pléthysmomètre)

Les volumes moyens (V), obtenus à partir des moyennes individuelles calculées sur les volumes des pattes droite et gauche de chaque animal, sont reportés dans le tableau 58.

Les résultats obtenus permettent de constater, chez les animaux non traités, l'établissement progressif de l'inflammation, une amorce de stabilisation apparaissant vers le dix-septième jour qui suit l'injection de l'agent inflammatoire (J17).

Signalons l'absence de phénomène inflammatoire visible, au début de l'expérimentation (J7).

Le produit de référence choisi, l'indométacine, administré en traitement chronique à raison de 1,5 mg/kg (dose journalière) manifeste un léger effet inhibiteur vis-à-vis de l'oedème induit par l'adjuvant de Freund, à partir du quatorzième jour (J14) qui suit l'injection de cet agent. Toutefois, cette action reste non significative jusqu'au dix-septième jour (pourcentage de variation par rapport au lot témoin : -21,5 %), pour se stabiliser au vingtième jour.

Concernant E. hirta administrée aux doses journalières de 200 et 400 mg/kg, aucun effet antagoniste vis-à-vis de l'inflammation polyarthritique n'est obtenu, tout au long de ces vingt jours de traitement chronique.

**TABLEAU 58 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE, ADMINISTREES EN TRAITEMENT CHRONIQUE, VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR L'ADJUVANT DE FREUND.**

LOTS	VOLUMES MOYENS (ml)						
	calculés à partir des moyennes individuelles V des volumes des deux pattes postérieures						
	J7	J7*	J8	J10	J14	J17	J20
TEMOIN (NaCl 0,9%) (N=11)	1,18 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,25 ± 0,01	1,42 ± 0,03	1,65 ± 0,09	1,95 ± 0,10	1,98 ± 0,09
INDOMETACINE 1,5 mg/kg (N=11)	1,20 ± 0,02	1,21 ± 0,02	1,25 ± 0,01	1,45 ± 0,03	1,48 ± 0,04	1,53 ± 0,04	1,51 ± 0,03
						***	***
E.HIRTA 200 mg/kg (N=11)	1,21 ± 0,02	1,20 ± 0,02	1,24 ± 0,02	1,41 ± 0,04	1,68 ± 0,11	1,94 ± 0,14	2,01 ± 0,17
E.HIRTA 400 mg/kg (N=11)	1,21 ± 0,03	1,21 ± 0,02	1,20 ± 0,02	1,39 ± 0,04	1,62 ± 0,11	1,93 ± 0,13	1,98 ± 0,15

N = nombre d'animaux par lot

\*\*\* p < 0,001

**3.2.3 Influence d'E. hirta et de l'indométacine, vis-à-vis de la douleur polyarthritique (test de Randall et Selitto)**

Au quinzième jour qui suit l'injection de l'adjuvant de Freund, les animaux témoins polyarthritiques peuvent supporter une pression moyenne équivalente à environ 198 g.

Administrée en traitement chronique, à la dose journalière de 1,5 mg/kg, l'indométacine n'exerce aucune protection vis-à-vis de ce stimulus douloureux (pourcentage de variation par rapport au lot témoin de +1 %).

Par contre, les deux doses d'extrait végétal testées, soit 200 et 400 mg/kg, augmentent le seuil de sensibilité des animaux, ceux-ci pouvant supporter une pression d'autant plus importante que la dose d'extrait est plus forte (pourcentages de variation respectifs de 24 % et 52 %). Cependant, cet effet n'est statistiquement significatif qu'avec la dose de 400 mg/kg.

**TABLEAU 59 : INFLUENCE D'E. HIRTA ET DE L'INDOMETACINE, VIS-A-VIS DE LA DOULEUR POLYARTHRIQUE.**

LOTS	TEMOIN : NaCl 0,9% : (N=11)	INDOMETACINE : 1,5 mg/kg : (N=11)	EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)	
			200 (N=11)	400 (N=11)
MOYENNE	197,7	200,4	245,4	301,4
ECART-TYPE REDUIT	13,1	18,3	30,1	38,3
% VARIATION PAR RAPPORT AU TEMOIN		+1 %	+24 %	+52 %

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05.

#### IV - 4 DISCUSSION

La recherche de propriétés anti-inflammatoires pour l'extrait aqueux d'E. hirta nous a amené à sélectionner deux modèles expérimentaux couramment utilisés et permettant d'aborder les aspects aigus et chroniques de l'inflammation, à savoir l'oedème induit par la carragénine et l'arthrite à l'adjuvant de Freund.

\* **La carragénine** est à l'origine d'une inflammation aigue, caractérisée par les phases vasculaire, cellulaire et de réparation précédemment exposées (paragraphe IV - 1), au cours desquelles interviennent les différents protagonistes cellulaires de l'inflammation (lymphocytes, macrophages, thrombocytes...) et différents médiateurs tels que l'histamine la sérotonine, la bradykinine. Son injection sub-plantaire chez le rat provoque l'apparition d'un oedème localisé, dans les heures qui suivent (effet maximal obtenu vers trois, quatre heures), oedème dont l'évolution peut être entravée par l'administration préventive d'anti-inflammatoires tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

(Gyires et coll., 1985 - Tsurumi et coll., 1986a).

\* **L'adjuvant de Freund** est à l'origine d'une inflammation chronique. En fait, ce composé induit une grave atteinte systémique généralisée affectant de nombreux systèmes et notamment la peau, le sang, le foie, les systèmes lymphatique et immunitaire ; cette réaction d'hypersensibilité retardée médiatée par les lymphocytes T se développe progressivement en quatre à six semaines (Tsurumi et coll., 1986d - Coderre et Wall, 1987).

Ce modèle expérimental est fréquemment utilisé pour l'étude de composés anti-inflammatoires potentiellement actifs dans l'arthrite rhumatoïde ; parmi ceux-ci, certains AINS (aspirine, indométacine, phénylbutazone...) peuvent se révéler efficaces (Ryckewaert, 1978).

Le premier modèle expérimental utilisé, à savoir l'induction d'un oedème par injection sub-plantaire de carragénine, nous a ainsi permis de déceler une activité anti-inflammatoire

dose-dépendante, après l'administration I.P. de doses sédatives d'E. hirta (100 et 200 mg/kg).

Cependant, cet effet inhibiteur n'apparaît que deux heures après l'injection de l'agent phlogistique, pour atteindre un maximum dès ce moment, dans le cas de la dose de 100 mg/kg (pourcentage d'inhibition de 25,9 %), ou au bout de trois heures, dans le cas de la dose de 200 mg/kg (pourcentage d'inhibition de 59,8 %).

De plus, cette action protectrice est relativement fugace, puisqu'elle chute assez rapidement dans les heures qui suivent, bien que restant significative tout au long de l'expérimentation.

En comparaison des effets obtenus avec l'anti-inflammatoire de référence, l'indométacine, E. hirta présente un profil d'activité différent.

Ainsi, si l'AINS de référence exerce également un effet inhibiteur dose-dépendant, celui-ci se manifeste beaucoup plus rapidement (dans les trente minutes qui suivent l'injection de la carragénine) et de façon nettement conséquente, puisqu'une activité proche de l'effet maximal est obtenue (pourcentages d'inhibition de 48,3 % - 37,9 % et 27,6 %, respectivement obtenus avec les doses de 10 - 5 et 2,5 mg/kg). De plus, cette action protectrice se maintient à un degré élevé et relativement stable tout au long de l'expérimentation.

Malgré des divergences quant au profil d'activité d'E. hirta et de l'indométacine, un rapprochement est possible, si l'on considère l'intensité maximale des effets anti-inflammatoires obtenus.

Ainsi, aux doses les plus fortes, soit 200 mg/kg pour l'extrait végétal et 10 mg/kg pour l'AINS de référence, des effets inhibiteurs comparables sont obtenus, trois heures après l'injection de la carragénine (pourcentages d'inhibition respectifs de 59,8 % et 58,5 %).

De plus, l'inflammation suit une évolution tout à fait similaire entre deux et quatre heures, un "décrochement" étant observé avant et après cette période, décrochement traduisant la plus faible efficacité d'E. hirta. Un tel rapprochement peut

également être mentionné entre les doses de 100 mg/kg d'extrait végétal et de 2,5 mg/kg d'indométacine, deux et trois heures après l'injection de la carragénine (figure 45).

Dans le second modèle expérimental utilisé, à savoir l'arthrite induite par l'adjuvant de Freund, le traitement curatif par E. hirta ou l'indométacine a été débuté sept jours après l'injection de l'adjuvant et donc durant la phase d'installation de l'inflammation. En effet, les premiers signes inflammatoires visibles se manifestent vers le dixième jour, notamment par un oedème localisé au niveau des pattes postérieures de l'animal et dont l'évolution atteint généralement son maximum vers le vingtième jour, date à laquelle le traitement a été suspendu.

Cette procédure permet d'intervenir sur un processus inflammatoire en début d'évolution et pourrait ainsi laisser transparaître une activité anti-inflammatoire trop faible pour agir efficacement sur une inflammation chronique bien établie.

Une telle activité a pu être obtenue avec l'AINS de référence choisi, l'indométacine, dont l'administration journalière, à raison de 1,5 mg/kg, s'avère efficace vis-à-vis de l'oedème développé au niveau des pattes postérieures du rat et vis-à-vis de la prise pondérale des animaux et ceci respectivement dix-sept et quatorze jours après l'injection de l'adjuvant (soit onze et six jours après le début du traitement).

Par contre, administrée aux doses sédatives journalières de 200 et 400 mg/kg, E. hirta reste inefficace sur ces deux paramètres et donc aucune activité anti-inflammatoire, vis-à-vis de l'arthrite induite par l'adjuvant de Freund, ne peut être avancée pour cet extrait végétal, dans les conditions expérimentales retenues.

Toutefois, à la différence de l'indométacine, si E. hirta n'agit pas sur l'oedème induit au niveau des pattes postérieures de l'animal, elle se révèle active sur l'hyperalgie inflammatoire, en augmentant le seuil de sensibilité à la douleur occasionnée par une pression. Cet effet, obtenu quinze

jours après l'injection de l'adjuvant (soit au neuvième jour du traitement chronique), n'est cependant significatif que dans le cas d'un traitement par la plus forte dose, soit 400 mg/kg (augmentation de la pression supportée de 52 %, par rapport aux témoins polyarthritiques).

En fait, cette action pourrait être considérée comme le reflet de l'activité analgésique centrale d'E. hirta précédemment démontrée (chapitre D II).

Ainsi, d'après l'ensemble des résultats obtenus sur ces deux modèles expérimentaux, E. hirta paraît exercer une certaine activité anti-inflammatoire sur les phénomènes aigus, mais resterait inefficace vis-à-vis de l'inflammation chronique et en particulier sur la réaction d'hypersensibilité retardée médiatée par les lymphocytes T et induite par l'adjuvant de Freund.

En fait, les différences observées entre E. hirta et l'AINS de référence (indométacine), tant au niveau de l'efficacité sur un modèle expérimental donné, qu'au niveau du profil d'activité, ne permettent pas d'exclure la possibilité d'une activité anti-inflammatoire du type AINS, l'ensemble de ces composés pouvant développer des effets plus ou moins importants, selon le type inflammatoire et le composé considérés. Ainsi, si l'aspirine, les dérivés pyrazolés, indoliques et propioniques constituent les anti-inflammatoires non stéroïdiens majeurs en rhumatologie, certains autres dérivés (phénothiaziniques, anthraniliques...) sont considérés comme des AINS peu actifs (Brouilhet et Giroud, 1978 - Ryckewaert, 1978).

Les mécanismes d'action, apparemment multiples et complexes, proposés pour ces médicaments anti-inflammatoires ne peuvent que conforter ces différences d'efficacité.

Toutefois, très souvent, leur action inhibitrice sur le métabolisme de l'acide arachidonique et en particulier sur la synthèse des prostaglandines a été rapportée pour expliquer en partie leur activité anti-inflammatoire (Brouilhet et Giroud,

1978 - Reuse, 1978 - Blotman et coll., 1983 - Famaey, 1983 - Gyires et coll., 1985 - Kameyama et coll., 1985 - Okuyama et Aihara, 1985 - Nakamura et coll., 1986 - Sackeyfio et Lugeleka, 1986 - Tsurumi et coll., 1986a, e).

Par ailleurs, cet effet inhibiteur sur la synthèse des prostaglandines peut également expliquer leurs propriétés anti-pyrétiques (les prostaglandines agiraient sur les centres thermorégulateurs ; leur synthèse serait induite par des monokines jouant le rôle de pyrogènes endogènes et produites par les monocytes-macrophages sous l'action d'un stimulus exogène), ainsi que leurs propriétés antalgiques (les prostaglandines potentialiseraient l'action dorigène d'autres médiateurs tels que l'histamine et la bradykinine).

(Benoist et Misset, 1979 - Famaey, 1983).

En fait, ces trois types d'activités très fréquemment associées (propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et antalgiques), obtenues avec un extrait aqueux d'E. hirta, ne sont pas uniquement rencontrées pour des anti-inflammatoires non stéroïdiens. De tels effets ont pu être révélés notamment pour la morphine, analgésique central pouvant altérer directement les centres hypothalamiques thermorégulateurs et inhiber la synthèse de bradykinine, médiateur impliqué dans le maintien de la vasodilatation de la phase inflammatoire vasculaire (Schmitt, 1973 - Reuse, 1978 - Benoist et Misset, 1979 - Gyires et coll., 1985).

La confirmation expérimentale d'une certaine activité anti-inflammatoire pour E. hirta permet, par la même occasion, de valoriser certaines de ses indications traditionnelles fréquemment mises à profit dans diverses contrées tropicales et subtropicales (deuxième partie : Indications thérapeutiques traditionnelles).

Ainsi, très souvent, différentes parties de la plante (plante entière, parties aériennes, feuilles ou latex), utilisées en usage interne (décoction, infusion...) ou plus fréquemment en

usage externe (cataplasmes, bains, instillation dans les yeux..), entrent dans le traitement de diverses affections, au cours desquelles des processus inflammatoires sont susceptibles d'intervenir. C'est ainsi qu'E. hirta est couramment employée pour soigner les entérites chroniques, les proctites, les stomatites, les aphtes, divers troubles oculaires et notamment les conjonctivites, les oedèmes, les phlegmons, les glandes enflammées, certaines tuméfactions de la gorge et des bras, ainsi que diverses affections de la peau telles que les furoncles.

Après avoir mis en évidence l'existence de propriétés analgésiques centrales pour l'extrait aqueux d'E. hirta, activité par ailleurs supprimée par un antagoniste spécifique des récepteurs aux opiacés (naloxone), et donc apparemment de type morphinomimétique, après avoir décelé une certaine activité anti-pyrétique et anti-inflammatoire pour ce même extrait, un profil d'activité proche de celui des dérivés morphiniques nous est apparu vraisemblable, ces composés présentant également les trois propriétés précédemment citées.

C'est pourquoi, le problème de la tolérance développée à l'encontre des effets des opiacés, à la suite d'une administration prolongée, a tout particulièrement retenu notre attention. En effet, la mise en évidence d'un tel phénomène pour E. hirta ne pourrait que nous conforter dans notre hypothèse d'un rapprochement avec ces analgésiques majeurs.

Aussi, avons-nous tenté de créer une tolérance chez la souris, après administrations intra-péritonéales répétées d'extrait végétal ou de morphine.

Ces expérimentations font l'objet du chapitre suivant.

V

RECHERCHE D'UNE TOLERANCE

A L'EGARD DES EFFETS PHARMACOLOGIQUES

D' E. HIRTA

## V - 1 INTRODUCTION

### \* Tolérance et dépendance

(Gavend, 1978 - Reuse, 1978 - Benoist et Misset, 1979)

Observée avec divers médicaments, la **tolérance** peut se définir comme un état particulier de l'organisme, engendré par l'administration répétitive d'une substance donnée et caractérisé par la réduction de tout ou une partie des effets pharmacologiques de cette dernière, nécessitant ainsi l'augmentation des doses afin de retrouver l'efficacité initiale.

Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'intervention de diverses modifications, telles que celles intéressant la destinée du composé dans l'organisme (répartition, transformations métaboliques, élimination...) responsables d'une diminution de sa concentration et de sa durée de présence au niveau des sites d'action (**tolérance dispositionnelle**), mais également par la diminution de la réactivité des organes sur lesquels agit la substance, ou par la mise en jeu progressive de processus d'homéostasie physiologique ou biochimique tendant à contrecarrer les effets de la substance (**tolérance fonctionnelle**). Ces différents processus sont susceptibles d'intervenir isolément ou simultanément.

L'administration répétée d'une substance peut non seulement engendrer une tolérance de l'organisme vis-à-vis de celle-ci, mais aussi à l'égard des effets d'autres composés appartenant à la même classe chimique ou pharmacologique, ce phénomène constituant la **tolérance croisée**.

Parfois associée à la tolérance, une **pharmacodépendance** plus ou moins conséquente peut apparaître, définie comme un état psychique et quelquefois également physique, résultant de l'interaction entre un organisme vivant et une substance et caractérisé par des modifications du comportement, ainsi que par d'autres réactions comprenant toujours une pulsion à

prendre la substance de façon continue ou périodique, afin de retrouver ses effets psychiques et quelquefois d'éviter le malaise de la privation (syndrome d'abstinence) apparaissant à la suite de l'arrêt ou de la réduction de l'administration du composé et caractérisé pour un certain nombre de symptômes particuliers).

La dépendance physique constitue un facteur important de renforcement de la dépendance psychique, dans la poursuite de la prise du composé ou dans la rechute à la consommation après le sevrage.

**\* Quelques exemples de composés psychotropes et non psychotropes, responsables de l'apparition de phénomènes de tolérance et/ou de dépendance**

Parmi les substances non psychotropes connues pour induire une tolérance, les plus classiques consistent en amines sympathomimétiques bronchodilatatrices (éphédrine, isoprénaline, salbutamol...), en sels acidifiants diurétiques (chlorure d'ammonium...), en dérivés nitrés (trinitrine...) (Gavend, 1978).

Les phénomènes de tolérance et de dépendance les plus spectaculaires sont observés avec les dérivés morphiniques.

Ainsi, les principales modifications psychiques recherchées (euphorie, joie contemplative, sensation d'échapper aux agressions externes, somnolence, rêverie tranquille et parfois exaltation de l'imagination) sont fonction des conditions d'utilisation.

La dépendance physique se manifeste précocement par divers symptômes dont les plus caractéristiques sont nerveux (anxiété, agitation, insomnie...), cardio-vasculaires et respiratoires (tachycardie, hypotension, hyperpnée...), digestifs (anorexie, nausées, vomissements, diarrhées...), mais peuvent également consister en douleurs musculaires et articulaires, en augmentations des sécrétions lacrymales et salivaires, pour ne citer que ces quelques exemples. La sévérité du syndrome de sevrage dépend non seulement du mode d'administration, de la dose

quotidienne, de l'intervalle entre les prises, de la durée de la dépendance, mais aussi de l'état de santé du sujet, de sa personnalité et des conditions dans lesquelles se produit le sevrage. Le délai d'apparition, la durée et l'intensité du syndrome sont en partie fonction du métabolisme de la substance considérée.

La tolérance se manifeste essentiellement à l'égard des actions analgésiques, sédatives, euphorisantes, dépressives sur la respiration, hypothermiques, hypotensives, émétiques et anti-diurétiques ; par contre, elle serait moins marquée pour la bradycardie et faible à l'égard de l'action myotique et des effets sur la motricité de l'appareil digestif.

Ce phénomène apparaît favorisé par l'administration à intervalles réguliers de doses suffisamment fortes permettant le maintien constant d'un taux élevé de la substance dans l'organisme. De plus, il disparaît rapidement après l'arrêt de l'administration chronique de la drogue, ceci coïncidant avec son élimination de l'organisme (Gavend, 1978 - Benoist et Misset, 1979).

Le rôle important joué par les facteurs du conditionnement tels que l'environnement, le lieu, les personnes associées au syndrome d'abstinence, à la quête, à l'obtention et à l'administration de la drogue, a pu être mentionné par divers auteurs (Gavend, 1978 - Sannerud et Young, 1987 - Poulos et coll., 1988).

Ainsi, l'introduction d'un nouveau stimulus tel que l'injection d'une autre substance, ou la suppression d'un ancien stimulus précédemment associé au traitement chronique par la morphine, pourrait inhiber le développement de la tolérance. De plus, au cours du sevrage associé à des stimuli environnementaux, ces derniers pourraient acquérir eux-mêmes la capacité de déclencher les symptômes ou signes du sevrage et donc intervenir dans le maintien de la dépendance.

Comme la tolérance croisée, une dépendance croisée est également rapportée entre les différents dérivés morphiniques, quelle que soit leur structure chimique, et consiste en la suppression des symptômes de sevrage par administration d'un

autre dérivé de cette famille (Gavend, 1978).

A côté des dérivés morphiniques, la consommation abusive de certains dépresseurs du système nerveux central, à des doses supérieures aux doses thérapeutiques, est susceptible d'engendrer des phénomènes de tolérance et de dépendance présentant différents caractères communs et correspondant à la dépendance du type barbiturique.

A ce groupe appartiennent des hypnotiques barbituriques et non barbituriques (chloral, glutéthimide, méthaqualone, mécloqualone...) et des tranquillisants mineurs (méprobamate, chlordiazépoxyde, diazépam...), auxquels peut être ajouté l'alcool.

Les caractéristiques essentielles du type de pharmacodépendance induit sont une dépendance psychique parfois forte, liée à la recherche d'un état d'excitation, d'euphorie et de la suppression de l'anxiété ; une dépendance physique se manifestant par un dangereux syndrome de sevrage (anxiété, tremblements, insomnie, hypotension, convulsions généralisées de type grand mal...) ; une tolérance partielle et variable d'un individu à l'autre, laissant persister certaines actions de la substance et se manifestant notamment à l'égard des effets dépresseurs sur le système nerveux central (effets sédatifs et hypnotiques) ainsi qu'un certain degré de tolérance et de dépendance croisées entre les différentes substances.

Dans le cas de ces composés, la tolérance engendrée pourrait s'expliquer, en partie, par l'augmentation des transformations métaboliques et donc par l'inactivation des composés (tolérance dispositionnelle), mais également par l'adaptation du système nerveux central aux effets dépresseurs de la substance (tolérance fonctionnelle).

(Gavend, 1978).

Parmi les divers autres composés responsables d'une pharmacodépendance, mentionnons les dérivés amphotaminiques (amphétamines, dexamphétamine, méthamphétamine...) qui induisent une forte dépendance psychique, une dépendance physique et une tolérance importante à l'égard de certaines actions sur le

système nerveux central et le système cardio-vasculaire ; tolérance qui correspondrait, soit à l'épuisement progressif du stock de noradrénaline sur lequel intervient l'amphétamine, soit à la déplétion en noradrénaline par captage d'un métabolite (parahydroxynoréphédrine) jouant le rôle de faux médiateur chimique partiellement inactif.

Autre exemple de composé stimulant du système nerveux central, la cocaïne est capable de provoquer une dépendance psychique très marquée.

Enfin, les dérivés du Cannabis sont bien connus pour induire des phénomènes de tolérance et de dépendance psychique et physique.

(Gavend, 1978)

**\* Mécanismes d'action impliqués dans la tolérance et la dépendance physique induites par les dérivés morphiniques**

Si des modifications au niveau de la pharmacocinétique ne semblent pas être en cause de façon déterminante dans le développement de la tolérance aux morphiniques (tolérance dispositionnelle), certains mécanismes de tolérance fonctionnelle apparaissent comme primordiaux.

Ainsi, par son action sur les centres nerveux, la morphine perturberait l'homéostasie de l'organisme du sujet non tolérant. Des ajustements physiologiques interviendraient alors, afin de rétablir cette dernière, ajustements qui deviendraient de plus en plus importants à mesure que se développe la tolérance. La suppression de la drogue provoquerait une nouvelle rupture de l'équilibre homéostasique, démasquant des phénomènes d'adaptation et se traduisant par le syndrome de sevrage (Gavend, 1978).

Divers neurotransmetteurs (catécholamines, acétylcholine, sérotonine) seraient impliqués dans les mécanismes d'action des morphiniques et dans les phénomènes de tolérance et de dépendance et seraient responsables de l'installation d'une hyperexcitabilité latente des synapses neuronales (augmentation de la libération des neurotransmetteurs, diminution de leur

dégradation, augmentation de leurs interactions avec les récepteurs post-synaptiques) (Gavend, 1978).

Wigdor et Wilcox (1987) mentionnent notamment le rôle important de la voie noradrénergique bulbo-spinale, dans les mécanismes d'interactions spinales et supraspinales, voie qui pourrait être perturbée dans les phénomènes de tolérance.

Des données plus précises ont pu être apportées quant aux mécanismes d'action impliqués, grâce à des études au niveau cellulaire.

Ainsi, la morphine provoque des modifications de la membrane neuronale post-synaptique, sa liaison aux récepteurs diminuant l'activité de l'adényl-cyclase et donc réduisant la transformation de l'ATP en AMP cyclique. Par exposition des récepteurs à un excès de morphiniques (toxicomanie), cette inhibition de l'adényl-cyclase est compensée par la formation *in situ* d'une nouvelle adényl-cyclase fonctionnelle qui synthétise de l'AMP cyclique ; d'où la nécessité d'augmenter la dose de morphiniques pour réduire la production d'AMP cyclique (tolérance).

Au cours de l'intoxication chronique, le taux d'AMP cyclique formé est équivalent à celui existant avant la prise de la drogue. Lors du sevrage, tandis que l'adényl-cyclase néoformée continue d'être fonctionnelle, celle bloquée par la liaison de la morphine aux récepteurs est libérée et resynthétise de l'AMP cyclique qui atteint alors un taux excessif (Cuche et Roux, 1978 - Hugues, 1978).

Selon Hugues (1978), l'absence de dépendance vis-à-vis des peptides endogènes (enképhalines) s'expliquerait par leur dégradation enzymatique rapide au niveau du cerveau et par leur libération intermittente, les récepteurs n'étant pas alors continuellement exposés à de fortes concentrations en enképhalines.

#### \* Problèmes méthodologiques

Devant l'ampleur sans cesse croissante des toxicomanies, de par les risques vitaux (cas des overdoses), les complications somatiques (infections bactériennes, hépatites virales, troubles

respiratoires...) et psychiques (états confusionnels, délires, hallucinations...) provoquées par l'abus des composés précédemment cités, par ailleurs souvent associés (cas des polyintoxications), mais aussi de par les difficultés rencontrées dans l'élaboration des traitements, la réalisation d'études cliniques et expérimentales sur l'animal s'est avérée indispensable, afin de mieux comprendre ces phénomènes de tolérance et de dépendance.

Toutefois, les études cliniques ne peuvent être que relativement limitées, pour des raisons d'éthique. De plus, les méthodes épidémiologiques, également envisageables, posent d'importants problèmes méthodologiques et d'interprétation.

Le modèle animal, quant à lui, a été très largement employé au cours de ces dernières années, notamment dans le cas des opiacés et des peptides endogènes.

Ainsi, un certain nombre d'expérimentations ont porté sur les propriétés de renforcement de ces composés, grâce à des épreuves d'auto-administration à des animaux non dépendants, ou grâce à des études de préférence pour un milieu préalablement associé à l'administration du produit (test de conditionnement de place) (Almaric, 1987 - Almaric et coll., 1987 - Vaccarino et coll., 1985a et b) ; d'autres études ont porté sur le syndrome de sevrage provoqué par l'arrêt brutal de l'administration du composé, ou par injection d'un antagoniste des sites récepteurs aux opiacés et étude du comportement de l'animal (Gmerek et coll., 1987 - Almaric, 1987).

Divers auteurs ont pu également aborder le problème de la tolérance à l'égard d'autres effets de la morphine, tels que les effets comportementaux observés dans les tests de renforcement alimentaire (Sannerud et Young, 1987 - Solomon et coll., 1987), les activités cataleptigènes (Winters et coll., 1988) et hypothermiques (Gunne, 1960), ou encore l'action de différents stimuli stressants analgésiques (choc électrique, stress psychologique, nage forcée) sur la tolérance développée à l'égard des effets analgésiques de la morphine (Takahashi et coll., 1988 - Weinstein et coll., 1988).

Quelques travaux ont été menés plus particulièrement sur la tolérance à l'égard des effets analgésiques de la morphine

et/ou d'autres composés tels que la métergoline, la kétamine, l'éthanol ou la nicotine (Fasmer et coll., 1987 - Fidecka, 1987 Solomon et coll., 1987 - Wu et coll., 1987 - Bhargava, 1988 - Porchet et coll., 1988 - Poulos et coll., 1988 - Winters et coll., 1988).

A cette diversité dans les effets recherchés, s'ajoute une grande variabilité dans les protocoles expérimentaux employés, tant au niveau des voies et de la fréquence d'injection des produits, qu'au niveau de la durée du traitement chronique, des animaux utilisés, ou des tests pharmacologiques retenus.

Ainsi, si les produits autres que la morphine sont généralement injectés par voie intra-péritonéale (I.P.), cet opiacé est très souvent administré par injection sous-cutanée (S.C.) ou par implantation sous-cutanée de "pelotes" contenant une quantité déterminée de substance, mais rarement par voie I.P. (Takahashi et coll., 1988 - Weinstein et coll., 1988 - Winters et coll., 1988).

La fréquence des injections et la durée du traitement chronique sont également très variables, puisque les produits testés peuvent être administrés une ou deux fois par jour, ou une fois par semaine, ou encore à intervalles de un à trois jours, pendant une période variant de trois jours à dix semaines.

Les expérimentations sont généralement menées sur le rat, mais rarement sur la souris (Fasmer et coll., 1987 - Takahashi et coll., 1988).

Enfin, le test analgésique le plus couramment employé est celui du trempage de la queue de l'animal dans de l'eau chaude, bien que quelques études fassent appel à un agent algique chimique (Fasmer et coll., 1987), ou à une douleur mécanique telle que celle induite par le pincement de la queue (Takahashi et coll., 1988) ou par un choc électrique (Weinstein et coll., 1988), ou parfois à une douleur thermique (test de la plaque chauffante) (Solomon et coll., 1987 - Poulos et coll., 1988).

Devant cette grande hétérogénéité dans les protocoles usités et tenant compte de notre objectif initial, axé sur la recherche d'une tolérance à l'égard de certains des effets pharmaco-

logiques d'E. hirta, précédemment mis en évidence chez la souris après une injection I.P., nous avons expérimenté divers protocoles, tout en essayant de rester le plus proche possible des différents travaux antérieurs les plus compatibles avec les conditions imposées par nos précédentes études (chapitres B et D).

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons tenté de retrouver les effets sédatifs (test de l'activimètre), inducteurs du sommeil barbiturique (test au pentobarbital) et analgésiques (test de la plaque chauffante), après quatre prétraitements par voie I.P. réalisés sur six jours (six, trois, un jour et trente minutes avant le test).

Puis, après ces premiers essais, nous en sommes venus à rechercher l'influence d'administrations I.P. journalières d'E. hirta, sur ses effets analgésiques vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur (test de la plaque chauffante).

Les différentes études concernant les propriétés analgésiques ont pu être menées en parallèle sur le sulfate de morphine, substance de référence devant nous permettre de valider les résultats obtenus avec E. hirta, par l'obtention d'une tolérance à l'égard de cet opiacé, dans les conditions expérimentales retenues.

## V - 2 INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS SEDATIFS D'E. HIRTA, MIS EN EVIDENCE DANS LE TEST DE L'ACTIVIMETRE

### 2.1 Procédure expérimentale

#### 2.1.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le chapitre A II.

Le test consiste dans l'enregistrement de la motilité de l'animal, grâce à un activimètre de conception originale, réalisé dans notre laboratoire et précédemment décrit (Chapitre B I - 2).

#### 2.1.2 Méthode

Les produits (extrait végétal ou solvant) sont administrés par voie I.P., à quatre reprises, soient six, trois, un jours, puis trente minutes avant le test.

E. hirta est injectée aux doses de 10, 20, 100 et 400 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %), dans les mêmes conditions.

Dans le cas du lot traité par la dose de 400 mg/kg et du lot témoin correspondant, une cinquième injection d'extrait végétal (lot traité) ou de solvant (lot témoin) a été pratiquée huit jours après la quatrième administration, les animaux étant à nouveau soumis au test, trente minutes après ce cinquième traitement (lots★)

L'activité générale de la souris est enregistrée de minute en minute, pendant cinq minutes.

Seules les valeurs moyennes cumulées sur cinq minutes sont prises en compte.

### 2.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques entre les lots traités et témoin correspondant sont réalisées à l'aide du test de Student.

### 2.2 Résultats

Les résultats présentés dans le tableau 60 mettent en évidence l'inefficacité des trois plus faibles doses, soit 10, 20 et 100 mg/kg, administrées à quatre reprises, à modifier significativement l'activité générale de l'animal.

Par contre, à la dose de 400 mg/kg, l'extrait végétal réduit significativement ce paramètre comportemental (réduction de 40 % par rapport aux témoins correspondants).

Un effet relativement proche est à nouveau obtenu, huit jours après cette série de quatre prétraitements, à la suite d'une cinquième injection (réduction de l'activité générale de 47 % par rapport aux témoins) (lots★).

Signalons toutefois une diminution de la motilité observée pour le lot témoin (-42 %), si l'on compare les résultats obtenus après la quatrième injection de solvant (premier test) et après la cinquième injection (second test, lot★).

**TABLEAU 60 : INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS PAR E. HIRTA SUR L'ACTIVITE GENERALE DE LA SOURIS (ACTIVITEST).**

LOTS	EUPHORBIA HIRTA				E. HIRTA			
	TEMOIN NaCl 0,9% (N=20)	10 (N=10)	20 (N=10)	100 (N=10)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	400 mg/kg (N=12)	TEMOIN NaCl 0,9% (N=10)	E. HIRTA 400 mg/kg (N=12)
MOYENNE	1158	1236	1272	1199	601	361	348	183
ECART-TYPE REDUIT	60	80	63	137	50	72	43	50
% DE VARIATION		+7%	+10%	+3%		-40%		-47%

lots ★

N = nombre d'animaux par lot

\* p < 0,05

## V - 3 INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL BARBITURIQUE D'E. HIRTA

### 3.1 Procédure expérimentale

#### 3.1.1 Matériel

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier), dont les caractéristiques et conditions d'élevage sont indiquées dans le paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

#### 3.1.2 Méthode

Les produits (extrait végétal ou solvant) sont injectés en I.P., à quatre reprises, soit six, trois, un jours et trente minutes avant l'administration I.P. d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/kg) (pentobarbital sodique, laboratoires Clin-Midy, St Jean de la Ruelle (45)).

E. hirta est testée aux doses de 10, 20, 100 et 400 mg/kg, les témoins recevant le solvant (NaCl 0,9 %) dans les mêmes conditions.

Dans le cas du lot traité par la dose de 400 mg/kg d'extrait végétal et du lot témoin correspondant, une cinquième injection d'extrait (lot traité) ou de solvant (lot témoin) a été pratiquée huit jours après la série des quatre prétraitements, puis suivie d'une nouvelle injection I.P. de pentobarbital à la dose de 25 mg/kg (lot★).

Les paramètres pris en compte sont le temps d'endormissement, ou intervalle de temps entre l'injection du barbiturique et l'apparition du sommeil, et la durée du sommeil, ou intervalle de temps entre le début du sommeil et le réveil.

### 3.1.3 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques entre chaque lot traité et son témoin correspondant sont effectuées à l'aide du test du X<sup>2</sup> corrigé (correction de Yates), sur les pourcentages d'endormissement obtenus.

### 3.2 Résultats

D'après les résultats présentés dans le tableau 61, les trois plus faibles doses d'extrait végétal, soit 10, 20 et 100 mg/kg, n'induisent pas significativement le sommeil barbiturique.

Par contre, la dose de 400 mg/kg provoque l'endormissement de 92 % des animaux traités.

Cet effet inducteur significatif est retrouvé, quoique légèrement réduit (83 % d'endormissement), huit jours après la série des quatre prétraitements et à la suite d'une cinquième injection d'extrait végétal (lot★).

**TABLEAU 61 : INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS PAR E. HIRTA SUR LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT CHEZ LA SOURIS PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL.**

LOTS	EUPHORBIA HIRTA				E. HIRTA			
	TEMOIN : NaCl 0,9% : (N=20)	10 : (N=10)	20 : (N=10)	100 : (N=10)	TEMOIN : NaCl 0,9% : (N=10)	400 mg/kg : (N=12)	TEMOIN : NaCl 0,9% : (N=10)	E. HIRTA : 400 mg/kg : (N=12)
MOYENNE (secondes)	215	209	425	301	115	1227	0	953
ECART-TYPE REDUIT	122	209	153	171	115	153	0	170
% D'ENDOR- MISSEMENT	20%	10%	35%	30%	10%	92%	0%	83%
						***		***

lots★

N = nombre d'animaux par lot

\*\*\* p < 0,001

## V - 4 INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES D'E. HIRTA

### 4.1 Procédure expérimentale

#### 4.1.1 Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées au paragraphe consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en un bain-marie (SBK 25D, Salvis, Lausanne) chauffé et contenant un récipient en verre dans lequel est déposé l'animal au moment du test. La température au niveau du récipient, soit  $56^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , est choisie de façon à obtenir une réaction de la souris en cinq secondes, réaction caractérisée par le léchage des pattes antérieures ou par un saut de l'animal pour tenter de s'échapper.

#### 4.1.2 Méthode

La technique utilisée est inspirée de celle de Janssen et Jagueneau, décrite par Boissier et coll. (1956).

Les produits testés sont l'extrait aqueux d'E. hirta, aux doses de 50 et 100 mg/kg, et le sulfate de morphine, à raison de 4,6 mg/kg.

Pour chaque produit, deux groupes expérimentaux sont réalisés :

\* Un lot A reçoit quatre prétraitements par voie I.P. (J-6, J-3, J-1 et Jo) et subit le test de la plaque chauffante trente minutes après chaque injection, soit quatre tests en tout.

\* Un lot B reçoit également quatre prétraitements, selon la même procédure, mais n'est soumis au test de la plaque chauffante qu'en fin de traitement, soit à Jo, trente minutes après la quatrième injection.

Dans tous les cas, à chaque fois qu'un test est réalisé, chaque animal y est soumis avant l'injection du produit et ceci à deux reprises espacées d'environ dix minutes, de façon à déterminer son temps moyen de réaction avant l'injection considérée.

Trente minutes après le dernier prétraitement (lot B) ou après chaque injection (lot A), l'animal est déposé dans le récipient en verre du bain-marie. Son temps de réaction est alors évalué une seule fois et constitue le temps de réaction après traitement.

Les temps moyens de réactions (T), obtenus pour chaque lot, avant et après traitement permettent de calculer le pourcentage de variation du seuil douloureux, selon le rapport suivant :

$$\frac{(T \text{ avant traitement} - T \text{ après traitement})}{T \text{ avant traitement}} \times 100$$

Pour chaque lot, le nombre d'animaux présentant une analgésie positive peut également être déterminé et correspond au nombre d'animaux dont le temps de réaction après traitement a au moins doublé, par rapport au temps de réaction estimé avant traitement.

#### **4.1.3 Analyse statistique**

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, de Cochran ou de Hartley, les comparaisons statistiques intra et inter lots sont effectuées à l'aide du test de Student.

#### **4.2 Résultats**

##### **4.2.1 Cas des animaux prétraités à quatre reprises et soumis à quatre tests (lot A)**

Les résultats sont présentés dans le tableau 62.

Après la première injection I.P. de sulfate de morphine, à la

**TABEAU 62 : INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES DU SULFATE DE MORPHINE ET D'E. HIRTA.**

MORPHINE 4,6 mg/kg (N=12)	J-6		J-3		J-1		Jo	
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après
MOYENNE (secondes)	4,7	7,8 ***	4,4	7,4 ***	5,4	7,3 **	7,4	7,5
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,6	0,2	0,8	0,3	0,4	0,9	1
% DE VARIATION		66%		68%		35%		1%
% D'ANALGESIE POSITIVE		17%		25%		0%		0%

**E. HIRTA 50 mg/kg (N=12).**

MOYENNE (secondes)	5,4	8,3 **	4,8	6,3 *	4,6	6,2 *	4,5	4,5
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,8	0,2	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4
% DE VARIATION		54%		31%		35%		0%
% D'ANALGESIE POSITIVE		25%		17%		17%		0%

**E. HIRTA 100 mg/kg (N=12).**

MOYENNE (secondes)	4,8	8,3 ***	4,2	6,7 ***	4,2	6,1 ***	4	5,4 **
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,6	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3
% DE VARIATION		73%		59%		45%		35%
% D'ANALGESIE POSITIVE		33%		25%		8%		0%

N = nombre d'animaux par lot.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

dose de 4,6 mg/kg (J-6), le temps moyen de réaction des animaux est significativement augmenté (+66 %) et a au moins doublé pour 17 % des souris traitées.

Au cours des prétraitements suivants, on observe une augmentation progressive du temps de réaction des animaux obtenu avant chacune des trois injections, le temps de réaction obtenu après chaque traitement restant relativement stable.

Si un effet analgésique significatif subsiste encore après la troisième injection (augmentation du temps de réaction de 35 %, à J-1), ce n'est plus le cas après le quatrième prétraitement.

Ainsi, à la suite de cette série de quatre prétraitements, le temps de réaction des animaux, obtenu avant la dernière injection (Jo), a augmenté significativement ( $p < 0,01$ ) de 57 %, par rapport au temps initial obtenu avant tout traitement (J-6).

Par contre, le temps de réaction enregistré après cette dernière injection (Jo) n'est pas significativement modifié, en comparaison de celui obtenu après le premier prétraitement, soit à J-6.

Quant à E. hirta, une évolution différente des effets analgésiques est obtenue, à la suite de quatre prétraitements.

Ainsi, après la première injection (J-6), l'extrait aqueux augmente significativement et de façon dose-dépendante le temps moyen de réaction de la souris (+54 % et +73 %, respectivement avec les doses de 50 et 100 mg/kg), mais aussi le nombre d'animaux présentant une analgésie positive (25 % et 33 %, respectivement avec les doses de 50 et 100 mg/kg).

Au cours des prétraitements suivants, on observe une réduction progressive des temps de réaction enregistrés avant et après chaque injection.

Un effet analgésique significatif subsiste encore après la troisième injection (J -1), dans le cas de la dose de 50 mg/kg (augmentation du temps de réaction de 35 %), et après le dernier traitement (Jo), dans le cas de la dose de 100 mg/kg

(augmentation du temps de réaction de 35 %).

A la suite de ces quatre prétraitements, le temps moyen de réaction obtenu avant la dernière injection ( $J_0$ ) a significativement chuté de 17 %, par rapport au temps initial obtenu avant tout traitement, soit à J-6 ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ , respectivement avec les doses de 50 et 100 mg/kg).

Les temps de réaction enregistrés après cette dernière injection ( $J_0$ ) sont également significativement réduits ( $p < 0,001$ ), en comparaison de ceux obtenus après le premier traitement, soit à J-6 (-46 % et -35 %, respectivement pour les doses de 50 et 100 mg/kg).

#### **4.2.2 Cas des animaux prétraités à quatre reprises et soumis à un seul test, après la dernière injection (lots B)**

Les résultats sont présentés dans le tableau 63.

Lorsque les animaux ne sont soumis qu'à un seul test, en fin d'expérimentation, quatre prétraitements par le sulfate de morphine ont fortement augmenté le temps de réaction des animaux, proche de dix secondes, si l'on tient compte du réglage de la température du bain-marie de façon à obtenir la réaction de la souris non traitée en cinq secondes.

En fait, cet effet est déjà installé avant la dernière injection, puisque les temps de réaction obtenus avant et après ce quatrième traitement sont identiques.

De plus, cette procédure expérimentale (un seul test final) augmente plus fortement les temps de réaction enregistrés avant et après la dernière injection (environ dix secondes), en comparaison du précédent protocole (réaction du lot A obtenu en environ sept secondes), ces deux lots (A et B) différant significativement ( $p < 0,05$ ).

Dans le cas des lots traités par E. hirta, les temps de réaction obtenus avant et après la quatrième injection ne diffèrent pas significativement et sont très légèrement supérieurs pour la plus forte dose, soit 100 mg/kg, mais restent toujours proches de cinq secondes.

En comparaison des lots A, les temps de réaction enregistrés avant et après ce dernier traitement ne diffèrent pas significativement, excepté pour les valeurs obtenues avant l'injection de la dose de 100 mg/kg, le lot A réagissant plus rapidement (quatre secondes) ( $p < 0,01$ ).

**TABLEAU 63** : INFLUENCE DE QUATRE PRETRAITEMENTS SUR LES EFFETS ANALGESIQUES DU SULFATE DE MORPHINE ET D'E. HIRTA (LOTS B).

LOTS	MORPHINE		EUPHORBIA HIRTA (mg/kg)			
	4,6 mg/kg (N=12)		50 (N=12)		100 (N=12)	
	avant	après	avant	après	avant	après
MOYENNE (secondes)	10,2	10,4	4,9	5,2	5,3	5,6
ECART-TYPE REDUIT	0,7	0,7	0,2	0,2	0,3	0,4
% DE VARIATION		2%		6%		6%

N = nombre d'animaux par lot

**V - 5 INFLUENCE D'ADMINISTRATIONS JOURNALIERES D'E. HIRTA,  
DURANT SIX OU NEUF JOURS, SUR SES EFFETS ANALGESIQUES**

**5.1 Procédure expérimentale**

**5.1.1 Matériel**

Les animaux et le dispositif utilisés sont identiques à ceux précédemment décrits, lors de la recherche de l'influence de quatre prétraitements sur les effets analgésiques d'E. hirta (paragraphe V - 4).

**5.1.2 Méthode**

La technique utilisée est inspirée de celle de Janssen et Jagueneau, décrite par Boissier et coll. (1956).

E. hirta est testée à la dose de 400 mg/kg ; le sulfate de morphine, quant à lui, est injecté à raison de 9,2 mg/kg.

Chaque produit est administré une fois par jour, pendant six jours (de J<sub>0</sub>, premier jour du traitement, à J<sub>5</sub>).

Au septième jour (J<sub>6</sub>), chaque lot ("E. hirta" et "morphine") est divisé en deux, une moitié recevant le traitement chronique habituel (lots B), l'autre moitié (lots A) étant soumise à un test de tolérance croisée, par inversion des produits (le lot traité en chronique par "E. hirta" reçoit une injection de sulfate de morphine à 9,2 mg/kg ; le lot traité en chronique par le sulfate de morphine reçoit une injection d'extrait végétal à 400 mg/kg).

Le traitement chronique est ensuite poursuivi, pour les lots B, jusqu'au neuvième jour (J<sub>8</sub>).

A J<sub>9</sub>, un test de tolérance croisée est réalisé, par inversion des produits, selon la même procédure précédemment employée, à J<sub>6</sub>, pour les lots A.

Les animaux sont soumis au test de la plaque chauffante, tous

les trois jours, soit à Jo (premier jour du traitement), J3, J6 et J9.

A chaque test, le temps de réaction de chaque animal est évalué à deux reprises, avant l'injection du produit considéré, puis une troisième fois, trente minutes après cette administration. Les temps moyens de réaction, calculés pour chaque lot, avant et après l'injection, permettent de déterminer le pourcentage de variation du seuil douloureux. Le pourcentage d'analgésie positive, ou pourcentage d'animaux dont le temps de réaction après traitement a au moins doublé, est également pris en compte.

### 5.1.3 Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, de Cochran ou de Hartley, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Student.

## 5.2 Résultats

Les résultats concernant les traitements chroniques par E. hirta et le sulfate de morphine sont respectivement présentés dans les tableaux 64 et 65 .

Après une première injection I.P. de sulfate de morphine, à la dose de 9,2 mg/kg (Jo), le temps moyen de réaction des animaux est significativement augmenté (+107 %) et a au moins doublé pour 55 % des animaux.

A la suite de quatre injections journalières (J3), les effets analgésiques précédents sont fortement diminués (pourcentage de variation du seuil douloureux de 25 % et aucune analgésie positive), mais restent toutefois significatifs.

Finalement, après un traitement chronique journalier durant sept jours (J6), aucun effet significatif n'est obtenu (lot B).

Au cours de cette expérimentation, on peut noter une réduction

progressive des temps de réaction des animaux, enregistrés avant et après l'injection du sulfate de morphine.

Ainsi, après sept jours de traitement (J6), le temps de réaction des animaux du lot B, obtenu avant la septième injection, a chuté de 26 % par rapport à la valeur obtenue avant tout traitement (Jo), tandis qu'une chute de 56 % est obtenue sur le temps de réaction enregistré après cette septième injection, en comparaison de la valeur déterminée après la première administration (Jo).

L'administration d'une dose de 400 mg/kg d'E. hirta, au septième ou au dixième jour de l'expérimentation, permet de retrouver un effet analgésique, par ailleurs plus conséquent pour le lot B soumis à un traitement chronique plus long (pourcentage de variation du seuil douloureux de 71 % ; 50 % d'analgésie positive).

Cette plus grande efficacité est liée à la réaction plus rapide des animaux "B" avant l'injection de l'extrait végétal (différence significative entre les lots A et B,  $p < 0,001$ ), le temps de réaction après traitement ne différant pas significativement.

Quant à E. hirta, une première injection I.P. d'une dose de 400 mg/kg (Jo) induit également une augmentation significative du temps de réaction de la souris (+79 %) et une analgésie positive pour 30 % des animaux.

A la suite de quatre injections journalières (J3), les effets analgésiques précédents sont nettement diminués (pourcentage de variation du seuil douloureux de 25 % et aucune analgésie positive), mais restent cependant significatifs.

Après sept jours de traitement chronique (J6), aucun effet n'est obtenu (lot B).

Ce traitement est responsable d'une réduction progressive des temps de réaction des animaux, enregistrés avant et après l'injection d'E. hirta.

Ainsi, à J6, le temps de réaction obtenu pour le lot B, avant la septième injection, a chuté de 32 % par rapport à la valeur enregistrée avant tout traitement (Jo), tandis qu'une chute de 68 % est obtenue sur le temps de réaction enregistré après cette septième injection, en comparaison de la valeur estimée après la première administration (Jo).

L'administration d'une dose de 9,2 mg/kg de sulfate de morphine, au septième ou dixième jour de l'expérimentation, induit un effet analgésique nettement plus important dans le cas des animaux "B" soumis à un traitement chronique plus prolongé (pourcentage de variation du seuil douloureux de 136 % ; 100 % d'analgésie positive).

Si les temps moyens de réaction des animaux de ces deux lots (A et B), obtenus avant et après l'injection du sulfate de morphine, sont plus élevés pour le lot A soumis à un traitement chronique par E. hirta durant six jours, ces valeurs ne diffèrent statistiquement qu'avant l'administration du produit ( $p < 0,001$ ).

**TABEAU 64 : INFLUENCE DE L'ADMINISTRATION JOURNALIERE D'E. HIRTA, DURANT SIX OU NEUF JOURS. INFLUENCE D'UNE INJECTION IP DE SULFATE DE MORPHINE, EN FIN DE TRAITEMENT CHRONIQUE PAR E. HIRTA.**

MORPHINE (mg/kg)	0	0		
E. HIRTA (mg/kg)	400	400		
N	20	20		
JOURS	Jo	J3		
	avant	après	avant	après
MOYENNE (secondes)	4,7	8,4	4,4	5,5
		***		**
ECART-TYPE REDUIT	0,1	0,4	0,2	0,3
% DE VARIATION		79%		25%
% D'ANALGESIE POSITIVE		30%		0%

N = nombre d'animaux par lot.

\*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.

A ↗

MORPHINE (mg/kg)	9,2		
E. HIRTA (mg/kg)	0		
N	10		
JOURS	J6		
	avant	après	
MOYENNE (secondes)	4,4	7,2	**
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,8	
% DE VARIATION		64%	
% D'ANALGESIE POSITIVE		30%	

B ↘

MORPHINE (mg/kg)	0	9,2		
E. HIRTA (mg/kg)	400	0		
N	10	10		
JOURS	J6	J9		
	avant	après	avant	après
MOYENNE (secondes)	3,2	2,7	2,2	5,2
				***
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,2	0,1	0,3
% DE VARIATION		-16%		136%
% D'ANALGESIE POSITIVE		0%		100%

**TABEAU 65 : INFLUENCE DE L'ADMINISTRATION JOURNALIERE DU SULFATE DE MORPHINE DURANT SIX OU NEUF JOURS.**

**INFLUENCE D'UNE INJECTION IP D'E. HIRTA, EN FIN DE TRAITEMENT CHRONIQUE PAR LE SULFATE DE MORPHINE.**

MORPHINE (mg/kg)	9,2	9,2
E. HIRTA (mg/kg)	0	0
N	20	20
JOURS	Jo	J3
	avant	après
MOYENNE (secondes)	4,3	8,9
		***
ECART-TYPE REDUIT	0,3	0,4
% DE VARIATION		107%
% D'ANALGESIE POSITIVE		55%

A ↗

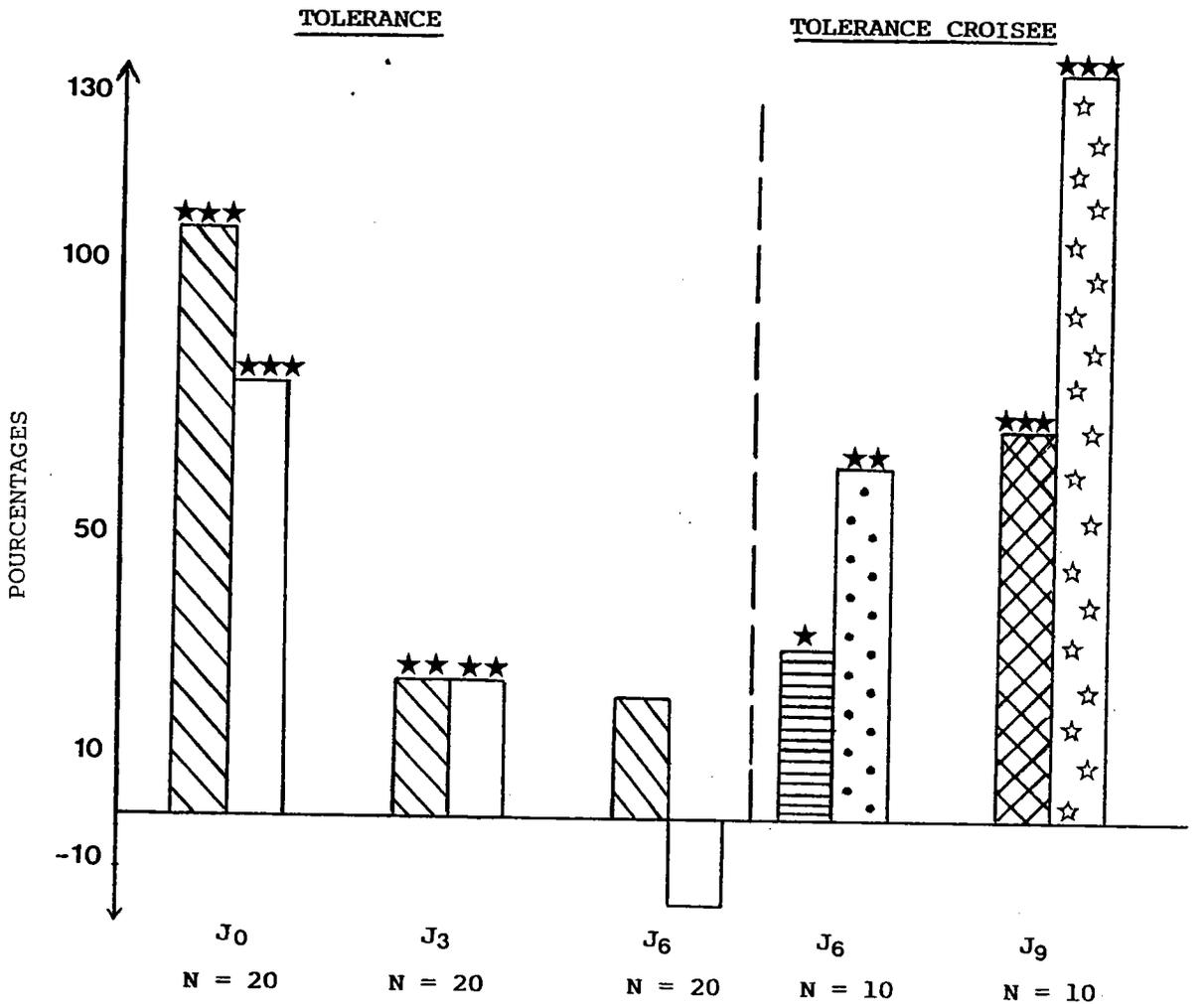
B ↘

MORPHINE (mg/kg)	0
E. HIRTA (mg/kg)	400
N	10
JOURS	J6
	avant : après
MOYENNE (secondes)	3,9 : 5,1
	***
ECART-TYPE REDUIT	0,2 : 0,5
% DE VARIATION	31%
% D'ANALGESIE POSITIVE	10%

MORPHINE (mg/kg)	9,2	0
E. HIRTA (mg/kg)	0	400
N	10	10
JOURS	J6	J9
	avant	après
MOYENNE (secondes)	3,2	3,9
		***
ECART-TYPE REDUIT	0,2	0,3
% DE VARIATION		22%
% D'ANALGESIE POSITIVE		0%

N = nombre d'animaux par lot.

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR LE SULFATE DE MORPHINE 9,2 mg/kg
-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR E. HIRTA 400 mg/kg
-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR LE SULFATE DE MORPHINE 9,2 mg/kg (J<sub>0</sub>-J<sub>3</sub>), SUIVI D'UNE INJECTION D'E. HIRTA 400 mg/kg (J<sub>6</sub>)
-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR E. HIRTA 400 mg/kg (J<sub>0</sub>-J<sub>3</sub>), SUIVI D'UNE INJECTION DE SULFATE DE MORPHINE 9,2 mg/kg (J<sub>6</sub>)
-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR LE SULFATE DE MORPHINE 9,2 mg/kg (J<sub>0</sub>-J<sub>3</sub>-J<sub>6</sub>), SUIVI D'UNE INJECTION D'E. HIRTA 400 mg/kg (J<sub>9</sub>)
-  TRAITEMENT CHRONIQUE PAR E. HIRTA 400 mg/kg (J<sub>0</sub>-J<sub>3</sub>-J<sub>6</sub>), SUIVI D'UNE INJECTION DE SULFATE DE MORPHINE 9,2 mg/kg (J<sub>9</sub>)

N = NOMBRE D'ANIMAUX PAR LOT

★ p < 0,05 ; ★★ p < 0,01 ; ★★★ p < 0,001

**FIG. 49 :** INFLUENCE D'ADMINISTRATIONS JOURNALIERES DE SULFATE DE MORPHINE ET D'E. HIRTA, DURANT SIX OU NEUF JOURS, VIS-A-VIS DE LA SENSIBILITE DE LA SOURIS A LA CHALEUR.

## V - 6 DISCUSSION

Objectif initial de notre démarche, la recherche d'une influence de plusieurs administrations I.P. d'E. hirta, vis-à-vis de certains de ses effets pharmacologiques précédemment décelés après un traitement unique, trouve sa raison d'être dans le rapprochement proposé entre cet extrait végétal et les dérivés morphiniques, notamment de par l'existence d'un effet dépresseur central, ainsi que de propriétés anti-pyrétiques, anti-inflammatoires et analgésiques centrales apparemment de type morphinique.

Effectivement, l'administration chronique des dérivés morphiniques, objets de fréquentes toxicomanies, peut induire une tolérance à l'égard de certains des effets de ces composés (effets sédatifs, analgésiques...) nécessitant l'augmentation des doses afin de retrouver l'activité initiale.

Le problème majeur auquel nous nous sommes vus confrontés réside dans l'élaboration d'un protocole expérimental rigoureux permettant la mise en évidence d'une tolérance à la morphine et à E. hirta, chez la souris, après administrations I.P. répétées.

Devant la grande diversité dans les protocoles utilisés et l'absence de méthodes suffisamment compatibles avec les exigences imposées par nos précédentes études, quant à la voie d'administration des produits (I.P.), aux animaux (souris) et aux tests pharmacologiques employés (tests comportementaux tels que l'activité, test d'induction du sommeil barbiturique, tests analgésiques tels que la plaque chauffante...), nous nous sommes vus dans l'obligation de procéder par "tâtonnements" et d'adapter progressivement nos modèles expérimentaux, en fonction des résultats.

### \* Influence de quatre prétraitements successifs

Première procédure expérimentée, l'administration de l'extrait végétal, par voie I.P. et à quatre reprises espacées dans le

temps, soit six, trois, un jours et trente minutes avant la réalisation du test pharmacologique, a été retenue dans le but d'éviter un trop grand stress aux animaux, lié à des traitements trop rapprochés dans le temps, stress pouvant perturber leur comportement.

Si le choix des jours de traitement reste arbitraire, un espacement dans le temps a pu être précédemment réalisé par certains auteurs qui administrent la morphine à intervalles moyens de trois jours (Poulos et coll., 1988), ou encore une seule fois par semaine, traitement suffisant selon les auteurs pour induire une tolérance (Solomon et coll., 1987).

Appliqué aux **effets sédatifs** (activitest), ce protocole expérimental nous a amené à choisir les doses d'extrait suivantes :

Les faibles doses de 10 et 20 mg/kg, inefficaces en traitement aigu, ont été testées dans le cas où les administrations répétées provoqueraient une "imprégnation" de l'animal, se soldant par l'apparition des effets sédatifs à plus faibles doses.

La dose de 100 mg/kg représente la première dose active en traitement unique (réduction significative de l'activité générale de la souris de 40 %).

Enfin, la forte dose sédatrice de 400 mg/kg (réduction de l'activité générale de la souris de 71 %) a été employée au cas où une tolérance se manifesterait et nécessiterait donc l'augmentation de la posologie pour retrouver les effets.

Effectivement, une disparition totale des effets sédatifs, précédemment obtenus après l'administration unique d'une dose de 100 mg/kg, a pu être obtenue à la suite de ces quatre prétraitements (pourcentage de variation de l'activité générale, par rapport aux témoins : +3 %), les deux plus faibles doses, soit 10 et 20 mg/kg, restant inefficaces (pourcentages respectifs de +7 % et +10 %).

Une activité sédatrice significative, quoique partielle, n'est retrouvée qu'avec la plus forte dose, soit 400 mg/kg (pourcentage de variation de l'activité générale, par rapport aux témoins : -40 %) et correspond, en fait, aux effets obtenus

après l'administration unique de la dose de 100 mg/kg. De plus, ce phénomène persiste huit jours après l'arrêt des prétraitements (lots ★ ), l'activité sédatrice conservant la même intensité (-47 %) à la suite d'une nouvelle administration de l'extrait végétal.

La réalisation de ces quatre prétraitements provoque également l'apparition d'une tolérance, à l'égard des **effets inducteurs du sommeil barbiturique**.

Ainsi, si les doses de 10 et 20 mg/kg sont inactives, aussi bien en traitement unique qu'après ces quatre injections, les effets inducteurs obtenus en traitement aigu, à raison de 100 mg/kg (80 % d'endormissement), sont perdus (30 % d'endormissement, contre 20 % pour le lot témoin).

A la différence de l'activité sédatrice, quatre prétraitements par une dose de 400 mg/kg ne réduisent pas l'intensité des effets inducteurs du sommeil barbiturique (92 % d'endormissement, contre 90 % en traitement aigu) qui, par ailleurs, reste stable au bout de huit jours, après une nouvelle administration (lots ★ ), si l'on prend en considération les témoins respectifs.

Les propriétés inductrices du sommeil barbiturique semblent donc moins sensibles au phénomène de la tolérance, lorsque les doses administrées sont suffisamment fortes.

La recherche d'une influence de ces quatre prétraitements, vis-à-vis des **effets analgésiques d'E. hirta**, nous a amené à sélectionner d'autres doses, soit 50 et 100 mg/kg, modérément efficaces en traitement aigu (augmentations respectives du temps de réaction de 45 et 77 % ; pourcentages respectifs d'analgésie positive de 20 et 40 %), le produit de référence, le sulfate de morphine, étant également testé à une dose moyenne, soit 4,6 mg/kg (augmentation du temps de réaction de 46 % ; pourcentage d'analgésie positive de 10 %).

Le passage d'une partie des animaux (lots A) après la première injection (J-6) permet de confirmer les effets analgésiques

précédemment obtenus en aigu. Toutefois, si ceux-ci sont très voisins dans le cas de l'extrait végétal (augmentations respectives du temps de réaction, après la première injection des doses de 50 et 100 mg/kg de 54 et 73 % ; pourcentages respectifs d'analgésie positive de 25 et 33 %), un effet légèrement supérieur est obtenu avec le sulfate de morphine (augmentation du temps de réaction de 66 %, pourcentage d'analgésie positive de 17 %), très certainement lié à la grande variabilité de la sensibilité de chaque animal, vis-à-vis de ce stimulus douloureux.

La poursuite des prétraitements et le suivi parallèle des effets analgésiques (J-3, J-1, Jo) a permis de révéler, dans le cas d'E. hirta, une réduction progressive de ces derniers se traduisant par une sensibilité croissante des animaux à la sensation douloureuse (chaleur), avant et après chaque administration et chaque test.

La réduction progressive du temps de réaction des animaux avant traitement pourrait laisser entrevoir l'apparition d'un apprentissage pouvant fausser les interprétations quant à l'hypothèse d'une tolérance, les souris ne réagissant pas à la douleur elle-même, mais tentant d'en prévenir la survenue après mémorisation de la procédure expérimentale.

Si l'existence d'un tel phénomène n'est pas exclue, son influence paraît minime, en comparaison de la tolérance développée. Effectivement, l'absence de tout effet analgésique est également obtenue chez des animaux prétraités à quatre reprises, mais soumis au test de la plaque chauffante une seule fois en fin de traitement (lots B), le temps de réaction de ces animaux, quoique légèrement supérieur, reste très proche de celui des souris soumises quatre fois au test.

Ainsi, la disparition des effets analgésiques d'E. hirta, à la suite de ces quatre prétraitements, ne peut s'expliquer uniquement par un phénomène d'apprentissage des animaux, mais bien par l'installation d'une tolérance.

Par contre, cette procédure expérimentale s'avère inefficace dans le développement d'une tolérance à l'égard de l'activité analgésique du sulfate de morphine testé à la dose de 4,6 mg/kg

Effectivement, le suivi des animaux à chaque traitement (lot A) dévoile une réduction progressive de leur sensibilité à la chaleur avant chaque traitement (augmentation du temps de réaction), tandis que chaque administration ne modifie pas significativement cette sensibilité (temps de réaction pratiquement inchangé).

Cette conservation des propriétés analgésiques du sulfate de morphine est également observée, dans le cas des animaux soumis une seule fois au test de la plaque chauffante (lot B) qui, par ailleurs, sont nettement moins sensibles à ce stimulus douloureux, observation confirmant l'influence d'un certain apprentissage, pour les souris soumises au test à plusieurs reprises (lot A).

Ce maintien des effets analgésiques du sulfate de morphine pourrait s'expliquer par son administration discontinue, adoptée au cours de cette expérimentation (Benoist et Misset, 1979).

#### \* Influence d'un traitement journalier

Si la réalisation de quatre prétraitements successifs espacés sur six jours nous a permis de déceler l'installation d'une tolérance à l'égard des effets sédatifs, potentialisateurs du sommeil barbiturique et analgésiques d'E. hirta, l'absence de résultats concluants pour l'opiacé de référence utilisé, le sulfate de morphine, constituait un problème auquel nous devions absolument répondre, pour permettre une interprétation correcte des phénomènes observés avec l'extrait végétal.

C'est pourquoi, un autre protocole a été adopté, en partie inspiré de différents travaux précédemment réalisés par divers auteurs.

En fait, parmi ces précédentes études, aucune ne remplissait toutes les conditions que nous nous étions imposées, de façon à rester suffisamment proche de celles adoptées lors de notre étude pharmacologique, à savoir, l'administration d'E. hirta et du sulfate de morphine par voie I.P. et la recherche des effets analgésiques chez la souris, par un test précédemment utilisé,

la plaque chauffante.

Les travaux les plus compatibles sont ceux de Fasmer et coll. (1987) sur la métergoline (injection I.P., une fois par jour pendant dix jours, à des souris soumises au test à la formaline à la fin du traitement), de Winters et coll. (1988) sur la kétamine et la morphine (injection I.P., une fois par jour pendant trois jours, pour la morphine testée à la dose de 2 mg/kg, et pendant cinq jours, pour la kétamine ; les animaux, des rats, sont soumis chaque jour au test du trempage de la queue dans l'eau chaude), de Takahashi et coll. (1988) sur la morphine (injection I.P. de 10 mg/kg, une fois par jour pendant dix jours ; les animaux, des souris, sont soumis chaque jour au test du pincement de la queue) et de Poulos et coll. (1988) sur la morphine (injection S.C. journalière de 5 mg/kg, à des rats soumis au test de la plaque chauffante environ tous les trois jours).

Ainsi, fréquemment rapportée, l'administration journalière a été retenue, bien que certains auteurs affirment l'inutilité d'un tel traitement, une injection hebdomadaire devant suffire à induire une tolérance (Solomon et coll., 1988).

De plus, la durée du traitement chronique a été fixée à six (lots A) ou neuf jours (lots B) ; les doses journalières d'extrait végétal et de morphine ont été augmentées, en comparaison de celles testées au cours des quatre prétraitements, ces modifications devant permettre de rester proche des données de la littérature. Enfin, les animaux ne sont soumis au test de la plaque chauffante que tous les trois jours, de façon à minimiser l'intervention d'un phénomène d'apprentissage précédemment observé à la suite des quatre prétraitements.

Un tel protocole s'est effectivement révélé efficace dans l'induction d'une tolérance à l'égard des effets analgésiques du sulfate de morphine et d'E. hirta (réduction du temps de réaction avant et après chaque injection et disparition complète des effets après sept jours de traitement (lots B)), confirmant ainsi l'importance d'une administration journalière des produits.

Signalons toutefois une certaine variabilité dans les effets

analgésiques des composés testés, obtenus après la première injection (pourcentages de variation respectifs de 107 et 79 % et pourcentages d'analgésie positive de 55 et 30 %, pour le sulfate de morphine et E. hirta), en comparaison des effets aigus obtenus au cours de la recherche d'une activité analgésique pour E. hirta (pourcentages de variation respectifs de 84 et 126 % ; pourcentages d'analgésie positive de 40 et 70 %, après injections du produit de référence et de l'extrait végétal) (chapitre C II), variabilité précédemment mentionnée pour E. hirta, au cours de la réalisation des quatre prétraitements successifs.

L'inversion des produits administrés, au septième (lots A) ou au dixième jour du traitement (lots B) (injection d'E. hirta aux animaux traités chroniquement par le sulfate de morphine ; injection de ce produit de référence aux animaux traités chroniquement par l'extrait végétal), permet de rechercher une éventuelle tolérance croisée, devant se manifester par une réduction des effets analgésiques aigus attendus à la suite de cette dernière et unique injection.

Une telle interaction n'ayant pu être observée, nous pouvons donc conclure à l'absence de tolérance croisée entre le sulfate de morphine et E. hirta. En effet, dans le cas de ces ultimes injections, une activité analgésique conséquente est retrouvée, d'autant plus prononcée que le traitement chronique a été plus long (lots B). En fait, cette supériorité d'activité pour les lots B semble principalement liée à la réaction plus rapide des animaux, avant la dernière injection.

Aussi, en raison de l'absence de tolérance croisée entre le sulfate de morphine et E. hirta, des mécanismes d'action différents semblent probables pour ces deux analgésiques centraux, des récepteurs différents pouvant être mis en cause. Effectivement, si la morphine est connue pour agir sélectivement sur les récepteurs  $\mu$ , les endomorphines (enképhalines, endorphines, dynorphines...) peuvent exercer leurs actions par l'intermédiaire de divers autres récepteurs ( $\delta$ , K,  $\epsilon$ ).

Cette hypothèse ne fait que conforter la suggestion précédemment émise, lors de la mise en évidence de propriétés

analgésiques centrales de type morphinique pour E. hirta, et concernant la recherche d'une éventuelle affinité de l'extrait végétal pour les différents récepteurs aux opiacés et aux endomorphines.

*VI*

*CONCLUSIONS*

La recherche de propriétés anti-histaminiques, analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires, abordée au cours de cette troisième partie expérimentale, a été conçue dans l'objectif principal de corréler les effets sédatifs importants initialement confirmés, avec une ou plusieurs de ces propriétés.

Cette étude complémentaire permet de cerner avec plus de précision le profil d'activité pharmacologique d'E. hirta et d'avancer les conclusions suivantes :

#### Propriétés anti-histaminiques

L'extrait aqueux d'E. hirta s'avère inefficace, vis-à-vis des contractions histaminiques induites sur l'iléon isolé de cobaye.

Ces résultats sont, par ailleurs, tout à fait compatibles avec de précédentes études pharmacologiques réalisées sur différents organes isolés (iléon, utérus, trachée de cobaye, iléon de souris) qui ont révélé l'efficacité d'extraits alcooliques ou hydro-alcooliques, des extraits aqueux restant inactifs, non seulement vis-à-vis de l'histamine, mais également vis-à-vis d'autres agents spasmogènes tels que l'acétylcholine, le chlorure de baryum ou la nicotine.

Les auteurs en ont conclu à une action typiquement spasmodique et dépressive directe sur la musculature lisse, plutôt qu'à des effets anti-histaminiques spécifiques.

(Hazleton et Hellerman, 1948 - Hellerman et Hazleton, 1950 - Hallet et Parks, 1953 - Feng et coll., 1962 - Dhar et coll., 1968).

Les effets sédatifs de l'extrait aqueux d'E. hirta ne peuvent donc être corrélés avec un blocage des récepteurs histaminiques.

### Propriétés analgésiques

Une activité analgésique centrale, apparemment morphinomimétique, peut être confirmée, E. hirta exerçant une protection vis-à-vis des douleurs chimique (algie induite par l'injection I.P. d'acide acétique) et thermique (algie induite par le contact avec une surface surchauffée), effet protecteur qui peut être antagonisé par la naloxone, antagoniste spécifique des récepteurs aux opiacés.

Ainsi, une telle action dose-dépendante se manifeste significativement vis-à-vis des douleurs chimique et thermique, dès les doses respectives de 20 et 25 mg/kg (DE 50 estimée à 25 mg/kg (24,4-25,4), dans le test de writhing), avec lesquelles une légère action anxiolytique a pu être précédemment obtenue (Chapitre B II).

Elle ne peut donc être imputée à un effet fortement sédatif qui pourrait rendre les animaux moins sensibles aux sensations douloureuses, comme cela a été proposé pour expliquer l'action protectrice légère exercée par de fortes sédatives de clorazépate dipotassique (Tranxène<sup>R</sup>), vis-à-vis de la douleur thermique.

L'activité analgésique d'E. hirta peut être comparée à celle des différents analgésiques périphériques (acétysalicylate de lysine et paracétamol) et centraux (morphine) expérimentés simultanément.

Ainsi, dans le cas d'une douleur chimique (test du writhing), la protection développée par la dose de 50 mg/kg d'extrait végétal (61 %) peut être rapprochée de celle manifestée par l'acétylsalicylate de lysine et le paracétamol testés à la dose de 68 mg/kg (respectivement 59 % et 60 %). Par contre, la dose de 1,15 mg/kg de sulfate de morphine exerce un effet protecteur légèrement supérieur (68 %).

Dans le cas d'une douleur thermique (test de la plaque chauffante), vis-à-vis de laquelle les antalgiques périphériques restent inefficaces, cette même dose d'extrait végétal augmente le seuil de sensibilité des animaux, de façon similaire à l'action de la dose de 4,6 mg/kg de sulfate de morphine

(pourcentages de variation respectifs de 45 % et 46 %), tandis que l'efficacité de la plus forte dose d'analgésique central testée, soit 9,2 mg/kg, est intermédiaire à celle des doses de 100 et 200 mg/kg d'extrait végétal (pourcentages de variation respectifs de 84 %, 77% et 96%).

Par contre, la prise en considération du doublement du temps de réaction de l'animal après traitement (analgésie positive) permet de rapprocher les doses de 9,2 mg/kg de sulfate de morphine et de 100 mg/kg d'E. hirta.

### Propriétés anti-pyrétiques

Administrée aux doses sédatives de 100 et 400 mg/kg, E. hirta antagonise significativement l'hyperthermie induite par l'injection sous-cutanée de levure.

Cette action anti-pyrétique se manifeste rapidement dans les trente minutes qui suivent l'injection de l'extrait végétal, pour atteindre un maximum au bout d'une heure (chutes respectives de la température rectale de 1°7 C et 1°9 C, pour les doses de 100 et 400 mg/kg et par rapport aux rats hyperthermiques) ; la température rectale enregistrée est alors très proche de la température normale du rat, ce qui traduit un antagonisme total de l'hyperthermie expérimentale.

Si cet effet s'estompe ensuite progressivement, il reste toutefois significatif cinq à six heures après l'administration de l'extrait végétal.

Le profil d'activité anti-pyrétique d'E. hirta, obtenu dans ce modèle expérimental, est très proche de celui de l'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de référence, l'acétylsalicylate de lysine, utilisé à une très forte dose, soit 200 mg/kg.

Cependant, ce composé présente une efficacité supérieure (chute maximale de la température de 2°5 C, une heure après son injection).

La confirmation expérimentale d'une activité anti-pyrétique

pour E. hirta permet de valoriser son utilisation en médecine traditionnelle, en tant que fébrifuge.

### Propriétés anti-inflammatoires

Administrée aux doses sédatives de 100 et 200 mg/kg, E. hirta exerce une activité anti-inflammatoire vis-à-vis des phénomènes aigus (oedème induit par l'injection sub-plantaire de carragénine).

Cet effet dose-dépendant ne se manifeste significativement que deux heures après l'injection de l'agent phlogistique, pour atteindre un maximum dès ce moment (inhibition de l'oedème de 25,9 %, pour la dose de 100 mg/kg) ou trois heures après cette injection (inhibition de l'oedème de 59,8 %, pour la dose de 200 mg/kg) et régresser ensuite assez rapidement, à partir de quatre (dose de 100 mg/kg) ou de cinq heures (dose de 200 mg/kg).

Le profil d'activité d'E. hirta diffère nettement de celui obtenu avec l'AINS de référence choisi, l'indométacine, dont l'activité inhibitrice s'établit plus rapidement (dans les trente minutes qui suivent l'injection de la carragénine) et se maintient à un niveau élevé et plus ou moins stable pendant environ six heures.

Toutefois, un effet inhibiteur maximal voisin de 60 % est obtenu, à la fois pour la dose de 200 mg/kg d'E. hirta et celle de 10 mg/kg d'indométacine.

A ces divergences quant au profil d'activité d'E. hirta et de l'AINS de référence, l'indométacine, vis-à-vis de l'inflammation aiguë (oedème induit par la carragénine), vient s'adjoindre l'inefficacité de l'extrait végétal sur l'inflammation chronique (polyarthrite induite par l'adjuvant de Freund).

Effectivement, un traitement chronique durant quatorze jours, par des doses journalières de 200 et 400 mg/kg, n'améliore pas la prise pondérale des animaux et n'antagonise pas l'oedème développé au niveau des pattes postérieures du rat.

Par contre, à la différence de l'indométacine, E. hirta exerce une activité analgésique vis-à-vis de la douleur associée à ce processus inflammatoire, cet effet n'étant toutefois statistiquement significatif qu'avec la plus forte dose (pourcentages de variation respectifs de 24 % et 52 %, pour les doses de 200 et 400 mg/kg).

La confirmation de propriétés anti-inflammatoires pour E. hirta permet à nouveau de valoriser son utilisation en médecine traditionnelle, pour diverses affections susceptibles de faire intervenir un processus inflammatoire (entérites chroniques, proctites, stomatites, aphtes, troubles oculaires, oedèmes, phlegmons, glandes enflammées, tuméfactions de la gorge et des bras, affections cutanées telles que les furoncles).

#### Tolérance à l'égard de différents effets pharmacologiques d'E. hirta

La réduction des effets sédatifs (activitest), inducteurs du sommeil barbiturique (test au pentobarbital) et analgésiques (test de la plaque chauffante) d'E. hirta peut être constatée, après administrations répétées de l'extrait végétal, soit à quatre reprises espacées dans le temps (six, trois, un jour et trente minutes avant le test pharmacologique), soit journalièrement et durant six ou neuf jours.

Ainsi, ces traitements successifs sont responsables de la perte partielle ou totale des effets précédemment obtenus en traitement aigu, avec les doses de 50, 100 et 400 mg/kg.

Si une telle tolérance aux effets analgésiques d'E. hirta peut être constatée grâce aux deux protocoles expérimentés, seule l'administration journalière du sulfate de morphine s'avère efficace dans cette optique, la mise en oeuvre de quatre prétraitements espacés dans le temps se traduisant, non pas par une réduction des effets analgésiques de cet opiacé (augmentation de la sensibilité des animaux à la chaleur, après chaque traitement), mais par une augmentation progressive de la sensibilité des animaux avant chaque traitement, celle-ci demeurant

pratiquement inchangée après chaque injection.

Ces résultats confirment l'importance des conditions expérimentales retenues et plus particulièrement du temps qui sépare les injections.

L'absence d'une tolérance croisée entre E. hirta et le sulfate de morphine peut également être constatée, après six ou neuf jours de traitement chronique, laissant ainsi présager de mécanismes d'action différents, peut-être en rapport avec une affinité différente pour les récepteurs aux opiacés et aux endomorphines.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce quatrième chapitre, complément de la précédente recherche visant à cerner le profil d'activité pharmacologique d'E. hirta par l'étude de diverses propriétés psychotropes (chapitres B et C), nous permet donc de conclure à l'existence de propriétés analgésiques centrales, apparemment morphinomimétiques, ainsi qu'à l'existence d'effets anti-inflammatoires vis-à-vis des phénomènes aigus et d'effets anti-pyrétiques .

Très fréquemment associées, ces trois propriétés peuvent se manifester plus ou moins intensément selon les composés et permettre ainsi le rattachement à l'une ou l'autre de ces trois classes, en fonction de l'effet thérapeutique le plus largement mis en valeur.

Toutefois, un tel rapprochement est parfois difficile ; ainsi, les dérivés salicylés sont généralement considérés comme le type de médicaments analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires, pour ne citer que cet exemple.

En raison de son activité analgésique centrale, E. hirta semble présenter un profil d'activité différent de ces dérivés salicylés et des analgésiques mineurs en général.

Par contre, un rapprochement entre cet extrait végétal et les

dérivés morphiniques n'est pas exclu.

Effectivement, divers auteurs (Schmitt, 1973 - Reuse, 1978 - Benoist et Misset, 1979 - Gyires et coll., 1985) ont pu mentionner l'existence de propriétés anti-pyrétiques et anti-inflammatoires pour la morphine ; les premières seraient liées à l'altération des centres hypothalamiques thermorégulateurs, les secondes seraient la conséquence de l'inhibition de la synthèse de bradykinine, médiateur de l'inflammation aiguë.

Bien que les mécanismes d'action impliqués dans les effets anti-pyrétiques et anti-inflammatoires d'E. hirta n'aient pas été abordés au cours de cette étude et mériteraient de faire l'objet d'une prochaine investigation, l'activité analgésique centrale, antagonisée par un antagoniste spécifique des récepteurs aux opiacés, la naloxone, tendrait à nous suggérer un tel rapprochement.

L'obtention d'une tolérance à l'égard des effets sédatifs, inducteurs du sommeil barbiturique et analgésiques d'E. hirta ne peut que nous conforter dans cette hypothèse.

Toutefois, ce phénomène n'est pas exclusivement observé avec les dérivés morphiniques ; divers autres composés non psychotropes (amines sympathomimétiques bronchodilatatrices, sels acidifiants diurétiques...) ou psychotropes (certains hypnotiques barbituriques et non barbituriques, certains tranquillisants mineurs, l'alcool, l'amphétamine...) sont susceptibles d'engendrer des états de tolérance et/ou de dépendance plus ou moins conséquents (Gavend, 1978).

De plus, l'absence de tolérance croisée, entre E. hirta et le sulfate de morphine, nous incline à envisager des mécanismes d'action différents.

Ces dernières constatations nous ont paru particulièrement intéressantes et mériteraient la mise en oeuvre d'une étude plus approfondie dans le domaine des analgésiques centraux, notamment par une approche plus fine des mécanismes d'actions possibles, telle que la recherche de l'affinité d'E. hirta pour les sites récepteurs concernés, mais également par une inves-

tigation plus poussée des phénomènes de tolérance et de dépendance, problèmes particulièrement épineux si l'on envisage une mise sur le marché ultérieure, pour cette plante.

*CHAPITRE E*

*ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE*

*D' E. HIRTA ADMINISTREE*

*PAR VOIE ORALE*

## **I INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LES ACTIVITES LOCOMOTRICE ET MANIPULATOIRE DU RAT PLACE EN BOITE A SKINNER**

Cette expérimentation a été réalisée au laboratoire de Biologie du Comportement de Nancy.

### **I - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

#### **1.1 Matériel**

Les animaux utilisés sont des rats mâles OFA (Iffa-Credo), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées au chapitre consacré aux animaux (Chapitre A II).

Le dispositif expérimental consiste en boîtes à Skinner, normalement employées pour les tests de conditionnement opérant, constituées par des cages standard (42 x 28 x 24 cm) dans lesquelles les rats se déplacent librement, sans y subir de chocs lumineux. Deux pédales, constituées par des rectangles de plexiglas (4 x 7 cm) sont ajoutées à la cage et permettent d'enregistrer l'activité manipulatoire des animaux.

#### **1.2 Méthode**

Les animaux reçoivent, par voie orale, un prétraitement d'extrait végétal mis en suspension, soit dans de l'eau distillée (doses de 1600 et 3200 mg/kg), soit dans une émulsion d'eau et de labrafil M 1944C à 20 % (dose de 1600 mg/kg).

Les témoins reçoivent le solvant seul (eau distillée ou "eau + labrafil"), dans les mêmes conditions.

Le volume administré est de 2 ml/kg.

Une heure trente minutes après le traitement, le nombre d'unités franchies, représentées sur le plancher par des carrés (activité locomotrice) et le nombre d'appuis sur les pédales (activité manipulatoire) sont comptabilisés pendant quinze minutes.

### 1.3 Analyse statistique

Après réalisation d'une analyse de variance (ANOVA) et vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les valeurs moyennes obtenues sur l'activité locomotrice et les manipulations des pédales, pour les différents lots traités, sont comparées aux valeurs moyennes obtenues pour le lot témoin correspondant, par le test de Student (lots "labrafil") ou par le test de Newman-Keuls (lots "H<sub>2</sub>O distillée").

#### I - 2 RESULTATS

D'après les résultats présentés dans le tableau 66, l'extrait d'E. hirta, dissous dans l'eau distillée et administré par voie orale, aux doses de 1600 et 3200 mg/kg, ne réduit pas significativement les activités locomotrice et manipulative des rats.

Par contre, lorsque l'extrait végétal est incorporé dans une émulsion "eau - excipient labrafil", une dose de 1600 mg/kg administrée oralement réduit significativement l'activité locomotrice des animaux, tandis que le nombre d'appuis sur les pédales n'est pas modifié.

**TABLEAU 66** : INFLUENCE D'E. HIRTA ADMINISTREE PAR VOIE ORALE, SUR LES ACTIVITES LOCOMOTRICE ET MANIPULATOIRE DU RAT PLACE EN BOITE A SKINNER.

PARAMETRES	LOTS	TEMOIN	E. HIRTA
		LABRAFIL 20 %	1600 mg/kg
		(N=8)	(N=9)
LOCOMOTION (moyenne)		127 ± 11	79 ± 11 **
APPUI SUR LES PEDALES (moyenne)		53 ± 6	50 ± 10

PARAMETRES	LOTS	TEMOIN	E. HIRTA (mg/kg)	
		H <sub>2</sub> O DISTILLEE	1600	3200
		(N=6)	(N=8)	(N=8)
LOCOMOTION (moyenne)		135 ± 20	120 ± 11	97 ± 14
APPUI SUR LES PEDALES (moyenne)		65 ± 18	48 ± 12	57 ± 11

N = nombre d'animaux par lot

\*\* p < 0,01

## **II INFLUENCE D'E. HIRTA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACÉE DANS L'ESCALIER**

### **II - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

#### **1.1 Matériel**

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Janvier). Leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le Chapitre A II.

Le dispositif expérimental, l'escalier, est identique à celui utilisé lors de la recherche d'effets sédatifs (Chapitre B I-3) et anxiolytiques (Chapitre B II-2), pour l'extrait végétal administré par voie I.P..

#### **1.2 Méthode**

La technique utilisée est inspirée de la méthode de Molinengo et Ricci-Canaleros (1970), mise au point sur les rats et adaptée aux souris par Simiand et coll. (1984).

Une heure après l'administration orale de l'extrait végétal, aux doses de 800 et 1600 mg/kg, ou de solvant (eau distillée), l'animal est retiré de sa cage d'élevage pour être déposé en bas de l'escalier, le dos tourné par rapport aux marches.

Le nombre de redressements effectués et le nombre de marches montées par la souris sont comptabilisés de minute en minute, pendant cinq minutes.

#### **1.3 Analyse statistique**

Les comparaisons statistiques entre les lots témoin et traités sont effectuées à l'aide du test de Newman-Keuls, après avoir vérifié l'homogénéité des variances.

II - 2 RESULTATS

D'après les résultats présentés dans le tableau 67, administrée oralement aux doses de 800 et 1600 mg/kg, E. hirta ne modifie pas significativement le nombre de redressements et de marches montées par la souris placée dans l'escalier.

Signalons une réduction plus importante du premier paramètre, notamment avec la dose de 800 mg/kg (diminution de 21 % par rapport aux témoins). Toutefois, cet effet reste non significatif et non dose-dépendant.

**TABLEAU 67 : INFLUENCE D'E. HIRTA ADMINISTREE PAR VOIE ORALE, SUR LES REDRESSEMENTS ET LES MARCHES MONTEES PAR LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER.**

REDRESSEMENTS

LOTS	TEMOIN	E. HIRTA (mg/kg)	
	H2O DISTILLEE	800	1600
	(N=10)	(N=10)	(N=10)
MOYENNE	35,2	27,8	33,5
ECART-TYPE REDUIT	2,8	2,1	3,6
% PAR RAPPORT AU TEMOIN		-21%	-4,8%

MARCHES MONTEES

LOTS	TEMOIN	E. HIRTA (mg/kg)	
	H2O DISTILLEE	800	1600
	(N=10)	(N=10)	(N=10)
MOYENNE	35,5	32,4	38,4
ECART-TYPE REDUIT	2,7	2,4	3,7
% PAR RAPPORT AU TEMOIN		-8,7%	+8,2%

N = nombre d'animaux par lot

### **III INFLUENCE D'E.HIRTA SUR LES EFFETS INDUCTEURS DU SOMMEIL DU PENTOBARBITAL ADMINISTRE A UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE**

#### **III - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

##### **1.1 Matériel**

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier), dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées au chapitre consacré aux animaux (Chapitre A II).

##### **1.2 Méthode**

Une heure avant l'injection I.P. d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital, soit 25 mg/kg (pentobarbital sodique, laboratoires Clin-Midy, St Jean de la Ruelle (45)), les animaux reçoivent l'extrait végétal par voie orale, aux doses de 800 et 1600 mg/kg.

Les témoins reçoivent le solvant seul (eau distillée), dans les mêmes conditions.

Le paramètre pris en compte est le pourcentage d'animaux endormis.

##### **1.3 Analyse statistique**

Les comparaisons statistiques entre les lots témoin et traités sont effectués à l'aide du test du X<sup>2</sup> corrigé (correction de Yates), sur les pourcentages d'animaux endormis.

#### **III - 2 RESULTATS**

Les pourcentages d'endormissement obtenus pour les différents lots et reportés dans le tableau 68 nous permettent de conclure à l'absence d'effets inducteurs du sommeil narcotique, lorsque

l'extrait végétal dissous dans de l'eau distillée est administré par voie orale

**TABLEAU 68** : INFLUENCE D'E. HIRTA ADMINISTREE PAR VOIE ORALE, VIS-A-VIS DE LA NARCOSE INDUITE PAR UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/kg).

PARAMETRE	LOTS	TEMOIN	E. HIRTA (mg/kg)	
		H <sub>2</sub> O DISTILLEE	800	1600
		(N=10)	(N=10)	(N=10)
POURCENTAGE D'ENDORMISSEMENT		30%	20%	30%

N = nombre d'animaux par lot

## IV INFLUENCE D'E. HIRTA VIS-A-VIS DE LA DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE

### **IV - 1 PROCEDURE EXPERIMENTALE**

#### **1.1 Matériel**

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss (Janvier) ; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le chapitre A II.

#### **1.2 Méthode**

La technique utilisée est inspirée de la méthode de Siegmund (1957).

L'extrait végétal est administré oralement, aux doses de 800 et 1600 mg/kg, une heure avant l'injection I.P. de l'agent algique, soit l'acide acétique à 1,2 % (acide acétique Rectapur 99-100 %, Prolabo, Paris).

Les témoins reçoivent le solvant (eau distillée), dans les mêmes conditions.

Immédiatement après avoir reçu l'agent algique, chaque animal est placé en cage individuelle (24 x 11 x 10 cm), pour être observé durant trente minutes.

Le paramètre pris en compte est le nombre total de contorsions et/ou d'étirements des pattes postérieures, permettant de calculer le pourcentage de protection obtenu pour chaque lot, par rapport au lot témoin, selon le rapport suivant :

$$\frac{\text{valeur moyenne témoin} - \text{valeur moyenne traité}}{\text{valeur moyenne témoin}} \times 100$$

#### **1.3 Analyse statistique**

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test

de Bartlett, les comparaisons statistiques entre les lots témoin et traités sont effectuées à l'aide du test de Newman-Keuls.

#### IV - 2 RESULTATS

Les nombres moyens de contorsions et d'étirements des pattes postérieures, comptabilisés pour les différents lots et reportés dans le tableau 69, permettent de conclure à l'absence d'effets protecteurs d'E. hirta, vis-à-vis de la douleur occasionnée par un agent algique chimique (acide acétique à 1,2 %). C'est pourquoi, aucun pourcentage de protection n'est mentionné dans ce tableau.

**TABLEAU 69** : INFLUENCE D'E. HIRTA, ADMINISTREE PAR VOIE ORALE, VIS-A-VIS DE LA DOULEUR OCCASIONNEE PAR L'ACIDE ACETIQUE.

LOTS	TEMOIN	E. HIRTA (mg/kg)	
	H <sub>2</sub> O DISTILLEE	800	1600
	(N=10)	(N=10)	(N=10)
MOYENNE	49,5	49,9	48,9
ECART-TYPE REDUIT	4,4	6,1	4,5

N = nombre d'animaux par lot

## V CONCLUSIONS

Ces quatre expérimentations menées sur le rat (test de la boîte à Skinner) ou la souris (tests de l'escalier, d'induction du sommeil barbiturique et du writhing) permettent de conclure à l'absence d'efficacité d'E. hirta, lorsque l'extrait végétal est administré par voie orale, dissous dans de l'eau distillée.

Ainsi, aux fortes doses testées, soit 800, 1600 et 3200 mg/kg, les effets sédatifs, inducteurs du sommeil barbiturique et analgésiques précédemment décelés après l'injection I.P. de l'extrait dissous dans du NaCl 0,9 % ne sont pas retrouvés.

Cependant, l'incorporation d'E. hirta à une émulsion "eau-labrafil" (80 - 20 V/V) a permis l'obtention d'un léger effet sédatif dans le test de la boîte à Skinner (réduction significative de l'activité locomotrice de 38 %, par rapport aux témoins).

Toutefois, cette activité reste discriminative, puisque ne se manifestant que sur le paramètre locomotion, et n'affectant pas l'activité manipulative de l'animal (appui sur les pédales).

Le solvant utilisé apparaît donc comme très important et même capital, dans la manifestation des effets pharmacologiques d'E. hirta. Ainsi, l'emploi de labrafil à 20 % semble améliorer l'absorption digestive du ou des principes actifs de l'extrait végétal.

Néanmoins, une telle hypothèse nécessiterait une vérification plus approfondie et notamment la reproduction des effets positifs obtenus, non seulement en ce qui concerne l'activité sédatrice d'E. hirta, mais aussi vis-à-vis d'autres actions pharmacologiques telles que les propriétés inductrices du sommeil barbiturique, analgésiques, anti-pyrétiques ou anti-inflammatoires.

En fait, les quatre expérimentations précédemment présentées ne doivent être considérées que comme préliminaires et ne peuvent absolument pas remettre en question la voie orale.

Effectivement, si cette voie d'administration ne pose aucun problème chez l'homme, la procédure employée pour l'animal (gavage à l'aide d'une sonde gastrique) apparaît comme très stressante et peut évidemment perturber son comportement et engendrer une certaine variabilité dans les résultats obtenus.

De plus, les expérimentations portent sur un extrait total de plante et donc sur un complexe de molécules chimiques plus ou moins volumineuses ; or, très souvent, l'activité pharmacologique n'est pas imputable à une substance donnée, mais plutôt à un groupe de composés pouvant être complexés par d'autres molécules, quant à elles inactives, rendant ainsi l'absorption digestive beaucoup plus difficile.

De plus amples informations pourraient être fournies par la réalisation d'une étude chimique suffisamment poussée et corrélée à l'étude pharmacologique, de manière à tenter de relier une activité donnée à un groupe de substances et permettre aussi la préparation d'extraits purifiés plus facilement absorbables.

# *CONCLUSIONS*

Le regain d'intérêt manifesté à l'égard des médecines dites "douces", tant au niveau des médias que des organismes de santé publics et privés, n'est pas étranger à l'essor considérable que connaît, depuis quelques années, l'ethnopharmacologie.

Alliant l'investigation auprès des tradipraticiens et des populations autochtones, afin de répertorier les usages thérapeutiques de diverses plantes de la pharmacopée traditionnelle, à une recherche toxicologique, chimique et pharmacologique menée en laboratoire, à l'aide de techniques contemporaines, cette science a pour objectif essentiel de recenser le savoir traditionnel en voie de disparition et d'évaluer les indications thérapeutiques traditionnelles.

Bien évidemment, face au nombre impressionnant de plantes et d'indications thérapeutiques qui leur sont conférées, toutes ne peuvent faire l'objet de telles recherches ; une sélection doit nécessairement être réalisée. Si celle-ci est souvent basée sur la notoriété de la plante considérée et sur les convergences dans les indications mentionnées par les tradipraticiens, le choix effectué peut également porter sur d'autres propriétés, moins connues parce que d'un intérêt moindre pour les populations autochtones souvent confrontées à diverses affections endémiques particulièrement sévères, comme les atteintes parasitaires, mais cependant susceptibles de retenir l'attention des sociétés "modernes" sensibilisées à d'autres problèmes.

Les travaux réalisés sur E. hirta L., Euphorbiaceae à distribution pantropicale, entrent parfaitement dans le cadre d'une telle investigation.

Très largement employée en médecines traditionnelles, E. hirta a fait l'objet de nombreuses études botaniques, ethnopharmacologiques, toxicologiques, chimiques et pharmacologiques.

Notre premier objectif a été de repositionner cette espèce d'un point de vue taxonomique et de présenter le plus clairement possible les problèmes d'identification liés à la synonymie, notamment avec E. pilulifera L..

D'un point de vue botanique, cette plante herbacée, vivace ou annuelle, dressée ou rampante, selon le milieu où elle croît, présente les caractères spécifiques du genre *Euphorbia* et notamment la présence de laticifères producteurs d'un latex blanc et d'inflorescences ou cyathiums, composée chacune d'une fleur femelle et de cinq fleurs mâles réduites à une étamine dans le cas d'E. hirta.

De par sa distribution pantropicale, il n'est pas surprenant de retrouver cette espèce dans de nombreuses pharmacopées traditionnelles, comme le montre la grande variété des noms vernaculaires.

Plus étonnant est le nombre considérable d'usages thérapeutiques qui lui sont conférés dans les domaines les plus divers, tels que les affections gastro-intestinales (dysentéries amibiennes, diarrhées, ulcères, diverses parasitoses ; propriétés purgatives...), rénales (lithiases ; propriétés diurétiques...) hépatiques (ictères ; propriétés hypoglycémiantes), cardiaques (crise cardiaque), respiratoires (asthme, bronchite...), génitales (troubles menstruels, stérilité, gonorrhée ; propriétés galactagogues...), oculaires (conjonctivites...), de la peau et des muqueuses (cors, aphtes, affections parasitaires ; propriétés cicatrisantes et anti-inflammatoires...). A ces propriétés peuvent être ajoutés des effets sédatifs, fébrifuges et analgésiques, les derniers cités résultant de l'amélioration de diverses pathologies traitées par E. hirta (dysentérie, problèmes articulaires et musculaires...).

Ces nombreux usages n'ont pas manqué de retenir l'attention des médecines "modernes", tant dans le domaine allopathique, pour ses propriétés amoebicides et anti-asthmatiques, que dans celui de l'homéopathie, pour ses effets sur les systèmes respira-

toires (asthme...) et vasculaires (hémorragies...), ainsi que sur l'appareil génital (leucorrhées acides).

Outre les nombreuses préparations et posologies prescrites en médecines traditionnelles, diverses formes galéniques ont pu être élaborées, telles que le Socamibe, le Dysentéral 1 et 2, commercialisés comme anti-dysentériques, mais aussi différents extraits, élixirs et teintures, employés seuls ou associés à d'autres substances ou à d'autres extraits végétaux, pour traiter diverses affections respiratoires.

Si E. hirta fut pratiquement oubliée après 1914, en tant que spécialité pharmaceutique, elle n'a cessé de susciter l'intérêt de nombreux chercheurs, tant au niveau de ses propriétés pharmacologiques, de sa composition chimique, qu'au niveau de sa toxicité, notamment en raison de son appartenance à la famille des Euphorbiaceae réputées pour la toxicité de leur latex.

C'est ainsi que les études de toxicité aiguë et chronique ont démontré l'absence ou la faible toxicité d'extraits aqueux, hydro-alcooliques et alcooliques d'E. hirta, administrés à l'animal par voies I.P. et orale, ainsi que la bonne tolérance des préparations (extrait hydro-alcoolique, nébulisat) expérimentées en clinique, à des doses thérapeutiquement efficaces.

Les études chimiques antérieures ont abouti à l'identification des polyphénols tels que les tanins galliques et catéchiques, les acides phénols, les composés flavoniques, les leucoanthocyanes, les anthocyanosides et les dérivés coumariniques ; elles ont également porté sur la recherche de dérivés terpéniques et notamment de diterpènes, de triterpènes et de dérivés stéroliques.

Plusieurs acides organiques ont pu être isolés et identifiés, en particulier l'acide shikimique responsable d'effets myorelaxants ; mais également vingt-deux acides aminés dont l'acide  $\gamma$ aminobutyrique ; divers alcools aminés dont la choline, capable d'induire la contraction de différents muscles lisses ; ainsi que plusieurs acides, alcools et carbures aliphatiques, des glucides (oses, osides, itols) et des éléments minéraux.

En partie responsable du regain d'intérêt manifesté à l'égard de cette espèce végétale, au cours de ces dernières années, l'activité amoebicide a fait et fait encore actuellement l'objet de nombreuses recherches, en raison de l'importance endémo-épidémique de la dysentérie amibienne.

Néanmoins, l'action sur les systèmes respiratoires et cardiovasculaires, ainsi que les propriétés spasmolytiques et galactagogues ont également retenu l'attention de divers auteurs.

Quelques travaux ont porté sur la recherche d'effets irritants, co-carcinogènes et anti-cancéreux.

D'autres études ont permis de confirmer l'existence de propriétés hypoglycémiantes et de constater l'absence d'activités antibactériennes, anti-fongiques, anthelminthiques et anti-virales. Enfin, signalons l'absence d'actions sur le système nerveux central et de propriétés analgésiques, constatée au cours d'un screening de plusieurs plantes indiennes (Dhar et coll., 1968).

Notre contribution à ces précédentes études s'est limitée, dans les domaines de la botanique et de la toxicologie, à la réalisation de coupes histologiques des parties aériennes et à la confirmation de l'absence de toxicité d'un extrait aqueux, administré à la souris, par voies I.P. et orale.

Quant à l'étude chimique, elle nous a permis, d'une part, de vérifier la stabilité des différents extraits aqueux utilisés au cours de nos travaux pharmacologiques (obtention de profils chromatographiques similaires) et, d'autre part, de confirmer la présence des groupes chimiques antérieurement identifiés, tels que des tanins galliques et catéchiques, des acides phénols dont l'acide chlorogénique, des composés flavoniques, des composés réducteurs, des acides organiques, des acides aminés et notamment l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, des glucides (présence de galactose et de lévulose) des sels minéraux (forte teneur en potassium et, à un degré moindre, en calcium) et des saponosides. Par contre, aucun anthocyanoside, dérivé de la benzo  $\alpha$  pyrone, dérivé cyanogénétique ou alcaloïde n'a été retrouvé.

En fait, l'essentiel de notre travail a été consacré à la recherche d'un profil pharmacologique précis d'un extrait aqueux d'E. hirta, préparé à partir de la plante entière, selon les usages traditionnels.

### RECHERCHE DES PROPRIETES PSYCHOTROPES

Les récentes observations de P. Cabalion (communication personnelle, 1983), attribuant à E. hirta un effet calmant apparemment de type anxiolytique non soporifique, observations confortées par l'emploi de cette plante comme sédatif en médecine traditionnelle, ont constitué le véritable facteur initiateur de cette étude.

De plus, la recherche d'extraits végétaux à propriétés sédatives du type tranquillisant mineur s'inscrivait parfaitement dans les thèmes principaux développés par le laboratoire de Pharmacognosie.

Des **effets sédatifs** ont ainsi pu être décelés, chez la souris placée en situation contraignante (tests de l'activimètre et de l'escalier) et non contraignante (test d'exploration d'un milieu nouveau), respectivement dès les doses de 100 et 12,5 mg/kg, injectées par voie I.P..

Associés à cette activité, de légers **effets anxiolytiques** ont pu être démontrés chez la souris, dans les tests de l'escalier et de la chambre claire/obscur, lorsqu'E.hirta est administrée par voie I.P., aux faibles doses de 12,5 et 25 mg/kg.

Des **effets céntraux potentialisateurs et inducteurs du sommeil barbiturique** (pentobarbital et barbital) ont également été mis en évidence, dès les doses respectives de 400 et 50 mg/kg, sans qu'aucune activité hypnotique propre n'est pu être décelée.

De plus, l'extrait végétal s'est avéré inefficace dans la recherche de propriétés neuroleptiques chez le rat (recherche d'une activité cataleptique et d'une protection vis-à-vis des stéréotypies amphétaminiques) et chez la souris (recherche

d'une protection vis-à-vis de la toxicité de groupe induite par la dexamphétamine) ; bien au contraire, une légère potentialisation des stéréotypies amphetaminiques a pu être observée, aux doses de 100 et 400 mg/kg (respectivement +34 % et +19 %).

Si une légère protection vis-à-vis du ptosis réserpinique et de l'hypothermie cholinergique induits chez la souris a pu être décelée avec la dose de 400 mg/kg, ces résultats ne peuvent suffire pour permettre le rattachement d'E. hirta à la classe des anti-dépresseurs, de par la faible importance des effets obtenus en comparaison des anti-dépresseurs de référence utilisés, soit l'imipramine et l'amitriptyline, mais aussi en raison de l'absence d'efficacité vis-à-vis des autres paramètres pris en compte, soit l'akinésie et l'hypothermie réserpiniques, les tremblements, le larmolement et la salivation cholinergiques.

Enfin, nous avons pu constater l'existence d'une **activité hypothermique modérée et transitoire** induite par une forte dose sédatrice, soit 400 mg/kg, chez le rat et la souris, se traduisant par une chute respective de la température rectale de 1° C et 3° C.

Cet effet hypothermique modéré, mais également les actions potentialisatrices du sommeil barbiturique et des stéréotypies amphetaminiques, sont observés avec les tranquillisants benzodiazépiniques.

#### RECHERCHE D'UN PROFIL DE TYPE BENZODIAZEPINIQUE

Ainsi, à la suite de ce premier screening pharmacologique, le profil d'activité d'E. hirta pouvait présenter certains points communs avec celui des benzodiazépines.

C'est dans cette perspective qu'ont été recherchés des effets anti-convulsivants et myorelaxants, qui caractérisent généralement ces tranquillisants mineurs.

D'autre part, l'affinité de l'extrait végétal pour les sites récepteurs benzodiazépiniques a été évaluée à l'aide de techniques in vivo et in vitro, les premières faisant intervenir un

antagoniste spécifique de ces sites récepteurs, le RO 15-1788, les secondes permettant de quantifier le déplacement d'une benzodiazépine marquée fixée sur les sites récepteurs de synaptosomes de cerveau de rat, par des substances présentant une affinité pour ces derniers.

Concernant les effets anti-convulsivants, aucune protection n'a pu être obtenue vis-à-vis des convulsions induites par le pentétrizol.

Si un effet myorelaxant se manifeste aux doses sédatives de 200, 400 et 800 mg/kg, vis-à-vis de l'équilibration et de l'initiative motrice de la souris, se traduisant par le déséquilibre respectif de 50, 40 et 60 % des animaux, cet effet non dose-dépendant n'affecte pas leur force musculaire et pourrait trouver son explication dans l'action dépressive centrale développée par E. hirta.

De plus, in vivo, le RO 15-1788 ne s'oppose pas aux effets sédatifs de l'extrait végétal, mis en évidence dans les tests de l'open-field et d'exploration d'un milieu nouveau.

L'utilisation d'une technique in vitro, mise au point pour l'évaluation de l'affinité de molécules pures pour les sites récepteurs benzodiazépiniques, n'a pas permis de déceler une telle affinité dans le cas de l'extrait végétal.

En fait, cette méthode ne paraît pas du tout adaptée à l'étude de tels complexes moléculaires riches en substances inactives. Effectivement, plusieurs expérimentations ont montré que le Poa sp., inactif sur le système nerveux central, pouvait à fortes concentrations déplacer le flunitrazépam marqué des sites récepteurs et perturber la filtration du milieu d'incubation, phénomène également observé avec l'extrait aqueux d'E. hirta et qui pourrait être responsable d'un relargage du flunitrazépam marqué.

## RECHERCHE DE PROPRIETES ANTI-HISTAMINIQUES

L'activité anti-histaminique d'extraits hydro-alcooliques et alcooliques d'E. hirta, démontrée par certains auteurs, n'a pu être mise en évidence, avec l'extrait aqueux, sur le modèle de l'iléon isolé de cobaye.

Par conséquent, l'effet sédatif d'E. hirta ne peut être corrélé à une activité anti-histaminique.

## RECHERCHE DE PROPRIETES ANALGESIQUES, ANTI-PYRETIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES

La recherche de propriétés analgésiques, souvent associées à des effets sédatifs, mais également de propriétés anti-pyrétiques et anti-inflammatoires, s'est tout naturellement inscrit dans le plan expérimental initialement établi.

De cette étude, une **activité analgésique centrale**, dose-dépendante, a pu être mise en évidence, vis-à-vis de douleurs d'origine chimique (test à l'acide acétique) et thermique (test de la plaque chauffante), dès les doses respectives de 20 et 25 mg/kg.

La disparition de cet effet, suite à l'administration préventive d'un antagoniste spécifique des récepteurs aux opiacés, la naloxone, laisse entrevoir une action possible au niveau de ces sites.

L'activité analgésique obtenue avec la dose de 50 mg/kg d'extrait végétal (61 % de protection vis-à-vis de la douleur d'origine chimique et 45 % d'augmentation moyenne du seuil de sensibilité des animaux à la chaleur) est comparable à celle développée par l'acétylsalicylate de lysine et le paracétamol, deux antalgiques périphériques exerçant respectivement une protection de 59 % et 60 % vis-à-vis de la douleur d'origine chimique, ainsi qu'à l'action du sulfate de morphine, analgésique central efficace vis-à-vis des douleurs d'origine chimique (68 % de protection, obtenus avec la dose de 1,15 mg/kg) et thermique (augmentation du seuil de sensibilité de 46 %, avec la dose de 4,6 mg/kg).

L'activité anti-pyrétique de l'extrait aqueux d'E. hirta a pu être confirmée chez le rat, dans le test de l'hyperthermie à la levure, avec les doses de 100 et 400 mg/kg réduisant respectivement l'hyperthermie de 1°7 C et de 1°9 C.

Le profil d'activité ainsi obtenu a pu être rapproché de celui de l'acétylsalicylate de lysine, qui présente toutefois une efficacité supérieure à la forte dose testée, soit 200 mg/kg, l'hyperthermie étant réduite de 2°5 C.

L'extrait végétal s'est également révélé efficace vis-à-vis de processus inflammatoires aigus (test de l'oedème à la carragénine), les doses de 100 et 200 mg/kg exerçant une action inhibitrice maximale respective de 25,9 % et de 59,8 %, quoique transitoire en comparaison des effets obtenus avec l'indométacine, AINS de référence testé aux doses actives de 2,5 - 5 et 10 mg/kg.

A la différence de l'indométacine, si aucune activité n'a pu être obtenue, dans le cas de processus inflammatoires chroniques du type polyarthrite induite par l'adjuvant de Freund, une protection vis-à-vis des phénomènes douloureux associés à cette affection a pu être décelée avec la dose de 400 mg/kg, responsable de l'augmentation du seuil de sensibilité des rats de 52 %.

#### **RECHERCHE D'UNE TOLERANCE A L'EGARD DE CERTAINES DES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES D'E. HIRTA**

Suggérée par les résultats obtenus au cours de la recherche des propriétés analgésiques pour l'extrait aqueux d'E. hirta, l'existence d'un profil d'activité du type analgésique central morphinomimétique nous a amené à aborder le problème de la tolérance, phénomène caractéristique des dérivés morphiniques.

Recherchée à l'égard des effets sédatifs (test de l'activimètre), inducteurs du sommeil barbiturique (test au pentobarbital) et analgésiques (test de la plaque chauffante) de l'extrait végétal, une tolérance a pu être induite chez la souris, à la suite de quatre prétraitements par voie I.P.

espacés sur six jours, mais également après un traitement chronique journalier réalisé par voie I.P., durant six ou neuf jours.

Cependant, l'absence de tolérance croisée entre le sulfate de morphine et E. hirta, dans le test de la plaque chauffante, laisse présager de mécanismes d'action différents.

#### **ACTIVITE D'E. HIRTA ADMINISTREE PAR VOIE ORALE**

Toutes les expérimentations précédemment présentées ont été réalisées sur un extrait aqueux d'E. hirta, administré par voie I.P., voie d'injection très couramment utilisée lors de la recherche d'un profil pharmacologique.

Cependant, le devenir de l'activité après administration orale, voie d'utilisation traditionnelle, devient indispensable pour le développement industriel du produit.

L'inefficacité de l'extrait aqueux dissous dans l'eau distillée, à induire les effets sédatifs (tests de la boîte à Skinner et de l'escalier), inducteurs du sommeil barbiturique (test au pentobarbital) et analgésiques (test à l'acide acétique), précédemment obtenus après injection I.P., ainsi que l'obtention d'une légère activité sédatrice, chez le rat placé en boîte à Skinner, lorsque l'extrait végétal est dissous dans une émulsion "eau - labrafil", nous a amené à poser le problème de l'absorption digestive du ou des principes actifs.

Ces premiers essais expérimentaux ne peuvent que nous encourager dans la poursuite des investigations entreprises, notamment par l'emploi d'autres excipients, ou encore par l'administration intraduodénale ou rectale de l'extrait végétal.

\*\*\*

De cette étude pharmacologique, a pu être précisé le profil d'activité d'un extrait aqueux d'E. hirta.

Parmi les divers effets obtenus, les propriétés analgésiques centrales très marquées apparaissent comme essentielles et associées à des propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et sédatives.

Cette forte activité analgésique se manifeste à des doses nettement inférieures aux doses sédatives efficaces (dose analgésique minimale efficace : 20mg/kg ; dose minimale sédative efficace, dans les tests contraignants : 100 mg/kg), tandis que les effets anti-pyrétiques et anti-inflammatoires apparaissent dès la dose de 100 mg/kg.

Administrée à la dose de 50 mg/kg, E. hirta exerce une activité analgésique comparable à celles développées par l'acétylsalicylate de lysine (68 mg/kg), le paracétamol (68 mg/kg) et le sulfate de morphine (1,15 mg/kg), dans le cas de douleurs d'origine chimique, et à celle du sulfate de morphine testé à la dose de 4,6 mg/kg, dans le cas d'une douleur d'origine thermique.

Une telle activité de l'extrait et l'absence de toxicité aiguë devraient favoriser son développement industriel et aboutir à sa mise sur le marché, en renforçant son potentiel thérapeutique.

Toutefois, des études complémentaires sont indispensables, en particulier sur la voie orale, la tolérance, la toxicité chronique et la pharmacologie clinique.

Ce travail qui s'inscrit dans les perspectives de l'ethnopharmacologie a largement contribué à la confirmation de certaines indications thérapeutiques marginales d'E. hirta, telles que les activités anti-pyrétiques, anti-inflammatoires et sédatives et nous a permis de déceler une puissante activité analgésique d'origine centrale.

*TRAVAUX CITES*

- ADJANOHOUN E.J., A.M.R. AHYI, L. AKE ASSI, L. DAN DICKO, H. DAOUA, M. DELMAS, S. SOUZA (de), M. GARBA, S. GUINKO, A. KAYONGA, D. N'GOLO, J.L. RAYNAL et M. SAADOU, 1980, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger, ACCT, Paris, 80-83.
- ADJANOHOUN E.J., L. AKE ASSI, J.J. FLORET, S. GUINKO, M. KOUMARE, A.M.R. AHYI et J. RAYNAL, 1981, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, ACCT, Paris, 44-.
- ADJANOHOUN E.J., L. AKE ASSI, J. EYME, J.N. GASSITA, E. GOUDOTE, J. GUEHO, F.S.L. Ip, D. JACKARIA, S.K.K. KALACHAND, A. KEITA, B. KOUDOGBO, D. LANDREAU, A.W. OWADALLY et A. SOOPRAMANIEN, 1983, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (îles Maurice et Rodrigues), ACCT, Paris, 70-71.
- ADJANOHOUN E.J., A.M.R. AHYI, L. AKE ASSI, K. AKPAGANA, P. CHIBON, A. EL-HADJI, J. EYME, M. GARBA, J.N. GASSITA, M. GBEASSOR, E. GOUDOTE, S. GUINKO, K.K. HODOUTO, P. HOUNGNON, A. KEITA, Y. KEOULA, W.P. KLUGA-OCLOO, I. LO, K.M. SIAMEVI et K.K. TAFFAME, 1986, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo, ACCT, Paris, 157-.
- ADVENIER C., 1979, Antihistaminiques, in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2, 1833-1845, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion Scientifique Française, Paris.
- AFRIA B.S. et D. MUKHERJEE, 1981, Changes in keto acids, amino acids and protein levels in the leaves of a C3 and a C4 species of Euphorbia, J. Indian Bot. Soc., 60 (3-4), 261-265.
- AJAO A.O., F. EMELE et B. FEMI-ONADEKO, 1984, Antibacterial activity of Euphorbia hirta, Fitoterapia, LVI (3), 165-166.
- AKE ASSI L., J. ABEYE, S. GUINKO, R. GIGUET et Y. BANGAVOU, 1981, Contribution à l'identification et au recensement des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle et la pharmacopée en République Centrafricaine, ACCT, Paris, 42-43.
- ALMARIC M. et G.F. KOOB, 1985, Low doses of methylnaloxonium in the nucleus accumbens antagonize hyperactivity induced by heroin in the rat, Pharmacol. Biochem. Behav., 23, 411-415.

- ALMARIC M., 1987,  
Les opiacés : rôle dans les processus de renforcement,  
Annales de la Fondation Fyssen, (3), 51-58.
- ALMARIC M., E.J. CLINE, J.L. MARTINEZ, F.E. BLOOM et G.F. KOOB, 1987,  
Rewarding properties of  $\beta$ -endorphin as measured by conditioned place preference,  
Psychopharmacology, 91, 14-19.
- ANONYME, 1986,  
Médecine traditionnelle et pharmacopée. Euphorbia hirta,  
ACCT, Paris, 0 (0), 33 p.
- ANTON R., 1974,  
Etude chimiotaxonomique sur le genre Euphorbia,  
Thèse de doctorat d'état ES Sciences, Université Louis Pasteur  
Strasbourg, 184 p.
- ARTHUR H.R., 1954,  
A phytochemical survey of some plants of north Borneo,  
J. Pharm. Pharmacol, Londres, 6, 66-72.
- ASKEW B.M., 1963,  
Life Sci., 10, 725-.
- ATALLAH A.M. et H.J. NICHOLAS, 1972,  
Triterpenoids and steroids of Euphorbia pilulifera,  
Phytochemistry, 11, 1860-.
- AYENSU E.S., 1978,  
Medicinal plants of west Africa,  
Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan, 125-127.
- BABBINI M., N. MONTANARO, P. STROCCHI et M. GAIARDI, 1971,  
Enhancement of amphetamine induced stereotyped behavior by benzodiazepines,  
Europ. J. Pharmacol., 13, 330-340.
- BALLY P.R.O., 1937,  
Native medicinal and poisonous plants of east Africa,  
Kew. Bull., 14-.
- BALLY P.R.O., 1938,  
Repertorium specierum novarum regni vegetabilis. Heil = und giftpflanzen der eingeborenen von Tanganyika,  
Dahlem, Berlin, 34-.
- BARKER L.A., 1981,  
Histamine H1 and muscarinic receptor antagonist activity of cimetidine and tiotidine in the guinea pig isolated ileum,  
Agents Actions, II, 699-705.
- BARKER L.A. et J. EBERSOLEB, 1982,  
Histamine H2 receptors on guinea pig ileum myenteric plexus neurons mediate the release of contractile agents,  
J. Pharmacol., 221, 69-75.

- BARKER L.A. et L.B. HOUGH, 1983,  
Selectivity of 4-methylhistamine at H1 and H2 receptors in the  
guinea pig isolated ileum,  
Br. J. Pharmacol., 80, 65-71.
- BARKER L.A., 1985,  
Regional variation in the sensitivity of longitudinal smooth  
muscle to histamine at H1 receptors in guinea pig ileum and  
colon,  
Br. J. Pharmacol., 85, 377-381.
- BARNES C.D. et L.G. ELTHERINGTON, 1973,  
Drug dosage in laboratory animals. A handbook,  
University of California Press, Berkeley, 341 p.
- BARRET J.E., L.S. BRADY, J.M. WITKIN, J.M. COOK et P.  
LARSCHIED, 1985,  
Interactions between the benzodiazepine receptor antagonist RO  
15-1788 (flumazepil) and the inverse agonist  $\beta$ -CCE :  
behavioral studies with squirrel monkeys,  
Life Sci., 36, 1407-1414.
- BASIT N., M.A. SIDDIQUIZ et Z. AHMED, 1977,  
In vitro effect of extracts of Euphorbia hirta Linn. on  
Entamoeba histolytica,  
Rivista di Parassitologia, 38 (2-3), 259-262.
- BASLAS R.K. et R. AGARWAL, 1980,  
Chemical investigation of some anticancer plants of Euphorbia  
genus,  
Indian J. Chem., 19B, 717-718.
- BASLAS R.K. et R. AGARWAL, 1980,  
Isolation and characterization of different constituents of  
Euphorbia hirta Linn.,  
Current Sci., 49 (8), 311-312.
- BEAUMONT K., A.K. CHEUNG, M.L. GELLER et D.D. FANESTIL, 1983,  
Inhibitors of peripheral-type benzodiazepine receptors present  
in human urine and plasma ultrafiltrates,  
Life Sci., 33, 1375-1384.
- BELZUNG C., R. MISSLIN, E. VOGEL, R.H. DODD et G. CHAPOUTHIER,  
1987,  
Anxiogenic effects of methyl  $\beta$  carboline-3-carboxylate in the  
light/dark choice situation,  
Pharmacol. Biochem. Behav., 28, 29-33.
- BENIGNI R., C. CAPRA et D.E. CATTORINI, 1962,  
Piante medicinali chimica farmacologia e terapia. Euforbia  
pilulifera,  
Inverni et Della Beffa, 1, 565-567.
- BENOIST J.M. et J.L. MISSET, 1979,  
Antalgiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1049-1091, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.

- BERHAUT J., 1975,  
Flore illustrée du Sénégal,  
Clairafrique, Dakar, III, 455-.
- BERNABE J., 1986,  
Etude in vitro des récepteurs aux benzodiazepines,  
D.E.A. de toxicologie, Centre des Sciences de l'Environnement  
de Metz, 113 p.
- BERTRAND I., 1988,  
Etude pharmacologique d'une rutacée de la pharmacopée  
traditionnelle africaine, Xanthoxylum xanthoxyloides Waterm.,  
Thèse de doctorat de l'Université de Metz, mention  
pharmacognosie, Centre des Sciences de l'Environnement, 344 p.
- BESSON J.M. et D. LE BARS, 1980,  
Neurophysiologie de la douleur et niveau d'intervention  
possible des endomorphines,  
in : Quovadis, 161-173, MUYARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds.),  
Clin Midy, Montpellier.
- BHARGAVA H.N., 1988,  
Intragastric administration of cyclo(leu-gly) inhibits the  
development of tolerance to the analgesic effect of morphine  
in the rat,  
Life Sci., 43, 187-192.
- BIDET D. et J.C. GAIGNAULT, 1984,  
Récepteurs biologiques et recherche de molécules actives :  
exemple des récepteurs aux benzodiazépines,  
l'Actualité Chimique, octobre, 17-30.
- BLANC P., P. BERTRAND, G. SAQUI-SANNES (de) et R. LESCURE,  
1963,  
Sur les propriétés galactogènes de plantes de la flore  
africaine : Sersalisia djalonensis et Euphorbia hirta,  
Ann. Biol. Clin., 21 (10-12), 829-840.
- BLANC P., P. BERTRAND et G. SAQUI-SANNES (de), 1968,  
Sur la présence de composés fluorescents dans Euphorbia hirta  
(Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 15, 53-57.
- BLANC P., P. BERTRAND et G. SAQUI-SANNES (de), 1971,  
Méthode d'extraction des dérivés flavoniques (flavonols et  
hétérosides de flavonols). Application à Euphorbia hirta L.  
(Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 131-132.
- BLANC P., P. BERTRAND et G. SAQUI-SANNES (de), 1971,  
Méthode d'extraction d'acides phénols d'Euphorbia hirta L.  
(Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 133-.
- BLANC P., P. BERTRAND et G. SAQUI-SANNES (de), 1971,  
Méthode d'extraction du leucocyanidol dans une Euphorbiacée  
exotique : Euphorbia hirta L.,  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 135-136.

- BLANC P., P. BERTRAND, G. SAQUI-SANNES et M. ANE, 1971,  
Identification par chromatographie et étude spectrale de  
quelques acides phénols : acide ellagique, acide gallique,  
acide chlorogénique, acide caféique dans une Euphorbiacée  
exotique : Euphorbia hirta L. (Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 137-142.
- BLANC P., P. BERTRAND, G. SAQUI-SANNES (de) et M. ANE, 1971,  
Présence de 3,5,7,3',4' hydroxyflavone (quercétol) et de  
3,5,7,4' hydroxyflavone (kaempférol) dans Euphorbia hirta L.  
(Euphorbiacées). Etude de leur spectre ultra violet,  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 143-144.
- BLANC P., P. BERTRAND, G. SAQUI-SANNES (de) et M. ANE, 1971,  
Les hétérosides flavoniques d'Euphorbia hirta L.  
(Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 163-165.
- BLANC P., P. BERTRAND, G. SAQUI-SANNES (de) et M. ANE, 1971,  
Séparation et identification des acides aminés d'Euphorbia  
hirta L. (Euphorbiacées),  
Toulouse Pharm., 19 (1-2), 167-169.
- BLOTMAN F., P. POUBELLE, J. CHAINTREUIL et M. DAMON, 1983,  
Icosanoïdes, inflammation articulaire et polyarthrite  
rhumatoïde,  
in : Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et  
ses dérivés, 134-173, BLOTMAN F., A. CRASTES DE PAULET et L.  
SIMON (Eds.), Masson, Paris.
- BOISSIER J.R., C. DUMONT et C. MALEN, 1956,  
Action analgésique expérimentale du morpholyl-N-tertio-  
octylacétamide (TR 315),  
Anesthésie et Analgésie, 13, 569-574.
- BOISSIER J.R. et P. SIMON , 1966.  
Etude pharmacologique prévisionnelle d'une substance  
psychotrope ,  
Thérapie, XXI, 799-818.
- BOISSIER J.R., C. DUMONT et R. RATOUIS, 1971,  
Etude pharmacologique d'un nouvel antidépresseur  
tricyclique,  
Thérapie, XXVI, 459-479.
- BOISSIER J.R., P. SIMON, M. ZACZINSKA et J. FICHELE,  
1972,  
Etude psychopharmacologique expérimentale d'une nouvelle  
substance psychotrope, la 2-éthylamino 6-chloro 4-méthyl 4-  
phényl 3-1 benzoxazine,  
Thérapie, XXVII, 325-338.
- BOISSIER J.R. et C. ADVENIER, 1978,  
Médicaments anticholinergiques,  
in : Thérapeutique médicale, 287-290, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

- BOITEAU P., 1986,  
Médecine traditionnelle et pharmacopée. Précis de matière  
médicale malgache,  
ACCT, Paris, 141 p.
- BONETTI E.P., L. PIERI, R. CUMIN, R. SCHAFFNER, M. PIERI, M.R.  
GIAMZU, R.K.M. MULLER et W. HAEFELY, 1982,  
Benzodiazepine antagonist RO 15-1788 : neurological and  
behavioral effects,  
Psychopharmacology, 78, 8-18.
- BONTA I.L., 1983,  
Icosanoïdes, macrophages et inflammation,  
in : Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et  
ses dérivés, 93-97, BLOTMAN F., A. CRASTES DE PAULET et L.  
SIMON (Eds.), Masson, Paris.
- BOSCHMANS S.A., M.F. PERKIN et S.E. TERBLANCHE, 1987,  
Antidepressant drugs : imipramine, mianserin and trazodone,  
Comp. Bioch. Physiol., 86c (2), 225-232.
- BOUQUET A., 1969,  
Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo  
(Brazzaville),  
Mémoires ORSTOM (36), 114-115.
- BOUQUET A. et M. DEBRAY, 1974,  
Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire,  
Mémoires ORSTOM (32), 84-.
- BOURIN M., M. PONCELET, R. CHERMAT et P. SIMON, 1983,  
The value of the reserpine test in psychopharmacology,  
Arzneim.-Forsch./Drug Res., 33 (II), 8, 1173-1176.
- BOYER P. et D. MOUSSAOUI, 1980,  
Aspects biochimiques des syndromes dépressifs et mode d'action  
des médicaments antidépresseurs,  
in : Neurobiochimie clinique, 76-79, ZARIFIAN E. (Ed.),  
l'Actualité en Neurobiologie (1), Sandoz, Rueil Malmaison.
- BRAESTRUP C. et F. SQUIRES, 1977,  
Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized  
by high affinity 3H diazepam binding,  
Pro. Natl. Acad. Sci., USA, 74 (9), 3805-3809.
- BROUILHET H. et J.P. GIROUD, 1978,  
Anti-inflammatoires non stéroïdiens,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 1,  
957-994, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion  
Scientifique Française, Paris.
- BRUNAUD M. et E. VALLEE, 1978,  
Etude pharmacodynamique des benzodiazépines. Action sur les  
neuro-transmetteurs,  
Psychologie Médicale, 10, 79-86.
- BUSHNELL O.A., M. FUKUDA et T. MAKINODAN, 1950,  
The antibacterial properties of some plants found in Hawaii,  
Pacif. Sci., 4, 172-.

- BUSSEL B. et C. BERGEGO, 1979,  
Myorelaxants,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1579-1589, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.
- CABRE H., 1939,  
Flore de la Guadeloupe et dépendances. Notes de phytothérapie  
allopathique et homéopathique comparées,  
Imprimerie Catholique Basse-Terre, Guadeloupe, III, 17-18.
- CAIUS J.F., 1938,  
The medicinal and poisonous spurge of India,  
J. Bombay Nat. Hist. Soc., 40 (2), 284-286.
- CARVALHO L.P.(de), P. VENAULT, M.C. POTIER, R.H. DODD, C.L.  
BROWN, G. CHAPOUTHIER et J. ROSSIER, 1986,  
3-(Methoxycarbonyl)-amino- $\beta$ -carboline, a selective antagonist  
of the sedative effects of benzodiazepines,  
Europ. J. Pharmacol., 129, 323-332.
- CHAMBON J.P., J.C. MOLIMARD, R. CALASSI, J. MARUANI, D.  
RODIER, G. SIGAULT, R. LEYRIS, R. RONCUCCI et K. BIZIERE,  
1984,  
Anticonvulsivant activity of CM 40142, a new gaba derivative  
in mice and photo-epileptic baboons,  
Arzneim.-Forsch., 34, 1017-1021.
- CHANG-FU H., 1977,  
Flora of Taiwan,  
Epoch Publishing Co., LTD, III, 462-.
- CHAPOUTIER G., 1987,  
Des molécules pour la mémoire,  
La Recherche, (192), 1258-1260.
- CHAUVEL P., 1980,  
Aspects neurobiologiques des épilepsies et mode d'action des  
anti-épileptiques,  
in : Neurobiochimie clinique, 98-105, ZARIFIAN, E. (Ed.),  
l'Actualité en Neurobiologie (1), Sandoz, Rueil Malmaison.
- CHIU T.H. et H.C. ROSENBERG, 1983,  
Multiple conformational states of benzodiazepine receptors,  
Trends in Pharmacol. Sci., 4 (8), 348-350.
- CHOPRA R.N., S.L. NAYAR et I.C. CHOPRA, 1956,  
Glossary of indian medicinal plants,  
Council of Sci. and Indus Res., New-Delhi, 113-114.
- CLARKE J.H., 1962,  
A dictionary of practical materia medica,  
Health Sci. Press, Rustington, 1, 48-.
- COCCARO E.F. et L.J. SIEVER, 1985,  
Second generation antidepressants : a comparative review,  
J. Clin. Pharmacol., 25, 241-260.

- CODERRE T.J. et P.D. WALL, 1987,  
Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats : an alternative  
animal model of arthritis to that produced by Freud's  
adjuvant,  
Pain, 28, 379-393.
- COSTA E., A. GROPPETTI et M.K. NAIMZADA, 1972,  
Effects of amphetamine on the turnover rate of brain  
catecholamine and motor activity,  
Br. J. Pharmacol., 44, 742-752.
- COSTA E., A. GUIDOTTI, C.C. MAO et A. SURIA, 1975,  
New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines,  
Life Sci., 17, 167-186.
- COSTA E. et A. GUIDOTTI, 1976,  
A gaba hypothesis for the action of benzodiazepine,  
in : Gaba in nervous system function, 413-426, ROBERTS E.,  
T.N. CHASE et D.B. TOWER, (Eds.), Raven Press, New York.
- COSTA E. et A. GUIDOTTI, 1979,  
Molecular mechanisms in the receptor action of  
benzodiazepines,  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 19, 531-545.
- COURVOISIER, 1956,  
J. Clin. Exp. Psychopath., 17, 25-37.
- CRAWLEY J.N. et U.K. GOODWIN, 1980,  
Preliminary report of a simple animal behavior model for the  
anxiolytic effects of benzodiazepines,  
Pharmacol. Biochem. Behav., 13, 167-170.
- CUCHE H. et J.M. ROUX, 1980,  
Aspects biochimiques de la douleur,  
in : Neurobiochimie clinique, 93-97, ZARIFIAN E. (Ed.),  
l'Actualité en Neurobiologie (1), Sandoz, Rueil Malmaison.
- CUFODONTIS G., 1958,  
Enumeratio plantarum aethiopiae spermatophyta,  
Bull. J. Bot. Nat. Belgique, 28, 449-.
- DALIL M., 1984,  
Essai thérapeutique d'un décocté lyophilisé d'Euphorbia hirta  
L. (mbal) dans le traitement ambulatoire de l'amibiase  
intestinale,  
Thèse d'état de docteur en pharmacie, Université de Dakar,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, 70 p.
- DANNEBERG P., R. BAUER, K. BOKE-KUHN, W. HOEFKE, F.J. KUHN, E.  
LEHR et A. WALLAND, 1986,  
General pharmacology of brotizolam in animals,  
Arzneim.-Forsch./Drug Res., 36 (1), 540-586.
- DEBAILLE G. et P. PETARD, 1953,  
Notes préliminaires sur les plantes antidysentériques du  
Soudan et de la Haute-Volta,  
Bull. Med. AOF, 10, 11-14.

DECAUX F., 1944,  
Formulaire de phytothérapie,  
Legrand et Bertrand, 175 p.

DE DEYN P.P. et R.L. MAC DONALD, 1987,  
CGS 9896 and ZK 91296 but not CGS 8216 and RO 15-1788, are pure  
benzodiazepine receptor antagonists on mouse neurons in  
culture,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 242 (1), 48-55.

DEHEN H., 1979,  
Récepteurs morphiniques et peptides endogènes "morphine-like",  
Les traitements antalgiques, 29 (19), 1549-1555.

DELAY J., P. DENIKER et J.M. HARL, 1952,  
Utilisation en thérapeutique psychiatrique d'une phénothiazine  
d'action centrale élective,  
Ann. Méd. Psychol., 110, 112-.

DENIKER P. et M.F. POIRIER, 1978,  
Médicaments psychotropes. I Généralités et neuroleptiques,  
in : Thérapeutique médicale, 234-244, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

DENIKER P. et M.F. POIRIER, 1978,  
Médicaments psychotropes. II Sels de lithium et  
antidépresseurs,  
in : Thérapeutique médicale, 244-250, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

DENIKER P. et M.F. POIRIER, 1978,  
Médicaments psychotropes. III Tranquillisants,  
in : Thérapeutique médicale, 250-254, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

DHAR M.L., M.M. DHAR, B.N. DHAWAN, B.N. MEHROTRA et C. RAY,  
1968,  
Screening of indian plants for biological activity : Part I,  
Indian J. Exp. Biol., 6, 232-247.

DINGEMANSE J. et D.D. BREIMER, 1984,  
Benzodiazepine receptors,  
Pharmacy int., 5, 33-36.

DUKA T., M. ACKENHEIL, J. NODERER, A. DOENICKE et R. DOROW,  
1986,  
Changes in noradrenaline plasma levels and behavioural  
responses induced by benzodiazepine agonists with the  
benzodiazepine antagonist RO 15-1788,  
Psychopharmacology, 90, 351-357.

DUNHAM N.W. et T.S. MIYA, 1956,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 46, 208-209.

EVANS F.J. et S.E. TAYLOR, 1983,  
Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes,  
Fortschritte d. Chem. Org. Naturst., 44, 99 p.

- FAMAHEY J.P., 1983,  
Anti-inflammatoires non stéroïdiens et métabolisme de l'acide arachidonique,  
in : Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et ses dérivés, 174-188, BLOTMAN F., A. CRASTES DE PAULET et L. SIMON (Eds.), Masson, Paris.
- FASMER O.B., O.G. BERGE et K. HOLE, 1987,  
Development of tolerance to the antinociceptive effect of metergoline,  
Psychopharmacology, 93, 16-18.
- FENG P.C., L.J. HAYNES, K.E. MAGNUS, J.R. PLIMMER et H.S.A. SHERRATT, 1962,  
Pharmacological screening of some west indian medicinal plants,  
J. Pharm. Pharmacol., 14, 556-561.
- FERARD J.F., 1986,  
Aspect de la toxicologie et de la biosorption du cadmium chez l'algue Chlorella vulgaris,  
Thèse d'état ES Sciences, Université de Metz, Centre des Sciences de l'Environnement, 222 p.
- FIDECKA S., 1987,  
Interactions of ketamine, naloxone and morphine in the rat,  
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 39, 33-40.
- FILE S.E., R.G. LISTER et D.J. NUTT, 1982,  
The anxiogenic action of benzodiazepines antagonist,  
Neuropharmacology, 21, 1033-1037.
- FILE S.E. et S. PELLOW, 1985,  
The anxiogenic action of RO 5-4864 in the social interaction test : effect of chlordiazepoxide, RO 15-1788 and CGS 8216,  
Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 328, 225-228.
- FILE S.E., D.J. GREENBLATT, I.L. MARTIN et C. BROWN, 1985,  
Long-lasting anticonvulsivant effects of diazepam in different mouse strains. Correlations with brain concentrations and receptor occupancy,  
Psychopharmacology, 86, 137-141.
- FILE S.E. et S. PELLOW, 1986,  
Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist : RO 15-1788,  
Psychopharmacology, 88, 1-11.
- FILE S.E., J. DINGEMANSE, H.L. FRIEDMAN et D.J. GREENBLATT, 1986,  
Chronic treatment with RO 15-1788 distinguishes between its benzodiazepine antagonist, agonist and inverse agonist properties,  
Psychopharmacology, 89, 113-117.
- FILE S.E. et S. PELLOW, 1987,  
Behavioral pharmacology of minor tranquilizers,  
Pharmac. Ther., 35, 265-290.

- FLEURENTIN J., 1983,  
Répertoire des pharmacopées traditionnelles du Yémen et étude pharmacologique de deux espèces à propriétés hépatorénales : Crepis rueppellii et Anisotes trisulcus,  
Thèse de doctorat d'état ES Sciences pharmaceutiques, Nancy 1.
- FLEURENTIN J., C. HOEFLER, A. LEXA, F. MORTIER et J.M. PELT, 1986,  
Hepatoprotective properties of Crepis rueppellii and Anisotes trisulcus : two traditional medicinal plants of Yémen,  
J. Ethnopharmacol., 16, 105-111.
- FRIZE E.D., 1954,  
N. Engl. J. Med., 251, 1006-.
- GAVEND M., 1978,  
Tolérance et dépendance,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 1,  
181-196, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion Scientifique Française, Paris.
- GERARDY J., 1982,  
Psychopharmacologie du gaba,  
J. Pharm. Belg., 37, 435-441.
- GIROUD J.P. et H. BROUILHET, 1978,  
Glucocorticoïdes dans la polyarthrite rhumatoïde,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 1,  
995-1001, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.
- GLASSON B. et A. BENAKIS, 1978,  
Médicaments antiépileptiques  
in : Thérapeutique médicale, 254-262, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- GMEREK D.E., L.A. DYKSTRA et J.H. WOODS, 1987,  
Kappa opioids in rhesus monkey. III Dependence associated with chronic administration,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 242 (2), 428-436.
- GOURET C. et J. THOMAS, 1973,  
Test du ptosis à la réserpine chez la souris,  
Fiche technique n° 30,  
J. Pharmacol., 4 (3), 401-404.
- GOURET C., R. SERCOMBE, J.A. COSTON, P. BOUVET et G. RAYNAUD, 1973,  
Profil psychopharmacologique d'un antidépresseur potentiel appartenant à la série de l'hydroxyméthyl 5 oxazolidinone 2 ,  
Thérapie, 28, 1197-1215.
- GRAY E.G. et V.P. WHITTAKER, 1960,  
The isolation of synaptic vesicles from the central nervous system,  
Physiological Society, 9, 35-37.

- GRAY E.G. et V.P. WHITTAKER, 1962,  
The isolation of nerve endings from brain : an electron-  
microscopic study of cell fragments derived by homogenization  
and centrifugation,  
J. Anat., 96, 79-88.
- GREENWAY P.J., 1941,  
East african plants of proved or potential value as drug  
producers,  
E. Afr. Agric. J., 6, 130-.
- GUERIN J., B. BIOULAC, P. HENRY et P. LOISEAU, 1979,  
Système nerveux végétatif,  
Sandoz, 74-76.
- GUILLAUMIN M.A., 1951,  
Plantes de la Nouvelle-Calédonie. Données complémentaires sur  
les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie,  
Ann. Pharm., 9, 678-.
- GUILLEMIN R., 1980,  
Biosynthèse des enképhalines et des endorphines,  
in : Quovadis, 107-116, MUYARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds.),  
Clin Midy, Montpellier.
- GUNNE L.M., 1960,  
The temperature response in rats during acute and chronic  
morphine administration. A study of morphine tolerance,  
Arch. Int. Pharmacodyn., CXXIX (3-4), 416-428.
- GUPTA D.R. et S.K. GARG, 1965,  
Free organic acids of Euphorbia species,  
Indian J. Appl. Chem., 28 (3), 113-114.
- GUPTA D.R. et S.K. GARG, 1966,  
A chemical examination of Euphorbia hirta Linn.,  
Bull. Chem. Soc., 39 (11), 2532-2534.
- GYIRES K., S. FURST, I. MIKLYA, I. BUDAVARI et J. KNOLL, 1985,  
Analysis of the analgesic and anti-inflammatory effects of  
rimazolium, a pyrido-pyrimidine derivative, compared with that  
of prostaglandin synthesis inhibitors and morphine,  
Drugs Exptl. Clin. Res., 11 (8), 493-500.
- HAEFELY W. et H. MOHLER, 1980,  
Le mécanisme d'action des benzodiazépines. La découverte du  
récepteur spécifique et du rôle de celui-ci dans l'inhibition  
gabaergique au niveau du système nerveux central,  
Rapport de la recherche Roche, Bâle, 20 p.
- HAEFELY W., 1983,  
Antagonists of benzodiazepines,  
L'encephale, IX, 143B-150B.
- HAEFELY W., 1983,  
The biological basis of benzodiazepine actions,  
J. Psychoactive Drugs, 15 (1-2), 19-38.

- HAEFELY W., 1985,  
Pharmacology of benzodiazepines antagonists,  
Pharmacopsychiatry, 18, 163-166.
- HALL C.S., 1934,  
Emotional behavior in the rat. I Defecation and urination as  
measure of individual differences in emotionality,  
J. comp. psychol., 18, 385-403.
- HALLETT F.P. et L.M. PARKS, 1951,  
A note on the isolation of l-inositol from *Euphorbia*  
*pilulifera* L.,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 40, 474-.
- HALLETT F.P. et L.M. PARKS, 1951,  
A note on the isolation of quercitrin from *Euphorbia*  
*pilulifera* L.,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 40, 56-57.
- HALLETT F.P. et L.M. PARKS, 1953,  
Observations on the antispasmodic principle of *Euphorbia*  
*pilulifera* L.,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 42 (10), 607-609.
- HALLIWELL G., R.M. QUINTON et F.E. WILLIAMS, 1964,  
A comparison of imipramine, chlorpromazine and related drugs  
in various tests involving autonomic function and antagonism  
of reserpine,  
Brit. J. Pharmacol., 23, 330-350.
- HANDLEY D.A., R.G. VAN VALEN, C.M. WINSLOW, J.C. TOMESCH et  
R.N. SAUNDERS, 1987,  
In vitro and in vivo pharmacological profiles of the PAF  
receptor antagonist SRI 63-675,  
Thrombosis and Haemostasis, 57 (2), 187-190.
- HARLEY G.W., 1970,  
Native african medicine. With special reference to its  
practice in the Mano tribe of Liberia,  
Frank Cass and Co. LTD, Londres, 294 p.
- HARTWELL J.L., 1969,  
Plants used against cancer. A survey,  
Lloydia, 32 (2), 162-, 165-.
- HARVEY S.C., 1975,  
Hypnotics and sedatives,  
in : Pharmacological basis of therapeutics, 17, 345-374,  
GOODMANN A.G. et L.S. GILMAN (Eds.), Mac Millan, New York.
- HAXAIRE C., 1979,  
Phytothérapie et médecine familiale chez les Gbaya-Kara  
(République Centrafricaine),  
Thèse de docteur de 3ème cycle en écologie générale et  
appliquée (option écologie terrestre), Université des Sciences  
et Techniques du Languedoc, Montpellier, 256 p.

- HAZLETON L.W. et R.C. HELLERMAN, 1948,  
Studies on the pharmacology of Euphorbia pilulifera,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 37, 491-497.
- HEAL R.E., E.F. ROGERS, R.T. WALLACE et O. STARNES, 1950,  
A survey of plants for insecticidal activity,  
Lloydia, 13 (2), 89-151.
- HELLERMAN R.C. et L.W. HAZLETON, 1950,  
The antispasmodic action of Euphorbia pilulifera,  
J. Amer. Pharm. Assoc., 39, 142-146.
- HIERONYMUS J., 1882,  
Plantae diaphoricae florae argentinae,  
Bol. Acad. Nac. Ciencias, 444-.
- HO I.K., I. YAMAMOTO et H.H. LOH, 1975,  
A model for the rapid development of dispositional and  
functional tolerance to barbiturates,  
Europ. J. Pharmacol., 30, 164-171.
- HO I.K. et R.A. HARRIS, 1981,  
Mechanism of action of barbiturates,  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21, 85-111.
- HOEFLER C., J. FLEURENTIN, F. MORTIER, J.M. PELT et J.  
GUILLEMAIN, 1987,  
Comparative choleric and hepatoprotective properties of  
young sprouts and total plant extracts of Rosmarinus  
officinalis in rats,  
J. Ethnopharmacol., 19, 133-143.
- HOLLT V., 1986,  
Opioid peptide processing and receptor selectivity,  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26, 59-77.
- HOLMES E.M., 1923,  
Euphorbia pilulifera,  
Pharm. J. Pharmacist., 110, 162-163.
- HOULIHAN W.J. et R.N. SAUNDERS, 1986,  
Platelet activating factor (PAF) : a biologically active ether  
phospholipid,  
Triangle, 25 (2-3), 97-103.
- HUGHES R.N., 1965,  
Food deprivation and locomotor exploration in the white rat,  
Ani. Behav., 13, 30-32.
- HUGHES J., 1978,  
Les morphines du cerveau,  
La Recherche, 9 (93), 866-875.
- HUNKELER W., H. MOHLER, L. PIERI, P. POLC, E.P. BONETTI, R.  
CUMIN, R. SCHAFFNER et W. HAEFELY, 1981,  
Selective antagonist of benzodiazepines,  
Nature, 290, 514-516.

- HUTCHINSON J. et J.M. DALZIEL, 1936,  
An appendix to the flora of west tropical Africa,  
in : The useful plants of west tropical Africa, 143-, DALZIEL  
J.M. (Ed.), Crown Agents for Oversea Governments and  
Administrations, Londres.
- HUTCHINSON J. et J.M. DALZIEL, 1958,  
Flora of west tropical Africa,  
Crown Agents for Oversea Governments and Administrations,  
Londres, 2ème éd., 1 (2), 417-.
- IRVINE F.R., 1930,  
Plants of the Gold Coast,  
Oxford Univ. Press, Londres, 191-.
- ITO Y., S. YANASE, J. FUJITA, T. HARAYAMA, M. TAKASHIMA et H.  
IMANAKA, 1981,  
A short-term in vitro assay for promoter substances using  
human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr  
virus,  
Cancer Letters, 13, 29-37.
- JENSEN K., 1959,  
Acta Psychiat. Scand., 34, 195-.
- JOHNSTON G.A.R. et M. WILLOW, 1982,  
Gaba and barbiturate receptors,  
in : More about receptors, 111-114, LAMBLE J.W. (Ed.),  
Elsevier Biomedical Press, New York.
- JULIANO J.B., 1923,  
Additional cyanophoric plants of the makiling region,  
Phil. Agric., 11, 231-232.
- KAISER C. et W.J. RZESZOTARSKI, 1987,  
Neurotransmissions. Cholinergic agents,  
Research Biochemicals Incorporated, Natick, Massachusetts,  
III, (2).
- KAMEYAMA T., F. AMANUMA, S. OKUYAMA, S. HIGUCHI et H. AIHARA,  
1985,  
Pharmacological studies of furo [3,2-b] indole derivatives. I  
Analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory effects of FI-  
302, N-(3-piperidinopropyl)-4-methyl-6-trifluoromethyl-furo  
[3,2-b] indole 2 carboxamide, in experimental animals,  
J. Pharmacobio-Dyn., 8, 477-486.
- KARIMOU S., 1984,  
Contribution à l'étude de l'influence d'extraits hydrosolubles  
d'Euphorbia hirta L. et d'Holarrhena floribunda G. Don (Dür et  
Schinz) sur la multiplication de Trichomonas vaginalis en  
culture in vitro,  
Thèse d'état de docteur en pharmacie, Université de Dakar,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, 82 p.
- KARRER W., 1958,  
Konstitution und vorkommen der organischen pflanzenstoffe  
(exclusive alkaloides),  
Birkauser Verlag, 8ème éd., Basel, 1, 1207 p.

- KEITH H.G., 1952,  
North Borneo forest records. A preliminary list of north  
Borneo plant names,  
Ye Olde Printerie LTD, Hong-Kong, 2ème éd..
- KERHARO J., 1969,  
Note sur deux drogues africaines aux propriétés amoebicides  
confirmées : Holarrhens floribunda et Euphorbia hirta,  
Bull. Soc. Méd. Afr. Noire, 14 (1), 237-242.
- KERHARO J., 1971,  
Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales  
et toxiques de la pharmacopée sénégalaise traditionnelle,  
Thèse d'état de docteur en pharmacie, Université de Dakar,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, 168-169.
- KERHARO J. et J.G. ADAM, 1974,  
La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales  
et toxiques,  
Vigot Frères, Paris, 2ème partie, 411-414.
- KHOSLA S.N., 1979,  
Chemical weeding with gramoxone and 2,4-D in Cymbopogon  
pendulus Wats. Nees ex Steud (Jammu Lemongrass or RRL-16),  
Indian Perfumer, 23 (2), 125-127.
- KINGHORN A.D. et F.J. EVANS, 1975,  
A biological screen of selected species of the genus Euphorbia  
for skin irritant effects,  
Planta Medica, 28 (4), 325-335.
- KOE B.K., 1979,  
Biochemical effects of antianxiety drugs on brain monoamines,  
in : Anxiolytics, 173-195, FIELDING S. et H. LAL (Eds.),  
Pergamon Press, New-York.
- KOKWARO J.O., 1976,  
Medicinal plants of east Africa,  
E. Afr. Lit. Bur., Kampala, 92-.
- KOSTOWSKI W., E. MALATYNSKA , A. PLAZNIK , W. DYR et W.  
DANYSZ, 1986,  
Comparative studies on antidepressant action of alprazolam in  
different animal models,  
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 38, 471-481.
- KWOMEGNE-MOYO F., 1986,  
Plantes usuelles de la pharmacopée Bamiliké (Cameroun),  
Thèse d'état de docteur en pharmacie, Faculté de Médecine et  
de Pharmacie, Limoges, 120-121.
- LANHERS M.C., I. BERTRAND, J. FLEURENTIN, P.R. LEHR et J.M.  
PELT, 1986,  
Influence of Anisotes trisulcus and Crepis rueppellii extracts  
on sites of bile formation in the rat,  
Arzneim.-Forsch./Drug Res., 5(1), 826-829.

LANHERS M.C., J. FLEURENTIN, F. MORTIER, J.L. POUSSET et J.M. PELT, 1987,  
Mini-review : composition chimique de Euphorbia hirta L.,  
Al Biruniya, 3 (2), 121-136.

LAPIERRE Y.D., 1979,  
Nooanaleptiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1709-1719, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.

LAPIN I.P., 1962,  
Qualitative and quantitative relations between the effects of  
imipramine and chlorpromazine on amphetamine group toxicity,  
Psychopharmacologia, 3, 413-422.

LAROUSSE C., 1979,  
Anti-épileptiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1525-1544, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.

LAURENT J.P., 1980,  
Mécanisme d'action et effets pharmacologiques des  
benzodiazépines,  
Méd. et Hyg., 38, 4018-4024.

LECRUBIER Y., J.P. TILLEMENT et A. PUECH, 1979,  
Neuroleptiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1651-1673, GIROUD J.P., G. MATHE. et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.

LEMIEUX G.A., A. DAVIGNON et J.A. GENEST, 1956,  
Can. Med. Ass. J., 74, 522-.

LEWIS W.H., 1977,  
Medical botany. Plants affecting man's health,  
Wiley J. and Sons, New-York, 515 p.

LIM R.K.S., F. GUZMAN, D.W. RODGERS, K. GOTO, C. BRAUN, G.D.  
DICKERSON et R.J. ENGLE, 1964,  
Site of action of narcotic and non narcotic analgesics  
determined by blocking bradykinin evoked visceral pain,  
Arch. Int. Pharmacodyn., 152, 25-58.

LIND E.M. et A.C. TALLANTIRE, 1962,  
Some common flowering plants of Uganda,  
Oxford Univ. Press, Londres, 112-.

LIOTE F., 1987,  
Action sur l'inflammation des anti-inflammatoires non  
stéroïdiens,  
Le Concours Médical, 109 (supplément au n°43), 4190-4194.

- LIPPA A.S., P.A. NASH et E.N. GREENBLATT, 1979,  
Pre-clinical neuropsychopharmacological testing procedures for  
anxiolytic drugs,  
in : *Anxiolytics*, 41-81, FIELDING S. et H. LAL (Eds.),  
Pergamon press, New York.
- LIPPA A.S., K.M. GARRET, B. TABAKOFF, B. BEER, L.P. WENNOGLE  
et L.R. MEYERSON, 1985,  
Heterogeneity of brain benzodiazepine receptors : effects of  
physiological conditions,  
*Brain Res. Bull.*, 14, 189-195.
- LITCHFIELD J.T. et F. WILCOXON, 1949,  
A simplified method of evaluating dose effect experiments,  
*J. Pharmacol.*, 96, 99-113.
- LORD J.A.H., A.A. WATERFIELD, J. HUGHES et H.W. KOSTERLITZ,  
1977,  
Endogenous opioid peptides : multiple agonists and receptors,  
*Nature*, 267, 495-499.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951,  
Protein measurement with the Folin phenol reagent,  
*J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MAIDEN J.H., 1889,  
The useful native plants of Australia (including Tasmania),  
Trubner and Co., Londres, 183-187.
- MARANGOS P.J., S.M. PAUL, A.M. PARMA, F.K. GOODWIN, P. SYAPIN  
et P. SKOLNOCK, 1979,  
Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain (*in  
vitro*),  
*Life Sci.*, 24, 851-858.
- MARTIN M., J. RIDET, A. CHARTOL, J. BIOT, L. PORTE et A.  
BEZON, 1964,  
Action thérapeutique de l'extrait d'*Euphorbia hirta* dans  
l'amibiase intestinale. A propos de 150 observations,  
*Méd. Trop.*, 24 (3), 250-261.
- MENNINI T., M. GOBBI et R. TOSTA, 1984,  
Effects of denzimol on benzodiazepine receptors in the CNS :  
relation-ship between the enhancement of diazepam activity and  
benzodiazepine binding sites, induced by denzimol in the rat,  
*Life Sci.*, 35 (18), 1811-1820.
- MILLER L.G., D.J. GREENBLATT et R.I. SHADER, 1987,  
Benzodiazepine receptor binding : influence of physiologic and  
pharmacologic factors,  
*Biopharm. Drug Disposition*, 8, 103-114.
- MISSLIN R., PH. ROPARTZ et P. MANDEL, 1975,  
Etude comparée des effets du di-n-propylacétate et de  
l'oxazépam sur l'activité spontanée et conditionnée de la  
souris,  
*C.R. Acad. Sci. Paris*, 281, 1175-1178.

- MISSLIN R. et PH. ROPARTZ, 1976,  
Effets du di-n-dipropylacétate sur la fréquence cardiaque et  
l'émotivité de la souris,  
C.R. Acad. Sci. Paris, 282, 1541-1543.
- MISSLIN R., PH. ROPARTZ et P. MANDEL, 1976,  
Action of di-n-propylacetate on the spontaneous and acquired  
behaviour in goldfish, mice and rats,  
Pharmacol. Biochem. Behav., 4, 643-646.
- MISSLIN R. et PH. ROPARTZ, 1981,  
Effects of methamphetamine on novelty seeking behavior by  
mice,  
Psychopharmacology, 75, 39-43.
- MISSLIN R., F. HERZOG, B. KORCH et PH. ROPARTZ, 1982,  
Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-  
adrenal response in the mouse,  
Psychoneuroendocrinology, 7, 217-221.
- MISSLIN R., 1983,  
Contribution à l'étude des conduites néotiques chez la souris,  
Thèse Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- MISSLIN R., 1984,  
Does neophobia necessarily imply anxiety ?,  
Behav. Processes, 1-5.
- MISSLIN R. et M. CIGRANG, 1984,  
Rôle des vibrisses dans le contrôle des réponses aux  
stimulations nouvelles chez la souris.  
Biol. et Behav., 9, 184-191.
- MISSLIN R., PH. ROPARTZ et L. JUNG, 1984,  
Impairment of responses to novelty and its antagonism by  
neuroleptis in mice,  
Psychopharmacology, 82, 113-117.
- MISSLIN R. et M. CIGRANG, 1986,  
Does neophobia necessarily imply fear or anxiety ?,  
Behav. Proc., 12, 45-50.
- MISSLIN R., C. BELZUNG et E. VOGEL, 1988,  
Interaction of RO 15-4513 and ethanol on the behavior of mice  
antagonistic or additive effects ?,  
Psychopharmacology, 94, 392-396.
- MOHLER H. et T. OKADA, 1977,  
Properties of 3H-diazepam binding to benzodiazepine receptors  
in rat cerebral cortex,  
Life Sci., 20, 2101-2110.
- MOHLER H., 1982,  
Benzodiazepine receptors : are there endogenous ligands in the  
brain ?,  
In : More about receptors, 105-110, LAMBLE J.W. (Ed.),  
Elsevier Biomedical. Press., New York.

- MOLINENGO R. et S. RICCI-CANALEROS, 1970,  
The "staircase maze" and the simple "staircase" in the  
analysis of the psychopharmacological action of CNS  
depressant,  
Pharmacology, 4, 169-178.
- MORRE N. et P. KEANE, 1983,  
Le site de liaison des benzodiazépines est-il un récepteur?,  
L'encéphale, IX, 125-130.
- MULLER J.C., 1955,  
J. Am. Med. Ass., 159, 836-.
- MULLER W.E., 1987,  
The benzodiazepine receptor,  
Cambridge University Press, Cambridge, 4, 52-113.
- EL NAGGAR L., J.L. BEAL, L.M. PARKS, K.N. SALMAN, P. PATIL et  
A.E. SCHWARTING, 1978,  
A note on the isolation and identification of two  
pharmacologically active constituents of Euphorbia pilulifera,  
Lloydia, 41 (1), 73-75.
- NAKAMURA H., A. SHIMODA, K. ISHII et T. KADOKAWA, 1986,  
Central and peripheral analgesic action of non-acidic non-  
steroidal anti-inflammatory drugs in mice and rats,  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 282 (1), 16-25.
- NDIR O., 1981,  
Contribution à l'étude pharmacologique et chimique d'Euphorbia  
hirta L.,  
D.E.A. de chimie et biochimie des substances naturelles,  
Université de Dakar, Faculté des Sciences, 56 p.
- NDIR O. et J.L. POUSSET, 1981,  
Plantes médicinales africaines. V Mise au point d'un test in  
vitro pour vérifier l'action amoebicide d'Euphorbia hirta,  
Pl. Méd. et Phytoth., 15 (2), 113-.
- NDIR O. et J.L. POUSSET, 1982,  
Plantes médicinales africaines. VIII Contribution à l'étude  
pharmacologique et chimique d'Euphorbia hirta L.,  
Méd. Afr. Noire, 29 (7), 503-518.
- NEWBOULD B.B., 1963,  
Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial  
adjuvant,  
Brit. J. Pharmacol., 21, 127-136.
- NOMURA S., S.H. ZORN et S.J. ENNA, 1987,  
Selective interaction of tricyclic antidepressants with a  
subclass of rat brain cholinergic muscarinic receptors,  
Life Sci., 40, 1751-1760.
- NORDGREN I., G. LUNDGREN et B. KARLEN, 1987,  
Effects of diazepam on muscarinic acetylcholine receptor  
binding in vivo and on oxotremorine induced tremor and  
hypothermia in mice,  
Pharmacol. and Toxicol., 60, 258-261.

- OGURI K., I. YAMADA-MORI, J. SHIGEZANE, T. HIRANO et H. YOSHIMURA, 1987,  
Enhanced binding of morphine and naloxone to opioïde delta receptor by glucuronate and sulfate conjugations at the 6-position,  
Life Sci., 41, 1457-1464.
- OKUYAMA S. et H. AIHARA, 1985,  
The site of action of morphine and indomethacin differs with electrical stimulation of cutaneous or tibial nerves in normal and adjuvant arthritic rats,  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 276 (1), 133-139.
- OLIVER-BEVER B., 1981,  
Medicinal plants in tropical west Africa. II Plants acting on the nervous system,  
J. Ethnopharmacol., 7, 25-26.
- PALMER L., G. LUNDGREN et B. KARLEN, 1980,  
A method using L hyoscyamine for the study of muscarinic acetylcholine receptor binding in vivo,  
Pharmacol. and Toxicol., 60, 54-57.
- PARHAM H.B.R., 1943,  
Fiji native plants with their medicinal and other uses,  
J. Poly. Soc., Wellington, 160 p.
- PARKIN, J.D., 1987,  
The enigma of aspirin,  
Aust. NZ. J. Med., 17, 192-194.
- PASSOUANT P. et M. BILLIARD, 1978,  
Hypno-sédatifs,  
in : Thérapeutique médicale, 226-233, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- PATEY G. et J. ROSSIER, 1986,  
Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioïdes endogènes,  
Ann. Endocrinologie, 47, 71-87.
- PELLOW S. et S.E. FILE, 1984,  
Multiple sites of action for anxiogenic drug : behavioural, electrophysiological and biochemical correlations,  
Psychopharmacology, 83, 304-315.
- PENSO G., 1978,  
Inventaire des plantes médicinales employées dans les différents pays,  
W.H.O., 280-.
- PERT C.B., M.J. KUCHAR et S.H. SNYDER, 1976,  
Opiate receptor : autoradiographic localization in rat brain,  
Proc. Natl. Acad. Sci., 73 (10), 3729-3733.

- POLC P., H. MOHLER et W.E. HAEFELY, 1975,  
The effect of diazepam on spinal cord activity : possible sites and mechanism of action,  
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 284, 319-337.
- POLC P. et W. HAEFELY, 1976,  
Effects of two benzodiazepines, phenobarbitone and baclofen on synaptic transmission in the cat cuneate nucleus,  
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 294, 121-131.
- POLC P., E.P. BONETTI, R. SCHAFFNER et W. HAEFELY, 1982,  
A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist RO 15-1788, benzodiazepine tranquilizers,  $\beta$ -carbolines and phenobarbitone,  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 321, 260-264.
- PONSINET G. et G. OURISSON, 1968,  
Les triterpènes des latex d'Euphorbia. Contribution à une étude chimio-systématique du genre Euphorbia, Adansonia, 8 (2), 227-239.
- PONSINET G. et G. OURISSON, 1968,  
Etudes chimiotaxonomiques dans la famille des Euphorbiacées. III Répartition des triterpènes dans les latex d'Euphorbia, Phytochemistry, 7, 89-98.
- PORCHET H.C., N.L. BENOWITZ et L.B. SHEINER, 1988,  
Pharmacodynamic model of tolerance : application to nicotine, J. Pharmacol. Exp. Ther., 244 (1), 231-236.
- PORSOLT R.D., A. LENEGRE, I. AVRIL, S. LANCRENON, L. STERU et G. DOUMONT, 1987,  
Psychopharmacological profile of new cognition enhancing agent exifone in the mouse, Arznein.-Forsch./Drug Res., 37 (1), 4, 388-393.
- POULET E., 1972,  
Description et usage d'une plante herbacée de Haute-Volta : Euphorbia hirta, Notes Doc. Voltaïques, Haute-Volta, 6 (1), 25-30.
- POULOS C.X., T. HUNT et H. CAPPELL, 1988,  
Tolerance to morphine analgesia is reduced by the novel addition or omission of an alcohol cue, Psychopharmacology, 94, 412-416.
- POUSSET J.L., 1984,  
Eléments de pharmacopée sénégalaise pratique, Méd. Afr. Noire, 31 (7), 385-399.
- POWER F.B. et H. BROWNING, 1923,  
Chemical examination of Euphorbia pilulifera, Pharm. J. and Pharmacist., 36, 506-510.
- PRADILLA (de la) C.F.,  
Des plantes qui nous ont guéris,  
Rapport non publié, 19-, 168-.

- PRIVAT A., 1980,  
Substance P et analgésie,  
in : Quovadis, 147-159, MUYARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds.),  
Clin Midy, Montpellier.
- PUECH A., Y. LECRUBIER, B. DICQUET et L. STERU,  
De la synapse aux médicaments,  
ICI-Pharm., 51 p.
- QUISUMBING E., 1947,  
The philippine journal of forestry,  
Depart. Agric. Nat. Res., 5, 145-171.
- QUISUMBING E., 1951,  
Medicinal plants of the Philippines,  
Depart. Agric. Nat. Res., 16, 504-507.
- RAFFAITIN F. et H. CUCHE, 1983,  
Les benzodiazépines. Perspectives pharmacologiques,  
l'Information Psychiatrique, 59 (5), 733-743.
- RAMBERT F.A., J. PESSONNIER, J.E. DE SEREVILLE, A. POINTEAU et  
J. DUTEIL, 1986,  
Profil psychopharmacologique original de l'adrafinitil chez la  
souris,  
J. Pharmacol., 77, 37-52.
- RAYMOND W.D., 1936,  
The poisonous effects of some local species of Euphorbia,  
E. Afr. Méd. J., 12, 373-.
- REEVES P.M. et M.P. SCHWEIZER, 1983,  
Aging, diazepam exposure and benzodiazepine receptors in rat  
cortex,  
Brain Res., 270, 376-379.
- REUSE J., 1978,  
Antihistaminiques de synthèse,  
in : Thérapeutique médicale, 294-301, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- REUSE J., 1978,  
Médicaments du système nerveux central. Analgésiques centraux  
majeurs,  
in : Thérapeutique médicale, 207-219, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- RICHARDS J.G., H. MOHLER et W. HAEFELY, 1982,  
Benzodiazepine binding sites : receptors or acceptors,  
Trends Pharmacol. Sci., 3, 233-235.
- RICHARDS J.G. et H. MOHLER, 1984,  
Benzodiazepine receptors,  
Neuropharmacology, 23 (2B), 233-242.
- RIDET J. et A. CHARTOL, 1964,  
Les propriétés antidysentériques de l'Euphorbia hirta,  
Méd. Trop., 24 (2), 119-143.

- ROLLAND A., 1984,  
Standardisation des différents paramètres influents sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique chez la souris Swiss,  
D.E.A. de toxicologie, Université de Metz, Centre des Sciences de l'Environnement, 49 p.
- ROLLAND A., 1988,  
Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'Eschscholzia californica Cham.,  
Thèse de doctorat de l'Université de Metz, mention pharmacognosie, Centre des Sciences de l'Environnement, 428 p.
- RONDOT R. et J. DE RECONDO, 1979,  
Antiparkinsoniens,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2, 1547-1578, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion Scientifique Française, Paris.
- ROQUES B.P., 1980,  
Différenciation des récepteurs morphiniques,  
in : Quovadis , 88-106, MUYARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds), Clin Midy, Montpellier.
- ROSSIER J., 1980,  
Etude de la biosynthèse des enképhalines,  
in : Quovadis, 117-120, MUYARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds.), Clin Midy, Montpellier.
- ROSSIER J. et G. CHAPOUTHIER, 1982,  
Brain opiates,  
Endeavour, 6 (4), 168-176.
- ROUGIER P.E., 1907,  
Maladies et médecine à Fiji, autrefois et aujourd'hui,  
Anthropos, II, 1006-.
- ROUSSELET R. et R. PARIS, 1971,  
Application de la chromatographie sur couche mince au contrôle de quelques médicaments végétaux (Busserole, Euphorbia hirta, Bois de Lierre, Orthosiphon, Boldo, Quassia, Aubier de Tilleul et Gui),  
Pl. Méd. et Phytoth., 5 (2), 159-170.
- ROUVEIX B., 1980,  
Test de l'hyperthermie induite par la levure chez le rat,  
J. Pharmacol., 11 (1), 133-136.
- RUBIN B., M. MALONE, M. WAUGH et J.C. BURKE, 1957,  
Bioassay of rauwolfia roots an alkaloids,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 120, 125-136.
- RUCKEBUSCH Y. et L. BUENO, 1983,  
La naloxone : pharmacologie et intérêt thérapeutique,  
Rev. Méd. Vét., 134 (2), 77-82.

- RYCKEWAERT A., 1978,  
 Traitement des maladies articulaires. Polyarthrite rhumatoïde,  
 in : Thérapeutique médicale, 822-829, FABRE J. (Ed.),  
 Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- SACKEYFIO A.C. et M.S. LUGELEKA, 1986,  
 The anti-inflammatory effect of a crude aqueous extract of the  
 root bark of Ficus elastica in the rat,  
 Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 281 (1), 169-176
- SALLE J. et M. BRUNAUD, 1968,  
 Un nouveau myorelaxant : le tétrazepam (4.261 CB),  
 VI International Congress of the C.I.N.P., Tarragona, April ,  
 443-445.
- SAMANIN R., A. JORI, S. BERNASCONI, E. MORPUGO et S.  
 GARATTINI, 1977,  
 Biochemical and pharmacological studies on amineptine (S 1694)  
 and (+) amphetamine in the rat,  
 J. Pharm. Pharmac., 29, 555-558.
- SANNERUD C.A. et A.M. YOUNG, 1987,  
 Environmental modification of tolerance to morphine  
 discriminative stimulus properties in rats,  
 Psychopharmacology, 93, 59-68.
- SANOFI, 1968,  
 Tranxène,  
 Dossier technique, 30 p.
- SAQUI-SANNES G. (de), 1971,  
 Etude chimique de polyphénols naturels. Données structurales  
 et pharmacologiques des principes actifs d'Euphorbia hirta L.  
 (Euphorbiacées),  
 Thèse d'état de docteur en pharmacie, Université Paul Sabatier  
 (UER des Sciences pharmaceutiques), Toulouse, 224 p.
- SATO J., K. ITO, M. SATO, T. AIMOTO, R. KIMURA et T. MURATA,  
 1979,  
 Effect of acetazolamide on sleeping time induced with  
 barbiturates in mice : possible relationship between  
 barbiturate sleep and brain carbonic anhydrase activity,  
 J. Pharm. Dyn., 2, 133-140.
- SATO J., E. OWADA, K. ITO, et T. MURATA, 1980,  
 Effect of acetazolamide on barbiturate-induced sleeping time  
 in mice. II Effect on barbiturate levels in the plasma and  
 brain,  
 Chem. Pharm. Bull., 28 (2), 645-647.
- SAUVAIRE D., A. MICHEL, J.J. SERRANO et M. RICHARD, 1987,  
 Pharmacological activity and toxicity of apyramide :  
 comparison with non-steroidal anti-inflammatory agents,  
 Drugs Exptl. Clin. Res., 13 (5), 247-252.

- SCHMITT J., P. COMOY, M. SUQUET, J. BOITARD, J. LE MEUR, J.J. BASSELIER, M. BRUNAUD et J. SALLE, 1967,  
Sur un nouveau myorelaxant de la classe des benzodiazépines :  
le tétrazepam,  
Bull. Chim. Thér., 4, 254-259.
- SCHMITT H., 1973,  
Eléments de pharmacologie,  
Flammarion Médecine-Science, 5ème éd., Paris, 580 p.
- SCHNELL R., 1953,  
Icones plantarum africanarum. Euphorbia hirta Linn.  
(Euphorbiacées),  
IFAN, Dakar, 1 (6).
- SCHORDERET M., Y. DUNANT et R.W. STRAUB, 1978,  
Analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires,  
in : Thérapeutique médicale, 219-226, FABRE J. (Ed.),  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- SIEGMUND J., 1957,  
J. Pharmacol. Exptl. Ther., 119, 453-.
- SIMIAND J., P.E. KEANE et M. MORRE, 1984,  
The staircase test in mice : a simple and efficient procedure  
for primary screening of anxiolytic agents,  
Psychopharmacology, 84, 48-53.
- SIMON P. et R. CHERMAT, 1972,  
Recherche d'une interaction avec les stéréotypies provoquées  
par l'amphétamine chez le rat,  
Fiche technique n°21,  
J. Pharmacol., 3 (2), 235-238.
- SIMON P., 1979,  
Anxiolytiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1621-1631, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.
- SIMON P. et L. COLONNA, 1979,  
Antidépresseurs,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1633-1649, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.
- SIMON P., R. CHERMAT, L. DOARE, M. BOURIN et R. FARINOTTI,  
1982,  
Interactions imprévues de divers psychotropes avec les effets  
du barbital et du pentobarbital chez la souris,  
J. Pharmacol., 13 (2), 241-252.
- SIMON P., 1985,  
Interactions hypnotiques-psychotropes : quelques aspects de  
pharmacologie expérimentale,  
J. Pharmacol., 16 (1), 1-5.

- SOFOWORA A., 1984,  
Medicinal plants and traditional medicine in Africa,  
John Wiley and Sons, New-York, 208-213.
- SOLOMON R.E., E.A. WASSERMAN et G.F. GEBHART, 1987,  
Tolerance to antinociceptive effects of morphine without  
tolerance to its effects on schedule-controlled behavior,  
Psychopharmacology, 92, 327-333.
- SOULIMANI R., 1987,  
Recherche d'un effet histaminique ou antihistaminique  
d'extraits végétaux sur l'iléon de cobaye,  
D.E.A. de toxicologie, Université de Metz, Centre des Sciences  
de l'Environnement, 104 p.
- SPENCER P.S.T., 1966,  
The antagonism of oxotremorine effects in the mouse by  
thymoanaleptics,  
Life Sci., 5, 1015-1023.
- SQUIRES R. et C. BRAESTRUP, 1977,  
Benzodiazepines receptors in rat brain,  
Nature, 266, 732-734.
- STEINMETZ E.F., 1964,  
Euphorbia piluliferae summitates,  
Quart. J. Crude Drug. Res., 4 (2), 548-551.
- STERU L., B. THIERRY, R. CHERMAT, B. MILLET, P. SIMON et R.D.  
PORSOLT, 1987,  
Comparing benzodiazepines using the staicase test in mice,  
Psychopharmacology, 92, 106-109.
- STOLERMAN L.P., H.S. GARCHA et I.C. ROSE, 1986,  
Midazolam cue in rats : effects of RO 15-1788 and picrotoxin,  
Psychopharmacology, 86, 183-188.
- STRANGE (le) R., 1977,  
A history of herbal plants,  
Angus and Robertson, Londres, 304 p.
- TAKAHASHI M., Y. DEGUCHI et H. KANETO, 1988,  
Blockade of the development of analgesic tolerance to morphine  
by concurrent treatment with opioid- but not non-opioid-  
mediated stress in mice,  
Japan J. Pharmacol., 46, 1-5.
- TAKEMOTO T. et M. INAGAKI, 1958,  
Constituents of Euphorbia pilulifera,  
Yakugaku Zasshi, 78, 294-295.
- TANDON M.M.R. et N. RAM, 1963,  
Studies on changes in carbohydrates during humidification of  
Euphorbia hirta (Dhudia) leaves,  
Agra. Univ. J. Res., 12, 47-58.

- THIEBOT M.H., P. SOUBRIE, P. SIMON et J.R. BOISSIER, 1973,  
Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat  
sous l'effet de psychotropes. Application à l'étude des  
anxiolytiques,  
*Psychopharmacologia*, 31, 77-90.
- THIEBOT M.H., P. SOUBRIE, P. SIMON et J.R. BOISSIER, 1976,  
Spécificité d'action des tranquillisants mineurs dans le test  
de l'escalier. Relation entre ces effets et leurs propriétés  
anxiolytiques,  
*J. Pharmacol.*, 7, 87-102.
- THIEBOT M.H. et P. SOUBRIE, 1983,  
Behavioral pharmacology of the benzodiazepines,  
in : *The benzodiazepines*, 67-91, COSTA E. (Ed.), Raven press,  
New York.
- TREIT D., 1985,  
Animal models for the study of anti-anxiety agents : a review,  
*Neurosci. Biobehav. Rev.*, 9, 203-222.
- TSURUMI K., K. KYUKI, M. NIWA, S. KOKUBA et H. FUJIMURA,  
1986a,  
Pharmacological investigations of the new antiinflammatory  
agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo[b,f]thiepin-2-yl)  
propionic acid. I Inhibitory effects on rat paw edema,  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 36 (II), 12, 1796-1800.
- TSURUMI K., K. KYUKI, M. NIWA, H. MIBU et H. FUJIMURA, 1986b,  
Pharmacological investigations of the new antiinflammatory  
agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo[b,f]thiepin-2-yl)  
propionic acid. II Inhibitory effects on acute inflammation  
and prostaglandin-related reactions,  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 36 (II), 12, 1801-1805.
- TSURUMI K., H. MIBU, K. OKADA, J. HASEGAWA et H. FUJIMURA,  
1986c,  
Pharmacological investigations of the new antiinflammatory  
agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo[b,f]thiepin-2-yl)  
propionic acid. III Inhibitory effects on leucocyte emigration  
and proliferation of granulation,  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 36 (II), 12, 1806-1809.
- TSURUMI K., S. KOKUBA, K. OKADA, M. YANAGIHARA et H. FUJIMURA,  
1986d,  
Pharmacological investigations of the new antiinflammatory  
agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo[b,f]thiepin-2-yl)  
propionic acid. IV Inhibitory effects on rat adjuvant  
arthritis,  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 36 (II), 12, 1810-1817.
- TSURUMI K., K. KYUKI, M. YANAGIHARA, J. HASEGAWA et H.  
FUJIMURA, 1986e,  
Pharmacological investigations of the new antiinflammatory  
agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo[b,f]thiepin-2-yl)  
propionic acid. V Antiplatelet effect of the drug and  
antiinflammatory effect of its main metabolite,  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 36 (II), 12, 1818-1822.

- TURNER A.J., 1987,  
Metabolism of enkephalins,  
Isi Atlas of Sci. : Pharmacol., 74-77.
- UEDA H. et C.M. HSU, 1949,  
A chemical study of Euphorbia,  
J. Taiwan Pharm. Assoc., 1, 40-43.
- UNITED STATES PATENT OFFICE, 1964,  
Medicinal compositions. U.S. Patent 3117910,  
Intern. Pharm. Abstr., 266b.
- VACCARINO F.J., H.O. PETTIT, F.E. BLOOM et G.F. KOOB, 1985a,  
Effects of intracerebroventricular administration of methyl  
naloxonium chloride on heroin self-administration in the rat,  
Pharmacol. Biochem. Behav., 23, 495-498.
- VACCARINO F.J., F.E. BLOOM et G.F. KOOB, 1985b,  
Blockade of nucleus accumbens opiate receptors attenuates  
intravenous heroin reward in the rat,  
Psychopharmacology, 86, 37-42.
- VEERANJANEYULU K. et V.S.R. DAS, 1982,  
Photoacoustic spectroscopy-leaf absorption spectra,  
J. Exp. Bot., 33 (134), 515-519.
- VERGIAT A.M., 1970,  
Plantes magiques et médicinales des féticheurs de l'Oubangui  
(région de Bangui),  
J. Agric. Trop. Bot. Appl., 237 p.
- WAGNER H., S. BLADT et E.M. ZGAINSKI, 1983,  
Drogen analyse,  
Springer-Verlag, Berlin, 300-.
- WAROT D., C. ADVENIER, P. ETEVENON et J.R. BOISSIER, 1979,  
Hypnotiques,  
in : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique 2,  
1591-1618, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),  
Expansion Scientifique Française, Paris.
- WATT J.M. et M.G. BREYER-BRANDWIJK, 1962,  
The medicinal and poisonous plants of southern and eastern  
Africa,  
E. and S. Livingstone LTD, 1, 408-411.
- WAUQUIER A., 1979,  
Enhancement of brain self-stimulation behavior by minor  
tranquilizers in the rat : evidence and interpretations,  
in : Anxiolytics, 95-116, FIELDING S. et H. LAL (Eds.),  
Pergamon Press, New York.
- WEBB L.J., 1948,  
Guide to the medicinal and poisonous plants of Queensland,  
Coun. Sci. Indus. Res. Aust. Bull., Melbourne, 232, 10-, 54-.

- WEINSTEIN I.J., L.B. HOUGH et K.R. GOGAS, 1988,  
Cross-tolerance and cross-sensitization between morphine  
analgesia and naloxone-sensitive and cimetidine-sensitive  
stress-induced analgesia,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 244 (1), 253-258.
- WEISS S.R.B., R.M. POST, J. PASTEL et P.J. MARANGOS, 1985,  
Differential mediation of the anticonvulsivant effects of  
carbamazepine and diazepam,  
Life Sci., 36, 2413-2419.
- WENIGER B., 1985,  
La médecine populaire dans le plateau central d'Haïti,  
Thèse de docteur de 3ème cycle en toxicologie de  
l'environnement, Université de Metz, Centre des Sciences de  
l'Environnement, 198-199.
- WHITTAKER V.P., I.A. MICHAELSON et R.J. KIRLAND, 1964,  
The separation of synaptic vesicles from verve ending  
particles "synaptosomes",  
Biochem. J., 90, 293-303.
- WIGDOR S. et G.L. WILCOX, 1987,  
Central and systemic morphine-induced antinociception in mice  
contribution of descending serotonergic and noradrenergic  
pathways,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 242 (1), 90-95.
- WILLIS J.C., 1973,  
A dictionary of the flowering plants and ferns,  
Cambridge Univ. Press, 8ème ed., 441-444.
- WINTER C.A., E.A. RISLEY et G.W. NUSS, 1962,  
Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay  
for antiinflammatory drugs,  
Proc. Soc. Exp. Biol., 111, 544-547.
- WINTERS W.D., A.J. HANCE, G.G. CADD, D.D. QUAM et J.L.  
BENTHUYSEN, 1988,  
Ketamine- and morphine-induced analgesia and catalepsy. I  
Tolerance, cross-tolerance, potentiation, residual morphine  
levels and naloxone action in the rat,  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 244 (1), 51-57.
- WONG-TING-FOOK W.T.H., 1980,  
The medicinal plants of Mauritius,  
Enda o.i., Dakar, doc. 10, 16-.
- WORMS P., J.P. KAN, A. PERIO, C.G. WERMUTH, K. BIZIERE et R.  
RONCUCCI, 1986,  
Profil pharmacologique d'un psychotrope original, la minaprine  
Comparaison avec six antidépresseurs de référence,  
J. Pharmacol., 17 (2), 126-138.
- WRIGHT S., 1973,  
Physiologie appliquée à la médecine,  
Flammarion Médecine-Sciences, 12ème éd., Paris, 606 p.

WU P.H., T. PHAM et C.A. NARANJO, 1987,  
Nifedipine delays the acquisition of tolerance to ethanol,  
Europ. J. Pharmacol., 139, 233-236.

YAKSH T.L., 1987,  
Pharmacology and physiology of spinal analgesia,  
Isi Atlas of Sci. : Pharmacol., 1, 173-176.

ZARIFIAN E., H. CUCHE et H. LOO, 1980,  
Aspects biochimiques de la schizophrénie et mode d'action des  
neuroleptiques,  
in : Neurobiochimie clinique, 72-75, ZARIFIAN E. (Ed.),  
l'Actualité en Neurobiologie (1), Sandoz, Rueil Malmaison.

ZIPCY E., 1975,  
Essai sur l'ethnopharmacologie du Cameroun,  
Thèse d'état de docteur en pharmacie, Faculté de Pharmacie,  
Marseille, 119-121.

## Résumé :

Ont pu être menées de front la synthèse bibliographique des indications thérapeutiques traditionnelles conférées à Euphorbia hirta L., des études botaniques, toxicologiques, chimiques et pharmacologiques antérieures, la vérification de certaines de ces données et la réalisation d'une étude pharmacologique initialement axée sur les propriétés psychotropes.

Les caractéristiques botaniques des Euphorbiaceae, la faible toxicité d'E. hirta L. (DL 50 de l'extrait aqueux, par voie I.P., chez la souris  $8,82 \text{ g/kg}$ ) et la présence des différents groupes chimiques antérieurement isolés (polyphénols, terpènes, acides organiques et aminés, saccharides, saponosides, sels minéraux) ont pu être confirmées, ainsi que l'absence d'alcaloïdes et de dérivés cyanogénétiques.

Parmi les nombreuses indications traditionnelles d'E. hirta L. mentionnées dans la littérature (affections gastro-intestinales, génitales, de la peau et des muqueuses, rénales, hépatiques ; troubles cardio-respiratoires ; propriétés sédatives, analgésiques, fébrifuges et anti-inflammatoires), les effets sédatifs, dose-dépendants, ont été confirmés dès 100 mg/kg (tests comportementaux contraignants et non contraignants réalisés sur la souris). A faibles doses (12.5 et 25 mg/kg), un léger effet anxiolytique a pu être mis en évidence. L'absence de propriétés hypnotiques, neuroleptiques, anti-dépressives, anti-histaminiques, anti-convulsivantes et myorelaxantes, ainsi que l'absence d'affinité pour les sites récepteurs aux benzodiazépines (techniques in vivo et in vitro), ont permis de suggérer un profil psychopharmacologique de type tranquillisants mineurs non benzodiazépiniques.

De par ces résultats et en raison de la coexistence fréquente d'effets sédatifs avec des effets analgésiques par ailleurs mentionnés pour E. hirta L., il a été mis en évidence une activité analgésique centrale morphinomimétique dès 20 mg/kg, des effets anti-pyrétiques et anti-inflammatoires dans les processus aigus (100 mg/kg).

Ont été démontrées l'existence d'une tolérance à l'égard des effets sédatifs et analgésiques et l'absence de tolérance croisée avec la morphine.

Par voie orale, E. hirta L. n'est efficace qu'après dissolution dans un excipient du type Tabrafil.

## Mots-clés :

TRADITION, REGIONS TROPICALES ET SUBTROPICALES, EUPHORBIACEAE, EUPHORBIA HIRTA L., SEDATIFS, ANALGESIQUES CENTRAUX, ANTI-PYRETIQUES, ANTI-INFLAMMATOIRES.

9/17/72  
8846  
2x

