



HAL
open science

Recherche et évaluation de l'activité biologique des substances végétales sur le S.N.C. chez la souris, in vivo et vis-à-vis des récepteurs cholinergiques, histaminergiques et opoïdes, in vitro, au niveau du duodenum de rat et de l'iléon de cobaye

Rachid Soulimani

► **To cite this version:**

Rachid Soulimani. Recherche et évaluation de l'activité biologique des substances végétales sur le S.N.C. chez la souris, in vivo et vis-à-vis des récepteurs cholinergiques, histaminergiques et opoïdes, in vitro, au niveau du duodenum de rat et de l'iléon de cobaye. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1992. Français. NNT: 1992METZ001S . tel-01775951

HAL Id: tel-01775951

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775951>

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE METZ

Centre des Sciences de l'Environnement

Thèse pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Mention "PHARMACOLOGIE"

**RECHERCHE ET EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES
SUBSTANCES VEGETALES VIS A VIS DU S.N.C., IN VIVO, CHEZ LA
SOURIS ET VIS A VIS DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES,
HISTAMINERGIQUES ET OPIOIDES, IN VITRO, AU NIVEAU DU
DUODENUM DE RAT ET DE L'ILEON DE COBAYE.**

Soutenu

Le 14 janvier 1992

par

RACHID SOULIMANI

JURY

M. J.M. PELT
M. B. KRAFFT
M. F. MORTIER
M. J. FLEURENTIN
M. R. MISSLIN
M. J. CROS
Me D. BAG
Melle M.L. A

Professeur (Président du jury, Metz)
Professeur (Nancy)
Professeur (Rapporteur, Nancy)
Maître de conférences (Directeur de thèse, Metz)
Professeur (Rapporteur, Strasbourg)
Professeur (Toulouse)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420403 9

ARDEVAL, Nice)

Je dédie ce travail

A mes parents

en témoignage de leur affection et leur soutien

A mes frères et soeurs

en témoignage d'une profonde affection réciproque

A Joëlle

en témoignage de profonde affection et de reconnaissance pour sa compréhension, son aide et sa totale abnégation

A tous mes amis

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE -METZ	
N° inv.	1392042S
Cote	S/M3 92/1
Loc	Magasin

AVANT PROPOS

" Les hommes sont tous frères, et ils s'entre-déchirent, les bêtes farouches sont moins cruelles. Les lions ne font point la guerre aux lions, ni les tigres aux tigres; ils n'attaquent que les animaux d'espèce différente : l'homme seul, malgré sa raison, fait ce que les animaux sans raison ne firent jamais. "

Les aventures de Télémaque, fils d'Ulysse, FENELON

A Mr. le professeur J.M.PELT qui, au delà de l'amour entre les individus d'une même espèce, a toujours appelé à l'amour entre les espèces par le simple respect des différents écosystèmes qui composent notre biosphère, je voudrais lui exprimer ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de présider ce jury et d'avoir été toujours disponible pour conseiller, encourager et soutenir.

Je suis également très reconnaissant à Monsieur J. FLEURENTIN, Maître de conférence, ami et guide de ce travail et auprès duquel je n'ai cessé de louer disponibilité et humeur égale en toutes circonstances, je lui exprime toute ma gratitude pour ses conseils, ses compétences et son dynamisme.

Sans l'aide, la disponibilité et la grande expérience pour la réalisation et les études chimiques des extraits végétaux de Monsieur le Professeur F. MORTIER, ce travail n'aurait pu être réalisé, qu'il trouve ici l'expression de l'immense reconnaissance et toute mon estime, pour les nombreux conseils, les critiques et l'aide à tout moment qu'il m'a toujours prodigués.

Il m'est très agréable d'adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur R. MISSLIN auprès duquel j'ai rencontré une attention bienveillante et une aide efficace, notamment au cours de la réalisation et de l'interprétation des études comportementales, je lui suis très reconnaissant pour avoir accepté d'être l'un des rapporteurs.

Monsieur le Professeur B. KRAFFT m'a enseigné les bases du comportement animal et de l'ethologie pendant trois années successives, je lui suis très reconnaissant pour m'avoir initié aux problèmes du comportement et pour avoir accepté de faire partie du jury pour juger mon travail.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur J. CROSS pour avoir trouvé un intérêt à juger mon travail et pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je suis heureux de pouvoir compter, parmi les membres de ce jury, Madame le Professeur BAGREL qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à Monsieur le Docteur DICK, P.D.G. des laboratoires ARDEVAL ainsi qu'à Mr. KANNENGEISSER, Directeur commercial, Mr. DERRIEU, Directeur scientifique et Melle ABOU-CHACRA, Responsable du contrôle et qui a accepté de siéger dans ce jury.

Cette thèse est un fruit d'un long travail qui, au cours de sa réalisation, a connu plusieurs cycles des quatre saisons, tempêtes, automnes, printemps et beaux temps. Qu'il me soit permis d'assurer de toute ma reconnaissance les différentes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

je remercie :

Monsieur le professeur PIHAN pour ses conseils et sa disponibilité ainsi qu'à toute son équipe.

Mlle Joelle GUERRA pour son aide précieusement affective et le temps passé devant l'ordinateur pour préparer cette thèse, que Monsieur P.J. GUERRA trouve aussi mes remerciements très amicaux.

Monsieur et Madame YOUNOS, amis et Professeur de Biologie pour son aide et son soutien aux moments les plus difficiles.

Monsieur J. C. BLOCK, ami et professeur de microbiologie pour sa disponibilité et sa sincérité dans l'amitié, ainsi qu'à Marie-Claire et toute la famille.

Monsieur le professeur G. BALANSARD et toute son équipe, de l'Université de Marseille, pour l'accueil et la disponibilité qu'ils m'ont accordé pendant la réalisation de la chromatographie sur colonne.

Monsieur Adrian WAHL, Directeur de l'institut pour son soutien, Isabelle DRUM pour sa gentillesse et sa disponibilité, Collette COUSSEMENT pour sa sympathie ainsi que Héléne, Francine KLEIN, M. et Mme ROBERT et tous les membres de l'institut.

La S.F.E., son président J. FLEURENTIN et ses secrétaires Mme J. JEANMAIRE et P. ALTIDE.

P. VASSEUR, P. LEHR, J.F. FERARD, P. BAUDA, M.C. LANHERS, M. JOYEUX, C.

HEOFFLER et tous les membres du secrétariat du C.S.E. et mes collègues pour le soutien et l'amitié que manifeste chacun à des degrés différents.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PARTIE I</u>	
<u>ETUDE DES PROPRIETES NEUROTROPES ET ANALGESIQUES</u>	
<u>DE DEUX PLANTES MEDECINALES:</u>	4
<i>Melissa officinalis L.</i>	
<i>Passiflora incarnata L.</i>	
Introduction	4
<u>CHAPITRE A:</u>	
<u>I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	6
I-1) <i>Melissa officinalis L.</i>	
I-2) <i>Passiflora incarnata L.</i>	
A) BOTANIQUE	8
B) UTILISATIONS TRADITIONNELLES	8
C) CHIMIE	9
D) PHARMACOLOGIE	12
<u>CHAPITRE B:</u>	
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	
<u>I) ETUDES CHIMIQUES.</u>	15
I-1) ETUDE CHIMIQUE DE <i>MELISSA OFFICINALIS L.</i>	15
I-2) ETUDE CHIMIQUE DE <i>PASSIFLORA INCARNATA L.</i>	15
2-1) <u>Préparation des extraits</u>	
2-2) <u>Calcul des rendements</u>	
2-3) <u>Chromatographie sur couche mince</u>	
a) Recherche des flavonoïdes	17
b) Recherche des alcaloïdes	19
2-4) <u>Résultats</u>	23
2-4-1) <i>Melissa officinalis</i>	
2-4-2) <i>Passiflora incarnata</i>	
2-5) <u>Conclusion</u>	31
2-6) <u>Discussion</u>	32

II) ETUDES PHARMACOLOGIQUES	33
II-1) Préparation des extraits	33
1-1) <u>Les extraits de <i>Melissa officinalis L.</i></u>	33
a) Extrait hydroalcoolique et huile essentielle	
b) fractions	
1-2) <u>Les extraits de <i>Passiflora incarnata L.</i></u>	35
a) Extrait hydroalcoolique Pi1	
b) Extrait aqueux Pi2	
c) Extrait Pi3 et Pi4	
d) Extrait Pi5	
II-2) <u>Animaux</u>	37
II-3) <u>RECHERCHE DES PROPRIETES NEUROTROPES</u>	38
3-1) RECHERCHE DE PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES	38
3-1-1-1) <u>INTRODUCTION</u>	
A) Propriétés sédatives et anxiolytiques	38
A-1) <u>Tests comportementaux</u>	
3-2) RECHERCHE DES PROPRIETES HYPNOTIQUES	
II-3-1-2) <u>INFLUENCE DE <i>M. OFFICINALIS</i> ET DE <i>P. INCARNATA</i> SUR</u>	
<u>LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER</u>	46
1) Procédure expérimentale	
2) Méthode	
3) <i>Melissa officinalis L.</i>	47
a) extrait hydroalcoolique	
b) fractions	
c) huile essentielle	
d) témoin et produit de référence	
Statistiques	

3-1) RESULTATS

49

- 3-1-1) Extrait hydroalcoolique
- 3-1-2) Huile essentielle de *M.officinalis*
- 3-1-3) Les fractions seules
- 3-1-4) Les fractions associées par deux
- 3-1-5) Les fractions associées par trois
- 3-1-6) Les fractions associées par quatre
- 3-1-7) L'extrait hydroalcoolique total et l'association de l'ensemble des fractions

4) *Passiflora incarnata*

64

- a) Témoin
- b) Extrait hydroalcoolique de *P.incarnata*: Pi1
- c) Extrait aqueux : Pi2
- d) Etude des différents extraits
 - d-1) Extrait Pi3
 - d-2) Extrait Pi4
 - d-3) Extrait Pi5
- e) Etude des groupes chimiques
 - e-1) Alcaloïdes et maltol
 - e-2) Harmaline + harmalol
 - e-3) Maltol
 - e-4) Flavonoïdes

65

Statistiques

4-1) RESULTATS

67

- 4-1-1) Extraits hydroalcoolique (Pi1)
- 4-1-2) Extrait aqueux (Pi2)
- 4-1-3) Les extraits Pi3; Pi4 et Pi5
- 4-1-4) Le mélange alcaloïde + maltol et le maltol
- 4-1-5) Les flavonoïdes

II-3-1-3) <u>Influence des extraits de <i>M.officinalis</i> et de <i>P.incarnata</i> sur le comportement de la souris dans le test de milieu nouveau.</u>	74
1) <u>Procédure expérimentale</u>	
2) <u>Méthode</u>	
3) <u>Influence de l'extrait hydroalcoolique de <i>M.officinalis</i></u>	75
4) <u>Influence des extraits <i>P.incarnata</i></u>	75
a) L'extrait hydroalcoolique	
b) extrait aqueux	
Statistiques	
5) <u>Résultats</u>	76
1- Influence de <i>M.officinalis</i> sur le comportement de la souris dans le test du milieu nouveau.	
2- Influence de <i>P.incarnata</i> sur le comportement de la souris dans le test du milieu nouveau.	

II-3-1-4) <u>EFFETS INDUCTEUR ET POTENTIALISATEUR DU SOMMEIL DE <i>M.OFFICINALIS</i> ET DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> APRES TRAITEMENT A UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE ET HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL SODIQUE CHEZ LA SOURIS</u>	79
1) Protocole expérimentale	
2) Matériel et Méthode	
3) Effet des extraits végétaux sur l'induction du sommeil narcotique	80
a) <i>M.officinalis</i>	
b) <i>P.incarnata</i>	

Statistiques	
3-1) <u>Résultats</u>	81
3-3-1) Effet de <i>M.officinalis</i> sur l'induction du sommeil barbiturique chez la souris.	
3-1-2) Effet des extraits de <i>P.incarnata</i> sur l'induction du sommeil barbiturique chez la souris.	
4) Effet des extraits végétaux sur la Potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.	85
a) Effet <i>M.officinalis</i>	
b) Effet de <i>P.incarnata</i>	

Statistiques

4-1) <u>Résultats</u>	85
4-1-1) Effet de <i>M.officinalis</i> sur la potentialisation du sommeil au pentobarbital chez la souris	
4-1-2) Effet de <i>P.incarnata</i> sur la potentialisation du sommeil au pentobarbital chez la souris.	
II-3-1-5) <u>INFLUENCE DE L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS CONFRONTEE A UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSURE</u>	90
1) <u>Procédure expérimentale</u>	
1-1) Matériel	
1-2) Méthode	
Statistiques	
2) <u>Résultats</u>	91
II-3-1-6) <u>CONCLUSION</u>	94
1) <u><i>Melissa officinalis</i></u>	94
2) <u><i>Passiflora incarnata</i></u>	94
II-4) <u>RECHERCHE DE PROPRIETE ANALGESIQUE DE <i>M.OFFICINALIS</i></u>	96
A) Influence de <i>M.officinalis</i> , vis-à-vis d'une douleur occasionné par l'acide acétique (test du writhing)	96
1) <u>Procédure expérimentale</u>	
1-1) Animaux	
1-2) Méthode	
Statistiques	
C) <u>Résultats</u>	97
D) Influence de <i>M.officinalis</i> vis à vis de la chaleur (test de la plaque chauffante)	99
1) <u>Procédure expérimentale</u>	
1-1) Animaux	
1-2) Méthode	

Statistiques

E) Résultats

100

F) Conclusion

100

II-5) DISCUSSION

102

PARTIE II :

**EVALUATION ET RECHERCHE, IN VITRO, DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS VEGETAUX
VIS A VIS DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES, HISTAMINERGIQUES ET OPIOIDES**

<u>INTRODUCTION</u>	107
<u>CHAPITRE I : RAPPELS PHYSIOLOGIQUES</u>	110
<u>A- REPARTITION DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES, HISTAMINERGIQUES ET OPIOIDES</u>	110
<u>A-I) LES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES.</u>	110
A-I-I) Effets physiologiques et mécanisme d'action de l'acétylcholine.	
A-I-I-I) <u>les cholinomimétiques (agonistes)</u>	
A-I-I-II) <u>les parasympatholytiques (antagonistes)</u>	
A-I-I-III) <u>Récepteurs : Nature et Localisation</u>	
<u>A-II) LES RECEPTEURS HISTAMINIQUES.</u>	115
<u>A-II-I) EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'HISTAMINE</u>	
A-II-I-I) Sur le muscle lisse	
A-II-I-II) Système nerveux central	
<u>A-II II) ROLE ET DISTRIBUTION DES RECEPTEURS HISTAMINERGIQUES</u>	
<u>A-III) LES RECEPTEURS OPIACES</u>	120
<u>A-III-1) ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES OPIACES</u>	
<u>A-III-2) ROLES ET DISTRIBUTION DES RECEPTEURS OPIOIDES</u>	

CHAPITRE II : <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	127
A) <u>MATERIELS ET METHODES</u>	127
A-I) <u>EXTRAITS UTILISES</u>	127
A-I-I) <u>PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES</u>	
PRESENTATION DES PLANTES	128
A-I-II) <u>CARACTERISATION ET CONDITIONS D'ELEVAGE DES</u>	
<u>ANIMAUX UTILISES DANS LES DIFFERENTES</u>	
<u>EXPERIMENTATIONS</u>	132
A-II) <u>PREPARATION DES SOLUTIONS</u>	133
a) <u>Transit intestinal</u>	
b) <u>Duodénum et Iléon isolés</u>	
A-III) <u>METHODES</u>	133
a) <u>Transit intestinal</u>	
b) <u>Duodénum et Iléon isolés</u>	
B) <u>TRANSIT INTESTINAL</u>	137
B-1) Produit de référence	
B-2) <i>Melissa officinalis</i>	
B-3) <i>Peumus boldus</i>	
C) <u>RECEPTEURS CHOLINERGIQUE</u>	138
C-I) <u>ACTION DES EXTRAITS VEGETAUX SUR LE PERISTALTISME</u>	
<u>INTESTINAL</u>	138
a) <i>Melissa officinalis</i>	
b) <i>Peumus boldus</i>	
c) <i>Annona reticulata</i>	
d) <i>Fagara zanthoxyloïdes</i>	
e) <i>Euphorbia hirta</i>	

C-II) <u>INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A VIS DES</u>	
<u>CONTRACTIONS INDUITES PAR LA CARBAMINOYLCHOLINE AU</u>	
<u>NIVEAU DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES.</u>	139
1) Solution de carbaminoylcholine	
2) Solution de sulfate d'atropine (Antagoniste cholinergique de référence)	
3) Extraits testés vis à vis de la contraction induite par la carbaminoylcholine	140
a) <i>Euphorbia hirta L.</i>	
b) <i>Fagara zanthoxyloides Lam.</i>	
c) <i>Annona reticulata L.</i>	
d) <i>Melissa officinalis L.</i>	
e) <i>Peumus boldus</i>	
f) <i>Fumaria officinalis L.</i>	
4) Extraits testés vis à vis de la contraction induite par le chlorure de baryum.	140
a) <u>Chlorure de Baryum</u>	
b) <u>Papavérine (Antagoniste musculotrope)</u>	
c) <u>Extrait végétal</u> <i>Peumus boldus</i>	
5) Extraits végétaux testés vis à vis de la pilocarpine, un agoniste cholinergique spécifique aux récepteurs muscariniques	141
a) <u>Pilocarpine</u>	
b) <u>Extrait végétal</u> <i>Peumus boldus</i>	
C-III) <u>RESULTATS</u>	
1) Action des extraits végétaux sur le transit intestinal de la souris, <i>in vivo</i>	145
2) Action des extraits végétaux sur le péristaltisme intestinal	145
3) Action des axtraits végétaux sur les récepteurs chilinergiques	151
C-IV) <u>CONCLUSION</u>	166

D) RECEPTEURS HISTAMINIOUES 167

**D-1) INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A VIS DES
CONTRACTIONS INDUITES PAR L'HISTAMINE AU NIVEAU DES
RECEPTEURS HISTAMINIOUES** 167

- 1) Solution de l'histamine
- 2) Solution de dexchlorphéniramine (Polaramine)
(Antagoniste histaminique H1 de référence)
- 3) Solution de prométhazine (Phenergan)
(Antagoniste histaminique H1 de référence)
- 4) Extraits testés vis à vis de la contraction induite
par l'histamine

168

- a) *Euphorbia hirta L.*
- b) *Fagara zanthoxyloïdes Lam.*
- c) *Eschscholtzia californica Cham.*
- d) *Fumaria officinalis L.*
- e) *Melissa officinalis L.*

D-2) RESULTATS 172

D-3) CONCLUSION 178

E) <u>RECEPTEURS OPIACES</u>	181
E-1) <u>INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A VIS DES CONTRACTIONS INDUITES PAR LES STIMULATIONS ELECTRIQUES. METTANT EN JEU LES RECEPTEURS OPIACES, AU NIVEAU DE L'ILEON ISOLE DE COBAYE</u>	
1) Solution de la morphine : Relation Effet-Dose	182
2) Solution de Naloxone (Antagoniste opiacés) : relation Effet-Dose	182
3) Extraits et substances de référence testés vis à vis de la contraction induite par la stimulation électrique	182
a) <i>Fagara zanthoxyloïdes Lam.</i>	
b) <i>Eschscholtzia californica</i>	
c) <i>Fumaria officinalis L.</i>	
d) <i>Annona reticulata L.</i>	
e) <i>Euphorbia hirta L.</i>	
f) Buprénorphine (Témgésic)	
g) Trimébutine (Debridat)	
h) Atropine:(sulfate d').	
i) Papavérine	
j) Polaramine	
k) Cimétidine:(Tagamet)	
E-2) <u>RESULTATS</u>	187
E-3) <u>CONCLUSION</u>	207
<u>COMPARAISON DES METHODES IN VIVO ET IN VITRO</u>	210
CONCLUSION GENERALE	216
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pharmacognosie, de "pharmacon" (poison et médicament) et de "gnozis" (connaissance), est la science des médicaments d'origine naturelle.

C'est le domaine du principe actif extrait d'une plante, elle porte sur l'étude des matières premières, de leurs caractéristiques chimiques, de leurs propriétés pharmacologique et de leur mise en forme galénique, alors que la phytothérapie englobe de manière générale tout ce qui associe Plantes à Santé.

Le monde végétal reste aujourd'hui, malgré les progrès immenses de la chimie de synthèse, le plus gros réservoir des principes actifs.

Chaque peuple, chaque ethnie possède à travers le monde une somme de connaissances sur les plantes et leurs multiples utilisations, depuis l'antiquité.

Comme complément à ces données empiriques et pour permettre des études méthodiques afin de confirmer ou d'infirmes ces données, il est nécessaire de faire appel à des tests pharmacologiques.

Tel était l'objectif fixé par le laboratoire de biologie végétale et de pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement au sein duquel ce travail a été effectué et dont les thèmes de recherche principaux développés concernent entre autres l'étude des plantes actives sur le système nerveux central et en particulier les espèces sédatives, anxiolytiques et analgésique, ainsi que les plantes à propriétés cholérétiques, diurétiques, hépatoprotectrices, antispasmodiques, antihistaminiques, laxatives et antidiarrhéiques.

La conception et la réalisation de ce travail s'inscrit dans le cadre des recherches menées au laboratoire de Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'environnement de l'Université de Metz et visant à sélectionner des plantes médicinales et des produits naturels utilisés dans les pharmacopées traditionnelles et à rechercher expérimentalement des propriétés pharmacologiques à l'aide de méthodes qui ont fait leurs preuves ailleurs.

L'ensemble de ces thèmes de recherche nécessite le choix d'une part des extraits à étudier et d'autre part la mise en place et le développement de plusieurs tests pharmacologiques, in vivo et in vitro. Ces deux choix se sont établis sur une approche reposant sur trois paramètres principaux :

Dans une première étape, nous avons tenté de rassembler et de synthétiser l'ensemble des données ethnopharmacologique, toxicologique, clinique et pharmacologique tirées de l'étude bibliographique d'un certain nombre de plantes médicinales.

Ensuite, en fonction des indications mentionnées dans la synthèse bibliographique, nous avons tenté de confirmer ou infirmer, à l'aide d'une batterie de tests *in vivo*, les propriétés pharmacologiques :

* Sédatives et/ou anxiolytique à l'aide de tests comportementaux contraignants (test de l'escalier et test de l'enceinte claire/obscur) et non contraignants (test du milieu nouveau). Ce type d'activité pharmacologique se trouve toujours associé à une activité hypnotique, deux tests permettent l'évaluation de cet effet, le test de l'induction et le test de potentialisation du sommeil au pentobarbital

* Analgésiques à l'aide de deux tests permettant d'évaluer et de spécifier la nature de l'analgésie, périphérique ou centrale (test de la plaque chauffante et test du Writhing ou de l'acide acétique).

* laxatives ou antidiarrhéiques par le test du transit intestinal consistant à évaluer l'effet des extraits vis-à-vis de la progression du contenu intestinal.

Nous avons tenté également de rechercher le support de l'activité pharmacologique soit à l'aide de techniques de fractionnement chimique, et d'évaluation de l'activité d'une ou plusieurs fractions isolées, soit à l'aide de l'évaluation de l'effet biologique des marqueurs purifiés contenus dans les extraits étudiés.

Loin de constituer une première tentative dans ce mode d'approche des plantes médicinales, notre travail s'inscrit en fait dans une continuité de différentes études précédemment menées sur d'autres espèces végétales au sein du laboratoire, dans le domaine des psychotropes *in vivo*, afin de compléter le screening pharmacologique sur ces espèces végétales. Dans cet objectif, et dans une deuxième étape, après avoir confirmé les activités sur le système nerveux central et sur le transit intestinal, *in vivo*, d'extraits de plantes sélectionnées, notre intérêt s'est porté sur la technique de l'intestin isolé (duodénum isolé de rat et iléon isolé de cobaye) *in vitro*, qui présente plusieurs avantages:

Les techniques devraient répondre aux exigences d'un test de screening.

Les récepteurs sont nombreux et variés, en effet on y trouve des récepteurs cholinergiques, histaminergiques et opioïdes.

Ainsi l'organe isolé pourra être étudié à la fois pour la recherche des substances à propriétés histaminiques ou antihistaminiques, cholinergiques ou anticholinergiques et analgésiques majeurs.

En l'occurrence, c'est l'étude de ces trois types de récepteurs que nous avons entreprise afin :

- d'adapter la technique à l'étude des extraits végétaux et non à celle des molécules isolées.
- de vérifier la spécificité et la reproductibilité des résultats.
- de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus dans notre laboratoire par des techniques *in vivo* sur les mêmes extraits de plantes.

Les substances antihistaminiques, en particulier les antihistaminiques H1, ont toujours manifesté un effet secondaire sédatif en plus de leur effet principalement antihistaminique; c'est pourquoi nous avons entrepris de rechercher le comportement des extraits, qui ont manifesté un effet sédatif *in vivo*, vis-à-vis des récepteurs histaminergiques *in vitro*.

L'étude des plantes médicinales à propriétés analgésiques requiert l'utilisation de méthodes classiques *in vivo* effectués chez la souris, le développement d'une technique d'étude *in vitro* vis-à-vis des récepteurs opioïdes pourrait répondre à deux objectifs, compléter le screening des études *in vivo*, d'une part, rechercher le mécanisme d'action des extraits végétaux à propriétés analgésiques d'autre part.

Dans une troisième étape, nous avons tenté de rechercher l'implication des récepteurs cholinergiques et histaminergique dans le fonctionnement des récepteurs opioïdes au niveau de l'iléon isolé de cobaye en utilisant des antagonistes de références anticholinergiques et antihistaminiques.

PARTIE I

**ETUDE DES PROPRIETES NEUROTROPES ET
ANALGESIQUES DE DEUX PLANTES
MEDICINALES :**

MELISSA OFFICINALIS L.
ET
PASSIFLORA INCARANATA L.

PARTIE I
INTRODUCTION

PARTIE I

INTRODUCTION

La première partie de notre travail a été réalisée dans le cadre de la collaboration Université-Industrie avec un laboratoire pharmaceutique, le choix des plantes étant établi dans un premier temps à partir des indications traditionnelles retenues par le ministère (B.O. 90/20 bis). Dans un deuxième temps, une étude bibliographique nous permet d'orienter notre démarche expérimentale et de réaliser les différents tests pharmacologiques afin de confirmer ou d'infirmer ces indications et d'optimiser les processus d'extraction et de préparations industrielles des extraits.

En collaboration avec le laboratoire pharmaceutique, notre intérêt s'est porté sur deux espèces végétale réputées comme possédant des activités sur le système nerveux central, *Melissa officinalis* et *Passiflora incarnata*.

Le développement systématique des différents tests pharmacologiques *in vivo* sur l'extrait total de ces deux plantes nous paraît être une approche nouvelle et nécessaire pour des plantes introduites ou en voie d'introduction, en phytothérapie.

Melissa officinalis et *Passiflora incarnata* sont deux plantes connues et indiquées pour leurs effets sédatifs et anxiolytiques, et l'industrie pharmaceutique les emploie déjà depuis plusieurs années pour ces mêmes indications.

Cependant les différents travaux scientifiques, en particulier pour *Melissa officinalis*, ont été très succincts pour apporter une preuve confirmant ces indications (Soulimani et coll., 1991), par contre pour *Passiflora incarnata* la grande partie des investigations mentionnées en bibliographie a été consacrée à sa composition chimique alors que son activité pharmacologique n'a fait l'objet que de quelques travaux pour l'activité sédatif et anxiolytique. (Soulimani et coll., 1992)

Le but de nos travaux est donc de rechercher l'existence à partir d'extraits de *M.officinalis* et de *P.incarnata*, préparés selon le même mode que la réalisation galénique (commercialisée sous le nom de Suspension Intégrale de Plante Fraîche : S.I.P.F.), d'activités pharmacologiques de type sédatif, anxiolytique ou analgésique et par conséquent de confirmer ou d'infirmer les indications thérapeutiques et de valider leur forme galénique.

Les travaux d'identification chimique sont dans l'ensemble exclusivement consacrés aux alcaloïdes et aux flavonoïdes pour les extraits de *P. incarnata* et notre contribution ici s'est limitée dans un premier temps à la synthèse des travaux bibliographiques et au fractionnement et la caractérisation des principaux groupes chimiques à l'aide de techniques analytiques courantes (réaction d'identification, chromatographie sur couche mince : C.C.M.). La finalité ici est de définir des profils chimiques types des différents extraits réalisés. Pour *M. officinalis* nous avons réalisé dans un premier temps un fractionnement de l'extrait total, puis nous avons tenté d'évaluer l'activité pharmacologique de ces fractions prises séparément et en association par 2, 3, 4 et la totalité afin d'isoler la ou les fractions actives avant de les identifier dans un deuxième temps.

L'étude pharmacologique a débuté par des études *in vivo* chez l'animal par voie intra-péritonéale de deux types d'extraits, aqueux et hydroalcoolique : étude du comportement, influence sur le sommeil barbiturique et recherche d'un effet antalgique. Cette étude s'est complétée par la recherche de l'activité pharmacologique des fractions ou des substances pures présentes dans ces espèces.

Ainsi dans une dernière étape de cette première partie, en raison de la présence chez *P. incarnata* de principes dominants (alcaloïdes et flavonoïdes), nous avons tenté de voir si ces substances étaient le support de l'activité. Nous avons également tenté de rechercher le support d'activité au niveau des fractions isolées et de l'huile essentielle de *M. officinalis*.

Notre intention n'était pas de réaliser une étude chimique complète sur chacune des deux plantes étudiées, mais simplement de vérifier si l'activité pharmacologique des extraits totaux était liée à l'une ou l'autre des fractions isolées pour *M. officinalis* ou aux alcaloïdes et/ou flavonoïdes pour *P. incarnata*.

CHAPITRE A

I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1) *Melissa officinalis L.*



Melissa officinalis, espèce aromatique de la famille des labiées à odeur citronnée, est une plante herbacée, vivace, spontanée, cultivée en Europe centrale et dans le bassin méditerranéen. Les parties aériennes étaient utilisées depuis l'Antiquité en médecines grecque et islamique (Ibn Al Baytar, 1877-1883; Nauroy J., 1954). Son usage s'est transmis en Europe grâce à la médecine islamique, Avicenne la recommandait pour ses propriétés digestives, carminatives et curatives vis-à-vis des troubles intestinaux et Rhazes la prescrivait contre "les chagrins et la mélancolie" ; "elle serait salutaire contre les douleurs de la faiblesse du coeur". Les anciens l'avaient appelé la "gaieté du coeur", en raison de ses disantes vertus "cordiales".

En France, la mélisse est traditionnellement utilisée en médecine populaire contre les troubles digestifs (douleurs stomacales, digestion difficile, coliques flatulentes, nausées dues à la grossesse), contre les troubles nerveux (mélancolie, insomnie, nervosité, vertiges), contre les douleurs (dentaires, auriculaires, abdominales, céphalées, dysménorrhées) et enfin contre des troubles divers (syncope, faiblesse du coeur, bourdonnement d'oreilles, asthmes). (Fournier P., 1948)

La mélisse est inscrite à la pharmacopée française et son emploi est reconnu dans l'avis 90/22 bis en ces termes : "la mélisse est traditionnellement utilisée dans le traitement des troubles digestifs et de la composante douloureuse des colites spasmodiques, ainsi que dans le traitement des états névrotiques des troubles mineurs du sommeil" (Bull. Off. N°90/22 bis, 1990).

Quelques travaux succincts de pharmacologie ont mis en évidence une activité sédatrice (Racz-Kotilla et coll., 1980) antispasmodique (Forster et coll., 1980), cholérétique (Chabrol et coll., 1932), antihormonale (Auf'Mkolk et coll., 1984; Auf'Mkolk et coll., 1985; Kohrle et coll., 1985; Kemper, 1982) et antivirale (Kucera et Hermann, 1967; Wagner et Sprinkmeyer, 1973) de la mélisse.

La composition chimique révèle la présence d'une faible quantité d'huile essentielle (0.05 %), riche en aldéhyde et en alcool terpénique (Basker, 1978; Bezanger, 1980; Garnier et coll., 1961; Pellecuer et coll., 1981; Titel et coll., 1982; Masakova et coll., 1979; Bezanger, 1980). D'autres composés ont été mis en évidence : des acides phénols (Bezanger, 1980; Herrmann, 1954; Paris, 1981; Schenck, 1944; Thieme, 1973) des triterpènes (Brieskorn et coll., 1953), des tanins (Herrmann, 1954), des flavonoïdes (Thieme, 1973) et des vitamines B1 et B2 (Schintgen, 1975; Kemper, 1982).

I-2) *Passiflora incarnata L.*

A) BOTANIQUE

Passiflora incarnata L. appartient à l'ordre des Violales qui comprend 20 familles. La famille des Passifloracées est répartie en 12 genres et 600 espèces préférentiellement sous un climat tropical et tempéré chaud. Le genre principal est *Passiflora* avec 500 espèces américaines, quelques - unes asiatiques et australiennes et une malgache. (Paris et Moyses, 1967; Pharmacop. Fr., 1976)

C'est une plante vivace, sarmenteuse, grimpante, à tige ligneuse pouvant atteindre 9 mètres de long. Les rameaux sont légèrement pubescents à leur extrémité ; leur écorce est d'un gris pourpré.

Les feuilles sont alternes, simples, stipulées, portées par un long pétiole muni de deux glandes nectarifères noirâtre au sommet (Perrot, 1943; Pharmacop. homéop., 1981). Les fleurs solitaires et pédonculées prennent naissance à l'aisselle des feuilles, elles sont hermaphrodites régulières, pentamères et accompagnées de trois bractées papilleuses (Garnier et coll., 1961; Paris et Moyses, 1967; Pharmacop. Fr., 1976). Le calice, composé de cinq sépales verdâtres, est en forme de coupe ; la corolle comporte cinq pétales blancs. Les cinq étamines présentent de grandes anthères orangées. Elle est originaire des contrées chaudes de l'Amérique et peut s'acclimater en France (Garnier et coll., 1961). Elle est spontanée, surtout aux U.S.A., et elle est cultivée en Afrique du Nord, dans le Sud de la France où les gelées sont rares aussi peut-on la trouver en Anjou, dans le Morbihan et dans l'ouest du Calvados (Perrot, 1943; Pharmacop. Fr., 1976; Pharmacop. homéop., 1981). La floraison et la récolte ont lieu de Mai à Août. Les parties employées sont les parties aériennes (Bezanger, 1980; Pharmacop. homéop., 1981).

B) UTILISATIONS TRADITIONNELLES

Passiflora incarnata est employée, surtout en Amérique du Nord, dans le traitement de l'anxiété, les insomnies, les névralgies et son utilisation est également recommandée comme spasmolytique. En France, elle n'a été employée qu'en homéopathie jusqu'à la première guerre mondiale où l'on constata son action favorable contre l'angoisse suscitée dans cette période de guerre et ceci sans les effets secondaires classiques observés avec les barbituriques. D'après Garnier et coll., (1961) cette espèce serait dénuée de toute toxicité.

Ses propriétés sédatives furent remarquées à la fin du XIX^{ème} siècle par des médecins américains qui l'utilisèrent en neurologie. (Bezanger, 1980)

Son utilisation est principalement recommandée dans les troubles du sommeil en lui reconnaissant une activité sédative qui sera particulièrement recommandée dans les troubles du sommeil chez l'enfant. (Bezanger, 1980; Garnier et coll., 1961)

Leclerc (1920) la préconise " contre les troubles nerveux de la ménopause", et " comme remède à l'insomnie liée à la grippe, sans effets secondaires de dépression nerveuse, de pesanteur de la tête ou de tristesse", ce qui la différencie des narcotiques.

Bullington (1897) et Stapleton (1904) avaient obtenu de bons résultats dans "le traitement de l'insomnie, des neurasthénies, des hystéries et dans certaines névralgies".

L'importance thérapeutique de *Passiflora incarnata* pendant le siècle dernier et en particulier les vingt dernières années ont donné lieu à de nombreux travaux de recherche afin d'en isoler une éventuelle fraction active.

C) CHIMIE

L'ensemble des recherches phytochimiques a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs classes chimiques dont les plus importantes sont : Les alcaloïdes et les flavonoïdes.

1) Les alcaloïdes (à noyau β -carboline)

Recherche qualitative :

Neu (1954) a mis en évidence l'existence de dérivés indoliques (0,1 %) dont l'harmane, qu'il a supposé être, au départ, de la passiflorine.

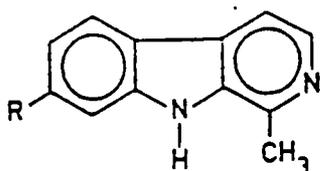
Lutomski et Wrocinsky (1960) ont isolé de l'harmine et de l'harmol (Paris et Moyse, 1967; Lutomski et coll., 1967, 1968, 1974; Pharmacop. Fr., 1976).

Peckolt (1909) et Neu (1956) ont mis en évidence la présence de l'harmine.

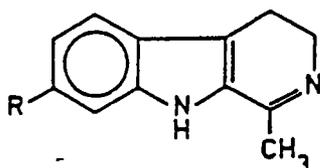
Ambuhl (1966) et Lohdefink et Kating (1974) ont isolé et confirmé l'existence de l'harmol.

Hultin (1965) a mis en évidence de l'harmaline, de l'harmalol, du méthylharmine et du N-méthylnorharmane.

Bennati (1967), Bennati et Fedelie (1968) et Lutomski et coll., (1980) ont isolé d'autres dérivés de l'harmane : harmaline et harmalol.



Harmane	R = H
Harmol	R = OH
Harmine	R = OCH ₃



Harmalol	R = OH
Harmaline	R = OCH ₃

Schéma I-1 Structures chimiques des alcaloïdes harmaniques de *Passiflora inacarnata*

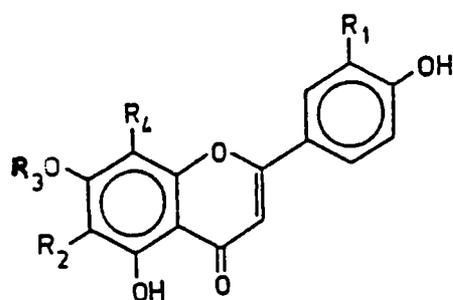
Recherche quantitative :

La recherche quantitative des alcaloïdes a été effectuée à l'aide de différentes méthodes analytiques : titration acidimétrique, détermination photométrique, dosage par spectrofluorométrie. La quantité d'alcaloïdes présente dans la plante est de l'ordre de 0,032 à 0,1%. (Löhdefink et Kating, 1974 ; Bennati, 1971))

2) Flavonoïdes

Les travaux de Gavasheli (1970) ont montré que la teneur des flavonoïdes chez *Passiflora incarnata* était variable en fonction de l'organe végétal et de la période de récolte ainsi il a constaté que la teneur des flavonoïdes avant la floraison, dans la plante, était respectivement pour les feuilles et la racine de 0,22 % et 0,35 % et que pendant la floraison cette teneur variait de 0,21 % à 0,31 % avec un minimum de 0,13 à 0,15 % à la fructification.

Lutomski (1960-1968) et Schilcher (1968) ont mis en évidence la présence des flavones -C- glycosides dans la passiflore.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Vitexine	H	H	H	C-glucose
Isovitexine	H	C-glucose	H	H
Orientine	OH	H	H	C-glucose
Isoorientine	OH	C-glucose	H	H
Saponarine	H	C-glucose	O-glucose	H

Schéma I-2 Structures chimiques des flavonoïdes de *Passiflora incarnata*

D'autres travaux ont permis de mettre en évidence cinq flavonoïdes principaux: Vitexine, isovitexine, orientine, isoorientine, de la saponarine et de la saponaretine. (Schilcher, 1968; Glotzbach et Rimpler, 1968; Löhdefink, 1976; Quercia, 1978)

Gavasheli (1970) et Gavasheli et coll. (1974) ont mis en évidence à l'état de trace de la rutine et de la quercétine.

Lutomski (1960) et Lutomski et coll. (1974) ont identifié, en faible quantité de l'apigénine, de la lutéoline et du kampférol.

Des C-hétérosides: le saponarol, le vitexol, l'isovitexol, l'orientol et l'isoorientol ont également été identifiés par Schilcher (1968) et Löhdefink (1976).

3) Maltol et Ethyl-maltol.

Les travaux de Lutomski et coll. (1960,1967,1968) ont permis de mettre en évidence la présence du maltol dans la Passiflore.

Ayoagi et Coll. (1974) ont confirmé la présence du maltol et identifié l'ethyl-maltol.

La quantité du maltol étant très faible dans la plante (0.05%).

4) Sucres

Gavasheli et coll. (1974) ont mis en évidence la présence du D-glucose, le D-fructose, le saccharose et le raffinose.

5) Des Hydroxycoumarines ont été identifiés au niveau des racines (ombelliférone et scopolétine) par Gavasheli (1973).

6) Acides Aminés.

Gavasheli et coll.(1974) ont mis en évidence la présence de 12 acides aminés banals.

D) PHARMACOLOGIE

1- Pharmacologie des extraits de *P. incarnata*

Passiflora incarnata est inscrite à la pharmacopée française depuis 1937 (Pharmacop. Fr., 1976).

Phares et Lindsay (1867) sont les premiers à avoir découvert l'activité sédative de *Passiflora incarnata* L.

Cette activité sédative a été confirmée par Bullington (1897) et Stapleton (1904) qui a également remarqué que cette activité est exempte d'effets secondaires et sans effets narcotiques ni stupéfiants, il a également considéré que *Passiflora incarnata* est un excellent remède des insomnies d'origine cérébrale.

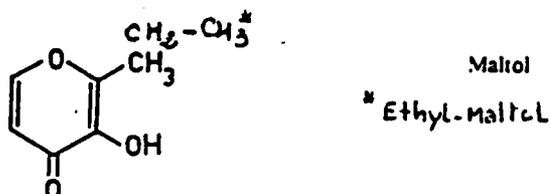


Schéma I-3 Structure chimique du maltol et de l'éthyl-maltol.

Paris et Moyse (1967) ont mis en évidence l'activité sédatrice de *Passiflora incarnata* sur la diminution de la motilité de la souris à la dose de 10 mg/kg de plante sèche.

George et coll. (1940) ont montré l'activité sédatrice de *Passiflora incarnata* sur le SNC et sur le coeur.

Lecoq et coll. (1964) ont recherché des activités sédatrices, hypnotiques et analgésiques par la technique chronaxométrique (*).

Della Loggia et coll. (1981) ont mis en évidence l'activité anxiolytique et potentialisatrice sur le sommeil barbiturique.

Nengebauer (1949) a mis en évidence l'activité sédatrice et l'activité périphérique de *Passiflora incarnata* sur l'intestin isolé de lapin, par une diminution du tonus et de la fréquence des contractions, avec augmentation de l'amplitude, à dose plus forte il a observé une inhibition de la contraction de l'intestin.

Speroni et Minghetti (1988) ont confirmé l'activité sédatrice de l'extrait de *Passiflora incarnata* et ont mis en évidence, par fractionnement de l'extrait, 2 fractions actives dont la structure définitive n'est pas encore élucidée.

2- Pharmacologie des molécules ou des groupes chimiques extraits de *P. incarnata*

a) Alcaloïdes

Ruff et coll. (1976) avaient constaté que les alcaloïdes extraits de la plante provoquaient une stimulation du système nerveux central à faible doses, alors qu'à fortes doses ils provoquaient une agitation motrice associée à une hallucination et des vomissements. (Zetter et coll., 1978)

Ambuhl (1966) a remarqué que *P. incarnata* avait une activité sédatrice plus lente et plus importante.

b) Maltol (Ayoagi et coll., 1974)

La dose létale 50 %, en s/c chez la souris, est de 820 mg/kg, l'injection en s/c de 400 mg/kg de maltol, chez la souris, produit une diminution de l'activité spontanée, une bradycardie, une hypothermie, un relâchement des muscles et une diminution du réflexe achilléen et cornéen. A 300 mg/kg le maltol provoque une dépression cérébrale et une potentialisation de l'effet de l'hexobarbital sur le sommeil. Aux fortes doses, il provoque une convulsion (500 mg/kg) et aux faibles doses, il inhibe l'activité motrice spontanée des souris.

(*) Technique consistant à mesurer la chronaxie, c'est à dire le temps séparant l'excitation du nerf et l'apparition de la dépolarisation sur l'écran de l'oscillographe.

c) Ethyl-maltol (Ayoagi et coll., 1974)

La dose létale 50 % est de 910 mg/kg chez la souris. Administré chez la souris Il a montré les mêmes actions que le maltol mais d'une façon moins importante. Il a une action anticonvulsivante, vis à vis du nitrate de strychnine à la dose de 300 mg/kg.

Le maltol testé individuellement provoque une dépression du SNC chez la souris et potentialise le sommeil à l'hexobarbital avec une action convulsivante aux fortes doses et une diminution de l'activité spontanée des animaux aux faibles doses.

L'ethyl-maltol possède une activité similaire au maltol mais avec une action plus convulsivante et une diminution moins importante de l'activité spontanée qu'avec le maltol.

Les propriétés pharmacologiques se trouvent modifiées à cause de la modification du groupement alkyl du maltol.

Il est donc difficile d'expliquer que les propriétés sédatives de *P. incarnata* sont seulement liées au maltol. (Ayoagi et coll 1974))

3) Toxicité

L'étude de la toxicité de *P. incarnata*, administrée en i.p. chez la souris, a montré :

- + à 250 mg/kg : une diminution de l'activité spontanée du rythme cardiaque et respiratoire.
- + à 1000 mg/kg : des tremblements puis la mort de l'animal.

CHAPITRE B : TRAVAUX PERSONNELS

I) ETUDES CHIMIQUES.

I-1) ETUDE CHIMIQUE DE *MELISSA OFFICINALIS L.*

Pour rechercher les composantes chimiques susceptibles d'être responsables de l'activité pharmacologique, nous avons procédé à une préparation d'un extrait hydroalcoolique et son fractionnement.

L'extrait hydroalcoolique est préparé à partir du cryobroyat de plantes fraîches, soumis à une macération à température ambiante dans une solution hydroalcoolique à 30 % (V/V) pendant 12 heures suivie d'une deuxième macération pendant 12 heures à 35°C. L'extrait obtenu est filtré, l'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite; puis l'extrait est lyophilisé.

Le lyophilisat obtenu représente un rendement de 26,15 % par rapport à la plante sèche.

Les fractions ont été obtenues par chromatographie sur colonne, réalisée au laboratoire de Pharmacognosie à l'Université de MARSEILLE.

10 g de lyophilisat hydroalcoolique de *M.officinalis*, sont déposés sur la colonne de chromatographie, la colonne est éluée par le mélange méthanol-eau dans les proportions 10 à 80 % (V/V), la migration se fait sous une pression de 1 mbar.

Pour chaque concentration en méthanol, quatre sous-fractions sont recueillies suivant un temps déterminé pour chaque sous fraction, lors du passage d'une concentration à l'autre en méthanol, le volume recueilli constitue le volume mort de chaque fraction.(tableaux 1 et 2)

I-2) ETUDE CHIMIQUE DE *PASSIFLORA INCARNATA L.*

2-1) Préparation des extraits

a) Extrait hydroalcoolique

Les extraits utilisés pour l'extraction et la révélation des flavonoïdes et des alcaloïdes proviennent d'un cryobroyat dont la préparation s'effectue de la façon suivante:

La plante fraîche portée à - 98° dans de l'azote liquide est broyée afin d'obtenir un cryobroyat qui sera conservé à très basse température.

Le cryobroyat utilisé pour l'ensemble de ces expériences est fourni par les laboratoires ARDEVAL.

Dans 900 ml d'une solution d'éthanol à 30 %, obtenue à partir d'une solution d'éthanol à 96 %, sont ajoutés 90 g de cryobroyat.

Le mélange est agité pendant 12 h à température ambiante puis placé dans une étuve à 37° durant 12 h.

Le macérat hydroalcoolique obtenu est alors filtré sur Büchner (filtration sous pression réduite).

Le filtrat recueilli est évaporé sous vide (Rotavapor-R, Büchi), à une température de 30-35°C afin d'éliminer le volume éthanolique.

La solution obtenue est lyophilisée (Lyophilisateur CD 52-1, Heto, Danemark).

b) Extrait aqueux

90 g de cryobroyat sont dissous dans 900 ml d'eau distillée.

Le protocole est ensuite le même que celui utilisé pour la préparation de l'extrait hydroalcoolique .

2-2) Calcul des rendements

Les extraits préparés sont destinés à l'analyse chimique et à différents tests pharmacologiques; aussi, pour calculer les correspondances en plante sèche de ces extraits, il est nécessaire de connaître les rendements entre cryobroyat, plante sèche et lyophilisat.

a) Rendement de la plante sèche dans le cryobroyat

Pour déterminer la quantité de plante sèche présente dans le cryobroyat, 2 g de cryobroyat sont soumis à une dessiccation dans une étuve à la température de 105°C.

Après environ 24 h, la plante sèche est pesée.

Soit m₂ la masse de la plante sèche obtenue, m₁ la masse du cryobroyat et R₁ le rendement de plante sèche dans le cryobroyat.

On a alors :

$$R_1 = \frac{\text{masse de plante sèche (m}_2\text{)}}{\text{masse de cryobroyat (m}_1\text{)}} \times 100$$

$$\text{C'est à dire : } R_1 = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

b) Rendement du lyophilisat dans la plante sèche

Après lyophilisation des 90 g de cryobroyat, les lyophilisats (l'un obtenu par extraction hydroalcoolique, l'autre par extraction aqueuse) sont pesés et leurs rendements par rapport à la plante sèche calculés :

Soit m_4 la masse de lyophilisat obtenu, m_3 la masse de plante sèche présente dans 90 g déterminée à partir de R1, et R2 le rendement de lyophilisat dans la plante sèche est alors de :

$$R2 = \frac{m_4}{m_3} \times 100$$

avec $m_3 = 90 \times R1$

I-2-3) Chromatographie sur couche mince (C.C.M.)

a) Recherche des flavonoïdes

a-1) Matériel

a-1-1) Support :

plaque de silice Kieselgel G 60 (Merck, Ref.5721)

a-1-2) Solvant :

Acide formique - Eau - Méthyléthylcétone -

Acétate d'éthyl (10/20/30/50; V/V)

a-1-3) Réactif de détection :

Réactif de Neu (ou diphenylborate d'amino

éthanol R 1% dans du méthanol) - Polyéthylèneglycol

4000 R 5% dans du méthanol

Après séchage à l'air, de la plaque pendant 30 mn, le réactif est pulvérisé et les tâches sont observées en lumière UV (365 nm).

a-1-4) Solutions témoins :

Les produits de référence utilisés sont les

suivants :

Orientine - Isoorientine - Vitexine - Isovitexine (Extrasynthèse Genay, (69) F.)

0,5 mg de chaque solution sont dissous dans 5 ml de méthanol

dépot de 10 μ l.

a-1-5) Extraits végétaux.

* Extrait aqueux : 0,3186 g de lyophilisat (1g de plante sèche) sont dissous dans 10 ml d'éthanol à 60 %.

** Extrait hydroalcoolique: 0,3114 g de lyophilisat (1 g de plante sèche) sont mélangés à 10 ml d'éthanol à 60 %

a-2) Mode opératoire

a-2-1) Préparation des extraits végétaux

a-2-1-1) Extraction de flavonoïdes à partir de la plante sèche (Fa)

A 1 g de plante sèche obtenu par dessiccation de 4.29 g de cryobroyat (calcul réalisé à partir du rendement R1), sont ajoutés 10 ml d'éthanol à 60 %.

Après 10 mn au bain marie à 60°C sous agitation, puis après refroidissement, la solution est évaporée à siccité.

Le résidu obtenu est dissous dans 2 ml d'éthanol 60 %.

a-2-1-2) Recherche de flavonoïdes dans le cryobroyat (Fb)

A 1 g de cryobroyat est ajouté 1 ml de méthanol; la solution est filtrée et le filtrat est récupéré pour l'analyse chromatographique.

a-2-1-3) Extraction des flavonoïdes à partir du lyophilisat préparé par extraction hydroalcoolique (Fc)

A 0.3186 g de lyophilisat (équivalent de 1 g de plante sèche déterminé grâce au rendement R2), sont ajoutés 10 ml d'éthanol à 60 %.

Après 10 mn au bain marie à 60°C, sous agitation, puis refroidissement, la solution est évaporée à siccité.

Le résidu obtenu est dissous dans 2 ml d'éthanol 60°.

a-2-1-4) Extraction des flavonoïdes à partir du lyophilisat préparé par extraction aqueuse.(Fd)

A 0.3114 g de lyophilisat, sont ajoutés 10 ml d'éthanol à 60°.

Le protocole est ensuite identique au protocole du lyophilisat hydroalcoolique.

a-2-2) Préparation des solutions témoins

0.5 mg de chaque témoin (orientine, isoorientine, vitexine et isovitexine) est dissous dans 5 ml de méthanol.

a-3) Chromatographie.

10 μ l de chaque solution (solutions à examiner et solutions témoins) sont déposés sur 2 plaques de chromatographie. Après migration du solvant sur un front de 15 cm, les plaques sont retirées et séchées à l'air. Après pulvérisation du réactif de Neu, les plaques sont de nouveau séchées à l'air pendant 30 mn, puis examinées en lumière ultraviolette à 365 nm et les Rf sont notés.

b) Recherche des alcaloïdes

b-1) Matériel

b-1-1) Support :

Plaque de silice Kieselgel G 60 (Merck, Ref.5721)

b-1-2) Solvant :

Les solvants qui ont été utilisés :

1/ Toluène - Acétate d'éthyle - Diéthylamine

(70/20/10; V/V)

2/ Ammoniaque concentrée R - Méthyléthylcétone -

Ether R -(4/32/64; V/V)

b-1-3) Réactif de détection :

Réactif de Dragendorff, formule de Munier et

Macheboeuf :

L'obtention de ce réactif nécessite la préparation préalable de 2 solutions :

- **une solution A :**

Sous-nitrate de bismuth (0.85 g) - Acide

acétique (10 ml) - Eau (40 ml)

- **une solution B :**

Iodure de potassium (8 g) - Eau (20 ml)

Le réactif final est obtenu par addition de :

Solution A (5 ml) - Solution B (5 ml) - Acide

acétique (20 ml) - Eau (70 ml)

b-1-4) Solutions témoins :

Les solutions de référence utilisées sont les suivantes :

Harmane - Harmine - Harmaline - Harmol - Harmalol (Sigma, France).

1 ml de chaque solution témoin est dissous dans 5 ml de méthanol R.

Dépôt: 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 et 80 μ l de chaque solution témoin sont déposés sur la plaque afin de déterminer le Rf et le seuil de détection.

b-1-5) Extraits végétaux.

Différentes préparations sont utilisées :

- + préparation n°1: dépôt après extraction d'alcaloïdes à partir du cryobroyat.
- + préparation n°2: dépôt après extraction d'alcaloïdes à partir du lyophilisat aqueux.
- + préparation n°3: dépôt après extraction d'alcaloïdes à partir du lyophilisat hydroalcoolique
- + préparation n°4: dépôt du cryobroyat lyophilisé.
- + préparation n°5: dépôt du lyophilisat hydroalcoolique.(EH1)
- + préparation n°6: dépôt du lyophilisat aqueux (EH2)
- + préparation n°7: dépôt du lyophilisat du résidu aqueux (EH5).
- + préparation n°8: dépôt après extraction d'alcaloïdes du cryobroyat.

b-2) Mode opératoire

b-2-1) Préparation des extraits végétaux

La mise en évidence des alcaloïdes a été réalisée sur différentes préparations végétales :

Préparation n°1 : (Alc1)

Préparation réalisée à partir du Cryobroyat :

A 214,59 g de Cryobroyat, (correspondant à 50 g de plante sèche) sont ajoutés 400 ml de méthanol R; La solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 1 h.

Après refroidissement, et filtration sous vide; le filtrat recueilli est évaporé à siccité au rotavapor.

Le résidu obtenu est mis en contact avec 150 ml d'une solution d'acide sulfurique R à 0.5 % (m/v) pendant 15 mn en agitant de temps à autre : en milieu acide en effet, les alcaloïdes se transforment en sels d'alcaloïdes solubles dans l'eau où les pigments chlorophylliens sont par contre insolubles.

La solution est ensuite filtrée sur papier filtre, la filtration permettant de retenir les pigments.

La solution est alors alcalinisée jusqu'à pH = 9 (pH mètre) avec une solution d'hydroxyde de potassium 20 % (m/v).

Elle est épuisée avec 3 fois 30 ml de chloroforme à l'aide d'une ampoule à décanter. Les 3 phases chloroformiques sont réunies puis filtrées sur sulfate de sodium anhydre. Elles sont alors évaporées au rotavapor pour éliminer le chloroforme.

1 ml de méthanol R est ajouté au résidu obtenu.

Préparation n°2 : (Alc2)

Préparation réalisée à partir d'un lyophilisat aqueux :

La masse équivalente, en lyophilisat aqueux, de 16,6 g de plante sèche à savoir 5.2 g de lyophilisat (d'après le rendement R3), sont utilisés pour cette extraction

Le protocole est ensuite identique au protocole précédent mais avec :

Volume de méthanol ajouté : 133 ml

Volume de chloroforme utilisé : 3 fois 10 ml

Volume de méthanol ajouté au résidu final : 1 ml

Préparation n°3 : (Alc3)

Préparation réalisée à partir du lyophilisat hydroalcoolique :

la masse équivalente, en lyophilisat hydroalcoolique, de 16,66 g de plante sèche à savoir 5.31 g de lyophilisat (d'après le rendement R3), sont utilisés pour cette extraction. Le protocole est ensuite identique au protocole de la préparation n°1 mais avec :

Volume de méthanol ajouté : 133 ml

Volume de chloroforme utilisé : 3 fois 10 ml

Volume de méthanol ajouté au résidu final : 1 ml

Préparation n°4 : (Alc4)

Préparation réalisée à partir de cryobroyat lyophilisé :

A de 214,59 g de cryobroyat (correspondant à 50 g de plante sèche), sont ajoutés 400 ml de méthanol R.

Le protocole est ensuite identique au protocole de la préparation n°1 mais avec : temps de contact de la plante et de l'acide sulfurique : 14 h (au réfrigérateur), ce qui a permis de diminuer la quantité de pigments chlorophylliens dans l'extrait.

Préparation n°5 : (Alc5)

Préparation réalisée à partir d'un lyophilisat hydroalcoolique EH1

1 mg de lyophilisat est dissous dans 1 ml de méthanol R.

Préparation n°6 : (Alc6)

Préparation réalisée à partir d'un lyophilisat aqueux EH2

1 mg de lyophilisat est dissous dans 1 ml de méthanol R.

Préparation n°7 : (Alc7)

Préparation réalisée à partir d'un résidu de lyophilisat aqueux EH5 :

1 mg de lyophilisat est dissous dans 1 ml de méthanol R.

Préparation n°8 : (Alc8)

Autre préparation réalisée à partir du Cryobroyat :

A l'équivalence en Cryobroyat de 75 g de plante sèche, c'est à dire à 321,88g de Cryobroyat, sont ajoutés 400 ml de méthanol R; la solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 1h.

Après refroidissement, elle est filtrée sous vide; le filtrat recueilli est évaporé à siccité au rotavapor.

Le résidu obtenu est mis en contact avec 225 ml d'une solution d'acide sulfurique R à 0.5 % (m/v) pendant 15 mn en agitant de temps à autre. La solution est ensuite filtrée sur papier filtre.

La solution est alors alcalinisée jusqu'à pH = 9 (PHmètre) avec une solution d'hydroxyde de potassium 20 % (m/v) Elle est épuisée avec 3 fois 45 ml de chloroforme, le solvant est évaporé à siccité puis le résidu est repris dans 1 ml de CHCL3.

b-2-2). Préparation des solutions témoins

Chaque solution témoin : harmine, harmane, harmol, harmaline, et harmalol est préparée de la façon suivante:
1 mg de chaque témoin est dissous dans 5 ml de méthanol R.

b-3) Chromatographie

Différentes quantités de chaque préparation (solutions à examiner et solutions témoins) sont déposées sur des plaques de chromatographie qui sont alors introduites dans la cuve à solvant.

Après migration du solvant sur un front de 15 cm, les plaques sont retirées puis séchées dans une étuve entre 100 et 105°C pendant 10 mn.

Le réactif de détection est alors pulvérisé .

Les quantités déposées sont rassemblées dans le tableau suivant:

Témoins	Quantités déposées (μ l)
Flavonoïdes	40 ; 60
Alcaloïdes	5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 80

Préparations	Quantités déposées (μ l)
Flavonoïdes	10 ; 30
Alcaloïdes :	
Alc1	20 ; 40 ; 60
Alc2	20 ; 40 ; 60 ; 200
Alc3	20 ; 40 ; 60 ; 170
Alc4	120 ; 240
Alc5,6,7	40
Alc8	40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 120

I-2-4) **RESULTATS :**

I-2-4-1) Melissa officinalis :

Les fractions ainsi que les sous fractions obtenues sont résumées sur le tableau 1.

Le tableau 2 rassemble les valeurs de la masse initiale du lyophilisat de départ (ayant été utilisées pour l'extraction méthanolique = 8,37 g) et des masses respectives de chacune des différentes sous fractions obtenues par chromatographie sur colonne.

Les masses des différentes sous-fractions ne présentent, chacune, que 60 à 66 % de la masse réelle.

La perte est de 8,95 % par rapport à la masse de départ. Ces valeurs permettent de calculer les doses d'extrait à administrer à l'animal pour la recherche des effets pharmacologiques.

La révélation des différentes sous fractions à l'aide de chromatographie en couche mince (CCM) a permis, d'une part de rassembler les fractions présentant les mêmes tâches, d'autre part de ne tester que les sous fractions dont les tâches présentaient des différences tant au niveau de leur migration qu'à celui de leur révélation et de n'entreprendre une recherche approfondie pour l'identification des différentes fractions que si les résultats pharmacologiques sont positifs avec l'une ou plusieurs de l'ensemble des fractions; par conséquent, 7 fractions sur 16, seulement, ont été sélectionnées et testées en pharmacologie en raison des différences présentes au niveau de leur migration et leur révélation.

I-2-4-2) Passiflora incarnata

A) Calcul des rendements

A-1) Rendement en plante sèche dans le cryobroyat

5 pesées ont été effectuées; les résultats obtenus sont les suivants :

	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
Pesées (g)	0,44	0,50	0,50	0,42	0,47
Moyenne des 5 pesées	0,466 g				

D'où le calcul du rendement :

$$R1 = 0,466/2.100$$

$$R1 = 23,3 \%$$

100 g de cryobroyat renferment donc 23,3 g de plante sèche.

A-2) Rendement du lyophilisat dans la plante sèche :

Les masses de lyophilisats obtenues sont les suivantes :

Lyophilisat hydroalcoolique : 6,68 g

Lyophilisat aqueux : 6,53 g

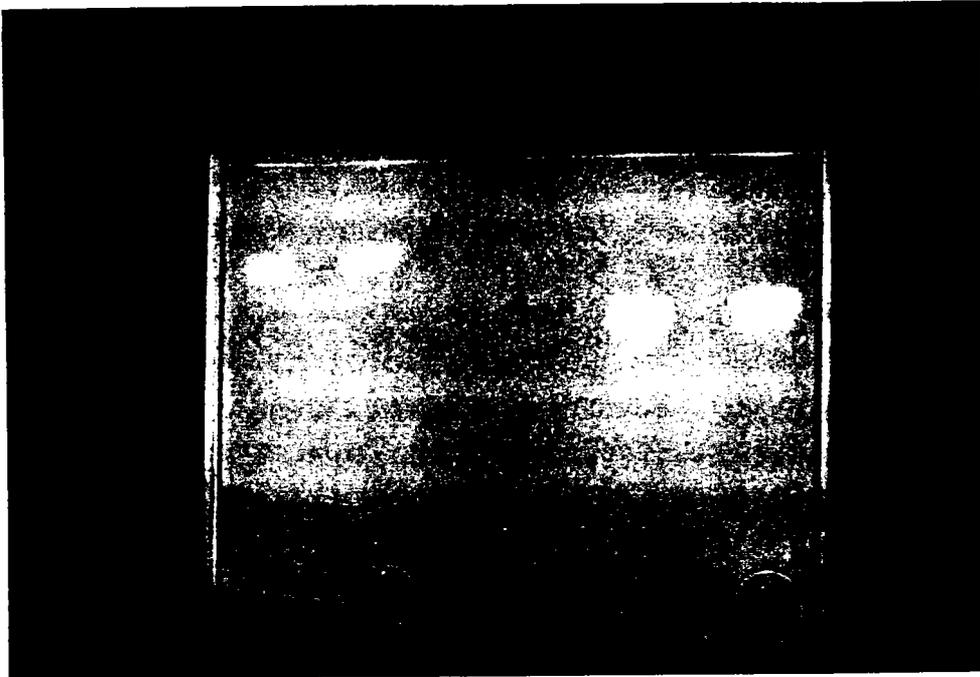
B) Identification des flavonoïdes

B-1) Résultats obtenus après CCM des témoins

Les échantillons témoins (Orientine, Isoorientine, Vitexine, Isovitexine), après pulvérisation du réactif de Neu et du Polyéthylèneglycol 4000, se colorent en jaune, qui apparait plus ou moins nuancé sous lumière ultraviolette (365 nm).

Les couleurs caractéristiques, ainsi que les fronts de migration (Rf) des différents témoins, sont rassemblés dans le tableau suivant :

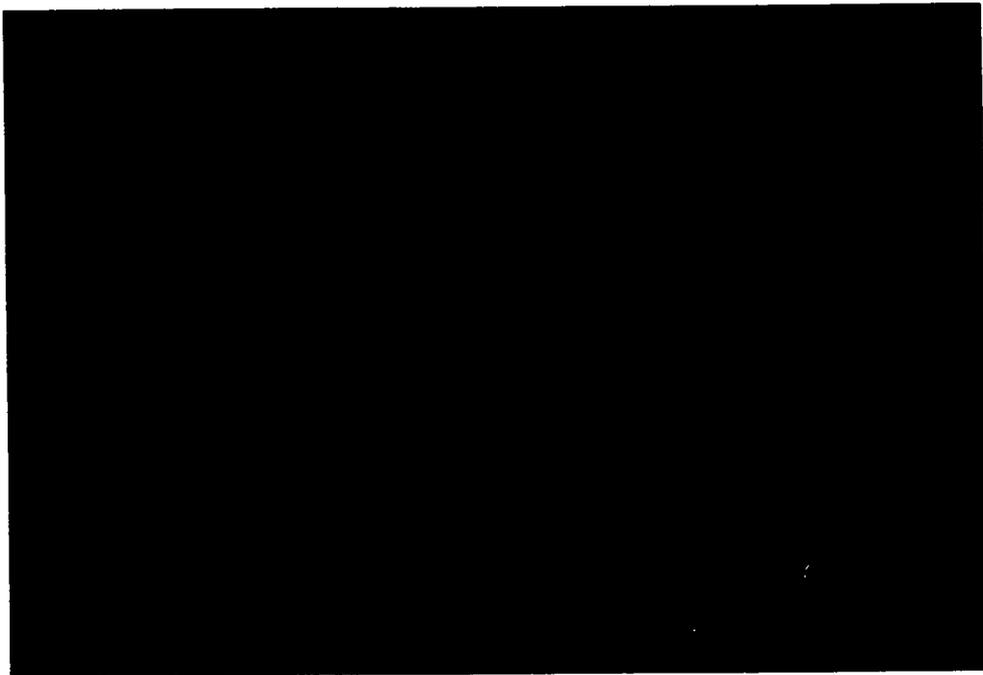
	Couleur	Rf
Orientine	Jaune orangé clair	0.73
Isoorientine	Jaune orangé plus foncé	0.62
Vitexine	Jaune vert	0.80
Isovitexine	Jaune vert	0.70



Vitexine

Isovitexine

Photo 1 Identification des flavonoïdes
Vitexine - Isovitexine



Orientine

Isoorientine

Photo 2 Identification des flavonoïdes
Orientine - Isoorientine.

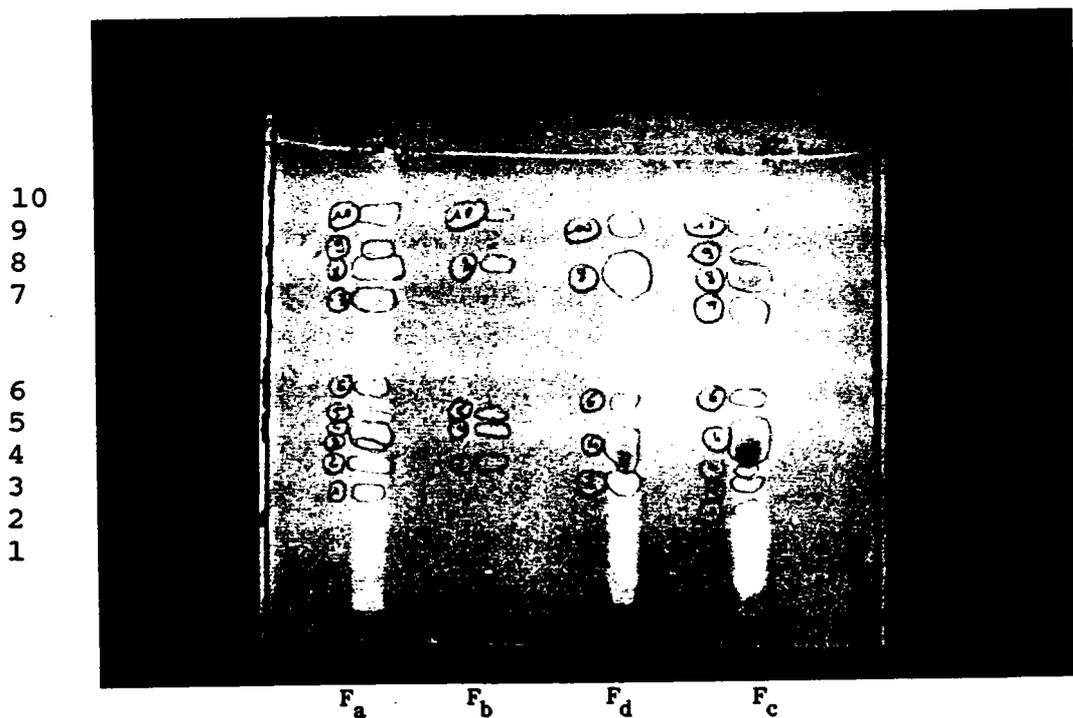


Photo 3 Identification des flavonoïdes dans différentes préparations végétales de *passiflora incarnata*

B-2) Résultats obtenus après CCM des différents extraits

végétaux de *P. incarnata*

Préparations	Couleur	Rf	Témoin correspondant
Fa. : Cryobroyat avec extraction	Jaune orangé	0.73	Orientine
	Orange	0.62	Isorientine
	Jaune vert	0.80	Vitexine
	Jaune vert	0.70	Isovitexine
Fb. : Cryobroyat sans extraction			
	Jaune vert	0.80	Vitexine
	Jaune vert	0.70	Isovitexine
Fd. : Lyophilisat hydroalcool.	Jaune orangé	0.73	Orientine
	Orange	0.62	Isorientine
	Jaune vert	0.80	Vitexine
	Jaune vert	0.70	Isovitexine
Fc. : Lyophilisat aqueux			
	Jaune vert	0.80	Vitexine
	Jaune vert	0.70	Isovitexine

C) Identification des alcaloïdes

C-1) Résultats obtenus après CCM des échantillons témoins

Avec le réactif de Dragendorff les témoins se colorent en orange plus ou moins prononcé.

Leurs couleurs caractéristiques ainsi que leurs Rf sont présentés dans le tableau suivant :

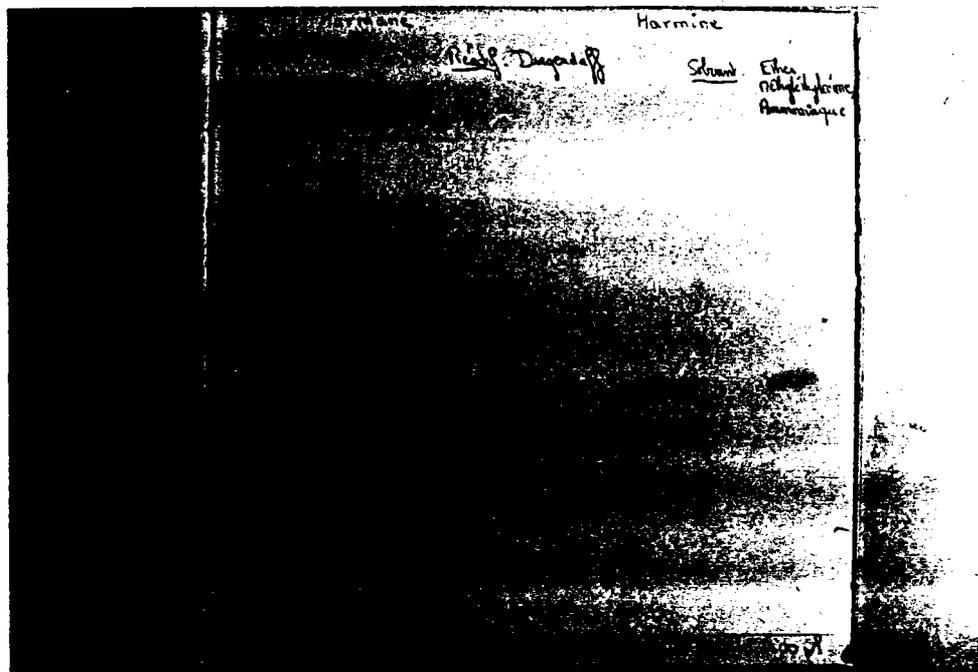
	Couleur	Rf
Harmame	Orange foncé	0.60
Harmine	Orange	0.47
Harmaline	Orange foncé	0.12
Harmol	Orange	0.30
Harmalol	Orange rosé	0.08

C-2) Résultats obtenus après CCM des différents extraits

végétaux de *P. incarnata* :

Seul le chromatogramme obtenu à partir de la préparation N°8 a présenté des taches intéressantes :

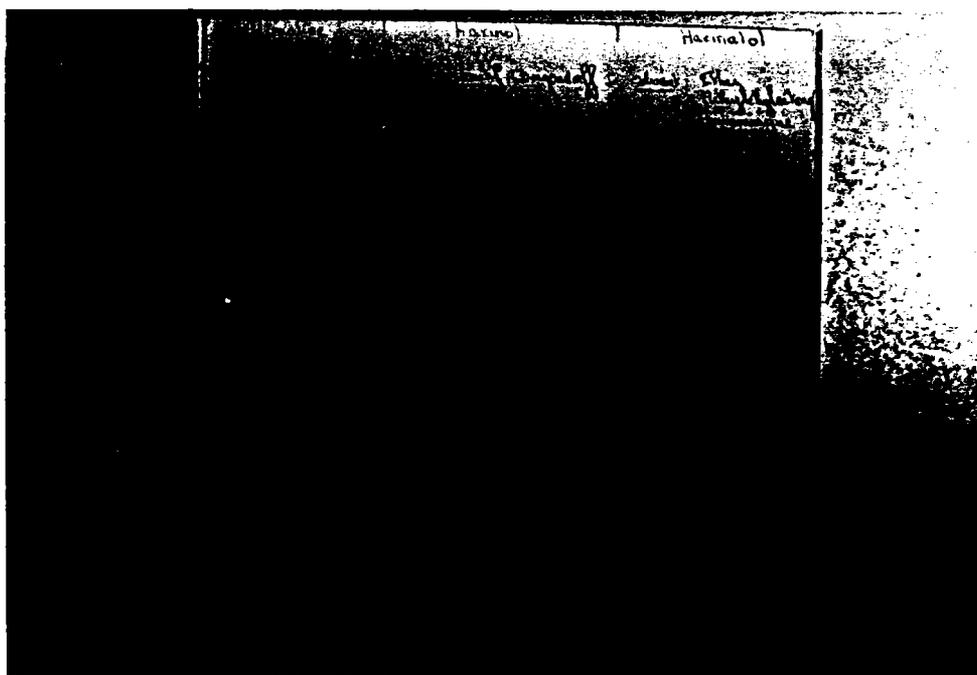
Préparation	Couleur	Rf	Témoin correspondant
N°8	Orange foncé	0.08	Harmalol
	Orange pâle	0.12	Harmaline



Harmane

Harmine

Photo 4 Identification des alcaloïdes
Hramane - Harmine



Harmaline

Harmol

Harmalol

Photo 5 Identification des alcaloïdes
Harmaline - Harmol - Harmalol

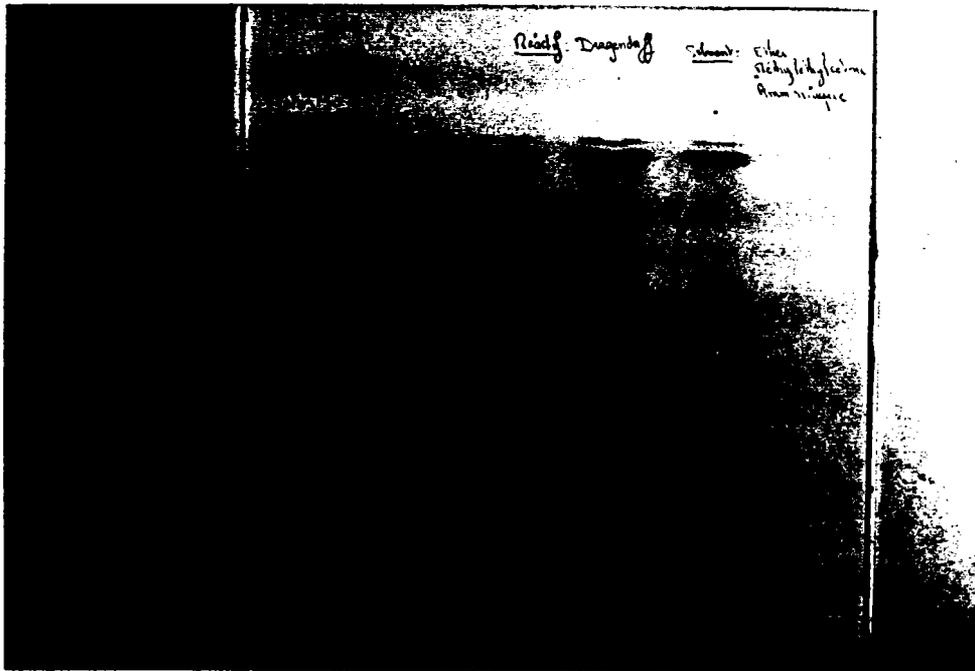


Photo 6 Identification des alcaloïdes dans le cryobroyat
de passiflora incarnata

I-2-5) CONCLUSION

A) LES ALCALOIDES

Le chromatogramme obtenu à partir des préparations N° 1,2,3,4,5,6 et 7, ne présente aucune des bandes orangées visibles sur le chromatogramme des échantillons témoins; les seules tâches obtenues sont des tâches vertes et jaunes caractérisant la présence de pigments chlorophylliens (chlorophylle a, chlorophylle b et carotène) dans les extraits.

Sur le chromatogramme obtenu à partir de la préparation N°8, figurent deux bandes orangées : (par ordre croissant de Rf)

- * L'une, qui pourrait correspondre à l'harmalol.
- * L'autre qui paraît semblable, quant à sa position, à l'harmaline.

B) LES FLAVONOIDES

Le chromatogramme obtenu avec les solutions préparées à partir de la plante sèche et du lyophilisat hydroalcoolique, présente, dans la moitié supérieure 4 bandes fluorescentes.

par ordre croissant de Rf, on observe :

- Une bande orange qui est semblable, quant à sa position et sa fluorescence, à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin d'isorientine.
- Une bande jaune vert qui correspond à la bande obtenue avec l'isovitexine.
- Une bande jaune orangée caractéristique de l'orientine.
- Une bande jaune vert qui correspond quant à sa position et sa couleur à celle de la vitexine.

Le chromatogramme obtenu avec les solutions préparées à partir du cryobroyat et du lyophilisat aqueux est dépourvu des bandes oranges et jaunes orangé, correspondant quant à leur position et leur couleur à l'isorientine et l'orientine:

- L'absence de ces deux flavonoïdes dans la solution préparée à partir du cryobroyat est sans doute due au fait que cette préparation n'a pas permis une concentration suffisante des flavonoïdes dans l'extrait végétal et que seuls vitexine et isovitexine, présents en quantité plus importante que orientine et isoorientine, ont pu être détectés.

I-2-6) DISCUSSION

L'ensemble des résultats révèle la présence de flavonoïdes du type orientine, isoorientine, vitexine et isovitexine dans les différents extraits étudiés, la teneur de ces flavonoïdes dans la plante étant de 0,15 à 0,30 % (Gavasheli, 1970) leur mise en évidence n'a présenté aucune difficulté; par contre, la chromatographie sur couche mince n'a pas permis de détecter tous les alcaloïdes et en particulier l'harmane, l'harmine et l'harmol en raison de leur faible teneur dans la plante qui ne présente que 0,03 à 0,1 % (Neu, 1954; Löhdefin et Kating, 1974) ce qui rend leur mise en évidence, du moins par la technique de C.C.M., relativement difficile, donc leur présence dans nos différents extraits étudiés serait sous forme de traces.

PARTIE I
ETUDES PHARMACOLOGIQUES

II) ETUDES PHARMACOLOGIQUES

II-1) Préparation des extraits.

II-1-1) Les extraits de *Melissa officinalis* L.

a) Extrait hydroalcoolique et huile essentielle

Deux lots d'extrait hydroalcoolique référencés (MOLI 1.1087 et MOLI 2.088) ont été préparés à partir du cryobroyat de plantes fraîches fourni par les laboratoires ARDEVAL; le cryobroyat est soumis à une macération à température ambiante dans une solution hydroalcoolique à 30 % (V/V) pendant 12 heures, suivie d'une deuxième macération pendant 12 heures à 35°C. L'extrait obtenu est filtré, l'éthanol est éliminé par évaporation sous vide, puis l'extrait est lyophilisé. Le lyophilisat obtenu représente un rendement de 17,8 % par rapport à la plante sèche pour MOLI 1.1087 et 26,9 % pour MOLI 2.0788. Les résultats sont exprimés en mg de plante sèche et non en mg d'extrait.

L'huile essentielle a été extraite au laboratoire ARDEVAL à partir de cryobroyat de *M.officinalis*.

b) fractions

Les fractions ont été obtenues par chromatographie sur colonne, réalisée au Laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Marseille, à partir de 10 g d'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis*., le méthanol est ajouté à des concentrations progressives comprises entre 10 et 80 % (V/V).

Pour chaque concentration en méthanol, quatre sous fractions sont recueillies suivant un temps déterminé pour chaque sous-fraction.

Les sous-fractions ainsi obtenues sont résumées sur le tableau 1

Tableau 1 : Fractionnement de MO par chromatographie et élution par le méthanol

Teneur en méthanol des fractions	sous-fraction obtenue	Nombre de fractions	Sous-fractions testées
10 %	- I - II - III+VM*	3	I : A III+VM : B
30 %	- I - II+III - VM	3	II+III : C VM : D
60 %	- I - II+III+VM	3	I : E II+III+VM : F
80 %	- I+II+III+VM	3	I+II+III+VM : G

* VM = volume mort

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des masses des différentes fractions obtenues.

Lyophilisat	Masse de départ : 8.37 g									
	10 %			30 %			60 %		80 %	Total
Fractions	I	II	III + VM	I	II + III	VM*	I	II + III + VM	I + II + III + VM	
masse obtenue (en mg)	3485	746	93	158	82.7	10.5	109	193	203	6081
masse totale calculée (en mg)	6228	1119	140	237	128	16.6	163	289	305	7665
masse totale théorique (en mg)	6696	1219	152	259	139	17	176	315	332	8307

* VM : volume mort

Le tableau 2 rassemble les valeurs de la masse initiale du lyophilisat (8,37 g) et des masses respectives de chacune des différentes sous-fractions obtenues par chromatographie sur colonne.

Les masses des différentes sous-fractions ne présentent chacune que 60 à 66 % de la masse réelle. La perte est de 8,95 % par rapport à la masse de départ. Ces valeurs permettent de calculer les doses d'extrait à administrer à l'animal pour la recherche des effets pharmacologiques.

La révélation des différentes sous-fractions à l'aide de chromatographie en couche mince (CCM) a permis, d'une part de rassembler les fractions présentant les mêmes tâches, d'autre part de ne tester que les sous-fractions dont les tâches présentaient des différences tant au niveau de leur migration qu'à celui de leur révélation. Par conséquent, 7 fractions sur 16, seulement, ont été testées.

II-1-2) Les extraits de *Passiflora incarnata* L.

a) Extrait hydroalcoolique Pi1

L'extrait Pi1 a été préparé à partir d'un cryobroyat de plantes fraîches (Lot 191 et référencé PILI.287.89) fourni par les laboratoires ARDEVAL, soumis à une macération à température ambiante dans une solution hydroalcoolique à 30 % (V/V) pendant 12 heures, suivie d'une macération pendant 12 heures à 35°C. L'extrait obtenu est filtré, l'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite, puis l'extrait est lyophilisé (extrait Pi1). Le rendement de la lyophilisation est de 13,89 %, par rapport au poids initial de plante sèche, les doses utilisées sont exprimées en mg de plante sèche.

b) Extrait aqueux Pi2

L'extrait aqueux Pi2 est préparé selon le même mode opératoire, avec de l'eau distillée.

c) Extrait Pi3 et Pi4

Les extraits Pi3 et Pi4 sont réalisés à partir de l'extrait aqueux Pi2 et ont été préparés de la façon suivante: A partir d'un lyophilisat de l'extrait aqueux, on prélève l'équivalent de 8 g en plante sèche auquel on ajoute 100 ml d'alcool à 30 % pour obtenir une solution hydroalcoolique à 30 % de 8000 mg/100 ml prête à être administrée aux animaux à la dose de 800 mg/10ml/kg, après élimination de l'alcool.

Cette solution est séparée en 2 fractions:

* la fraction Pi3 obtenue par l'élimination immédiate de l'alcool (Tableau 3).

* la fraction Pi4 est conservée pendant 7 jours à l'abri de la lumière et à température ambiante puis l'alcool est éliminé au bout des 7 jours avant l'utilisation pour les tests pharmacologiques. (Tableau 3)

TABLEAU No 3

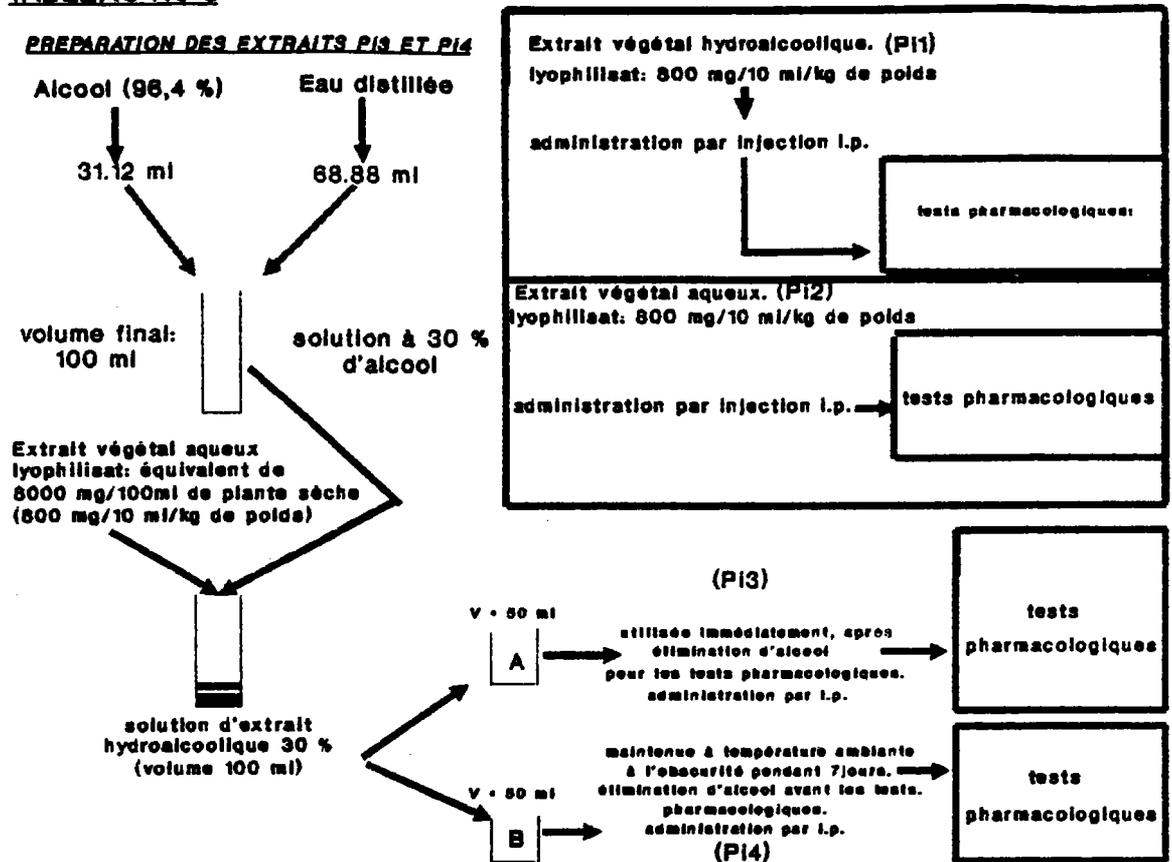
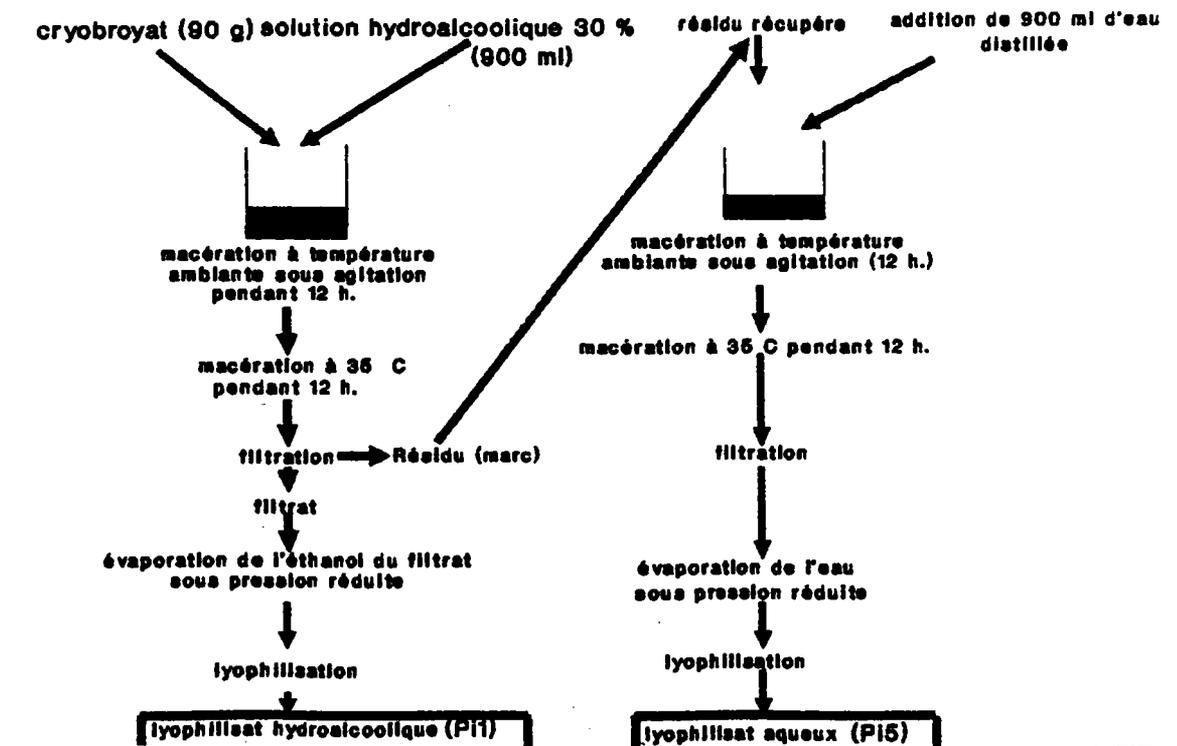


TABLEAU No 4

Préparation de l'extrait P15 à partir du résidu obtenu après réalisation de l'extrait P11.



c) Extrait Pi5

L'extrait Pi5 est préparé de la façon suivante:

90 g (cryobroyat) + 900 ml (solution hydroalcoolique 30 %).

macération, à température ambiante pendant 12 heures

macération à 37°C pendant 12 h.

filtration.

filtrat évaporé et lyophilisé pour préparation du

lyophilisat hydroalcoolique semblable à (Pi1).

Le résidu ou marc est repris dans 900 ml

d'eau distillée.

macération à température ambiante pendant 12 h.

macération à 37°C pendant 12 h.

évaporation et lyophilisation : Pi5. (Tableau 4)

II-2) Animaux.

Les souris mâles hétérozygotes, utilisées dans la plupart des tests, 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. Les tests pharmacologiques sont effectués sur des animaux âgés de 11 à 14 semaines (élevage Césal, Montmédy (55) et Janvier, Le Genest (53)). Dès leur réception, les animaux 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 de 12 heures d'obscurité et maintenue à une température constante de 21°C ± 1°C.

Les souris, utilisées dans le test du milieu nouveau, élevées 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°C ± 1°C.

L'eau et la nourriture (croquettes complètes et vitaminées M25 Extra-labo, Provins (77)) sont fournies à volonté pour les souris. 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.

Les produits de référence et les extraits de plantes sont dissouts dans un volume de 10 ml de NaCl 0,9 %. NaCl 0,9 % est utilisé comme témoin et solvant de préparation des substances et extraits à administrer en i.p..

II-3) RECHERCHE DES PROPRIETES NEUROTROPES

II-3-1) PROPRIETES SEDATIVES ET/OU ANXIOLYTIQUES

II-3-1-1) Introduction

A) Propriétés sédatives et anxiolytiques

Depuis les travaux de Delay et coll. (1952) concernant l'emploi thérapeutique psychiatrique du premier neuroleptique synthétisé, la chlorpromazine, les substances psychotropes sont classées en trois groupes principaux:

- Les psycholeptiques (hypnotiques, neuroleptiques ou tranquillisant 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 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).

En effet si de nombreuses substances très différentes, telles que certains neuroleptiques, hypnotiques ou antidépresseurs, mais également la morphine et certains agents β -bloquants ont une certaine activité anxiolytique plus ou moins prononcée, les médicaments thérapeutiques employés pour un tel effet principal sont représentés par les tranquillisants mineurs, encore appelés, de ce fait, "anxiolytiques", 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. 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 (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 neurotropes, 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'encontre 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, 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).

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, plus 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.

*** Modèles expérimentaux chez l'animal**

Concernant les effets neurotropes 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 déprimeurs centraux (hypnotiques, anesthésiques généraux, alcool ...), ainsi que par la suppression de tous les réflexes conditionnés pré-établis.

La recherche de ces propriétés sédatives est réalisée grâce à l'étude du comportement d'un petit rongeur, la souris, confronté à diverses situations particulières contraignantes ou non.

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 non familier, dépourvu de ces repères familiers, constitue une situation très aversive et anxiogène (situation contraignante) et a pour effet d'entraîner une inhibition du comportement général de l'animal dans ce milieu non familier (Misslin et coll., 1982), phénomène non observé lorsque la continuité topographique entre les milieux nouveaux et familiers est maintenue, c'est à dire lorsque l'animal peut accéder librement de son milieu familier au milieu nouveau sans aucune contrainte.(situation non contraignante)

Quant aux propriétés anxiolytiques, le problème majeur, posé par l'étude d'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 et à fortes doses de renforcer cette inhibition.

Ainsi, cette action désinhibitrice observée chez l'animal est généralement corrélée 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 se manifester à faibles doses et constituer un début d'une activité sédative qui ne se manifeste qu'à plus fortes doses.

Divers autres modèles expérimentaux, peuvent être utilisés pour cette recherche de propriétés anxiolytiques :

Ainsi, le test de l'escalier (test contraignant), précédemment utilisé lors de la confirmation d'effets sédatifs, 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 familier 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 neurotropes sédatives et/ou anxiolytiques pour les extraits hydroalcoolique et aqueux de *Melissa officinalis* et de *Passiflora incarnata* par la réalisation de ces expérimentations non contraignantes (test du milieu nouveau) et contraignantes (test de l'escalier et test de la chambre claire/obscur).

Dans la mesure où les hypothèses de départ, concernant des effets sédatifs et/ou anxiolytiques, sont toutes ou en partie vérifiées, il n'est pas envisageable d'effectuer la recherche d'une activité neurotrope, sans aborder leurs effets hypnotiques très souvent associés à cette activité neurotrope.

C'est pourquoi, après la mise en évidence d'effets sédatifs et anxiolytiques des extraits de *Melissa officinalis* et de *Passiflora incarnata*, 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.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces trois expérimentations, non contraignante (test d'exploration d'un milieu nouveau) ou contraignantes (test de l'escalier et chambre claire/obscur), ainsi que les expérimentations sur l'induction et la potentialisation du sommeil barbiturique, devraient permettre de confirmer ou non l'existence de propriétés sédatives ou/et anxiolytiques et les propriétés hypnotiques pour les différents extraits de *Melissa officinalis* et de *Passiflora incarnata*.

A-1) Tests comportementaux

L'administration préventive d'une substance dotée de propriétés neurotropes doit donc soit lever cette inhibition (anxiolyse) soit la renforcer (sédation) ce qui peut se traduire, au niveau expérimental, par l'augmentation ou la réduction de certains paramètres comportementaux, 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 à l'effet des substances étudiées sur le comportement de l'animal.

Seul l'ensemble de ces méthodes peut présenter une certaine valeur prévisionnelle et permettre de confirmer ou non l'existence d'une activité neurotrope.

D'une façon très générale, deux grands types expérimentaux peuvent être distingués : d'une part, les expérimentations non contraignantes et dont le modèle utilisé est le test du milieu nouveau; d'autre part les expérimentations contraignantes, dites paradoxalement de "situation libre" et dont les modèles utilisés sont le test de l'escalier et le test de la chambre claire/obscur.

* Le premier 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 familial et auquel il peut se soustraire à tout moment en retournant dans le compartiment familial. La conservation des repères familiaux, grâce au maintien de la continuité topographique entre les milieux nouveaux et familial, 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 familial), les comportements autoplastiques (toiletage, 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 précédents 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 par l'étude de l'activité locomotrice de l'animal et par l'enregistrement de divers autres paramètres comportementaux (redressements, préférence néotique, comportements autoplastiques...).

* Les deuxièmes 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 neurovégétatives (miction, défécation) et neuro-endocriniennes (augmentation de la réponse corticosurrénalienne). (Misslin et coll., 1982-83)

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 neurotropes désinhibitrices de type anxiolytiques aux faibles doses ou des propriétés sédatives aux fortes doses.

Parmi les diverses procédures expérimentales mises à notre disposition (open-field, planche à trou, enceinte claire/obscur, l'escalier...), nous en avons sélectionné deux : le test de l'escalier, car il présente l'avantage de constituer un environnement anxiogène pour la souris qui ne peut s'y soustraire et permet par conséquent de révéler les propriétés désinbitrices ou anxiolytiques d'une substance. Un dixième test contraignant permet de spécifier cette activité anxiolytique, il s'agit du test de la chambre claire/obscur qui présente une situation aversive avec la possibilité pour la souris de s'y soustraire.

Le premier 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, tandis que le second se déroule dans deux compartiments, l'un est éclairé en lumière blanche et l'autre est obscur, les deux compartiments sont séparés par une porte permettant l'accès libre à l'animal d'un compartiment à l'autre, sont notés les transitions et le temps passé dans le compartiment éclairé.

3-2) RECHERCHE DES PROPRIETES HYPNOTIQUES

3-2-1) Test d'induction et de potentialisation du sommeil barbiturique, chez la souris

La mise en évidence d'un effet neurotrope conduit à tester leur activité sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique. En effet la recherche d'une interaction vis à vis du sommeil induit par le pentobarbital appartient aux tests classiquement utilisés dans les screenings pharmacologiques de substances actives sur le système nerveux central, comme les sédatifs, les anxiolytiques, les antidépresseurs ou les psychostimulants.

Ce test permet de discriminer les substances qui augmentent, antagonisent ou ne modifient pas le sommeil expérimental induit par un barbiturique (Simon et coll., 1982 ; Simon, 1985).

L'interaction avec l'hypnose, induite par un barbiturique à métabolisme hépatique comme le pentobarbital sodique, peut résulter soit d'une action au niveau d'un récepteur central, soit d'une interaction dans le catabolisme du pentobarbital au niveau hépatique (Simon et coll., 1982; Jori et coll., 1970); soit les deux à la fois en parallèle (Tateoka et coll., 1987). Cette interférence sur le système hépatique rend nécessaire l'utilisation d'un test à l'aide d'un autre barbiturique éliminé par voie rénale, c'est la principale raison du choix de la plupart des auteurs du pentobarbital sodique et du barbital pour réaliser ce test au cours des différents screenings pharmacologiques (Boissier et coll., 1972; Porsolt et coll., 1987).

Propriétés pharmacologiques (Harvey (1975), Schmitt (1973), Passouant et Billard (1978), Warot et coll., 1979, Hô et Harris, 1981).

- Au niveau du système nerveux central, les barbituriques dépriment de manière réversible dose-dépendante l'activité de l'ensemble des tissus excitables pouvant aller de la simple sédation à une anesthésie et, à très forte dose, au coma. L'excitabilité corticale et thalamique, les systèmes limbiques et la formation réticulée sont inhibés.

- La plupart des barbituriques et en particulier le pentobarbital, présentent des propriétés anticonvulsivantes et myorelaxantes.

- Sur l'électro-encéphalogramme, on remarque que le pentobarbital modifie les activités électriques des différentes structures encéphaliques. A dose hypnotique, il altère les étapes du sommeil, diminue la latence d'endormissement et augmentent faiblement les ondes delta et l'activité de l'électro-encéphalogramme enregistrée pendant le sommeil.

Si le mécanisme intime de l'action des barbituriques n'est pas encore connu, de nombreux auteurs (Hô et coll., 1975; Gerardy, 1982; Costa et Guidottiet, 1979) suggèrent pour expliquer l'ensemble des effets observés sur l'animal que le mode d'action des barbituriques se situe non seulement au niveau du récepteur GABA, pour expliquer l'inhibition de la transmission synaptique, mais également sur l'inophore chlore. Par ailleurs, sur les neurotransmetteurs, le pentobarbital augmente la quantité d'acétylcholine dans tout le cerveau plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Nordberg et Wahlstrom, 1977); il diminue le turnover de la nor-adrénaline et de la sérotonine et augmente celui de la dopamine (Okamoto, 1978).

Problèmes méthodologiques

Les méthodes opératoires pour réaliser ce type de test sont généralement mal définies. Or, certains paramètres environnementaux peuvent modifier les résultats du test d'interaction vis à vis du sommeil barbiturique, en particulier le rythme circadien. Il faut constater que l'analyse et l'interprétation des phénomènes biologiques n'ont pas toujours pris en compte la chronobiologie, or la nécessité d'une telle approche est devenue indispensable, aussi bien au niveau des sciences fondamentales comme la pharmacologie, qu'au niveau des schémas thérapeutiques.

Des études de Davis (1962), Vesell (1968), Friedman et Walker (1968) ont montré chez le rat traité par des barbituriques que le temps d'endormissement est augmenté et que le temps de sommeil diminue pendant la phase d'obscurité. C'est au cours de cette phase que la température corporelle est maximale, que le taux de 5 hydroxytryptamine est minimal et que le taux de nor-adrénaline est maximal. D'autre part, il est bien connu que l'activité globale des souris est maximale au cours de la phase nocturne et minimale au cours de la phase diurne (Friedman et Walker, 1968; Kempf et coll., 1982). Il apparaît ainsi qu'un test comportemental réalisé sur une durée trop longue ou sur une durée englobant des périodes différentes au cycle nyctéméral des animaux, génère une variabilité importante dans les résultats. Pour éviter des erreurs d'interprétation une méthodologie doit être strictement définie. Aussi est-il nécessaire de synchroniser tous les animaux qui sont utilisés dans une étude expérimentale, et de choisir la phase du cycle optimal pendant laquelle les expérimentations seront réalisées. Quant aux autres paramètres, poids, âge, sexe, il nous a paru opportun de travailler avec des animaux d'âge constant (Rolland, 1984).

- Bien que ces tests soient d'utilisation courante, nous avons mis au point un protocole expérimental rigoureux qui nous a semblé faire défaut dans la littérature;

- Nous avons ensuite recherché les effets potentialisateurs d'une administration aiguë de *M.officinalis* et *P.incarnata*.

II-3-1-2) INFLUENCE DE M.OFFICINALIS ET DE P.INCARNATA SUR LE COMPOTEMENT DE LA SOURIS PLACEE DANS L'ESCALIER.

1) Procédure expérimentale

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss (Césal); leur caractéristique ainsi que les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux.

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.(photo 13)

Une lampe à incandescence blanche, placée au dessus de la marche la plus haute permet d'éclairer l'enceinte.

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.

Le clorzépatate dipotassique (TranxèneR, Clin-Midy, Paris), pris comme produit de référence, est administré aux doses de 5 et 10 mg/kg

Les témoins reçoivent le solvant (NaCl 0,9 %) et les différentes solutions et extraits sont préparés dans une solution de NaCl 0,9 % pour être administrés en i.p..

3) *Melissa officinalis*

a) extrait hydroalcoolique

L'extrait hydroalcoolique est administré aux doses suivantes :

0,3 - 0,7 - 1,5 - 3 - 6 - 12 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400 - 800 mg/kg.

b) fractions

b1) fractions seules

Les fractions (A,B,C,D,E,F et G) sont testées aux doses 12,5 et 50 mg/kg de plante sèche. Certaines doses ont été testées à 100 mg/kg.

b2) fractions associées par deux

Les fractions associées (C+D, C+F, C+G, D+F, D+G et F+G) ont été testées aux doses de 12,5 et 100 mg/kg de plante sèche.

b3) fractions associées par trois

Les fractions associées (C+D+E et C+D+F) ont été testées à la dose de 100 mg/kg de plante sèche.

b4) fractions associées par quatre

La fraction associée (C+D+F+G) a été testées aux doses de 12,5 et 100 mg/kg de plante sèche.

b5) L'association de l'ensemble des 16 fractions isolées est administrée simultanément sous une dose calculée correspondant à 50 mg/kg de plante sèche.

b6) L'extrait hydroalcoolique total, ayant été utilisé pour le fractionnement, est administré à la dose de 50 mg/kg de plante sèche.

c) huile essentielle

L'huile essentielle est utilisée aux doses de :

3,125 - 6,25 - 25 et 100 μ l/kg

L'huile essentielle étant présente dans la plante à 0,1 %, ces doses correspondent respectivement à :

3,125 - 6,25 - 25 et 100 mg/kg en plante sèche

d) Témoin et Produit de référence

Le témoin NaCl 0,9 % est administré 30 min. avant le test.

Le produit de référence utilisé est le clorzébate dipotassique (TranxéneR) à la dose de 10 mg/kg et est administré 30 min. avant le test.

Toutes les doses sont exprimées en mg de plante sèche et non en mg d'extrait.

Statistiques

L'apparition d'une différence significative à l'aide d'une ANOVA globale nous permet de faire des comparaisons, deux à deux des lots traités au lot témoin, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett on peut utiliser un test paramétrique de comparaison multiples, le test T de Student.

3-1) RESULTATS

3-1-1) Extrait hydroalcoolique : étude de la relation doses-effets

La figure 1 met en évidence une diminution significative et relativement similaire du nombre de redressements et des marches montées, après traitement par l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* à partir de 3,12 à 25 mg/kg, la diminution étant maximale à 25 mg/kg. L'effet est encore significatif à 800 mg/kg. Le clorzébate dipotassique, pris comme produit de référence présente une diminution significative du nombre de redressements et des marches montées aux doses de 5 et 10 mg/kg.

3-1-2) Huile essentielle : étude de la relation doses-effets

La figure 2 montre l'absence d'une activité de l'huile essentielle sur les redressements et les marches montées chez la souris.

3-1-3) Les fractions seules : étude de la relation doses-effets

Les fractions prises individuellement n'ont révélé aucune modification des redressements et des marches montées dans le test de l'escalier. Cependant, il a été constaté des tendances à la diminution des redressements et des marches montées pour les fractions suivantes : C; D; F et G.

Par contre, les fractions C et E à la dose de 25 mg/kg augmentent les redressements et les marches montées.

Le choix des fractions à associer a été basé sur la tendance, de chaque fraction, à la diminution des redressements et des marches montées (Fig.3 et 4).

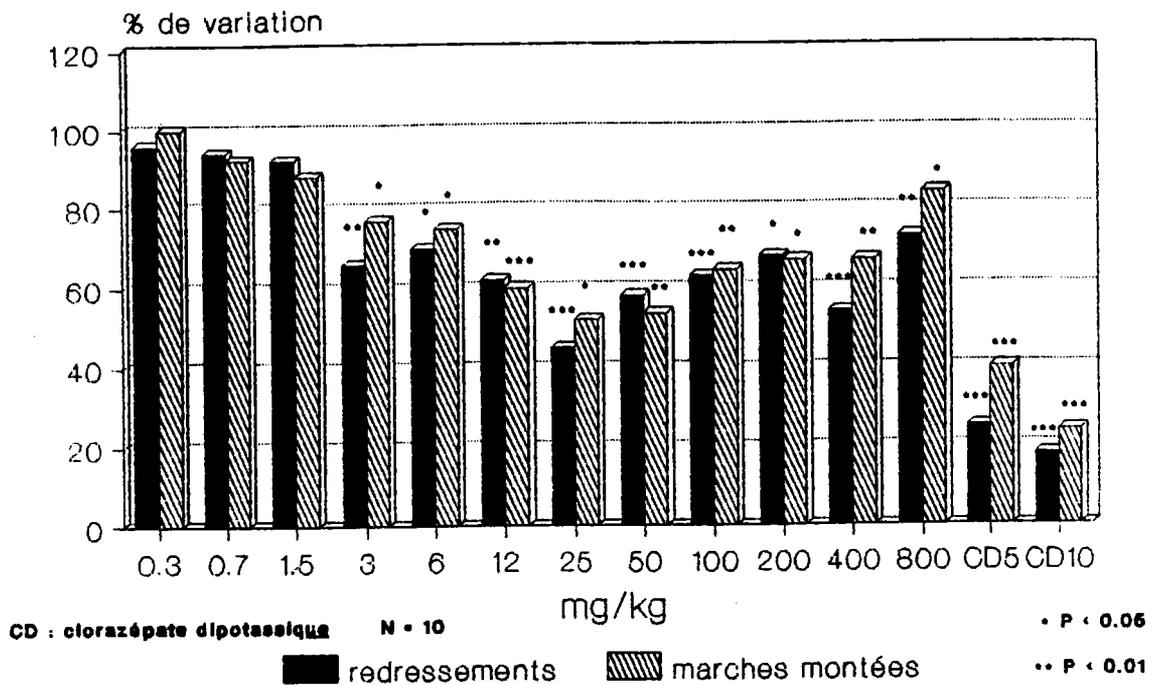


Fig.1 Effet de *M.officinalis* sur les redressements et les marches montées de la souris dans le test de l'escalier

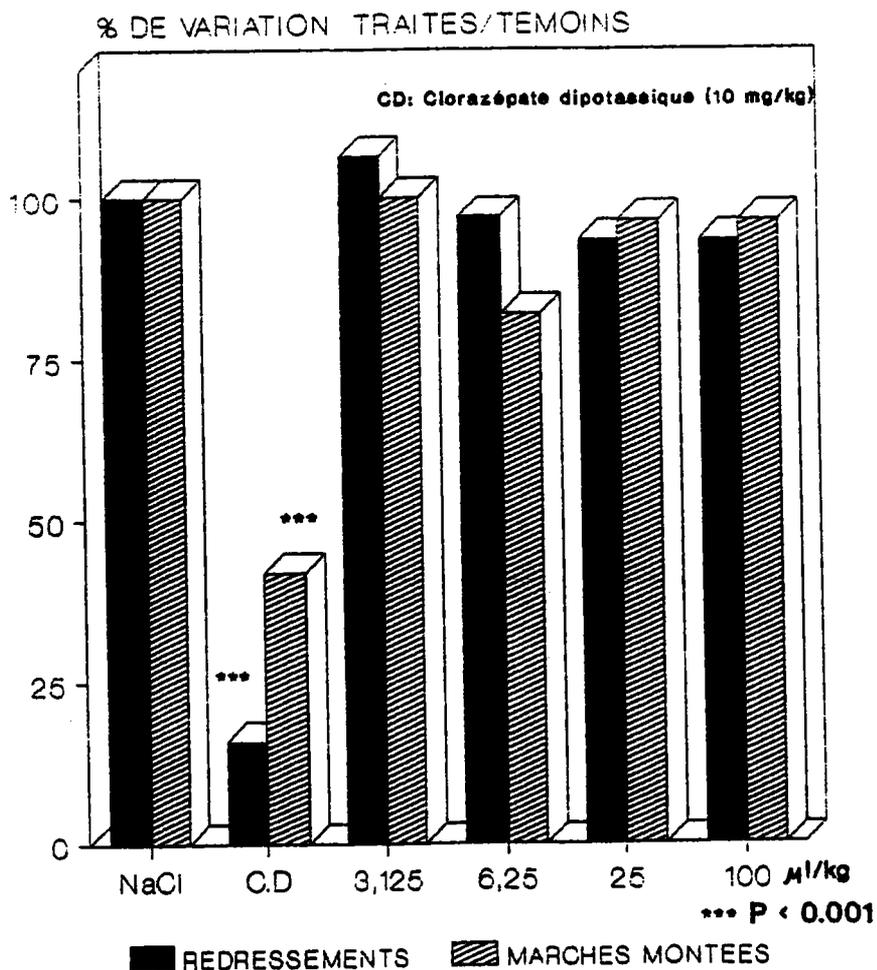


Fig.2 Effet de l'huile essentielle de MO sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier.

VARIATION TRAITES/TEMOINS

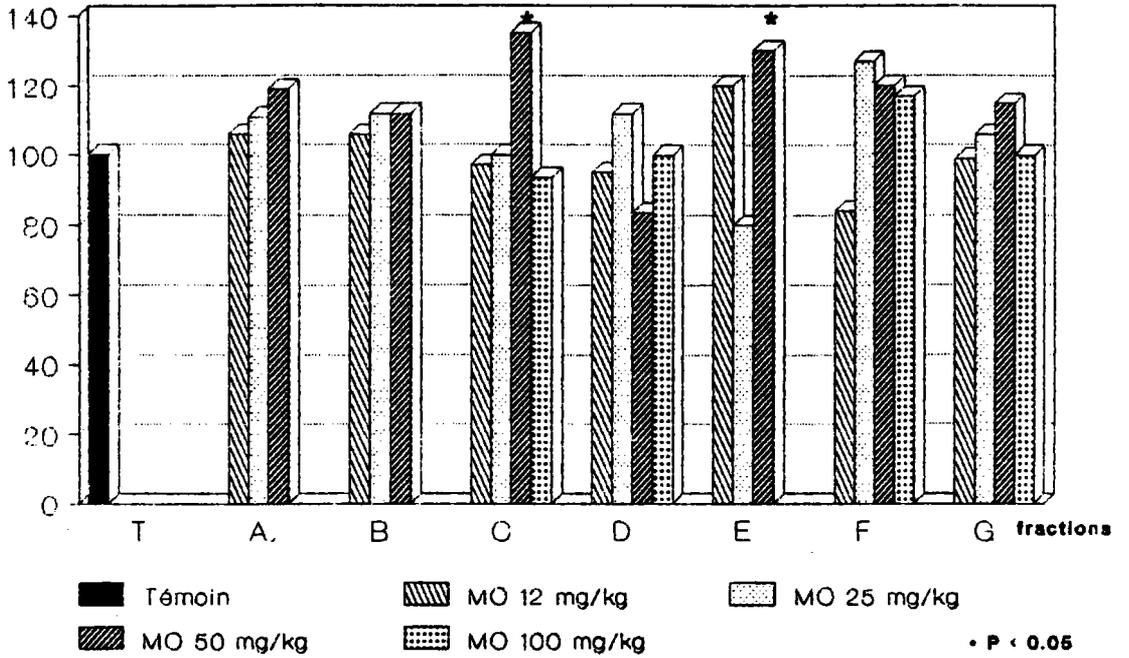


Fig.3: Effet des différentes fractions de M.O. sur les redressements de la souris, dans le test de l'escalier.

VARIATION TRAITES/TEMOINS

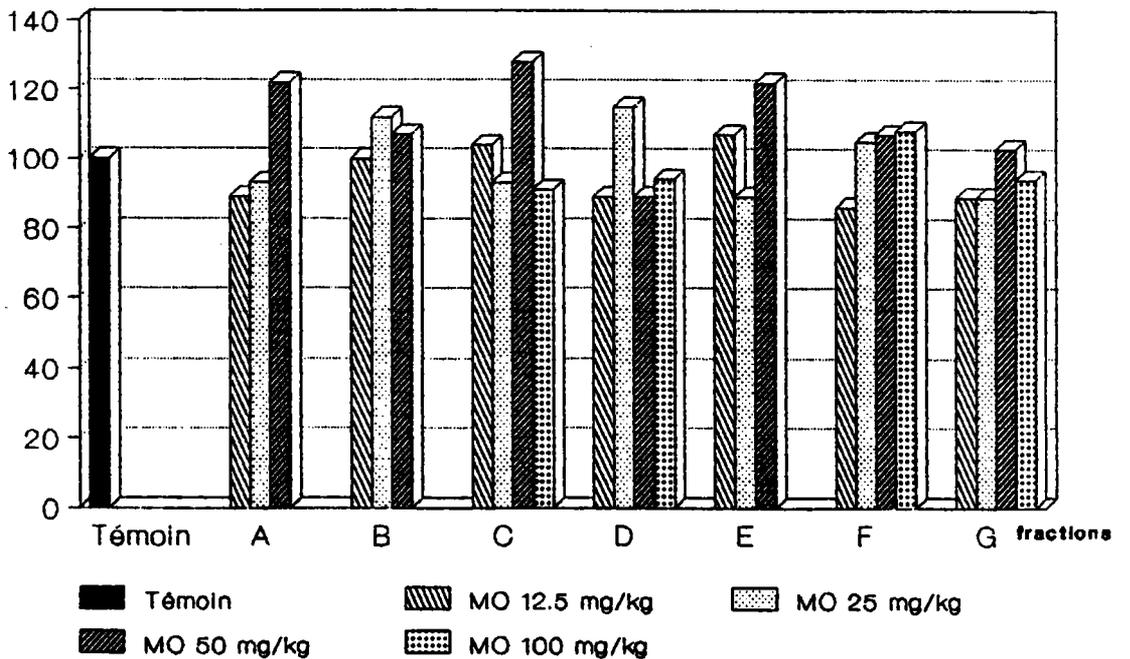


Fig.4: Effet des différentes fractions de M.O. sur les marches montées de la souris, dans le test de l'escalier.

Tableau 5.

a) Influence de l'extrait de *M.officinalis* sur les redressements de la souris dans le test de l'escalier.

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	MO 0,3 mg/kg	MO 0,7 mg/kg	MO 1,5 mg/kg	MO 3,12 mg/kg	MO 6,25 mg/kg	MO 12,5 mg/gk	MO 25 mg/kg
MOYENNES	34,4 /29,8	32,9	32	/24	26,5	28	24,8	17,8
ECART-TYP REDUIT	1,67 /1,52	2,87	7	/0,6	2,4	3,6	3,7	3,4
% VARIATI / TEMOIN	100 %	96	94	92	66	70	62	45
P <	//	NS	NS	NS	0,01	0,05	0,01	0,001

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	MO 50 mg/kg	MO 100 mg/kg	MO 200 mg/kg	MO 400 mg/kg	MO 800 mg/kg	CD* 5 mg/kg	CD* 10 mg/kg
MOYENNES	34,4 /29,8	20	21	23	18	25	7,5	6
ECART-TYP REDUIT	2,5 /3	4	2	4	2,8	3,5	0,9	1,6
% VARIATI / TEMOIN	100	58	63	68	54	73	25	18
P <	////////	0,001	0,001	0,05	0,001	0,01	0,001	0,001

* CD: clorazépate dipotassique (Tranxéner)

N = 10

b) Influence de l'extrait de *M.officinalis* vis à vis des marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	MO 0,3 mg/kg	MO 0,7 mg/kg	MO 1,5 mg/kg	MO 3,12 mg/kg	MO 6,25 mg/kg	MO 12,5 mg/gk	MO 25 mg/kg
MOYENNES	40 /39,8	40,5	36,5	/28,4	24	/25,7	/22,8	/20,8
ECART-TYP REDUIT	2,2 /2,42	3,61	6,3	/4,7	3,5	/2,3	/5,9	/4,7
% VARIATI / TEMOIN	100 %	100	92	88	77	75	60	52
P <	//	NS	NS	NS	0,05	0,05	0,001	0,05

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	MO 50 mg/kg	MO 100 mg/kg	MO 200 mg/kg	MO 400 mg/kg	MO 800 mg/kg	CD* 5 mg/kg	CD* 10 mg/kg
MOYENNES	36	25,5	23	24	24	30	15	9
ECART-TYP REDUIT		4,4	3	5,4	3,2	4,7	2,8	3,2
% VARIATI / TEMOIN	100 %	54	64	67	67	84	40	24
P <	/////	0,01	0,01	0,05	0,01	0,05	0,001	0,001

* CD: clorazépate dipotassique (Tranxéner)

N = 10

Tableau 6: Effet de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* sur les redressements et les marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

	LOTS	Témoins NaCl	Melissa officinalis Huile essentielle ($\mu\text{l/kg}$)			
DOSES	////////	0	3,12	6,25	25	100
REDRESS- EMENTS	% variat	100	106	97	93,9	932
	P <	////	NS	NS	NS	NS
MARCHES MONTEES	% variat	100	100	82	96	96
	P <	////	NS	NS	NS	NS

N = 10

Tableau 7: Influence des fractions isolées de MO vis à vis des redressements et des marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

REDRESSEMENTS (12.5 mg/kg)								
Lots	Témoins NaCl 0.9 % n:10	A n:8	B n:8	C n:6	D n:8	E n:8	F n:8	G n:8
Moyennes	31	33	33	30	29.5	38.8	26	30.6
Ecart-type réduit	1.9	3.12	3.6	3.12	3.6	2.9	4.76	1.96
% par rapport au lot témoin	100	106	106	97	96	120	84	99
P	-	NS						
MARCHES MONTEES (12.5 mg/kg)								
Moyennes	34.6	30.8	34.5	36	30.6	36.8	28.8	30.6
Ecart-type réduit	2	6.4	3.23	3.12	4.14	4.5	1.66	5.3
% par rapport au lot témoin	100	89	100	104	88.6	106.5	86	88.6
P	-	NS						

Tableau 8: Influence des fractions isolées de MO via à vis des redressements et des marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

REDRESSEMENTS (25 mg/kg)								
Lots	Témoin NaCl 0.9 % n:10	A n:8	B n:8	C n:8	D n:8	E n:8	F n:8	G n:8
Moyennes	31	34.5	35	31	36	25	39.5	33
Ecart-type réduit	1.66	2.7	3.0	6.2	3.4	1.8	3.54	2.86
% par rapport au lot témoin	100	111	112	100	112	80	127	106
P	--	NS						
MARCHES MONTEES (25 mg/kg)								
Moyenne	34.5	32	38.5	32	39.5	30.5	36	30.5
Ecart-type réduit	2	6.3	3.84	6.2	3.6	6.16	1	1.7
% par rapport au lot témoin	100	93	112	93	115	89	106	89
P	--	NS						

Tableau 9: Influence des fractions isolées de MO via à vis des redressements et des marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

REDRESSEMENTS (60 mg/kg)								
Lots	Témoin NaCl 0.9 % n:10	A n:8	B n:8	C n:8	D n:8	E n:8	F n:8	G n:8
Moyennes	31	37	36	42	26	44.5	39	36
Ecart-type réduit	2.6	1.2	4.2	3.4	1.7	6.0	4.2	1.8
% par rapport au lot témoin	100	119	112	136	83.5	130	120	115
P	--	NS	NS	0.05	NS	0.06	NS	NS
MARCHES MONTEES (60 mg/kg)								
Moyenne	34.5	42	37	44	30.5	42	37	35.6
Ecart-type réduit	2.0	2.50	2.66	7.3	4.5	8.5	3.6	6.7
% par rapport au lot témoin	100	122	107	127.5	88.5	122	107	103
P	--	NS						

Tableau 10: Influence des fractions isolées de M.officinalis vis à vis des redressements et des marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

	LOTS	Témoin NaCl 0.9%	C 100 mg/kg	D 100 mg/kg	F 100 mg/kg	G 100 mg/kg
Redressements	% variati Trai/Tém.	100	93,5	100	117	100
	P <	///////	NS	NS	NS	NS
Marches montées	% variati Trai/Tém.	100 %	91	94	108	94
	P <	////	NS	NS	NS	NS

N = 10

3-1-4) Les fractions associées par deux

Les fractions associées par deux (C+F; C+G et D+G) montrent une diminution significative des redressements à la dose de 100 mg/kg et une diminution non significative des marches montées. Les fractions (C+G et D+G) montrent également une diminution non significative des redressements et des marches montées à la dose de 12,5 mg/kg (Fig.5 et 6).

3-1-5) Les fractions associées par trois

Les fractions associées par trois (C+D+E et C+D+F) montrent une diminution des redressements mais aucune modification des marches montées à la dose de 100 mg/kg (Fig.7 et 8).

3-1-6) Les fractions associées par quatre.

Le fraction (C+D+F+G) a entraîné une diminution non significative des redressements et une diminution statistiquement significative des marches montées à la dose de 100 mg/kg (Fig.9 et 10).

3-1-7) L'extrait hydroalcoolique total et l'association de l'ensemble des fractions

L'extrait hydroalcoolique totale de *M.officinalis* entraîne, à la dose de 50 mg/kg, une diminution significative des redressements et des marches montées (respectivement 39,7 et 48,5 %). Un effet identique a été obtenu avec l'association des 16 fractions (respectivement 50 et 61 %) (Fig.11 et 12).

VARIATION TRAITES/TEMOINS

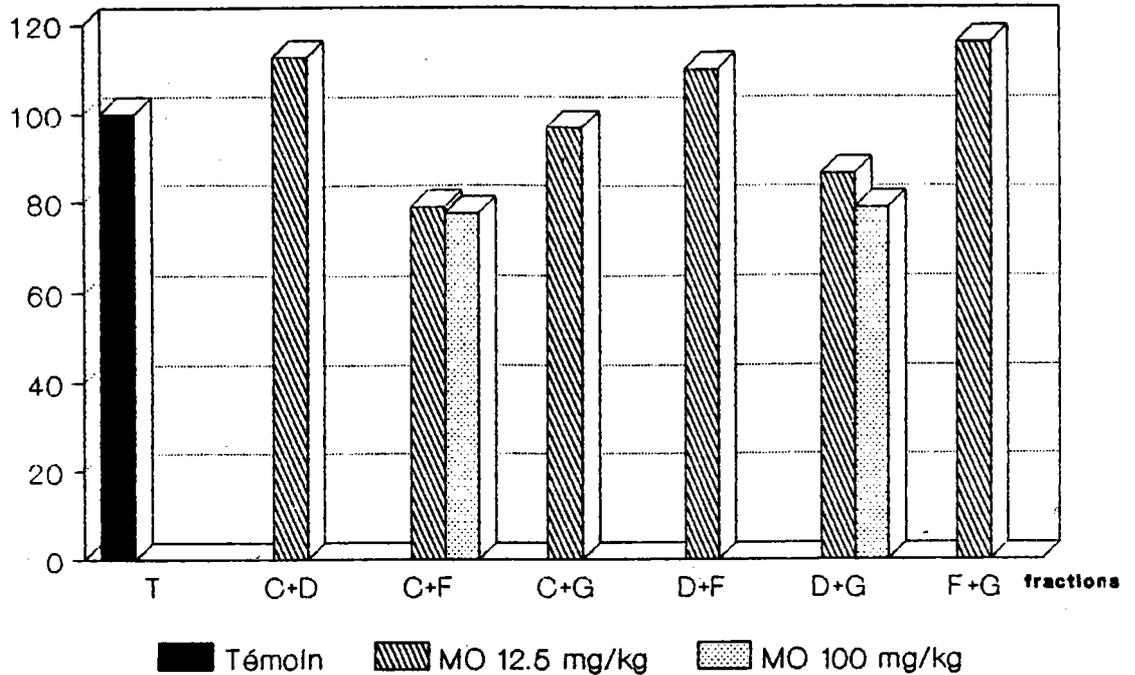


Fig.5: Effet des fractions, associées par deux, de MO sur les redressements de la souris, dans le test de l'escalier.

• p < 0.05

VARIATION TRAITES/TEMOINS

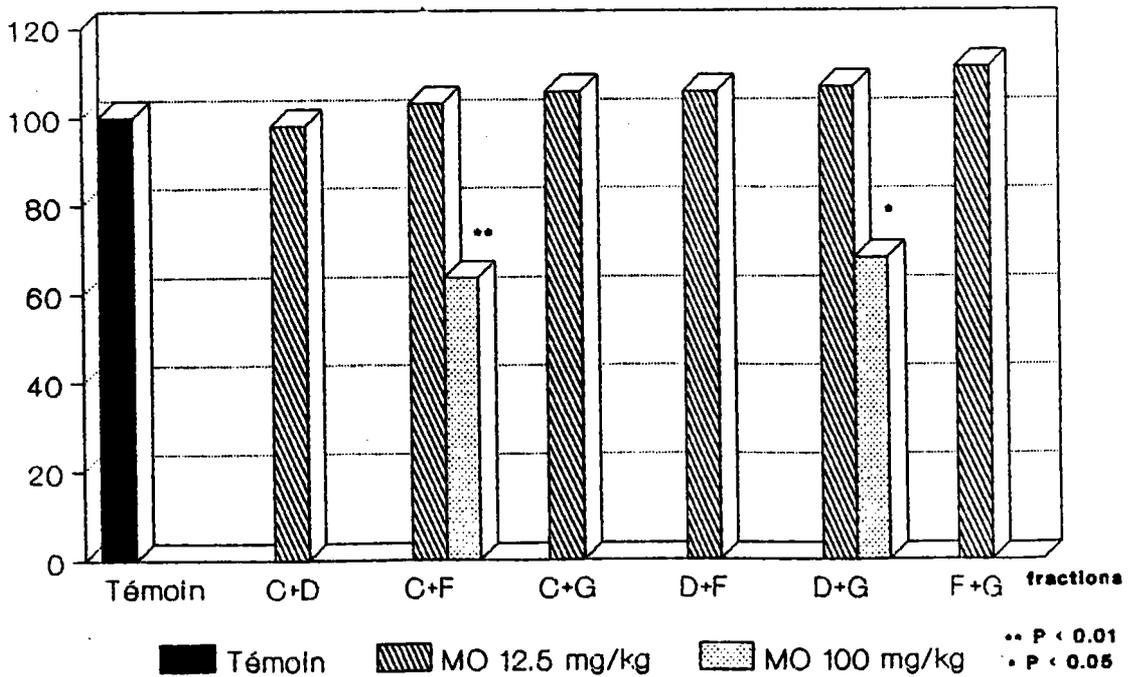


Fig.6: Effet des fractions, associées par deux, de MO sur les marches montées de la souris, dans le test de l'escalier.

** P < 0.01
* P < 0.05

VARIATION TRAITES/TEMOINS

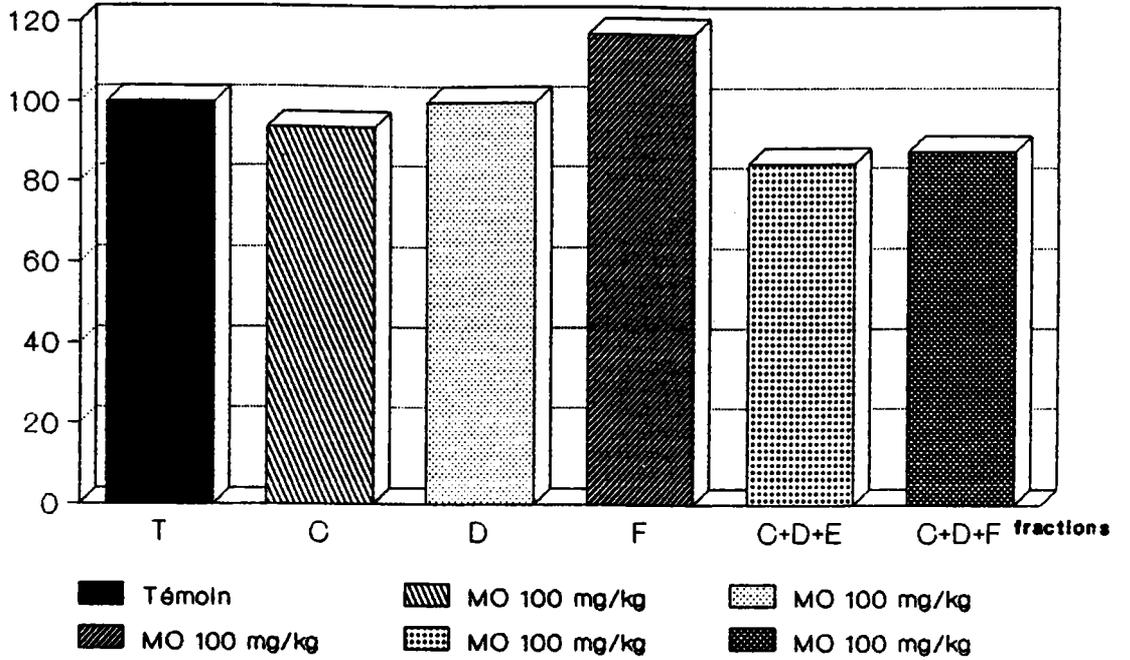


Fig.7 Effet des fractions, associées par trois, de M.O. sur les redressements de la souris.

VARIATION TRAITES/TEMOINS

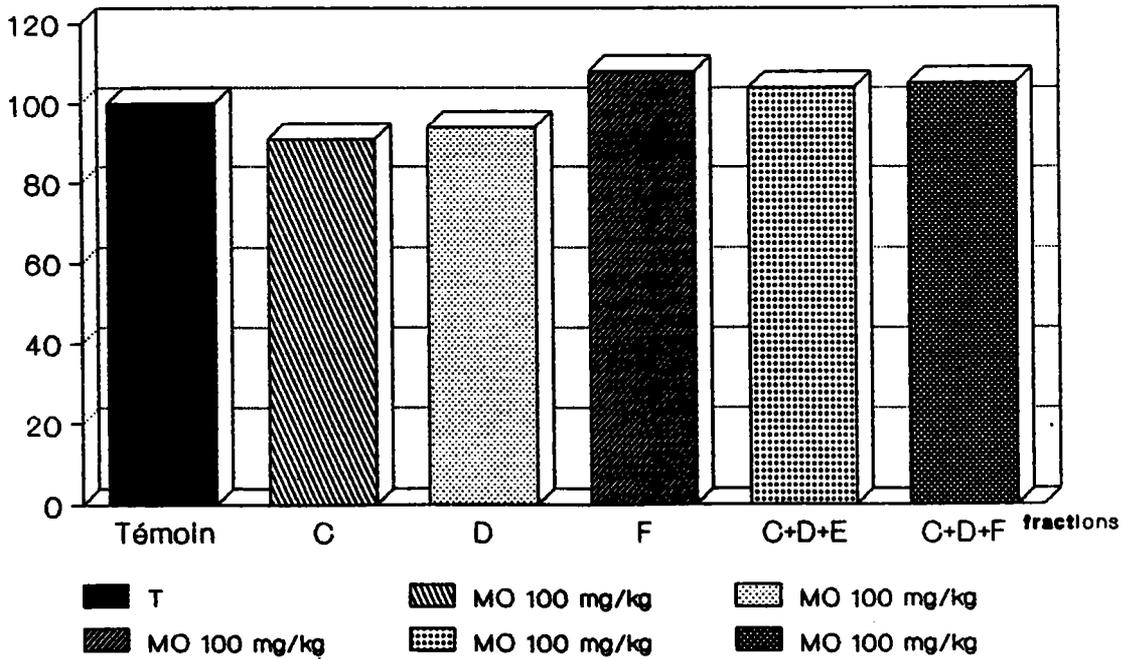


Fig.8 Effet des fractions, associées par trois, de M.O. sur les marches montées de la souris.

% de variation traitées/témoins

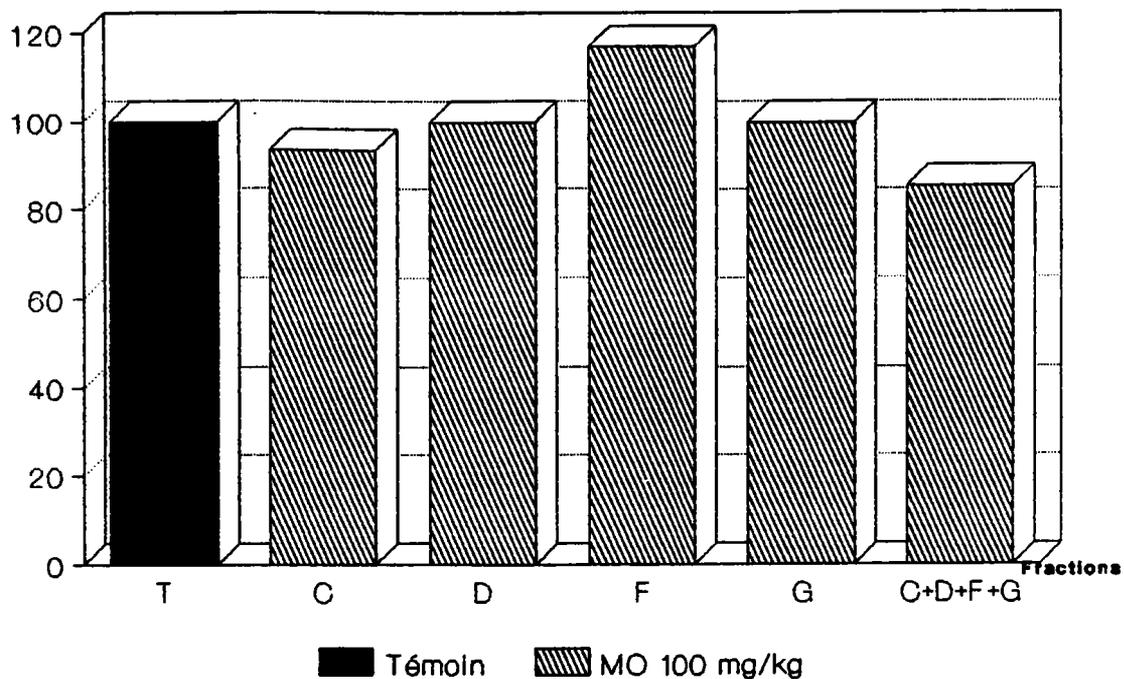


Fig.9 Effet des fractions, associées par quatre, de M.O. (100 mg/kg) sur les redressements de la souris.

% de variation traitées/témoins

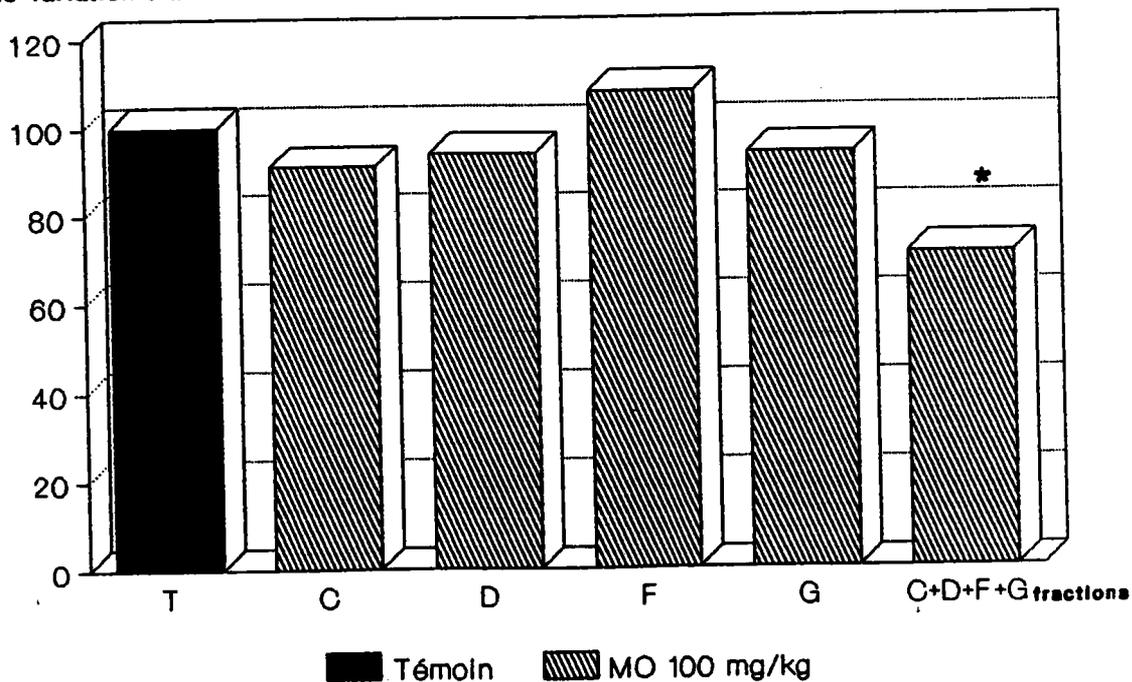


Fig.10 Effet des fractions, associées par quatre, de M.O. (100 mg/kg) sur les marches montées de la souris.

* P < 0.05

VARIATION TRAITES/TEMOINS

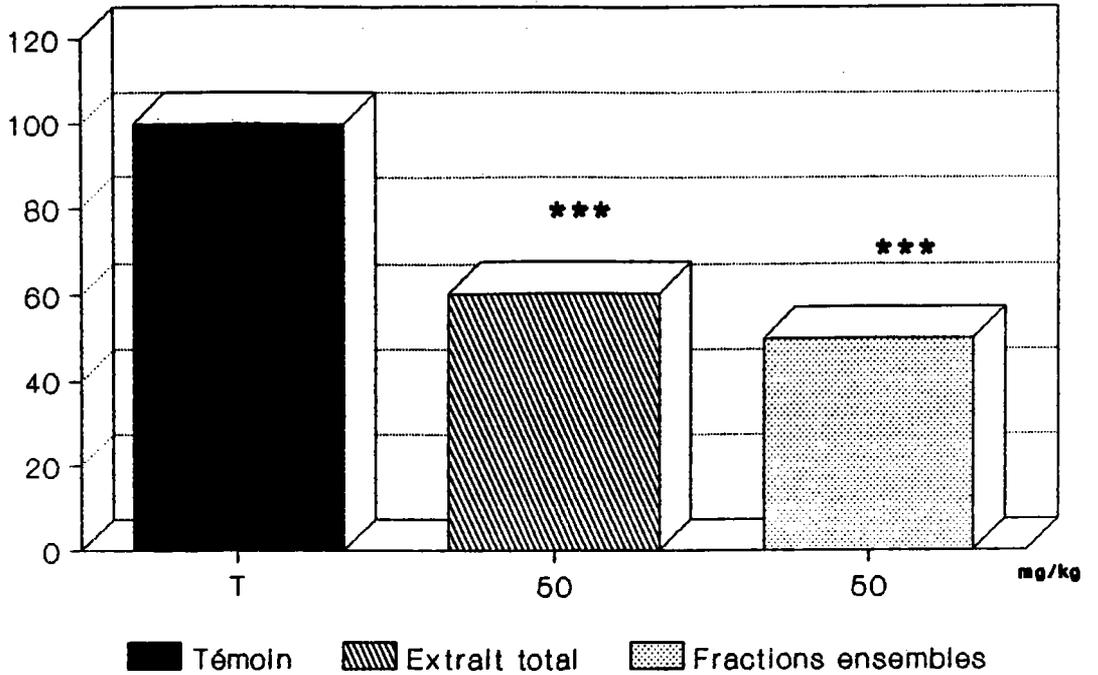


Fig.11 Effet des fractions ensemble et de l'extrait total de M.O. sur les redressements de la souris.

*** P < 0.001

VARIATION TRAITES/TEMOINS.

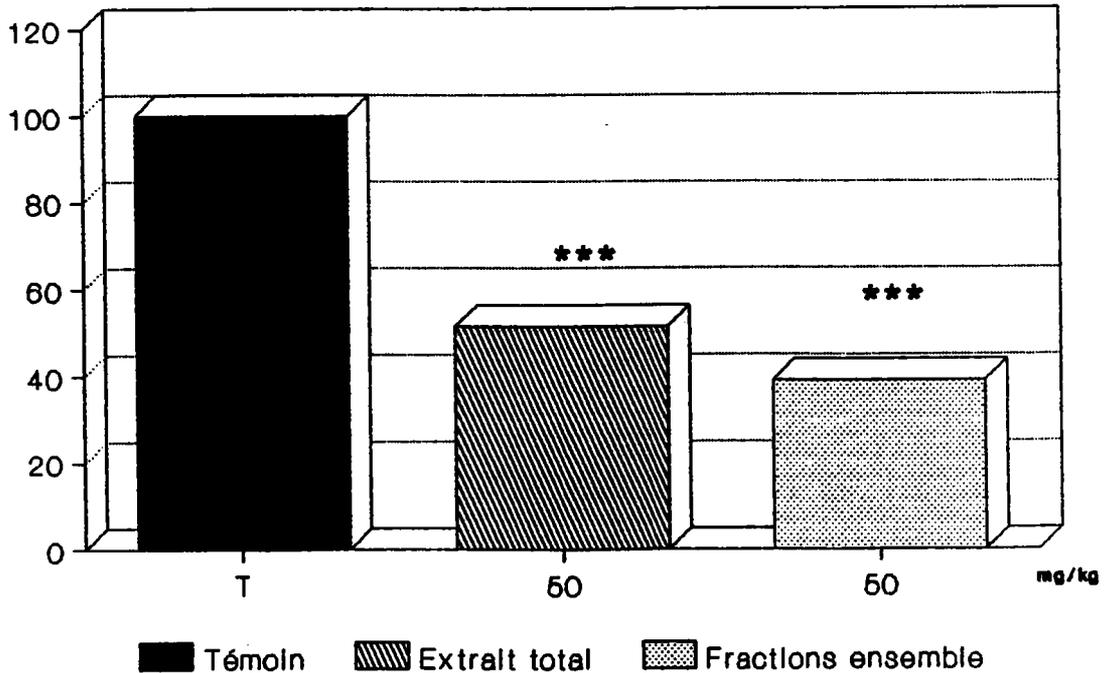


Fig.12 Effet des fractions ensemble et de l'extrait total de M.O. sur les marches montées de la souris

*** P < 0.001

Tableau 10b: Influence de l'extrait hydroalcoolique total et de l'ensemble des fractions de MO vis à vis des redressements et des marches montées de la souris.

REDRESSEMENTS (50 mg/kg)			
Lots	Témoin NaCl 0.9 % n:10	Extrait hydroalcoolique total n:10	L'ensemble de toutes les fractions (16) n:10
Moyennes	31	18.8	15.6
Ecart-type réduit	1.86	2.5	2.1
% par rapport au lot témoin	100	60.3	50
P	--	0.001	0.001
MARCHES MONTEES (50 mg/kg)			
Moyenne	34.5	17.8	13.5
Ecart-type réduit	2	2.3	2.2
% par rapport au lot témoin	100	51.5	39
P	--	0.001	0.001

Tableau 11: Influence des fractions associées par 2 et par 4 de MO vis à vis des redressements et des marches montées de la souris, dans le test de l'escalier.

REDRESSEMENTS (12.5 et 100 mg/kg)								
Lots	Témoin NaCl 0.9 % n:10	C+D n:8	C+F * n:10	C+G n:8	D+F n:8	D+G * n:10	F+G n:8	C+D + F+G n:10 *
Moyennes	31	35.5	24	30	34.6	24.6	36.8	26.6
Ecart-type réduit	1.86	6	2.2	4.8	3.86	2.17	3.8	8
% par rapport au lot témoin	100	112.5	77.6	97	110	79	118	86.6
P	--	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MARCHES MONTEES (12.5 mg/kg)								
Moyenne	34.6	33.8	22	36.6	36.6	23.6	39	24.6
Ecart-type réduit	2	6	3.2	7.6	2.7	3	2.66	3.3
% par rapport au lot témoin	100	98	63.6	106.6	106.6	68	111	71
P	--	NS	0.01	NS	NS	0.06	NS	0.06

* dose testée : 100 mg/kg

Tableau 12: Influence des fractions associées par 3 de MO vis à vis des redressements et des marches montées de la souris, dans le test de l'escalier.

REDRESSEMENTS (100 mg/kg)			
Lots	Témoin NaCl 0.9 % n:10	C+D+E n:10	C+D+F n:10
Moyennes	31	26.3	27.2
Ecart-type réduit	1.86	2.3	1.77
% par rapport au lot témoin	100	84.8	87.7
P	--	NS	NS
MARCHES MONTEES (100 mg/kg)			
Moyenne	34.5	35.9	36.2
Ecart-type réduit	2	2.6	3
% par rapport au lot témoin	100	104	105
P	--	NS	NS

4) *Passiflora incarnata*

a) Témoin

Le témoin NaCl 0,9 % est administré 30 min. avant le test.

b) Extrait hydroalcoolique de *P.incarnata* : Pi1

L'extrait hydroalcoolique est administré aux doses suivantes :

0,3 - 0,7 - 1,5 - 3 - 6 - 12 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400 - 800 mg/kg.

c) Extrait aqueux : Pi2

L'extrait aqueux est administré aux doses suivantes :

3 - 6 - 25 - 100 - 400 - 800 mg/kg

d) Etude des différents extraits

Les différents extraits ont été décrits précédemment (Tableau 3 et 4)

d-1) Extrait Pi3 :

L'extrait Pi3 est administré à 800 mg/kg.

d-2) Extrait Pi4 :

L'extrait Pi4 est administré à 800 mg/kg.

d-3) Extrait Pi5 :

L'extrait Pi5 est administré à 800 mg/kg.

e) Etude des groupes chimiques

e-1) alcaloïdes et maltol :

(harmane + harmine + harmol + harmaline + harmalol) + maltol :

Les alcaloïdes sont dissous dans 10 ml de NaCl 0,9 % aux doses de 0,5 - 2 - 8 - 18 mg/kg (doses correspondantes, respectivement, à 500, 2000, 8000 et 18000 mg/kg de plantes sèches) et additionnées d'une goutte de tween 80.

Le maltol est additionné au mélange d'alcaloïdes aux doses respectives de 0,25, 1, 4 et 9 mg/kg (puisque la teneur en alcaloïdes de la plante étant voisine de 0,1 % et en maltol de 0,05 %).

e-2) harmaline + harmalol

La révélation d'une fine quantité d'harmaline et d'harmalol dans l'extrait de *P. incarnata* par la C.C.M. nous a incité à vérifier si le support d'activité pharmacologique n'était pas localisé à ce niveau.

Le mélange est préparé à une dose de 0,8 mg/kg (dose équivalente à 800 mg/kg de plante sèche).

e-3) maltol

Le maltol est préparé à une dose de 0,4 mg/kg, c'est à dire le correspondant de 800 mg/kg de plante sèche.

e-4) flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes:

(vitexine + isovitexine + orientine + isoorientine)

le mélange : (vitexine + isovitexine)

et le mélange : (orientine + isoorientine)

sont préparés aux doses de 2 mg/kg (doses équivalentes à 800 mg/kg de plante sèche, puisque la teneur en flavonoïdes est d'environ 0,25 % dans la plante sèche).

Afin de rechercher l'activité de l'extrait végétal et des alcaloïdes vis à vis des récepteurs aux benzodiazépines on utilise un antagoniste de ces récepteurs, le ^{FLUMAZENIL} RO 15-1788, qui agit par blocage des sites récepteurs des benzodiazépines. Son action, vis à vis des effets de l'extrait végétal et du mélange alcaloïdes-maltol est étudiée dans le test de l'escalier.

la plante et le mélange alcaloïdes-maltol sont mélangés chacun avec le RO 15-1788 et dissous dans de l'eau distillée additionnée d'une goutte de Tween 80 et ils sont administrés par voie i.p., 30 minutes avant le test.

Statistiques

L'apparition d'une différence significative à l'aide d'une ANOVA globale nous permet de faire des comparaisons, deux à deux des lots traités au lot témoin, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett on peut utiliser un test paramétrique de comparaison multiples, le test T de Student.

4-1) **RESULTATS:**

4-1-1) **Extraits hydroalcoolique (Pi1)**

Les résultats présentés sur la figure 13 montrent que l'extrait hydroalcoolique (Pi1) de *P.incarnata* n'induit une augmentation significative des redressements qu'aux doses de 12 ; 50 et 400 mg/kg. Les marches montées n'étant significativement augmentées qu' à la dose de 400 mg/kg. Par contre une réduction significative des redressements est obtenue avec la dose de 200 mg/kg.

Ces résultats montrent qu'aucun effet sédatif n'a pu être mis en évidence au travers d'une gamme de 12 doses allant de 0,3 à 800 mg/kg de l'extrait hydroalcoolique.

De par ces résultats démontrant l'absence d'un effet sédatif pour l'extrait hydroalcoolique de *P.incarnata*, nous avons décidé de tester un autre extrait différent, en l'occurrence, un extrait aqueux (Pi2) préparé à partir du même lot de cryobroyat.

4-1-2) **Extrait aqueux (Pi2)**

Lorsqu'il est testé à 100 ; 400 et 800 mg/kg l'extrait aqueux de *P.incarnata* réduit significativement les redressements et les marches montées de façon dose-dépendante.(Fig.14)

4-1-3) **Les extraits Pi3 ; Pi4 et Pi5**

L'ensemble des résultats obtenus avec les différents extraits aqueux (Pi3 ; Pi4 et Pi5) nous a permis de constater que ces extraits induisent une diminution significative des redressements et une réduction non significative des marches montées à la dose de 800 mg/kg dans le test de l'escalier Fig.15.

VARIATION TRAIT./TEM.

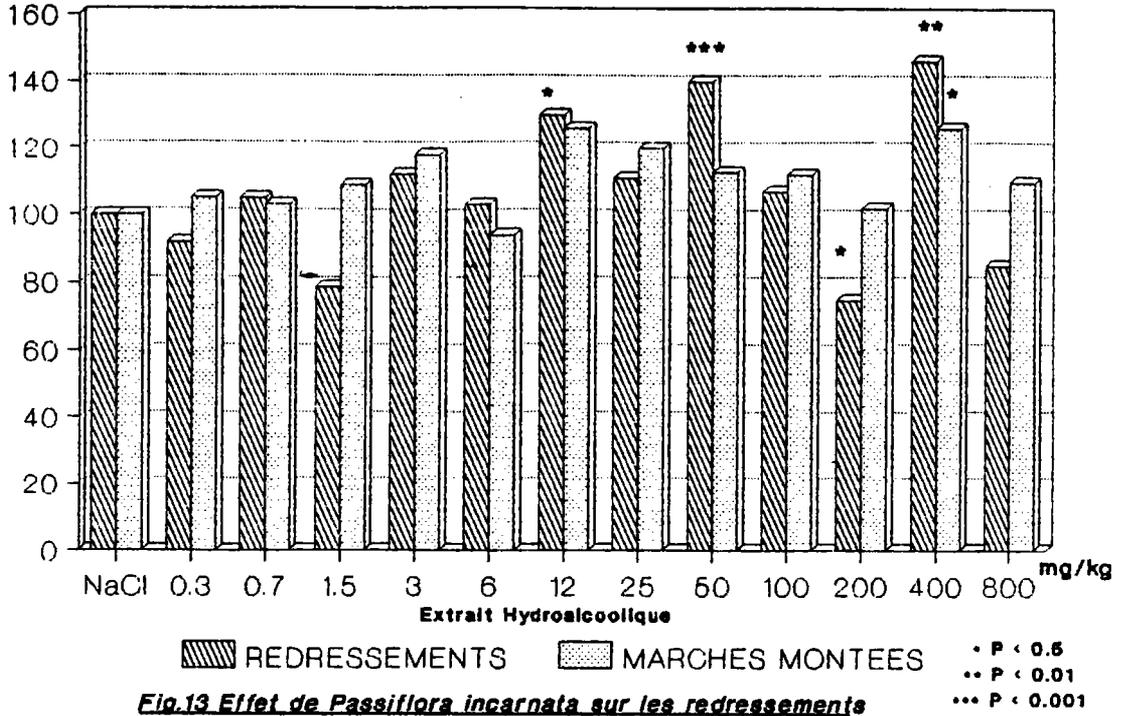


Fig.13 Effet de *Passiflora incarnata* sur les redressements et les marches montées de la souris (test de l'escalier).

VARIATION TEM./TRAT.

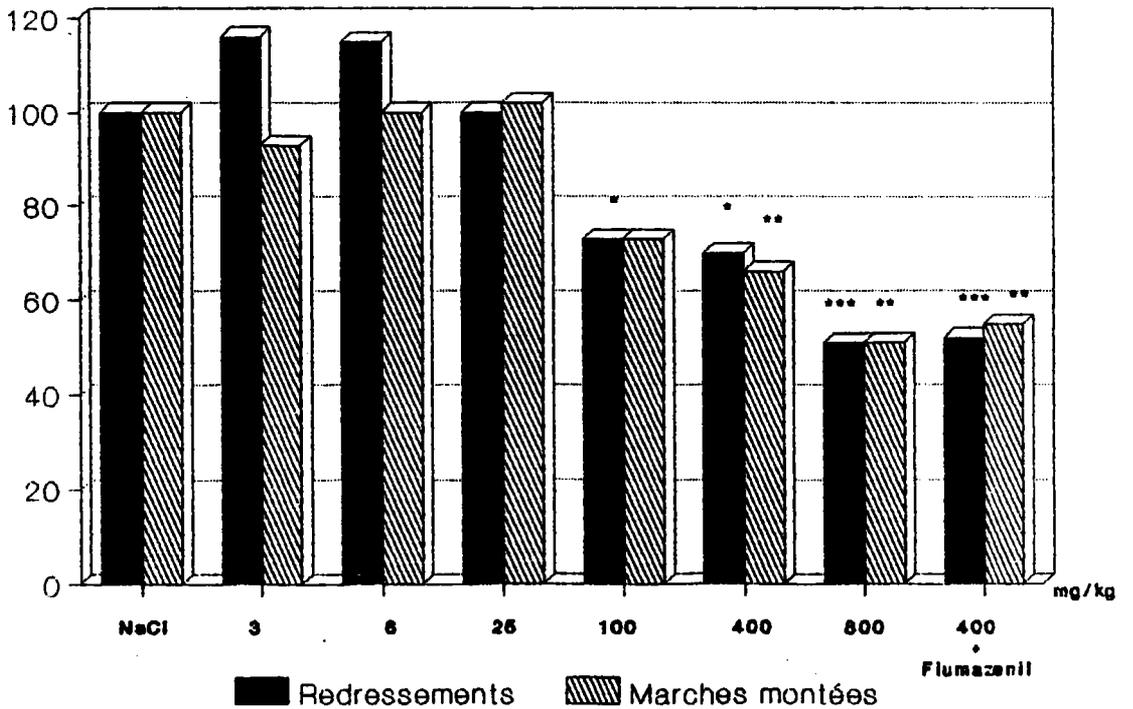


Fig.14 Effet de l'extrait aqueux de *Passiflora incarnata* sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier

* P < 0.05
 ** P < 0.01
 *** P < 0.001

Tableau 13. Influence de l'extrait hydroalcoolique de *P. incarnata* sur les redressements et les marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	PI 0,3 mg/kg	PI 0,7 mg/kg	PI 1,5 mg/kg	PI 3,12 mg/kg	PI 6,25 mg/kg	PI 12,5 mg/gk	PI 25 mg/kg
REDRESSE- MENTS	100 %	92,5	105	79	112	103	130	111
	//	NS	NS	NS	NS	NS	0,05	NS
MARCHES MONTEES	100 %	105	103	109	118	94	127	120
	//	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

LOTS	Témoin NaCl 0.9%	PI 50 mg/kg	PI 100 mg/kg	PI 200 mg/kg	PI 400 mg/kg	PI 800 mg/kg
REDRESSEM- ENTS	100 %	140	107	75	146	85
	/////	0.001	NS	0.05	0,01	NS
MARCHES MONTEES	100 %	113	112	102	127	110
	/////	NS	NS	NS	0,05	NS

Tableau 14: Influence de l'extrait aqueux de *P. incarnata* vis à vis des redressements et des marches montées dans le test de l'escalier.

LOTS	NaCl	Pi 3 mg/k	Pi 6 mg/kg	Pi 25 mg/kg	Pi 100 mg/kg	Pi 400 mg/kg	Pi 800 mg/kg	Pi* 400 mg/gk	
REDR ESSE MENT	% de var.	100	116	114,5	100	73	70	51	52
	P <	////	NS	NS	NS	0,05	0,05	0,001	0,001
MARC HES- MONT EES	% de var.	100	93	100	102	73	66	51	55
	P <	////	NS	NS	NS	NS	0,01	0,01	0,01

* Extrait aqueux de P.i. + RO 15-1788 N = 10

VARIATION TRAIT./TEM.

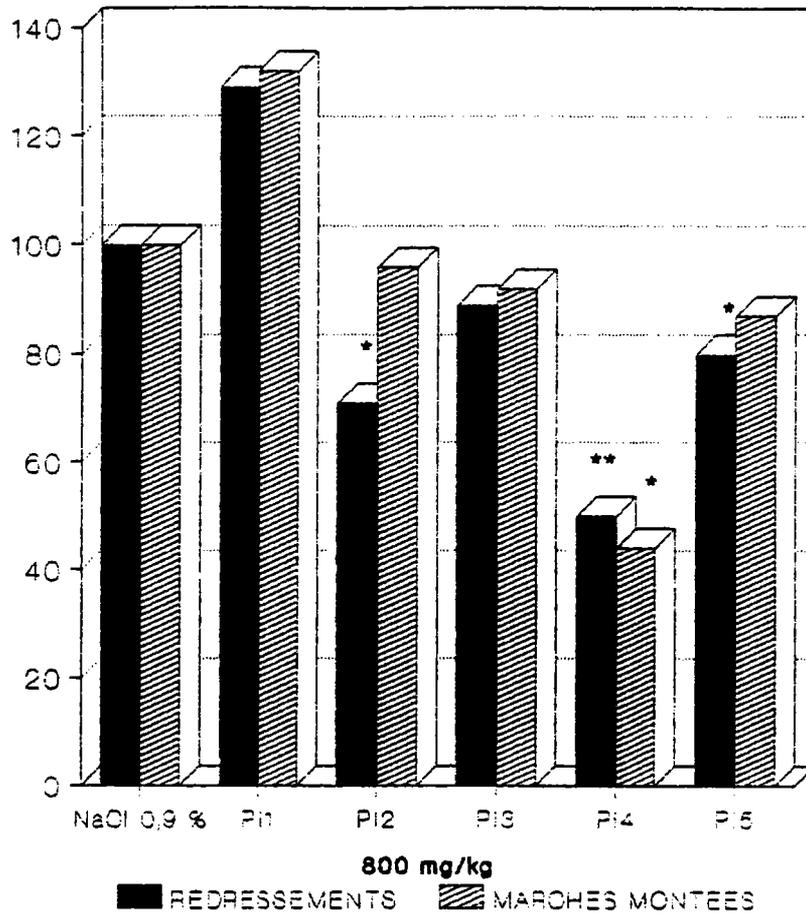


Fig.15 Effet de différentes préparations de *Passiflora incarnata* sur les redressements et les marches montées de la souris dans le test de l'escalier.
 * P < 0.05
 ** P < 0.01

Tableau 15: Effet des différents préparations de *P.incarnata* sur les redressements et les marches montées de la souris dans le test de l'escalier.

		TEMOINS	Pi1++	Pi2++	Pi3++	Pi4++	Pi5++
TEST DE L'ESCAL	REDRESS	100 %	85 %	71 %*	89 %	50 %**	80 %*
	MAR.MON	100 %	110 %	96 %*	92 %	44 %*	87

N = 10

++ dose = 800 mg/kg

* p < 0.05

** p < 0.01

4-1-4) Le mélange alcaloïde + maltol et le maltol

La figure 16 nous permet de constater que ni le mélange "alcaloïde + maltol" ni le mélange "harmaline + harmalol" n'a montré une modification, statistiquement significative, des paramètres comportementaux de la souris dans le test de l'escalier.

L'administration préalable de l'antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines n'a pas induit de modifications.

4-1-5) Les flavonoïdes

Ni le mélange des flavonoïdes ni le maltol seul n'a permis de constater des modifications des paramètres comportementaux de la souris dans le test de l'escalier par rapport aux témoins, ces deux substances restent sans effets significatifs dans ce test. (Fig.17)

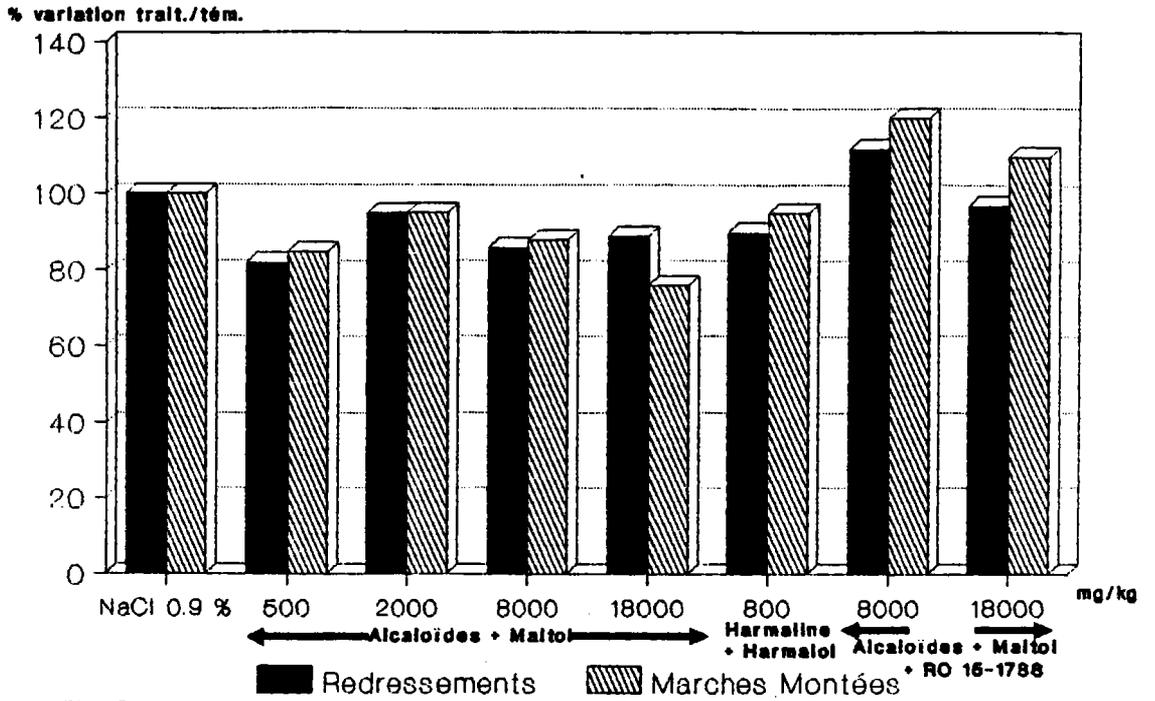


Fig.16 Influence du mélange alcaloïdes-maltol sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier.
(doses exprimées en équivalent plante sèche)

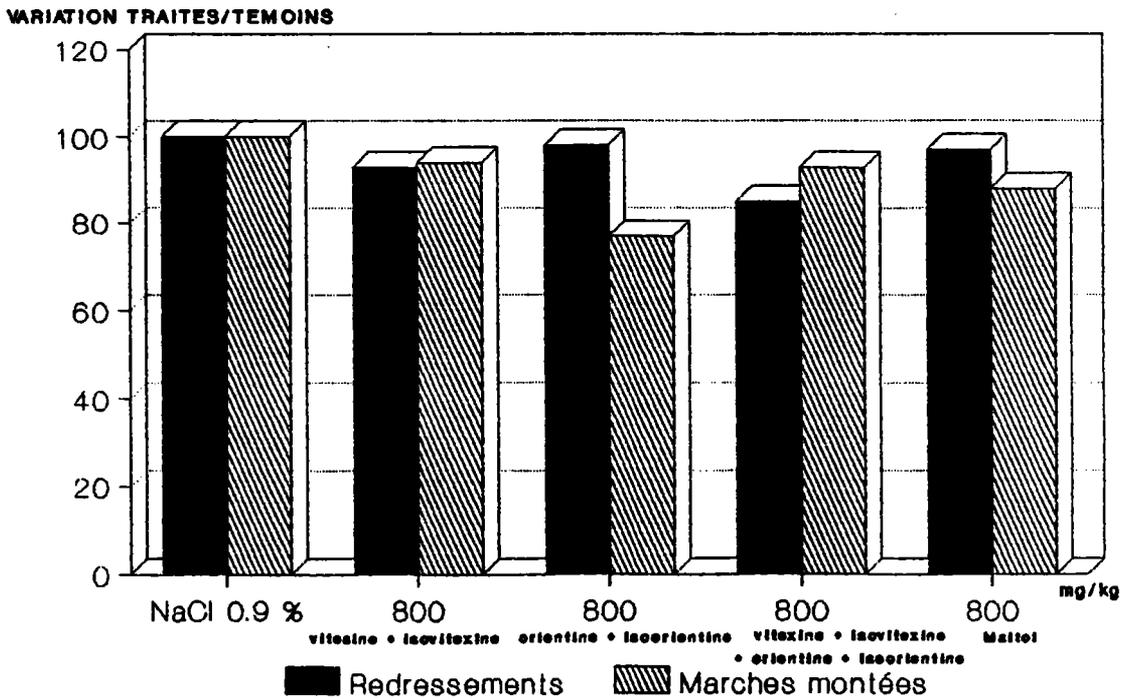


Fig.17 Influence du maltol et des flavonoïdes sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier.
(doses exprimées en équivalent plante sèche)

Tableau 16: Effet des alcaloïdes et du maltol sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier.

doses mg/kg	REDRESSEMENTS		MARCHES MONTEES	
	Moyennes	P <	Moyennes	P <
Témoins	31,5	/////	33	/////
500*	24,5	NS	30	NS
2000*	32	NS	30	NS
8000*	29	NS	28	NS
18000*	30	NS	24	NS
800**	27,5	NS	30	NS
Maltol 800	30	NS	28	NS

N = 10

* Alcaloïdes + Maltol

** Harmaline + Harmalol

Tableau 17: Effet des flavonoïdes sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier.

doses mg/kg	REDRESSEMENTS		MARCHES MONTEES	
	Moyennes	P <	Moyennes	P <
Témoins	30,5	/////	31,5	/////
Vitexine + Isovitexine 800	28,5	NS	29,5	NS
Orientine + Isoorientine 800	30	NS	25,5	NS
Vitexine + Isovitexine + Orientine + Isoorientine 800	26,5	NS	29,5	NS

N = 10

**II-3-1-3) INFLUENCE DES EXTRAITS DE *M.OFFICINALIS* ET DE
P.INCARNATA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS DANS LE
TEST DE MILIEU NOUVEAU**

1) Procédure expérimentale

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.

2) Méthode

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 milieu familial (LF), dans le milieu nouveau (LN) et totale ($L = LF + LN$) ainsi que le nombre de redressements.

3) Influence de l'extrait hydroalcoolique de *M. officinalis*

Les doses testées, de *M. officinalis* sont les suivantes :

3 - 6 - 12,5 - 25 - 50 - 100 mg/kg

4) Influence des extraits de *P. incarnata*

NaCl 0,9 % est utilisé comme témoin et solvant de préparation des extraits à administrer en i.p..

a) L'extrait hydroalcoolique

L'extrait hydroalcoolique est testé à une seule dose :

800 mg/kg

b) L'extrait aqueux

L'extrait aqueux de *P. incarnata* est testé aux doses suivantes :

25 - 100 - 400 et 800 mg/kg

Statistiques

L'homogénéité des variances, entre les lots témoins et chaque lot traité, étant vérifiée par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques sont réalisées, à l'aide d'un test paramétrique : le test de Dunnett.

5) RESULTATS

1- Influence de *M.officinalis* sur le comportement de la souris dans le test du milieu nouveau.

La figure 18 met en évidence une diminution significative de la locomotion et des redressements des souris traitées aux doses de 6,25 - 12,5 - 25 - 50 et 100 mg/kg avec un effet maximal à la dose de 25 mg/kg.

2- Influence de *P.incarnata* sur le comportement de la souris dans le test du milieu nouveau.

Les résultats obtenus sur la figure 19 nous permettent de conclure à l'activité inhibitrice de l'extrait végétal de *P.incarnata* sur la locomotion et les redressements, dans le test du milieu nouveau, à partir de la dose de 100 mg/kg, avec un effet maximal à 400 mg/kg, par contre l'extrait hydroalcoolique testé à 800 mg/kg n'a révélé aucune influence sur ces paramètres dans ce même test.

VARIATION TRAIT/TEM.

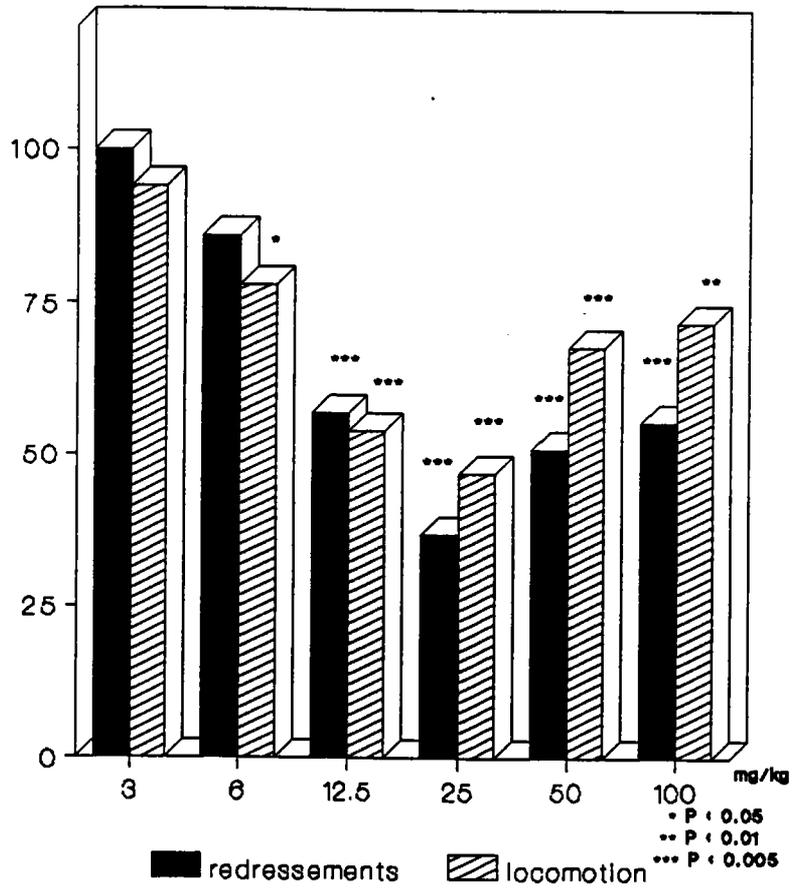


Fig.18 Effet de *Melissa officinalis* sur les redressements et la locomotion de la souris dans le test du milieu nouveau

VARIATION TRAIT/TEM.

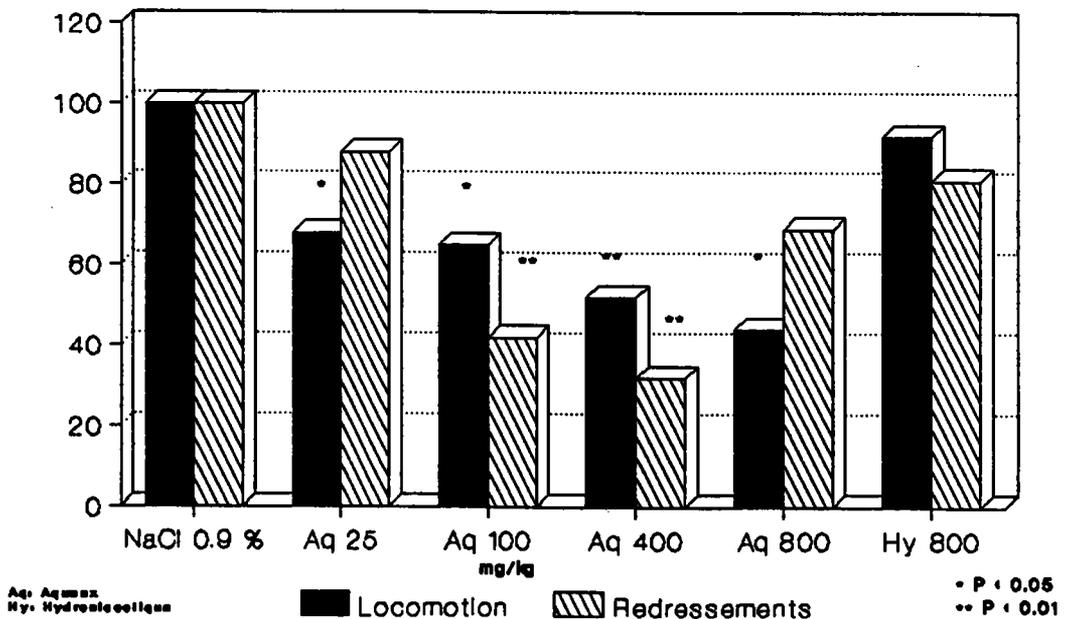


Fig.19 Influence de l'extrait végétal de *passiflora* sur la locomotion et les redressements de la souris dans le test dit du milieu nouveau.

Tableau 18: Effet de l'extrait aqueux et hydroalcoolique et du de *P.incarnata* sur le comportement de la souris dans le test du milieu nouveau.

doses mg/kg	LOCOMOTION		REDRESSEMENTS	
	Moyennes	P <	Moyennes	P <
Témoins	100	/////	100	/////
Aqueux 25	66	0,05	87	NS
Aqueux 100	64	0,05	53	0,01
Aqueux 400	52	0,01	46	0,01
Aqueux 800	48	0,05	39	NS
Hydroalc.800	88	NS	83	NS

N = 10

**II-3-1-4) EFFET INDUCTEUR ET POTENTIALISATEUR DU SOMMEIL DE
M.OFFICINALIS ET DE P.INCARNATA APRES TRAITEMENT A UNE
DOSE INFRA-HYPNOTIQUE ET HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL
SODIQUE CHEZ LA SOURIS.**

1) Protocole expérimental

Mise au point et validation du protocole:

La mise au point du protocole opératoire a constitué le thème d'un DEA (1984) et nous a permis de définir plusieurs paramètres :

- Les animaux : de même âge (11 à 13 semaines)
- Sexe des animaux : mâle, à cause du cycle oestral de 4 à 6 jours des souris femelles.

- Période de réalisation du test :

Phase nocturne = phase active des animaux. Selon le programme de cyclage de l'animalerie, les animaux sont conditionnés à leur nouveau cycle nuit/jour pendant un minimum de 15 jours.

L'application de ces conditions expérimentales à 17 lots de souris sur une période de un an nous a permis de montrer une réduction de la variabilité des résultats (20 %) par rapport à ceux obtenus auparavant (+ 50 %), et nous a permis de minimiser l'influence des saisons sur le sommeil des animaux.

2) 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.

M.officinalis et *P.incarnata* sont administrées par voie I.P., trente minutes avant l'injection 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.

3) Effets des extraits végétaux sur l'induction du sommeil narcotique

Une dose infra-hypnotique de pentobarbital est utilisée, à savoir 25 mg/kg.

Le clorazépate dipotassique (TranxèneR, Laboratoires Clin-Midy, Paris), est utilisé comme produit de référence et administré aux doses de 5 et 10 mg/kg.

NaCl 0,9 % est utilisé comme témoin et solvant pour la préparation des différentes solutions et extraits à administrer en i.p..

a) M.officinalis.

L'extrait végétal de *M.officinalis* est testé aux doses de

3,12 - 6,25 - 25 - 100 mg/kg.

L'huile essentielle est testée aux doses de

3,12 - 6,25 - 25 - 100 μ l/kg.

b) P.incarnata.

b-1) l'extrait aqueux

L'extrait végétal aqueux de *P.incarnata* est testé aux doses de 400 et 800 mg/kg

b-2) les extraits : Pi1, Pi3, Pi4 et Pi5

Les différents extraits sont testés aux doses de 800 mg/kg.

Statistiques

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test de X² (correction de Yates).

3-1) RESULTATS

3-1-1) Effet de *M.officinalis* sur l'induction du sommeil barbiturique chez la souris.

La figure 20 nous permet de constater que chez le lot témoin, traité au NaCl 0,9 %, seuls 10 % des souris sont endormies, alors qu'avec les doses de 3,12 et 6,25 mg/kg on obtient un effet inducteur du sommeil au pentobarbital; par contre le lot traité à l'huile essentielle aux mêmes doses que l'extrait de plante n'a montré aucune activité vis à vis de l'induction du sommeil au pentobarbital.

3-1-2) Effet des différents extraits (Pi1, Pi2, Pi3, Pi4, Pi5) de *P.incaranata* sur l'induction du sommeil au pentobarbital chez la souris.

D'après les résultats présentés sur les figures 21 et 22, l'extrait hydroalcoolique (Pi1) de *P.incaranata*, testé à 400 et 800 mg/kg, n'induit pas le sommeil chez des souris prétraitées par une dose infrahypnotique de pentobarbital; par contre, les extraits aqueux (Pi2) aux doses de 400 et 800 mg/kg, Pi3 et Pi4 aux doses de 800 mg/kg augmentent le nombre de souris endormies après traitement par cette même dose infra-hypnotique de barbiturique, l'extrait aqueux Pi5 augmente le nombre de souris endormies mais cet effet reste non significatif.

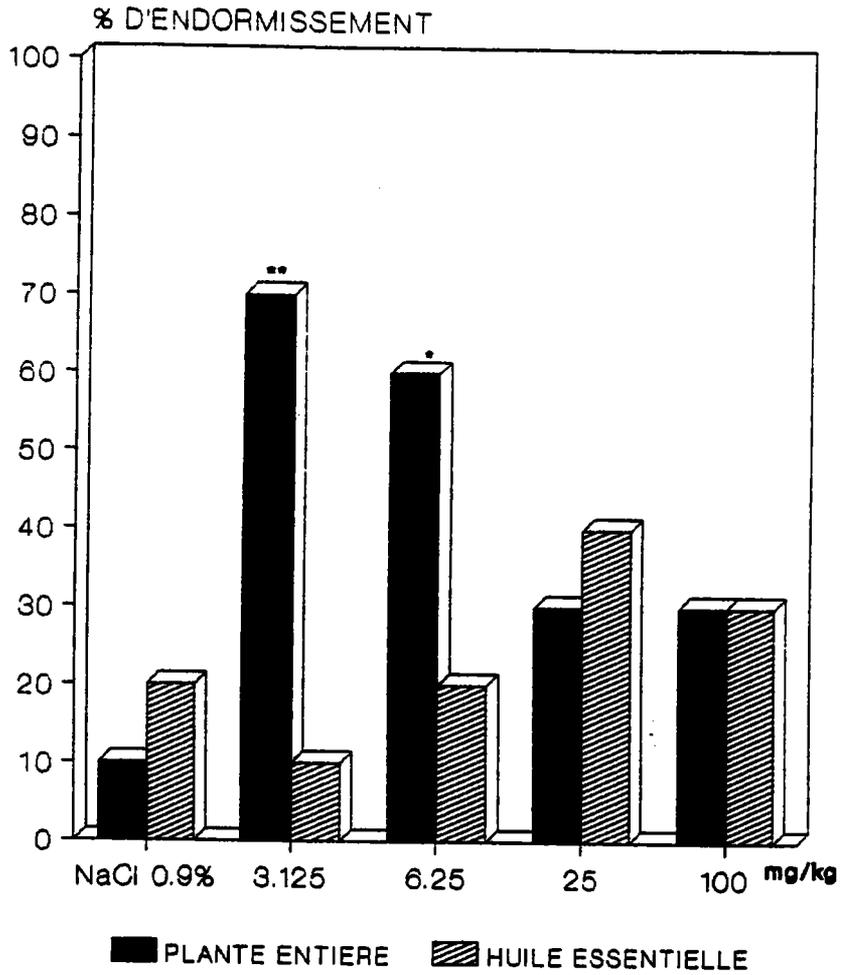


Fig.20 Effet de Melissa Officinalis sur l'induction du sommeil au pentobarbital, chez la souris. ** P < 0.001
* P < 0.05

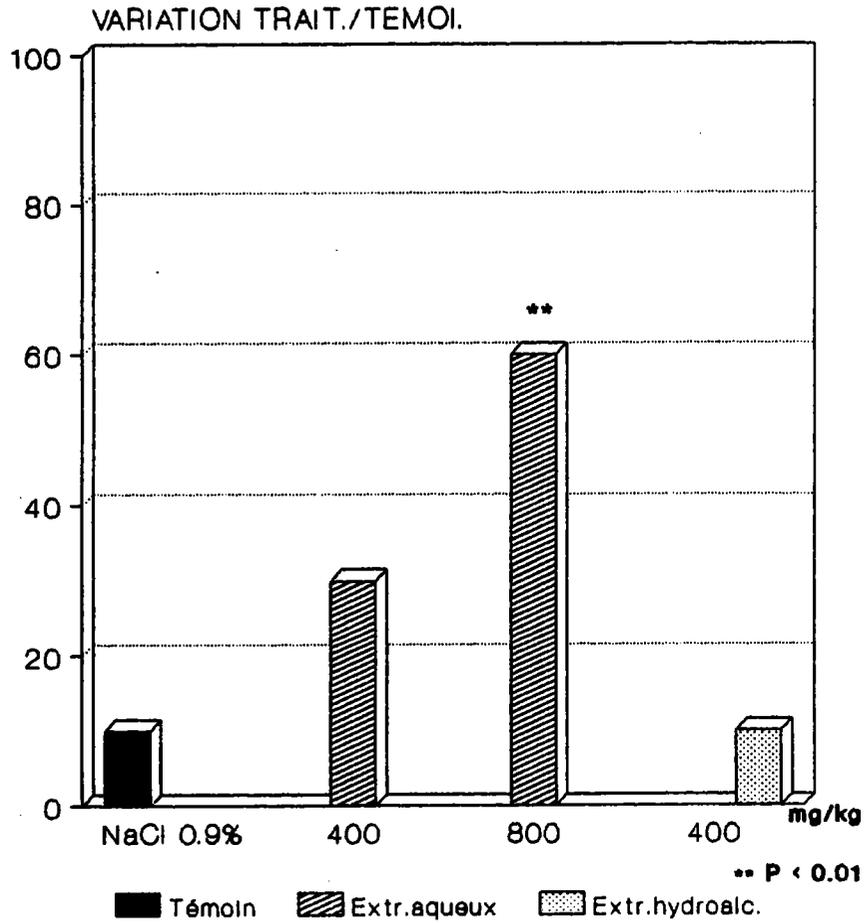


Fig.21 Effet de *passiflora incarnata* sur l'induction du sommeil au pentobarbital chez la souris.

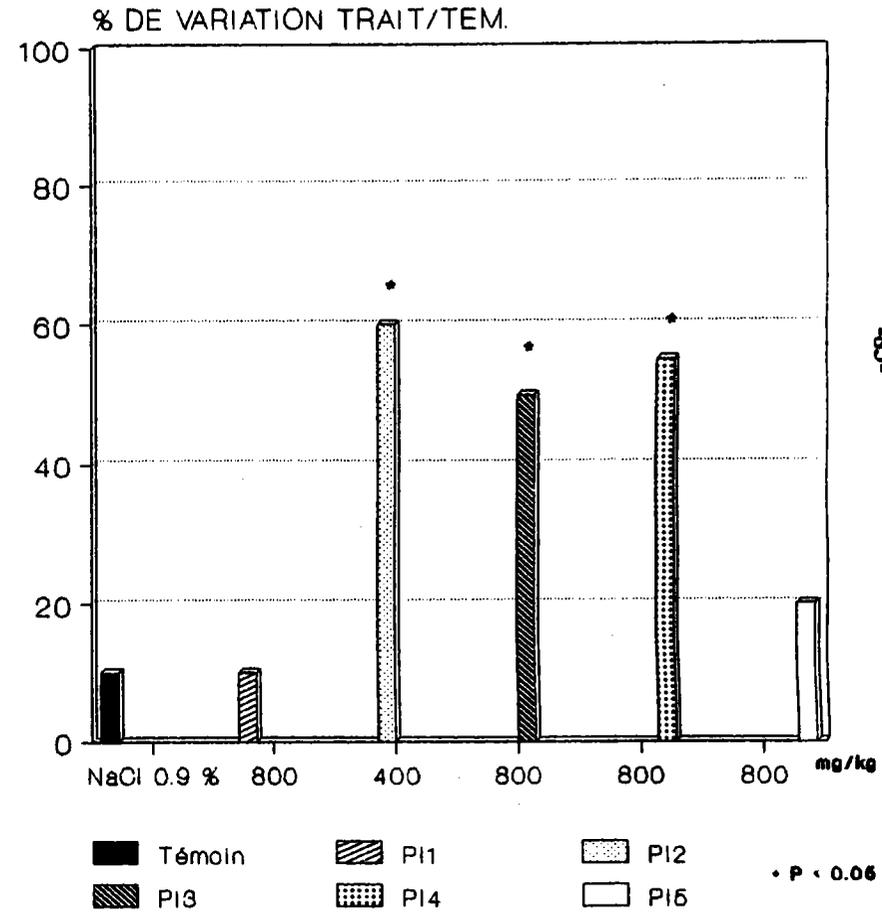


Fig.22 Effet de différents extraits de *Passiflora incarnata* sur l'induction du sommeil barbiturique chez la souris.

Tableau 19: Influence de l'extrait hydroalcoolique et de l'huile essentielle de *M.officinalis* sur l'induction du sommeil au pentobarbital.

LOTS		NaCl	M.O. (extrait hydroal.)				M.O. (Huile essentielle)			
			3 mg/k	6 mg/kg	25 mg/kg	100 mg/kg	3 µl/kg	6 µl/kg	25 µl/gk	100 µl/kg
Indu- cti- on	% de var.	10	70	60	30	30	10	21	40	30
	P <	////	0,01	0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

N = 10

Tableau 20: a) Effet de l'extrait aqueux de *P.incarnata* sur l'induction et la potentialisation du sommeil au pentobarbital.

Doses : mg/kg	0	Extrait aqueux P.i.2 400 mg/kg	Extrait aqueux P.i.2 800 mg/kg
Nombre de souris endormies	1/10	3/10	6/10
% de souris endormies .	10 %	30 %	60 %
P <	////////	NS	0,01

N = 10

b) Effet des différents extraits de *P.incarnata* sur l'induction et la potentialisation du sommeil au pentobarbital.

		TEMOINS	Pi1++	Pi2++	Pi3++	Pi4++	Pi5++
INDUCTI	////	10 %	10 %	60 %*	50 %*	55 %*	20 %
POTENTI	////	100 %	//	118 %	115 %	138 %	66 %*

N = 10

++ dose = 800 mg/kg

* p < 0.05

4) Effet des extraits végétaux sur la Potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

Le pentobarbital est administré à une dose hypnotique, soit 40 mg/kg.

a) Effet de *M.officinalis*.

L'extrait végétal est testé aux doses de 6,25 - 50 - 200 - 400 mg/kg.

b) Effet de *P.incarnata*.

L'extrait végétal est testé aux doses de 400 - 800 mg/kg.

STATISTIQUE

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test statistique de Dunnett.

4-1) RESULTATS

4-1-1) Effet de *M.officinalis* sur la potentialisation du sommeil au pentobarbital chez la souris

La figure 23 met en évidence un effet significatif de l'extrait végétal sur l'augmentation du temps de sommeil chez les souris traitées aux doses de 6,25 et 50 mg/kg, cet effet potentialisateur du sommeil disparaît aux doses de 200 et 400 mg/kg.

4-1-2) Effet de *P.incarnata* sur la potentialisation du sommeil au pentobarbital chez la souris.

Lorsque le pentobarbital est administré à une dose hypnotique l'extrait hydroalcoolique (Pi1) ainsi que les différents extraits aqueux (Pi2, Pi3 et Pi4) n'ont montré aucun effet significatif sur l'augmentation du sommeil au pentobarbital à la dose de 800 mg/kg à l'exception de l'extrait Pi5 qui, à la dose de 800 mg/kg, non seulement il n'est pas actif mais au contraire il s'oppose à l'action du pentobarbital en réduisant la durée du sommeil barbiturique, chez les souris, d'une façon statistiquement significative.(Fig.24 et 25.)

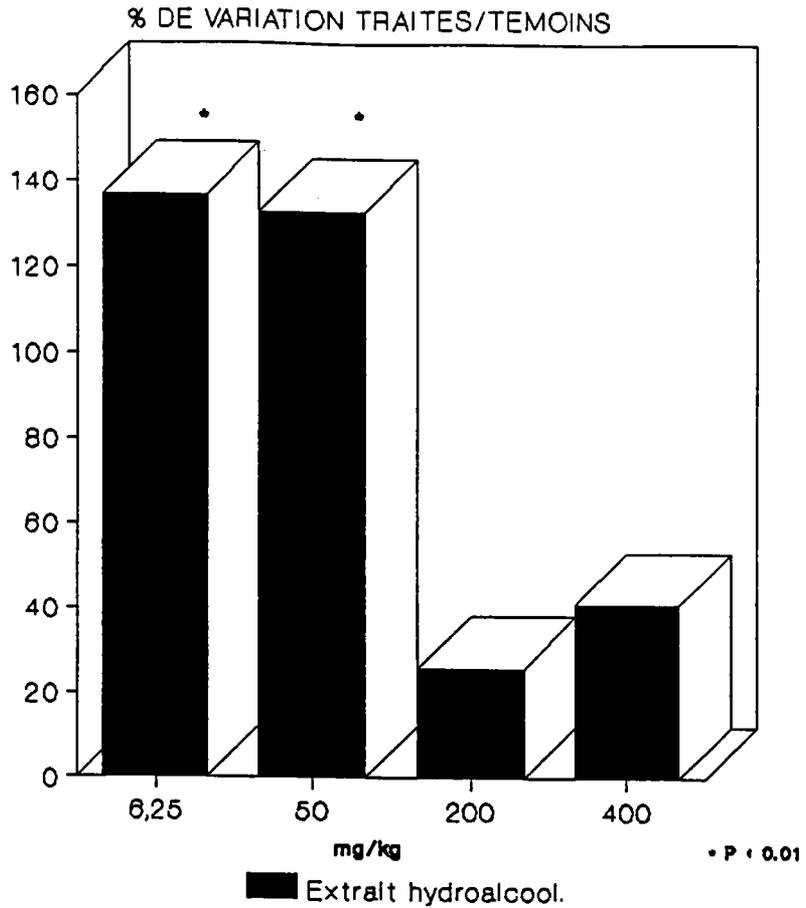


Fig.23 Effet de Melissa officinalis sur la potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

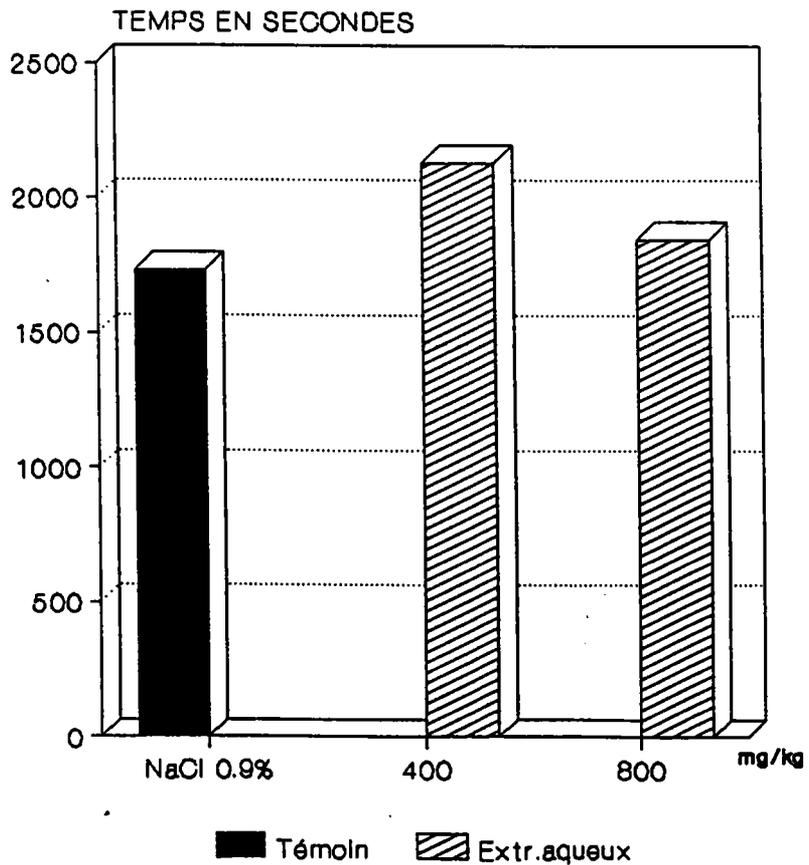


Fig.24 Effet de passiflora incarnata sur la potentialisation du sommeil au pentobarbital chez la souris.

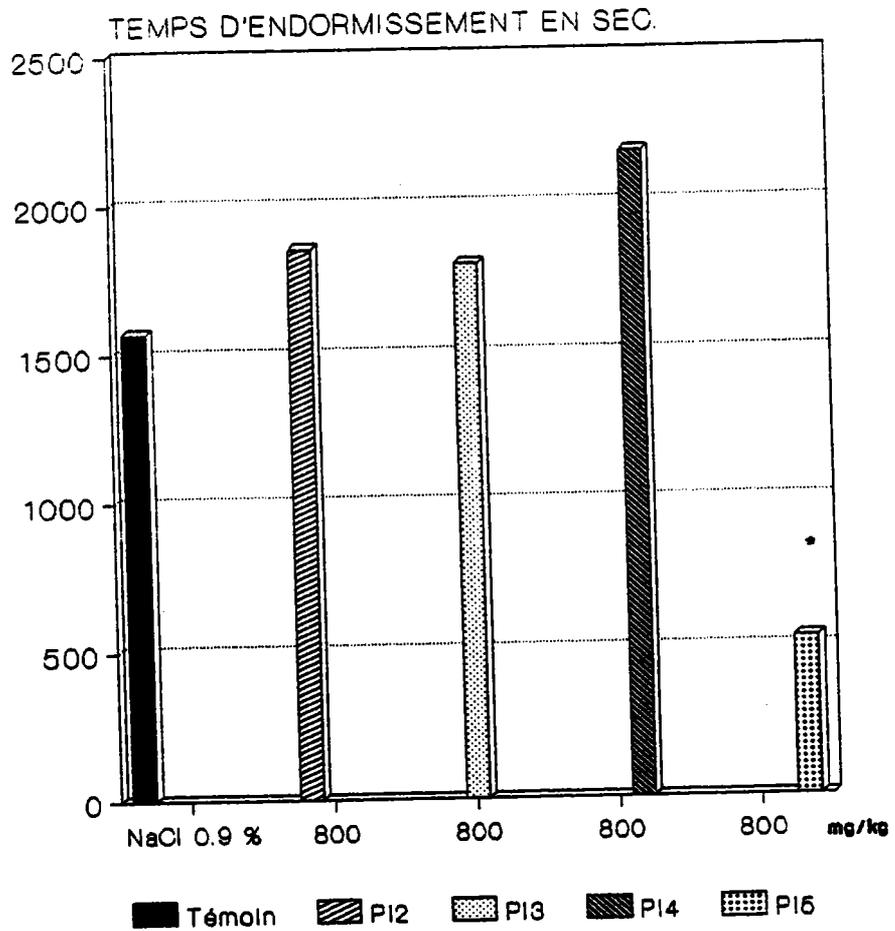


Fig.25 Effet de différentes préparations de Passiflora incarnata sur la potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

• P < 0.05

Tableau 21: Effet de *Melissa officinalis* sur la potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

Doses : mg/kg	0	6	50	200	400
temps d'endormiss en sec ± SE	1117 1227	2654	2606	1406	1746
% d'augmen du temps d' endormisst.	0	133	113	26	41
P <	////////	0.01	0.01	NS	NS

N = 10

Tableau 22 Effet de *Passiflora incarnata* sur la potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

Doses : mg/kg	0	Extrait aqueux P.i.2 400 mg/kg	Extrait aqueux P.i.2 800 mg/kg
temps d'endormiss en sec ± SE	1735±321	2126 ± 540	1850 ± 402
% d'augmen du temps d' endormisst.	0	123	107
P <	////////	NS	NS

N = 10

Tableau 23: Effet des différents extraits de *Passiflora incarnata* sur la potentialisation du sommeil barbiturique chez la souris.

Doses : mg/kg	0	P.i.3 800 mg/kg	P.i.4 800 mg/kg	P.i.5 800 mg/kg
temps d'endormiss en sec ± SE	1569 ± 354	1798 ± 615	2170 ± 1150	531 ± 68
% d'augmen du temps d' endormisst.	0	115	138	66
P <	///////	NS	NS	0,01

N = 10

II-3-1-5) INFLUENCE DE L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE *PASSIFLORA INCARNATA* SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS CONFRONTEE A UNE ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE

Les résultats obtenus avec l'extrait hydroalcoolique de *P. incarnata* sur le test de l'escalier, et qui n'ont pas montré un effet de réduction des paramètres comportementaux mais au contraire une tendance vers l'augmentation de ces paramètres, nous ont incité à l'utilisation d'un test plus spécifique dans le but de confirmer cette tendance d'augmentation des paramètres comportementaux.

1) Procédure expérimentale

1-1) Matériel

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles Swiss; leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux.

Le dispositif expérimental consiste en deux cages en plexiglass (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.

1-2) Méthode

L'extrait hydroalcoolique de *Passiflora incarnata* est administré par voie I.P., aux doses de 100 - 200 - 400 - 800 mg/kg (doses exprimées en plante sèche). 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).

Statistiques

L'apparition d'une différence significative à l'aide d'une ANOVA globale nous permet de faire des comparaisons, deux à deux des lots traités au lot témoin, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett on peut utiliser un test paramétrique de comparaison multiples, le test de Newman-Keuls.

2) RESULTATS

La figure 26 nous permet de rappeler que l'extrait hydroalcoolique de *P. incarnata* a entraîné une augmentation des redressements et des marches montées d'une façon significative dans le test de l'escalier, surtout à la dose de 400 mg/kg. Cet effet est confirmé par l'augmentation du temps passé dans le compartiment éclairé et des redressements dans un test plus spécifique, le test de la chambre claire/obscur, cette augmentation est surtout observée à la dose de 400 mg/kg c'est à dire à la même dose efficace que dans le test de l'escalier.(Fig 27)

VARIATION TRAIT./TEM.

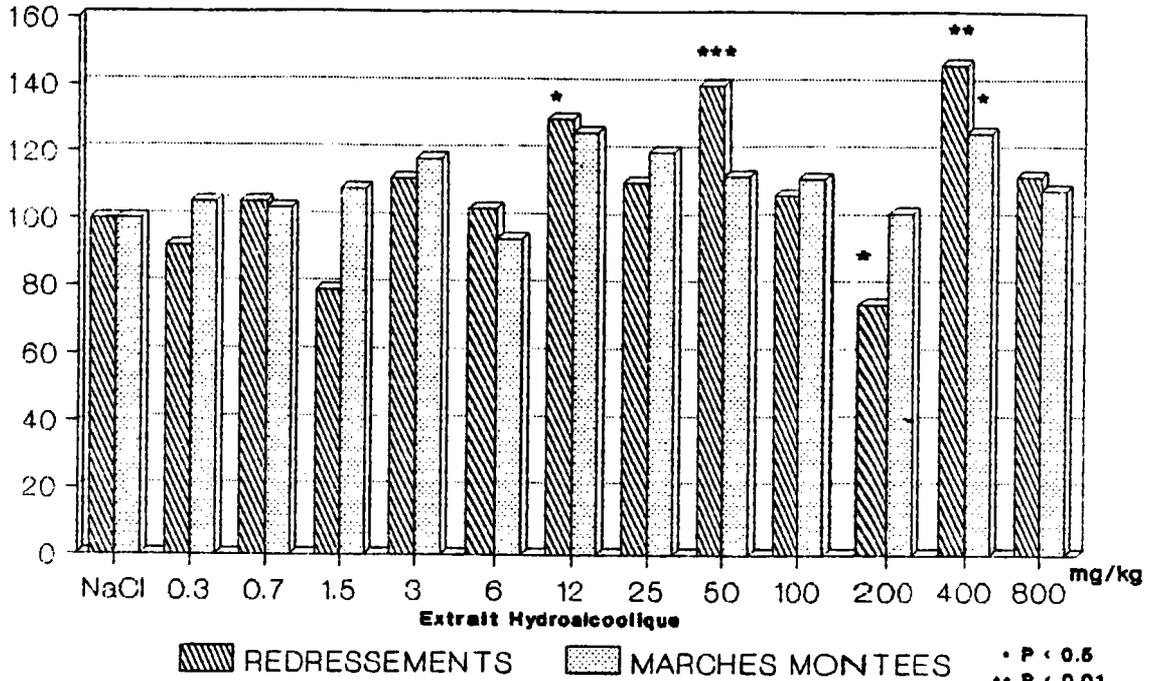


Fig.26 Effet de *Passiflora incarnata* sur les redressements et les marches montées de la souris (test de l'escalier).

• P < 0.5
 ** P < 0.01
 *** P < 0.001

% variation trait./tém.

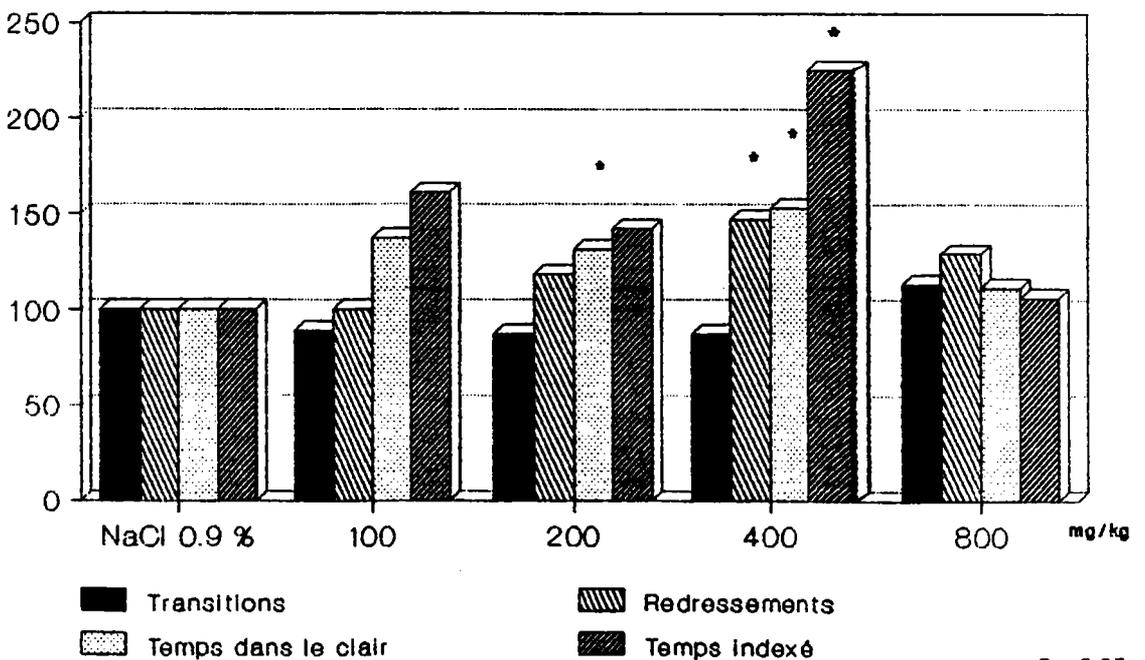


Fig.27 Influence de l'extrait hydroalcoolique de la *passiflora* sur le comportement de la souris dans le test de la chambre claire/obscure.

• P < 0.05

Tableau 24: Effet de l'extrait hydroalcoolique de *P.incarnata* sur le comportement de la souris dans le test de la chambre claire/obscur.

doses mg/kg	Temps passé dans le clair		Nombre de Transition		Temps Indexé		Nombre de Redressement	
	Moy.	P <	Moy.	P <	Moy.	P <	Moy.	P <
Témoins	46"37	////	7,5	////	6,9"	/////	14	/////
100	63"64	NS	6,7	NS	11,2"	NS	14	NS
200	61"04	5 %	6,5	NS	9,9"	NS	16,5	NS
400	70"70	5 %	6,5	NS	15,7"	5 %	20,5	5 %
800	51"47	NS	8,5	NS	7,1"	NS	18	NS

N = 10

II-3-1-6) CONCLUSION

1- Melissa officinalis:

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de remarquer qu'au travers des tests psychopharmacologiques, on peut confirmer que l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* possède des propriétés neurotropes de type sédatives puis qu'il a entraîné d'une part, la réduction des redressements, de la locomotion et des marches montées, aussi bien dans un test contraignant (test de l'escalier) que dans un test non contraignant (test du milieu nouveau), cet effet est dose dépendant jusqu'à la dose de 25 mg/kg mais diminue à forte dose. Aucune tendance à une activité anxiolytique dans le test contraignant (test de l'escalier) n'a été remarquée, d'autre part ce même extrait a montré une influence, à faible dose, vis-à-vis de l'induction et de la potentialisation du sommeil au pentobarbital, ce qui renforce la confirmation de ses propriétés sédatives. Ces résultats nous ont également permis de vérifier que l'huile essentielle ne constitue pas le support de cette activité.

Le fractionnement de l'extrait nous a amené à conclure que l'activité sédative résulte d'une éventuelle synergie de l'ensemble de l'extrait végétal puisque cette activité n'a pu être mise en évidence au niveau d'aucune fraction ni d'aucune association de fraction par 2, 3 ou 4; par contre le mélange de l'ensemble des fractions permet de restaurer l'activité sédative à la dose de 50 mg/kg et qui paraît être plus importante que l'extrait total lui même. Le fractionnement réalisé n'a donc pas permis d'isoler les fractions responsables de l'activité pharmacologique, les différentes fractions testées seules, associées par deux, par trois ou par quatre ont toujours présenté une activité pharmacologique inférieure à celle de l'extrait total, ce qui renforce l'utilisation de l'extrait total.

2) P. incarnata

L'ensemble des travaux réalisés et visant à évaluer l'activité pharmacologique de différents extraits obtenus par différents protocoles d'extractions nous permettent d'apporter les conclusions suivantes:

L'extrait hydroalcoolique (Pi1) obtenu à partir du même lot de cryobroyat que l'extrait aqueux (Pi2) ne présente pas d'activité neurotrope de type sédative dans le test d'escalier et le test du milieu nouveau, ni d'activité inductrice du sommeil barbiturique chez la souris, par contre ce même extrait a présenté une augmentation des redressements et des marches montées dans le test de l'escalier, à la dose de 400 mg/kg, ce qui nous a incité à vérifier, à l'aide d'un test plus spécifique (Test de l'enceinte claire/obscur), que cette augmentation du comportement locomoteur était liée à un effet neurotrope de type anxiolytique .

L'extrait aqueux (Pi2) de *P. incarnata* obtenu à partir de cryobroyat a présenté une activité neurotrope de type sédative, en réduisant les redressements, les marches montées et la locomotion, dans le test de l'escalier et le test du milieu nouveau à la dose de 800 mg/kg. Cet extrait présente également une induction du sommeil chez les souris prétraitées par une dose infra-hypnotique de pentobarbital à la dose de 400 mg/kg. Les extraits aqueux (Pi3 et Pi4) obtenu à partir de l'extrait aqueux (Pi2) présentent, également, une activité sédative, en réduisant les redressements et les marches montées, dans le test de l'escalier à la dose de 800 mg/kg. Ces mêmes extraits présentent de même, une induction du sommeil chez les souris prétraitées par une dose infra-hypnotique de pentobarbital à la dose de 800 mg/kg.

Les récepteurs aux benzodiazépines ne semblent pas être impliqués dans cette activité neurotrope sédatrice de l'extrait aqueux, comme cela a été démontré pour une espèce voisine, *Passiflora caerulea* qui contient une flavonoïde : la chrysin qui semble être le support de cette activité (Medina et coll, 1990).

L'addition de l'alcool n'altérerait en rien l'extrait aqueux obtenu précédemment, l'extrait aqueux serait donc le support de l'activité neurotrope sédatrice.

L'extrait (Pi5) obtenu à partir du résidu de la préparation de l'extrait hydroalcoolique et préparé dans les mêmes conditions que les extraits (Pi1 et Pi2), montre une réduction des redressements et des marches montées, dans le test de l'escalier, et reste sans effet sur l'induction du sommeil par contre cet extrait présente une diminution de la durée du sommeil dans le test de la potentialisation du sommeil barbiturique, ce qui pourrait laisser supposer que ce mode d'extraction a permis d'isoler des substances végétales pouvant présenter d'autres activités.

Ceci démontre que les substances actives étaient bien présentes dans le résidu ou le marc après extraction par un mélange hydroalcoolique.

Les résultats obtenus avec le test de l'escalier, pour l'extrait hydroalcoolique, et qui montraient une augmentation des redressements et des marches montées, donc une activité désinhibitrice autrement dit anxiolytique, ont été confirmés par l'utilisation d'un test plus spécifique, le test de la chambre claire/obscur, qui a permis de montrer le même effet du même extrait hydroalcoolique à la même dose.

Ceci nous permet de conclure à une activité neurotrope de type anxiolytique de l'extrait hydroalcoolique.

II-4) RECHERCHE DE PROPRIETES ANALGESIQUES DE M.OFFICINALIS

A) Introduction

*** 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 algogène électrique, 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 *M.officinalis* 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.

B) Influence de *M.officinalis*, vis à vis d'une douleur occasionnée par l'acide acétique (test du writhing)

Le test du writhing permet de mettre en évidence l'activité des analgésiques majeurs de type morphine et mineurs de type aspirine.

1) Procédure expérimentale

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.

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.

M.officinalis est administrée aux doses de 25, 100, 200, 400, 800 et 1600 mg/k.

Le produit de référence testés est l'acétylsalicylate de lysine ASL (AspegicR, Laboratoires Synthélabo France, Paris), à la dose de 68 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 % de protection par rapport au lot témoin, selon le rapport.

(Valeur moyenne témoin - Valeur moyenne traitée) / Valeur moyenne témoin x 100

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 témoins et traités. Ceux-ci sont ensuite comparés par un test de comparaisons multiples, le test de Newman-Keuls.

C) RESULTATS

D'après les résultats présentés sur la figure 28 et le tableau 25, *M.officinalis* réduit significativement le nombre de contorsion et d'étirements induits par l'injection d'acide acétique 1,2 %, dès la dose de 400 mg/kg, cet effet est dose dépendant jusqu'à la dose de 1600 mg/kg avec un maximum de protection de 70 %.

Les résultats obtenus avec le produit de référence ont montré que l'acétylsalicylate de lysine (A.S.L.) analgésique mineur, exerce un effet protecteur important et significatif à la dose de 68 mg/kg, en réduisant les phénomènes douloureux.

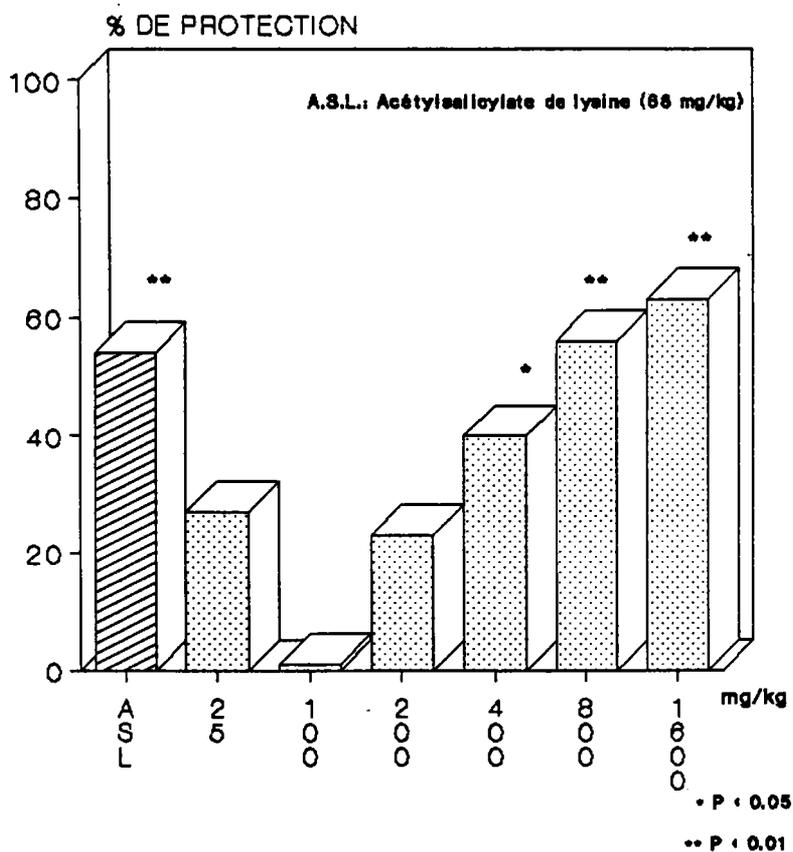


Fig.25 Effet de *M.officinalis* vis à vis de la douleur induite par l'acide acétique.

Tableau 25 Effet de *Melissa officinalis* vis à vis de la douleur induite par l'acide acétique.

	NaCl	ASL	Melissa officinalis					
LOTS	0,9 %	68 mg/kg	25 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/gk	1000 mg/kg
Moyenne	45,2 47,9	22	32,8	45	36,7	28,7	21	17,5
Ecart - type	6,74 4,4	3,53	6,4	8,76	4,7	5,4	4,6	3,5
% par rapport au témo.	100	46	72,5	100	76,6	60	44	36,5
% de protect.	/// ///	54	27,5	0	23,4	40	56	63,5
P <	////	0,01	NS	NS	NS	0,05	0,01	0,01

N = 10

D) Influence de *M.officinalis* vis à 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.

1) Procédure expérimentale

1-1) Animaux

Les animaux utilisés sont des souris mâles swiss (Janvier); leurs caractéristiques et conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacrés aux animaux.

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 $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 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.

1-2) Méthode

La méthode utilisée est décrite par Boissier et Coll.(1956).

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 le traitement.

Les substances à tester sont administrées par voie I.P., trente minutes avant le test proprement dit.

M.officinalis est injectée aux doses de 6 - 25 - 100 - 200 - 400 - 800 et 1600 mg/kg.

Le produit de référence utilisé est le sulfate de morphine à 10 mg/kg.

NaCl 0,9 % constitue la solution témoin et le solvant de préparation des différentes solutions et extraits végétaux à administrer en i.p..

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 :

$$T(\text{avant traitement}) - T(\text{après traitement}) / T(\text{avant traitement}) \times 100$$

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.

Analyse statistique

L'apparition d'une différence significative à l'aide d'une ANOVA globale nous permet de faire des comparaisons, deux à deux des lots traités au lot témoin, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, on peut utiliser un test paramétrique de comparaison multiples, le test T de Student.

E) RESULTATS

D'après les résultats présentés dans la figure 29 l'extrait de *M.officinalis* n'a montré aucun effet protecteur vis à vis de la douleur induite par la chaleur et ceci à aucune dose.

F) CONCLUSION

L'évaluation de l'activité analgésique au travers des deux tests utilisés, test du writhing et test de la plaque chauffante, nous ont permis de constater que *M.officinalis* possède des propriétés analgésiques périphériques et surtout à fortes doses par une protection significative contre la douleur induite par l'acide acétique dans le test du writhing alors qu'aucune protection vis à vis de la chaleur n'a permis de montrer une activité analgésique de type centrale.

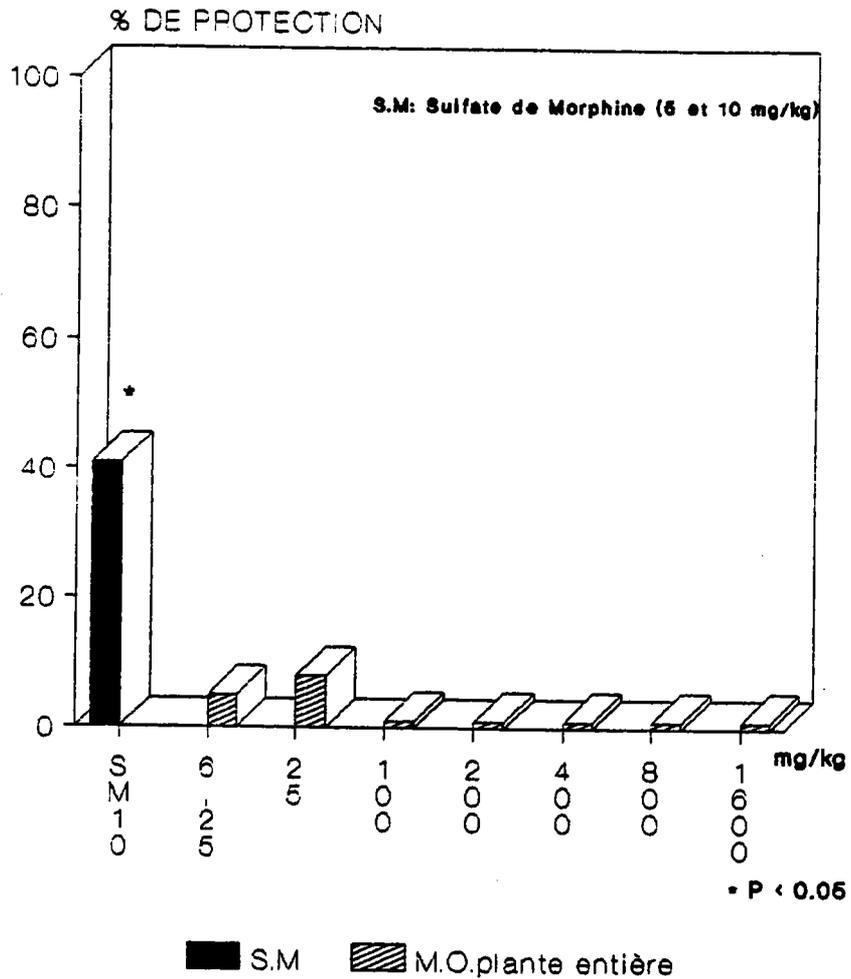


Fig.29: Effet de MO vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur chez la souris

Tableau 26: Effet de *Melissa officinalis* et du sulfate de morphine vis à vis de la douleur induite par la chaleur chez la souris.

Doses mg/kg	Morph. sulfa. 10	6	25	100	200	400	800	1600
% de variat -ion	+ 41	+ 5.2	+ 8.2	- 1.6	- 20	- 1.6	- 12	- 20
P <	0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

II-5) DISCUSSION

L'ensemble des travaux chimiques et pharmacologiques rassemblés sur le tableau 25 nous ont donc permis de dresser le bilan suivant :

Pour *M. officinalis*

L'extrait hydroalcoolique de *M. officinalis* présente des propriétés sédatives qui ont été mis en évidence à l'aide de tests comportementaux contraignant (test de l'escalier) et non contraignant (test du milieu nouveau), cette activité s'est révélée à la dose de 25 mg/kg pour l'extrait végétal et à 10 mg/kg pour le clorzébate dipotassique (Tranxène) utilisé comme produit de référence. De plus ce même extrait entraîne une induction et une potentialisation du sommeil au pentobarbital à la dose de 3 et 50 mg/kg. Cette activité sédative pourrait être due, probablement à un mécanisme de synergie entre les différentes composantes de l'extrait total, puisque le fractionnement de l'extrait ne nous a pas permis d'identifier une ou plusieurs fractions constituant le support de cette activité sédative, d'autant plus que certaines fractions ont montré une légère diminution des paramètres comportementaux, qui s'est avérée inférieure à celle induite par l'extrait total, alors que d'autres ont montré une légère augmentation de ces paramètres comportementaux avec plutôt une tendance vers une activité de type anxiolytique, l'addition de toutes les fractions isolées est la seule condition permettant de restaurer une activité comparable, voire supérieure, à celle de l'extrait total, ceci constitue une preuve de plus en faveur de l'activité d'un extrait dans sa totalité et que le fractionnement fait disparaître l'activité de base de l'extrait total. Il était intéressant, également, de vérifier l'implication de l'huile essentielle dans les activités pharmacologiques sédatives et inductrices du sommeil, les résultats obtenus ont permis d'écarter l'hypothèse suivant laquelle, l'une de ces activités serait liée à la présence de l'huile essentielle, puisque cette dernière, d'une part n'a montré aucune activité, dans l'ensemble des tests utilisés, d'autre part la forme de l'extrait utilisé étant un lyophilisat, l'absence de l'huile essentielle dans ce dernier est quasi-totale.

L'évaluation de l'activité analgésique de *M. officinalis* était recherchée en relation avec son utilisation traditionnelle dans l'analgésie périphérique et en particulier comme antispasmodique, il nous a semblé intéressant de vérifier si cette activité antispasmodique était liée à une activité analgésique périphérique ou plutôt à une activité de type musculotrope ou neurotrope au niveau des récepteurs cholinergiques et histaminergiques.

Ainsi une activité analgésique périphérique a été mise en évidence à l'aide du test du writhing et à la dose de 800 mg/kg, cette activité est comparable à celle obtenue avec l'acétylsalicylate de lysine, utilisé comme produit de référence, et qui est actif à la dose de 68 mg/kg. (Soulimani et coll., 1991)

	Melissa officinalis				Passiflora incarnata		
	Extrait hydroalcoolique	fraction par 2, 3 et 4	ensemble des fractions	huile essentielle	extrait hydroalcoolique	extrait aqueux	alcaloïdes flavono. et maltol
test du Milieu nouveau	diminution des paramètres comportement.	////////	////////	////////	Pas d'effet	Diminution des paramètres comportementaux	////////
test de l'escalier	diminution des paramètres comportement.	Pas d'effets	Diminution des param. comport.	Pas d'effet	Augmentation des paramètres comportementaux	Diminution des paramètres comportementaux	Pas d'effet
test de la chambre claire/obscur	////////	////////	////////		Augmentation des paramètres comportementaux	////////	////////
test de l'induction du sommeil	++++	////////	////////	Pas d'effet	Pas d'effet	++++	////////
test de la potentialisation du sommeil	++++	////////	////////	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	////////
conclusion	Activité neurotrope de type sédative	Pas d'effets	Activité neurotrope liée à la totalité	Pas d'effet	Activité neurotrope de type anxiolytique	Activité neurotrope de type sédative	Pas d'effet

Tableau 25 Récapitulatif des résultats obtenus sur l'évaluation de l'activité neurotrope et analgésique de *Melissa officinalis* et *Passiflora incarnata*

Pour *Passiflora incarnata*

L'étude de l'activité pharmacologique de *P. incarnata*, dont les différents travaux pharmacologiques précédents ont montré tantôt une activité sédatrice (Speroni et Minghetti; 1988), tantôt une activité anxiolytique (Della Loggia et Coll.; 1981), a permis de mettre en évidence la présence des deux activités, inhibitrice (sédatrice) et désinhibitrice (anxiolytique), et dont le clivage dépend surtout de la nature du solvant utilisé pour l'extraction, l'activité est sédatrice lorsque l'eau est utilisée comme solvant d'extraction, alors qu'elle est anxiolytique lorsque le solvant d'extraction utilisé est l'alcool à 30 %.(Soulimani et coll., 1991). La différenciation de cette activité tranquillisante en effets sédatifs ou anxiolytiques a déjà été observée pour des substances benzodiazépéniques (clorazépate dipotassique) en fonction de la dose administrée ou pour l'extrait d'*Eschscholtzia californica* (Rolland et coll., 1991). Dans le cas des extraits de *Passiflora incarnata* nous avons constaté que l'activité neurotrope obtenue dépendait du solvant utilisé lors de la préparation des extraits.

L'addition de l'alcool à 30 %, après une extraction aqueuse n'a pas modifié l'activité de l'extrait végétal qui conserve l'activité sédatrice mise en évidence pour l'extrait aqueux de départ. la conservation d'un extrait aqueux dans de l'éthanol à 30 % est ainsi possible et n'entraîne aucune modification de l'extrait aqueux préparé au départ.

Ainsi à deux types d'extraction différents on obtient deux profils d'activités neurotropes, une extraction aqueuse avec ou sans addition d'alcool à 30 % pour une activité neurotrope de type sédatrice, et une extraction hydroalcoolique pour une activité neurotrope de type anxiolytique.

L'extraction aqueuse à partir d'un marc repris après une extraction hydroalcoolique présente toujours une activité sédatrice, mais cet extrait a montré une réduction au niveau du temps d'endormissement dans la potentialisation du sommeil au pentobarbital, ceci laisse supposer la présence d'autres substances, responsable de cette réduction, au niveau de cet extrait.

L'utilisation de substances pures, telles que les dérivés harmaniques (harmane, harmine, hamaline, harmol et harmalol), les dérivés flavonoïdiques (vitexine, isovitexine, orientine et isoorientine) et le maltol, mises en évidence dans *P. incarnata* (Lutomski et Coll.; 1967, Quercia, 1978, Löhdefink et Kating, 1974), nous ont permis de contourner le problème du fractionnement, dans un premier temps en recherchant leur implication dans les différentes activités pharmacologiques démontrées avec les extraits.

Dans nos conditions opératoires, aussi bien la sédation que l'anxiolyse ne semblent se manifester qu'avec l'extrait total de la plante et aucune des substances pures contenues dans la plante (à très faibles doses) n'a entraîné un effet neurotrope analogue à l'extrait total, les différents auteurs qui ont attribué le support de cette activité neurotrope aux alcaloïdes et au maltol ont utilisé des doses de ces substances pures qui rapportées à la plante sèche donnent des doses (pouvant atteindre des fois 10 à 15 g/kg) ne pouvant être utilisées dans les tests pharmacologiques en raison d'une éventuelle toxicité et de la limite d'utilisation des extraits en expérimentation. (Aoyagi et coll., 1974)

Donc on peut constater que dans le cas de ces deux plantes médicinales, connues et très utilisées dans la thérapeutique douce, les deux grands problèmes souvent soulevés, à savoir l'activité du totum et l'utilisation du solvant d'extraction, sont résolus et permettent d'affirmer l'activité pharmacologique de leurs extraits.

PARTIE II

**EVALUATION ET RECHERCHE, *IN VITRO*, DE
L'ACTIVITE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A
VIS DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES,
HISTAMINERGIQUES ET OPIOIDES.**

PARTIE II

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Après avoir confirmé les propriétés sédatives, anxiolytiques et analgésiques des plantes étudiées dans la première partie de ce travail (*Melissa officinalis* et *Passiflora incarnata*) ainsi que d'autres plantes étudiées au sein de notre laboratoire à l'aide de techniques *in vivo*, nous avons tenté de compléter cette étude *in vivo* par une étude *in vitro* afin de comparer les résultats obtenus dans les deux techniques *in vivo* et *in vitro*, de vérifier la spécificité de l'activité pharmacologique des plantes étudiées et de tenter d'approcher leur mécanisme d'action.

Notre intérêt s'est porté sur la technique de l'intestin isolé en raison de sa richesse en plusieurs types de récepteurs :

Les récepteurs cholinergiques impliqués dans la régulation des contractions du muscle lisse intestinal et du transit intestinal donc dans l'activité analgésique périphérique de type antispasmodique ou dans l'activité spasmolytique.

Les récepteurs histaminiques impliqués aussi bien dans la sédation au niveau du S.N.C. (H1) qu'au niveau de la régulation des contractions intestinales et de l'acidité gastrique (H2).

Les récepteurs opiacés impliqués dans l'analgésie centrale et la régulation, directement ou indirectement, des contractions intestinales et du transit intestinal.

Etant donné l'implication de ces récepteurs dans la régulation de la contraction du muscle lisse intestinal et du péristaltisme de base, nous avons tenté d'évaluer l'effet des extraits sur le péristaltisme *in vitro*. L'action des différents produits sur le péristaltisme *in vitro* peut se traduire par un effet sur le transit intestinal, c'est pourquoi nous avons développé une technique *in vivo* (test sur le transit intestinal) afin de confronter les deux techniques. Ainsi après l'évaluation de l'effet des extraits vis à vis du péristaltisme intestinal *in vitro*, nous avons recherché leurs effets sur le transit intestinal *in vivo*.

Afin de rechercher l'action des extraits vis-à-vis des trois types de récepteurs nous avons mis au point une technique *in vitro* sur l'intestin isolé (iléon de cobaye et duodénum de rat). Cette dernière technique présente plusieurs avantages :

- * Les techniques devraient répondre aux exigences d'un test de screening.
- * Les organes isolés sont riches en récepteurs cholinergiques, histaminergiques et opioïdes.
- * L'organe isolé pourra être étudié à la fois pour la recherche des substances à propriétés histaminiques ou antihistaminiques, cholinergiques ou anticholinergiques et analgésiques majeurs (opiacés).

Le travail de cette deuxième partie s'inscrit donc dans une continuité de différentes recherches menées sur les deux plantes étudiées dans la première partie et sur d'autres espèces végétales étudiées au sein du laboratoire. Ainsi nous avons choisis 4 plantes qui possèdent des activités sédatives et/ou analgésiques : *Melissa officinalis* (Soulimani et coll., 1991), *Eschscholtzia californica* (Rolland et coll., 1991), *Fagara zanthoxyloides* (Bertrand, 1988) *Euphorbia hirta* (Lanhers et coll., 1990).

Ce choix est lié au fait que depuis longtemps on sait que les substances autres que les psychotropes peuvent également exercer des effets sédatifs surtout au niveau des tests in vivo ou des simples observations cliniques, ainsi les substances antihistaminiques H1, ont toujours manifesté un effet secondaire sédatif en plus de leur effet principalement antihistaminique; c'est pourquoi nous avons entrepris de rechercher le comportement de ces plantes à propriétés sédatives vis à vis des récepteurs histaminergiques in vitro.

L'étude des propriétés analgésiques de ces plantes a requis l'utilisation de méthodes classiques in vivo effectués chez la souris, le développement d'une technique d'étude in vitro vis-à-vis des récepteurs opioïdes pourrait répondre à deux objectifs, compléter le screening des études in vivo, d'une part, rechercher le mécanisme d'action des extraits végétaux à propriétés analgésiques d'autre part.

La recherche bibliographique sur les indications thérapeutiques des différentes plantes a constitué notre deuxième démarche pour le choix de 4 autres plantes, ainsi l'effet antispasmodique de *M.officinalis*, *F.officinalis*, *A.reticulata*, *P.boldus*, mentionné dans la bibliographie, peut être lié à leurs effets vis à vis des récepteurs cholinergiques ou des récepteurs opioïdes, au niveau intestinal.

En raison de l'implication des récepteurs cholinergiques et opoïdes dans la régulation du transit intestinal, nous avons tenté d'évaluer l'effet de certaines plantes vis-à-vis du péristaltisme intestinal in vitro d'une part et vis-à-vis du transit intestinal in vivo d'autre part.

Pour les extraits qui ont présenté une activité antispasmodique, nous avons cherché à définir l'origine neurogène ou myogène de leur activité, en évaluant leurs effets vis-à-vis de neuromédiateurs nerveux (acétylcholine et agonistes) mais aussi vis-à-vis d'un agent musculotrope (chlorure de baryum), afin de spécifier leur activité par rapport à l'atropine et la papavérine et par rapport à la pilocarpine, agoniste muscarinique.

Etant donné le degré d'implication des récepteurs opioïdes dans la régulation de différents mécanismes physiologiques impliquant d'autres types de récepteurs, nous avons tenté d'évaluer l'effet des antagonistes cholinergiques et histaminergiques de référence sur les récepteurs opioïdes afin de mettre en évidence le rôle des récepteurs cholinergiques et histaminergiques dans le fonctionnement des récepteurs opioïdes.

PARTIE II
RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

CHAPITRE I: RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

I- LES RECEPTEURS AU NIVEAU DU DUODENUM ET DE L'ILEON

L'innervation du duodénum et de l'iléon par des fibres postganglionnaires sympathiques et parasympathiques implique l'existence de récepteurs des neuromédiateurs libérés au niveau de ces fibres. Ces récepteurs concernent surtout l'acétylcholine et l'adrénaline. La réactivité du duodénum et de l'iléon, isolés, à d'autres neuromédiateurs tels que l'histamine et les endorphines, implique, également l'existence de récepteurs spécifiques à ces substances.

A- REPARTITION DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES, HISTAMINERGIQUES ET OPIOIDES

A-I) LES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES.

L'acétylcholine est synthétisée à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A dans le cytoplasme des terminaisons synaptiques et est mise en réserve dans les vésicules synaptiques. La concentration d'acétylcholine dans la fente synaptique est réduite (stoppant ainsi l'activation du récepteur) par une enzyme, l'acétylcholinestérase, qui est située sur la membrane postsynaptique. Cet enzyme détruit rapidement l'acétylcholine, libérant la choline.

A-I-I) EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET MECANISME D'ACTION DE L'ACÉTYLCHOLINE.

La liaison aux récepteurs cholinergiques peut se traduire par deux types d'effets en fonction de la nature du ligand:

- Un effet agoniste
- Un effet antagoniste

A-I-I-I) LES CHOLINOMIMETIQUES (agonistes)

Toute substance pouvant mimer l'action de l'acétylcholine sera dite cholinomimétique et sera considérée comme un agoniste de l'acétylcholine. Au niveau de la musculature lisse l'acétylcholine provoque une augmentation du tonus et du péristaltisme intestinal avec relâchement de la plupart des sphincters, augmentation du tonus du détroite et de l'urètre, relaxation du trigone et du sphincter vésical; une bronchoconstriction; une augmentation des sécrétions digestives, lacrymales, sudorales et nasopharyngées, ainsi qu'un effet miotique et la contraction du muscle ciliaire qui contribue au drainage de la chambre antérieure. L'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase limite considérablement son emploi en thérapeutique. Carbachol et bétanéchol sont des esters carbamiques de la choline qui résistent à la cholinestérase, ils ont par conséquent une durée d'action prolongée, en particulier au niveau du tube digestif et de la vessie.

La pilocarpine est un alcaloïde naturel provenant des feuilles d'un arbuste sud-américain du genre *pilocarpus*, la muscarine, alcaloïde contenu essentiellement dans divers Inocybes et Clytocibes (et en traces seulement dans l'*Amanita muscaria*), ces deux alcaloïdes sont deux agonistes spécifiques aux récepteurs muscariques et possèdent une action cholinomimétique.

A-I-I-II) LES PARASYMPATHOLYTIQUES.(antagonistes)

Le ligand est un antagoniste des récepteurs cholinergiques.

Leur action pharmacologique n'étant pas confinée uniquement au système nerveux parasymapthique, leur prototype est l'atropine, extraite de *Atropa belladona*, son action s'exerce sur tous les récepteurs cholinergiques, qu'ils soient centraux ou périphériques.

L'atropine est un ester formé d'une base organique.

A-I-I-III) RECEPTEURS : Nature et Localisation

L'innervation du tractus digestif, et en particulier le muscle lisse intestinal, par le parasymphatique permet l'implication de l'acétylcholine dans la régulation de l'activité contractile des fibres lisses au niveau duodénal et iléal donc suppose l'existence des récepteurs à l'acétylcholine au niveau de ces deux organes.

Ces récepteurs sont divisés en deux types :

Les récepteurs nicotiniqes N subdivisés eux mêmes en deux sous types : N1 localisés au niveau des ganglions sympathique et parasymphatique ainsi qu'au niveau du système nerveux central, N2 localisé au niveau des jonctions neuromusculaires. De même qualifie-t-on de nicotiniqes les effets successifs de stimulation et de blocage des drogues que l'on peut mettre en évidence au niveau des ganglions autonomes (N1) et au niveau des plaques motrices des muscles squelettiques (N2).

Les récepteurs nicotiniqes sont localisés surtout au niveau du système nerveux central, sur les ganglions du système nerveux autonome et sur les muscles squelettiques.

Les récepteurs muscariniqes sont répartis au niveau du système nerveux central et au niveau périphérique notamment au niveau du muscle lisse du tube digestif.

Birdsall et Hulm, 1985; Birdsall et coll., 1983; Eglén et Withing, 1986 les ont classé en 2 types M1 et M2 en fonction de leur affinité à la pirenzépine, antagoniste cholinergique muscarinique.

Les récepteurs M2 sont localisés au niveau du S.N.C. et en particulier au niveau de la musculature lisse (coeur, duodénum et iléon), ils sont surtout impliqués dans le contrôle de la libération de l'acétylcholine au niveau du muscle longitudinal lisse (Kilbinger et coll., 1984) alors que les M1 sont surtout présents au niveau du S.N.C. (corps strié, cortex et hippocampe) et au niveau des ganglions sympathiques et parasymphatiques (North et coll., 1983, 1985; Kilbinger, 1984; Kilbinger et Nafziger, 1985). Des études de liaisons spécifiques (binding) ont montré que la dicyclomine était capable de distinguer entre les récepteurs M1 au niveau central et des récepteurs M2 au niveau cardiaque. (Kenny et coll.;1985, Doods et coll. 1987; Kilbinger et coll., 1978-88)

Des auteurs ont pu différencier les récepteurs M1 (au niveau de la portion cérébrale) et des récepteurs M2 (au niveau du muscle lisse) par la comparaison de leurs structures primaires. (Kubo et coll., 1986 ; Peralta et coll., 1987)

La découverte d'un nouveau composé antimuscarinique AF-DX 116, a permis d'introduire une nouvelle classification des récepteurs muscariniqes de l'acétylcholine (Goyal et Rattan, 1978, Hammer 1979-80-82-84; Hirschowitz, 1984; Levine et coll, 1986; Giachetti et coll., 1986).

Des travaux récents ont permis également de mettre en évidence un troisième type de récepteur muscarinique M3 et une nouvelle classification de l'ensemble des récepteurs muscariniques, les récepteurs M1 au niveau du tissu nerveux et des ganglions sympathiques, les récepteurs M2 surtout au niveau du coeur et du muscle lisse intestinal et peu au niveau des régions cérébrales et M3 essentiellement au niveau des glandes exocrines et une faible proportion au niveau cérébral (Hammer et coll., 1986 ; Ladinsky et coll., 1987)

Le fait que les réponses physiologiques observées, après stimulation des récepteurs muscariniques, soient lentes, de longue durée et soient bloquées par l'atropine laisse supposer leur localisation au niveau du muscle lisse du tube digestif, dont la contraction est relativement plus lente et de longue durée et bloquée par l'atropine par rapport à celle du muscle squelettique qui est rapide, de courte durée et bloquée par la d-tubocurarine et qui implique plutôt les récepteurs nicotiniques.

Tableau II-A Rôle et distribution des récepteurs muscariniques et nicotiniques au niveau du système nerveux central et des organes périphériques

type	sous-types	Localisation	Effets	Auteurs
M	M ₁	Cortex Hippocampe Ganglions sympha. et parasymphat.	Message nerveux au niveau des synapses nerveuses	Kilbinger, 1985 Birdsall, 1985 Eglen, 1986 North, 1985
	M ₂	Muscle lisse Coeur - Intestin	Contrôle la libération de l'acétylchol. Régule les contractions du muscle lisse	Kilbinger, 1984 Kenny, 1985 Doods, 1987 Kilbinger, 1988 Nathanson, 1987 Peralta, 1987
	M ₃	Glandes exocrines	Régulation du fonctionnement des glandes exoc.	Hammer, 1986 Ladinsky, 1987
N	N ₁	Ganglions sympha. et parasymphat.	Régulent les contractions du muscle squelettique.	Goyal, 1978 Giachetti, 1986 Hammer, 1980-82
	N ₂	Jonction neuro-musculaire		

A-II) LES RECEPTEURS HISTAMINIQUES.

L'histamine ou β -imidazol éthylamine résulte de la décarboxylation de l'histidine par l'intervention d'une décarboxylase, enzyme qui peut être inhibée par l'hyposamine. L'histidine peut donner naissance à l'histamine mais aussi à plusieurs autres substances telles que: l'acide glutamique, l'acide imidazole acétique et lactique, ansérine ...etc...

A-II-I) EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'HISTAMINE.

L'histamine a d'importantes actions sur la circulation, le muscle lisse, les sécrétions et le système nerveux central.

A-II-I-I) Sur le muscle lisse:

L'histamine augmente le tonus de la plupart des muscles lisse comme l'utérus, l'intestin et les bronches. C'est l'intestin isolé de cobaye que l'on utilise pour le dosage biologique des faibles concentrations d'histamine dans les tissus ou les liquides corporels. L'histamine provoque des contractions au niveau de l'intestin isolé, C'est pourquoi l'iléon isolé de cobaye est utilisé pour l'étude de l'activité agoniste ou antagoniste de certaine substance vis à vis de la contraction induite par l'histamine. L'histamine peut déclencher chez les asthmatiques une crise aiguë en augmentant le tonus des muscles bronchiolaires.

A-II-I-II) Action au niveau du système nerveux central:

L'histamine est synthétisée et concentrée dans l'hypothalamus, elle est inégalement répartie dans les différentes structures cérébrales, sa distribution est assez proche de celle de la sérotonine. Son rôle est hypothétique:

- Régulation de l'activité nerveuse globale du télencéphale et peut-être contribution au contrôle et à l'alternance des divers états de veille et de sommeil, elle accroît la durée du sommeil provoqué par les hypnotiques et déprime les reflexes conditionnés, ces récepteurs sont impliqués dans des phénomènes de sédations. (Wauquier et coll., 1984)

A-II-II) Rôle et distribution des récepteurs histaminergiques.

Si la distribution de l'histamine dans le cerveau semble hétérogène (plus grande richesse dans la région hypothalamique), la présence des sites récepteurs H1, H2 et H3 dans le tissu nerveux est incontestable uniquement au niveau des mastocytes des gaines conjonctives et dans les neurones.

L'histamine libérée va se fixer sur trois types de récepteurs en fonction de l'organe cible.

Ces récepteurs histaminergiques sont subdivisés, conventionnellement en : Récepteurs H1; récepteurs H2 et récepteurs H3.

L'existence des récepteurs histaminiques au niveau du plexus musculaire lisse (iléon et duodénum) a été postulée par Ambache and Aboozar, 1970; 1973; Uhl, 1989, des travaux similaires ont permis leur mise en évidence au niveau de la muqueuse musculaire isolée de l'oesophage de cobaye (Fujinuma et coll., 1985) et en particulier les récepteurs H2 au niveau du muscle longitudinal de l'iléon par Fjalland 1979.

D'autres travaux ont permis la discrimination de 2 types de sites histaminergiques au niveau de l'iléon et de la vessie de cobaye. (Rubinstein et coll., 1985) et l'existence ainsi que le rôle des récepteurs H3 (Van Der Werf et coll., 1987) qui sont surtout impliqués dans la modulation et la régulation de la libération de l'histamine, (des autorécepteurs) (Arrang et coll., 1987) probablement par un mécanisme d'auto-inhibition de la libération de l'histamine (Van Der Vliet et coll., 1988); ces mêmes récepteurs exercent un effet inhibiteur sur la contraction de l'iléon (Trzeciakowski, 1987). Leur localisation a été mise en évidence au niveau présynaptique des terminaisons nerveuses synthétisant l'histamine (Arrang et coll., 1988).

Des auteurs ont démontré l'activité agoniste de la α -methyl-histamine et l'activité antagoniste de la thiopéramide au niveau cérébral chez le rat et la souris (Oishi et coll., 1989) (Arrang et coll., 1988) et l'activité antagoniste de la phencyclidine vis à vis des récepteurs H3 (Arrang et coll., 1988). Ces récepteurs H3 paraissent constituer des ligands hautement potentiels et sélectifs (Arrang et coll., 1989) et leur implication a été démontrée dans la neurotransmission cholinergique au niveau de l'iléon de cobaye (Ichinose et coll., 1989).

Les récepteurs histaminiques H1; H2 et H3 se répartissent donc au niveau central et périphérique. La classification de ces récepteurs a également été établie grâce à la découverte d'agonistes spécifiques de l'un ou l'autre de ces récepteurs:

- Methyl-2-histamine pour les récepteurs H1
- Methyl-4-histamine pour les récepteurs H2
- α -méthyl-histamine pour les récepteurs H3

(Black et coll., 1972; Owen, 1975; Oishi et coll., 1989 et Van der Vliet et coll.; 1988)

A-II III) LES ANTAGONISTES ET LEURS EFFETS

L'implication de l'histamine dans plusieurs manifestations pathologiques (anaphylaxie, allergie, ulcères gastro-duodénaux) a incité les scientifiques à chercher à neutraliser par divers moyens cette substances dans l'organisme pour s'opposer à ses effets pathologiques.

Les substances antagonistes de l'histamine ne vont pas empêcher la biosynthèse de l'histamine ni sa libération par les mastocytes, ni accélérer sa destruction mais vont empêcher l'histamine libérée d'activer ses récepteurs spécifiques. Ce sont des antagonistes compétitifs spécifiques de l'histamine au niveau de ses récepteurs. 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; Barker et Ebersoleb, 1982; Barker et Hough, 1983; Barker, 1985). 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). L'efficacité des antihistaminiques n'est pas identique expérimentalement vis à vis des différents effets de l'histamine et la dualité des récepteurs histaminergiques (Folkow et coll., 1948; Ash et Schild, 1966 et Van der Werf et coll.; 1987) a amené à distinguer trois types d'antihistaminiques:

1) Les antihistaminiques antagonistes des récepteurs H1

Découverts par (Bovet et Staub 1937; Ungar et coll., 1937) et qui s'opposent principalement aux effets de l'histamine sur le muscle lisse et les vaisseaux et intervenant dans les réactions d'allergie et les phénomènes de bronchospasme, leur action consiste à empêcher la contraction de la musculature lisse (essentiellement bronchique et intestinale chez l'homme), à diminuer la tendance hypotensive résultant de la dilatation des vaisseaux de petit diamètre (artérioles) et à normaliser la perméabilité microvasculaire.

2) Les antihistaminiques antagonistes des récepteurs H2

Leur développement est beaucoup plus récent (Black et coll., 1972). Les antihistaminiques H2 sont généralement des dérivés comportant des chaînes latérales plus longues (8 atomes) plus complexes et moins basiques que celles de l'histamine (elles ne sont pas chargées au pH physiologique). Ils se distinguent donc sur plusieurs points des antihistaminiques H1 essentiellement moins basiques et plus polaires; ils sont de ce fait beaucoup moins lipophiles.

3) Les antihistaminiques antagonistes des récepteurs H3

Ils sont surtout responsables de la modulation et la régulation de la libération de l'histamine (Van der Werf, 1987 ; Arrang et coll., 1987-1988; Trezeczalowski J.P.; 1987; Van der Vliet et coll.; 1988; Oishi et coll.; 1989 et Ichinose et coll.; 1989).

Tableau II-B Rôle et distribution des récepteurs histaminiques, H₁, H₂ et H₃ au niveau du système nerveux central et des organes périphériques

type	sous-types	Localisation	Effets	Auteurs
H	H ₁	Cerveau Hypothalamus: Neurone Gainés conjonctives	Sédation Phénomènes d'allergie	Black, 1972 Owen, 1975 Parsons, 1977 Oishi, 1989
	H ₂	Muscle lisse : Coeur, Intestin, Vessie, Iléon, Oesophage	Secrétion acide Régule les co ntractions du muscle lisse	Ambache, 1970 Uhl, 1989 Fujinuma, 1985 Rubinstein, 1985
	H ₃	Système Nerveux Central Présynapse des terminaisons nerveuses	Module la libération de l'histamine	Van Der W., 1987 Arrang, 1987-88 Van Der V., 1988 Trzeciakowki, 1987 Ichinose, 1989

A-III) LES RECEPTEURS OPIACES

A-III-1) ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES OPIACES

La plupart des opiacés actuellement disponibles possèdent, à différents degrés, les propriétés pharmacologiques de la morphine. La description des actions de la morphine illustrera donc également, d'un point de vue qualitatif tout au moins, celle des autres opiacés. La morphine est un alcaloïde, dérivé de l'opium, qui possède une très forte activité analgésique au niveau central. Elle présente l'inconvénient d'engendrer une tolérance et une dépendance lors de l'absorption orale ou par inhalation. La morphine produit ses effets pharmacologiques principaux au niveau de trois systèmes de l'organisme: le système nerveux central, le système gastro-intestinal et le système cardio-vasculaire.

a) Système nerveux central

Chez l'homme, l'administration de la morphine produit des altérations de l'humeur, une analgésie, des nausées et vomissements, une dépression de la respiration et un myosis.

Son administration chez l'animal engendre un effet analgésique puissant accompagné d'une multitude d'autres effets tels que : dépression respiratoire, ralentissement du transit intestinal et suppression du spasme des muscles lisses, hypotension et modification du rythme cardiaque, euphorie et modification du comportement, cette constatation suggéra l'existence de récepteurs spécifiques pour la morphine et ses dérivés, hypothèse qui trouva une vérification expérimentale grâce aux groupes de Snyder, 1973; de Pert et Snyder, 1973 et de Simon, 1984 aux Etats-Unis et de Terenius, 1973 en Suède, par des techniques de liaisons spécifique (ligands radioactifs).

Ces effets de la morphine sur le SNC sont dépendants de la dose et leur expression peut varier considérablement selon l'état de l'individu chez qui la morphine a été administré.

b) Analgésie

* La morphine est particulièrement efficace sur la douleur en tant que processus neurophysiologique relayé par des afférences sensorielles spécifiques de la douleur, c'est à dire sur l'élaboration de la perception sensorielle au niveau psychique, on observe chez les sujets une augmentation de la capacité à tolérer la douleur bien que celle-ci soit parfois encore perçue en tant que sensation.

En fait, la morphine n'affecte en rien les différentes modalités sensorielles, telles que le toucher, la vibration, la vue ou l'ouïe. La morphine diminue donc les symptômes de réaction liés à la perception douloureuse (anxiété, peur, voire panique), et rend ainsi la perception globale de la douleur plus tolérable. Il faut noter que cette action a un caractère qui est unique aux opiacés, car les anxiolytiques purs ne produisent pas l'analgésie. Cet effet neurophysiologique ne constitue pas le seul mécanisme de l'analgésie morphinique: des effets neurophysiologiques allant dans la direction d'une analgésie sont en plus exercés par la morphine à différents niveaux des voies nerveuses qui véhiculent la perception douloureuse. En règle générale, on peut dire que la morphine est un analgésique plus efficace pour les douleurs sourdes et continues que pour les douleurs de type aigu et à caractère intermittent.

c) Respiration

La morphine déprime la respiration. Cette action se manifeste déjà à de faibles doses de morphine; elle est la cause principale de décès par intoxication aux opiacés (overdose). La morphine provoque en effet une réduction de la sensibilité des centres respiratoires du tronc cérébral à une augmentation de la PCO₂ et la baisse de la PO₂ constituent deux stimuli activateurs des centres qui règlent la respiration automatique. En présence d'intoxication aux opiacés et de la dépression respiratoire qui s'en suit, il est donc contre-indiqué d'administrer de l'oxygène car l'hypoxie demeure le seul stimulus pour la respiration automatique. Le réflexe de toux est également inhibé par la morphine par son action inhibitrice sur le centre de la toux au niveau du bulbe rachidien (medulla oblongata). La noscapine (dérivé benzyloquinoléine) est l'un des opiacés naturels à action essentiellement antitussive, aux côtés d'autres dérivés de synthèse plus récents.

d) Système gastro-intestinal

D'une manière générale, on peut dire que la morphine augmente le tonus de la musculature lisse de tous les segments du tractus gastro-intestinal, tout en diminuant considérablement les contractions propulsives. Cette double action résulte en un ralentissement prononcé du temps de passage du bol alimentaire et en une réabsorption augmentée d'eau.

L'effet global de la morphine est donc constipant, d'où son utilisation thérapeutique comme antidiarrhéique. Il est intéressant de relever que l'action antidiarrhéique de l'opium a été reconnue il y'a plus d'un millénaire. De nos jours, des opiacés synthétiques de type phénylpipéridine, tels que le diphénoxylate et le lopéramide, dont l'action est relativement sélective sur le tractus gastro-intestinal, sont utilisés avantagement comme antidiarrhéique. Il est à noter que, contrairement à la plupart de ses autres actions, on n'observe que très peu de tolérance à l'effet constipant de la morphine. La morphine augmente la pression à l'intérieur du tractus biliaire. Cet effet, dont l'expression clinique peut aller de simples douleurs épigastriques jusqu'à une colique biliaire, est dû à un spasme du sphincter d'Oddi qui résulte en une stase biliaire. Cette action peut expliquer les augmentations des taux plasmatiques d'amylase et de lipase, observées parfois après administration de morphine.

Les actions sus-mentionnées de la morphine sur le tractus gastro-intestinal sont en partie inhibées par de fortes doses d'atropine. Elles sont toutefois complètement antagonisées par la naloxone.

A-III-2) ROLE ET DISTRIBUTION DES RECEPTEURS OPIACES

L'effort des chimistes et pharmacologues a toujours été et il est toujours dirigé vers le développement de substances dérivées de la morphine, possédant des propriétés analgésiques et antidiarrhéiques mais dépourvues de la capacité d'induire tolérance et dépendance et de déprimer la respiration. Cet effort a aboutit aux dérivés morphiniques semi-synthétiques et synthétiques, dont certains se révélèrent être des antagonistes compétitifs de la morphine.

Cette découverte importante répondit à certaines questions, mais en souleva une autre : comment se faisait-il que le système nerveux de l'homme possédât des récepteurs spécifiques pour un alcaloïde extrait d'un pavot originaire d'Asie Mineure et d'Extrême-Orient ? La réponse était simple et ne se fit pas tarder : le système nerveux produit des opiacés endogènes. En effet, en 1975 Hughes et Kosterlitz à Aberdeen découvrirent l'existence dans le cerveau de deux pentapeptides, la leucine-enképhaline et la méthionine-enképhaline, dont les actions, semblables à la morphine, sont neutralisées par la naloxone, un antagoniste spécifique au niveau des récepteurs aux opiacés. Au cours de la dernière décennie, on a identifié et caractérisé dans le système nerveux de nombreux autres opiacés endogènes.

Leur localisation au niveau cérébral a été confirmée par plusieurs auteurs. (Lord et Kosterlitz, 1977) et leur mise en évidence au niveau du cerveau a été réalisée par autoradiographie grâce à l'utilisation du dérivé tritié de la morphine (Slater et coll., 1986, 1989; Cross et coll., 1987; Blackburn et coll., 1988).

Les réponses physiologiques à l'administration de la morphine semblent impliquer des neurones localisés au niveau cérébral, tel est le cas de la substance grise péri-aquédurale pour le contrôle de la douleur, les structures limbiques dans la modification des états émotionnels, noyau du tractus solitaires du bulbe dans le contrôle de la respiration, noyau du tractus solitaire et noyau ambigu dans le contrôle du rythme cardiaque.

Les actions sur l'organisme de nombreuses substances, endogènes et exogènes, sont médiées par leur interaction avec des récepteurs spécifiques. Pour les opiacés, l'existence de récepteurs fut postulée au début de ce siècle déjà et confirmée dans les décennies suivantes.

En effet, de nombreuses études sur les relations structure-activité révélèrent l'existence d'une stéréospécificité stricte pour les actions des opiacés. On développa ensuite des antagonistes compétitifs de la morphine et démontra son action dose-dépendante, aboutissant à un effet maximal (saturabilité), sur différentes préparations in vitro (intestin isolé). Enfin, la précipitation d'un syndrome de sevrage par l'administration d'un antagoniste compétitif, après traitement chronique aux opiacés, ainsi que l'apparition d'une tolérance croisée entre opiacés possédant une structure moléculaire différente, constituèrent des arguments ultérieurs plaidant en faveur de l'existence de récepteurs spécifiques. La preuve définitive ne fut toutefois apportée qu'au début des années 70, lorsque différents groupes purent directement identifier et caractériser par la méthode de liaison spécifique (binding studies) les récepteurs aux opiacés, grâce au développement de ligands radioactifs à très haute affinité et porteurs d'une activité spécifique élevée. L'existence d'une multiplicité d'actions serait liée à l'existence de multiples récepteurs, cette hypothèse a été émise par Martin et coll.(1976) et confirmée par la découverte d'enképhaline permettant de clarifier le problème de l'hétérogénéité des récepteurs (Hugues et Kosterlitz, 1975). La comparaison des effets de ces enképhalines par rapport à celui de la morphine a été obtenue sur l'inhibition des contractions de l'iléon de cobaye et le canal déférent de la souris stimulés électriquement.

L'existence de sous-types de récepteurs aux opiacés fut initialement postulée lors de l'examen des actions d'un dérivé N-allyle de la morphine, la nalorphine (Schéma II-10). En effet, cet opiacé se comportait, en présence de la morphine, comme un antagoniste, mais possédait les propriétés analgésiques d'un agoniste lorsqu'il était administré seul. Martin W.R. (1979, 1984), un des pionniers de la pharmacologie des opiacés, postula alors l'existence de deux types de récepteurs, l'un pour la morphine, l'autre pour la nalorphine. Il élabore également les concepts d'agoniste partiel, d'agoniste-antagoniste et d'agoniste mixte. Selon ces concepts, les agonistes partiels sont des opiacés à action antagoniste en présence de morphine, mais qui ont des propriétés agonistes lorsqu'ils sont testés seuls.

D'autres opiacés, définis comme agonistes-antagonistes, sont des substances agonistes sur un type de récepteur mais antagonistes sur un autre type. Enfin le terme d'agoniste mixte définit une substance qui est agoniste sur plusieurs types de récepteurs. Il existe également des antagonistes mixtes. Avec la découverte de nouveaux opiacés de synthèse et des opiacés endogènes, le modèle à deux récepteurs se révéla insuffisant pour expliquer la diversité et la selectivité des actions de nombreuses molécules. Par une étude approfondie des actions de plusieurs dizaines d'opiacés sur différents tests pharmacologiques in vitro et in vivo, on a défini trois sous-types de récepteurs, appelés (μ , κ et σ).

Les syndromes observés par l'administration des substances morphinomimétiques dépendaient de leur affinité pour l'un ou l'autre des récepteurs opiacés ainsi l'utilisation de la morphine, de la kétocyclazocine et de SKF-10,047, agonistes spécifiques respectifs des récepteurs μ , κ et σ a permis d'attribuer chaque syndrome à chacun des trois types de récepteurs. (Martin et coll., 1964-67-74-76-84) De plus l'analyse des puissances relatives de certains opiacés endogènes et de synthèse a permis de définir un quatrième sous-type de récepteur appelé (δ). Récemment, grâce à l'utilisation d'antagonistes irréversibles (naloxazone et naloxonazine), deux sous-types du récepteur (μ) ont été postulés. Il s'agit des récepteurs μ_1 , à haute affinité pour la morphine, qui semblent médier l'effet analgésique, et des récepteurs μ_2 à plus faible affinité auxquels on attribue la dépression respiratoire induite par la morphine. La répartition des récepteurs opiacés et leur hétérogénéité au niveau périphérique a été confirmée par plusieurs travaux, ainsi on a pu montrer l'existence des récepteurs opiacés par la technique du binding sur les homogénats du plexus myentérique du muscle longitudinal de l'iléon de cobaye avec la mise en évidence particulièrement des récepteurs de type σ au niveau du canal déférent du hamster (Mc.Knight et coll., 1983 et 1984). Chaque type de récepteur a été localisé au niveau d'un organe différent, chez les cobayes au niveau de l'iléon des récepteurs μ , au niveau du canal déférent de la souris des récepteurs δ , au niveau du canal déférent de lapin des récepteurs κ et au niveau du canal déférent du rat des récepteurs ϵ (Giagnoni et coll., 1984), on a même pu mettre en évidence au sein de l'iléon de rat l'existence de plusieurs types de récepteurs (Liao et Freer, 1984); cependant il serait difficile d'établir une généralisation de cette distribution des récepteurs opiacés en raison de la variation des espèces utilisées par les différents auteurs.

Ainsi la mise en évidence des récepteurs μ et κ au niveau de l'iléon de cobaye et des récepteurs δ au niveau du canal déférent de cobaye par l'utilisation de la β -funaltrexamine et la richesse du canal déférent de la souris en récepteurs δ , a permis de mettre un autre type de récepteur dans un même organe mais de deux espèces animales différentes. (Hayes et coll., 1985; Takemori et coll., 1986; Johnson et coll., 1986 et 1987; Smith et coll., 1984-87-88)

Si l'analgésie constitue la principale activité de la morphine, cette dernière se trouve impliquée dans d'autres mécanismes. Par ailleurs Treudenburg au début du siècle (1915) avait constaté que la morphine était capable d'inhiber la commande nerveuse de certains organes périphériques tels que l'iléon de cobaye et que l'administration de la morphine directement au niveau du ventricule cérébral provoquait une inhibition du transit intestinal ce qui peut laisser supposer l'action de la morphine par voie indirecte (Manara et coll., 1986).

L'iléon isolé de cobaye ou de lapin ainsi que le canal déférent isolé de souris ont constitué un modèle fiable pour l'étude de l'implication de la morphine des enképhaline et de la β -endorphine aussi bien au niveau du péristaltisme intestinale et du transit intestinal lié aux problèmes de la diarrhée et de la constipation qu'au niveau de la tolérance et la dépendance aux opiacés ainsi que pour la recherche d'activité agoniste ou antagoniste vis à vis de la morphine. (Belestin et coll., 1984; Bhargava et Pillai, 1985; Donnerer et Lembeck, 1985; Watanabe et coll., 1988; Shook et coll., 1989)

La complexité du mécanisme d'action de la morphine et de ses agonistes et la difficulté de sa compréhension ont suggéré à certains auteurs de rechercher l'implication d'autres types de récepteurs dans les différents syndromes observés à l'administration de la morphine, ainsi les travaux de Paton W.D.M. (1954-56) et ceux de Gyang et Kosterlitz (1966) avaient montré que la morphine agissait en prévenant la libération d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, ils avaient constaté également que l'iléon isolé de cobaye pouvait être utilisé en tant qu'analogie du cerveau et que lorsque l'on testait des dérivés de la morphine, plus ou moins puissants sur l'iléon, on observait que leur capacité à inhiber la libération de l'acétylcholine était exactement parallèle à leur capacité à provoquer l'analgésie chez

l'homme ou l'animal et les antagonistes morphiniques bloquaient, de la même façon qu'au niveau cérébral, l'effet de la morphine au niveau de l'iléon isolé de cobaye.

Cette corrélation a été montrée par la technique du binding aux récepteurs opiacés au niveau du S.N.C. du rat et l'intestin isolé de cobaye. (Creese et Solomon, 1975). La médiation, de l'action de la morphine, par l'acétylcholine semble impliquer des récepteurs cholinergiques, des auteurs ont montré le rôle des récepteurs opiacés et en particulier les récepteurs μ dans la modulation de la libération de l'acétylcholine au niveau cérébral (Ahmed et Horst, 1986; Ennis et Wyllie, 1984).

L'acétylcholine ne semble pas être la seule impliquée dans ces mécanismes, les prostaglandines semblent jouer un rôle aussi bien au niveau de l'induction des contractions de l'iléon isolé de cobaye via les récepteurs opiacés, qu'au niveau de la manifestation de la dépendance morphinique sur ce même organe in vitro (Gaion et Trento, 1984; Johnson et coll., 1988). En résumé, on retiendra que, sur la base des connaissances actuelles, on postule quatre types principaux de récepteurs aux opiacés μ , κ , σ et δ . Les actions particulières de chaque opiacé découlent de l'activation d'un ou plusieurs types de récepteurs δ . De plus, un opiacé donné peut agir en tant qu'agoniste, antagoniste ou agoniste partiel sur chacun de ces types de récepteurs. Le tableau (II-C) résume l'implication des différents récepteurs dans l'expression de certaines actions des opiacés.

Cette étude bibliographique synthétique nous suggère de tenter à travers le modèle de l'organe isolé, qui semble présenter une certaine fiabilité, d'évaluer l'effet des substances végétales vis à vis des récepteurs opiacés afin d'approcher leur mécanisme d'action d'une part et de vérifier l'implication des récepteurs cholinergiques et histaminergiques dans cette cascade de réactions occasionnées par les récepteurs opiacés d'autre part.

Tableau II-C Rôle et distribution des récepteurs opioïdes au niveau du système nerveux central et des organes périphériques

type	sous-types	Localisation	Effets	Auteurs
Mu	Mu ₁	Distribution dans tout le S.N.C. Iléon de cobaye	* Analgésie supraspinale * Euphorie * Dépendance physique	Hughes et Kosterlitz, 1975 Martin, 1964-84 Creese et Solomon, 1975
	Mu ₂	S.N.C. Iléon de cobaye Iléon de rat	* Depression respiratoire * Euphorie * Dépendance * Contraction de l'iléon de cobaye	Lord et Kosterlitz, 1977 Ennis, 1984 Belestin, 1984 Gaion, 1984 Liao, 1984 Hayes, 1985
Kappa		S.N.C. Canal déférent de lapin - souris Iléon de cobaye et de souris	* Analgésie spinale * Myosis * Sédation	Giagnoni, 1984 Donnere, 1985 Johnson, 1987-88 Smith, 1988 Slater, 1986 Cross, 1987
Sigma		S.N.C. Canal déférent du hamster	* Dysphorie Hallucination * Stimulation vasomotrice	Mc.Knight, 1984 Watanabe, 1988
Delta		S.N.C. Canal déférent de la souris Canal déférent du rat	*Modification du comportement affectif * Analgésie	Takemori, 1984 Shook, 1989 Blackburn, 1988 Slater, 1989

PARTIE II
CHAPITRE II
TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS

A) MATERIELS ET METHODES

A-I) EXTRAITS UTILISES:

A-I-I) PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES:

* *Euphorbia hirta* : La plante entière sèche est réduite en poudre fine, 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.

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.

* *Melissa officinalis* est préparée à partir de cryobroyat, macérées pendant 12 heures à température ambiante et pendant 12 heures à 35°C, filtrées sur Büchner et ensuite lyophilisées.

* *Fagara xanthoxyloides* : Les feuilles sont broyées puis on réalise une infusion de 30 g de plante dans 200 ml d'eau distillée, puis une macération pendant 24 heures à 44°C, le produit est ensuite filtré sur Büchner, l'eau est évaporé au Rotavapor et l'extrait est lyophilisé.

* *Eschscholtzia californica* : L'extrait utilisé est un nébulisat réalisé par un broyage et une réduction en poudre fine des différentes parties aériennes de la plante, ensuite le produit obtenu subit une lixiviation par de l'éthanol à 70 % au moyen d'un extracteur en continu.

* *Fumaria officinalis*, *Peumus boldus* et *Annona reticulata* sont des nébulisats.

PRESENTATION DES PLANTES

1) *Melissa officinalis* L.

(Voir description Partie I)

2) *Peumus boldus* L.

Peumus boldus Molina. est une Monimiacée, spontané, qui pousse sur les collines ensoleillées du Chili.

C'est un petit arbre buissonnant toujours vert à feuilles entières. Petites cymes terminales de fleurs jaune très pâle à nombreuses pièces. Le fruit est constitué d'une petite drupe noirâtre. Elle est largement employée en médecine traditionnelle, mais également en médecine moderne où diverses préparations galéniques et fractions purifiées sont utilisées. Traditionnellement, les parties de *P. boldus*, support de ses activités, sont les feuilles séchées.

D'un point de vue chimique, elles contiennent plusieurs alcaloïdes tels que la réticuline, l'isocorydine, l'isocorydine N-oxyde, la N méthyllaurotétanine, la boldine, l'isoboldine, la norisocorydine, la laurotétanine, la laurolitsine ; mais également des glucosides flavoniques, tels que le glucoside A (pneumoside), le glucoside B (boldoside), les glucosides C, D (frangoside), E, F et G ; une huile essentielle riche en cinéol, p-cymol, ascaridol, eugénol, pinène et terpinéol, ainsi que des acides organiques, une gomme, des glucides, des lipides et des tanins ont pu être mis en évidence. Les indications actuelles sont classiquement les insuffisances hépatiques et la lithiase biliaire. Toutefois, *P. boldus* est également préconisée pour diverses autres affections telles que les troubles digestifs, les migraines, les maux d'oreilles, les rhumatismes, les odontalgies. Des effets activateurs des sécrétions salivaires et gastriques lui sont conférés, ainsi que des effets spasmolytiques sur l'intestin grêle (réduction du péristaltisme et du tonus intestinal).

3) *Annona reticulata* L.

Annona reticulata L. est un arbuste ou petit arbre bas, branchu, à rameaux dressés, lenticellés. Feuilles glabres ou glabrescentes dessous, lancéolées, acuminées au sommet, courtement cunéiformes ou arrondies à la base. Fleurs crèmes, axillaires, à sépales et pétales valvaires. Fruits rappelant un "coeur de boeuf", 10 cm de longueur, épiderme rougeâtre, sans protubérances mais comportant des aréoles anguleuses, commestibles. Espèce originaire d'Amérique tropicale et qui est actuellement introduite dans tous les pays chauds et humides. Les fleurs, les feuilles et l'écorce écrasées sont appliquées en cataplasme sur les entorses.

Les feuilles sont également, utilisées traditionnellement per os dans les troubles digestifs en Guadeloupe et en Martinique (avec du bicarbonate de soude) en Haïti (en décoction avec du sel), comme antidiarrhéique en Amérique Centrale, antivomitif et antalgique en Haïti, antiulcéreux en Jamaïque, antipyrétique en Haïti et aussi contre les "faiblesses des articulations" en Guadeloupe et en Martinique.

Les feuilles sont aussi recommandées comme anxiolytique per os en décoction avec du sel et en usage externe. des travaux pharmacologiques ont montré l'activité spasmolytique de *A. reticulata*, sur le duodénum isolé de rat. (Rolland et coll., 1988)

4) *Fagara xanthoxyloides* Lam.

Fagara xanthoxyloides Lam. est un arbuste ou un arbre de 8 m de hauteur dont les feuilles et l'écorce sont parfumées; folioles légèrement acuminées ou pas du tout, rigides, oblongues ou oblancéolées, quelquefois émarginées à l'apex, subaigües à la base, 5 à 10 cm de longueur, 2 à 4 cm de largeur; épines recourbées sur les rameaux et sur le rachis des feuilles. Fruits ellipsoïdes, environ 6 mm de longueur.

Espèce littorale répandue du Sénégal au Nigéria

Le décocté aqueux des feuilles et racines sert à laver les plaies "incurables". L'écorce de la racine entre dans le traitement des vers intestinaux et de l'oedème, la racine est également utilisée pour lutter contre l'hypothermie et les douleurs abdominales ainsi que les gastralgies du nourrisson.

Des travaux récents ont permis la mise en évidence des activités sédatives, anxiolytiques et analgésiques des feuilles et l'écorce de la plante. (Bertrand, 1988)

5) *Fumaria officinalis* L.

Fumaria officinalis L. est une plante herbacée, verte ou glauque très commune dans les champs, les endroits incultes, au bord des chemins dans toute l'Europe sauf dans l'extrême nord, dans les régions tempérées de l'Asie, en Afrique du Nord. La tige, souvent couchée, peut atteindre 70 cm de long; elle porte des feuilles profondément divisées. Les fleurs, rose violacé, très irrégulières, assez petites, sont réunies en grappes. Le fruit est une silicule globuleuse ne dépassant pas 2 mm.

Elle renferme des alcaloïdes, dont la fumarine ou protopine (0,13 %), et elle est dotée de propriétés antihistaminique plusieurs travaux cliniques ont montré son activité de régulation vis à vis de la cholérèse (amphocholérétique) et son activité spasmolytiques.

6) *Eschscholtzia californica* Cham.

Eschscholtzia californica Cham. est une plante originaire de la côte sud ouest américain de 40 à 50 cm de hauteur, trouvée abondamment en Californie et cultivée comme ornement dans les jardins. Les tiges, couchées puis dressées, sont couvertes de feuilles glauques finement découpées et sont terminées par des fleurs solitaires, de couleur vive, jaunes ou orangées.

Elle contient de nombreux alcaloïdes dont le plus important est la protopine. Elle est utilisée comme "soporifique" et contre les maux de tête sévères. Des travaux ont pu mettre en évidence une activité sédative à forte dose et une activité anxiolytique à faible dose. (Rolland, 1988 ; Rolland et coll., 1991)

7) *Euphorbia hirta* L.

Euphorbia hirta L. est une plante herbacée, vivace lorsqu'elle croît dans des endroits humides et faiblement éclairés, annuelle lorsque le milieu est très sec et très ensoleillé.

Cette plante originaire de l'Australie tropicale est largement répandue dans tous les pays tropicaux et subtropicaux (Afrique tropicale, Madagascar, Yemen, Inde occidentale, Chine, Japon ainsi que les îles du Pacifique austral). Elle 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.

Elle peut croître jusqu'à une altitude d'environ 1400 mètres, sur des sols sablonneux et humides, et plus ou moins riche en humus. Le macéré de la plante entière est utilisée dans les affections gastro-intestinales pour ses propriétés anti-entéralgiques. Le décocté de plante entière est utilisé pour ses propriétés antidiarrhéiques; la plante entre dans la composition d'un mélange, prescrit sous forme d'un décocté, pour supprimer les spasmes du pyllore.

Associée à du jus de citron elle est utilisée comme laxatif, les parties aériennes seules sont également utilisées pour leurs propriétés antispasmodiques. Les propriétés analgésiques ont été démontrées au cours d'un ensemble de travaux ethnopharmacologiques sur cette plante (Lanhers, 1988; Lanhers et coll., 1991).

A-I-II) CARACTERISATION ET CONDITIONS D'ELEVAGE DES ANIMAUX UTILISES DANS LES DIFFERENTES EXPERIMENTATIONS:

A-I-II-I) ESPECE UTILISEES

**** Souris :** Expérimentation *in vivo* : Souris mâles hétérozygotes, issues de la lignée Swiss et proviennent des centres d'élevage Césal (Montmédy (55), Janvier (Le Genest (53))).

**** Rats :** Expérimentations *in vitro* : Rats mâles de la lignée OFA (Iffa-Credo, l'Arbresle (69)), d'un poids moyen compris entre 200 et 350 g au moment du test.

**** Cobayes :** Expérimentation *in vitro* : Cobaye mâles (Iffa-Credo, L'arbresle (69)), dont le poids moyen est compris entre 250 et 300 g au moment du test.

I-I-II-II) CONDITIONS D'ELEVAGE

**** 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 laquelle les animaux sont maintenus dans une animalerie cyclée (12 heures d'éclairage / 12 heures d'obscurité) et thermostatée (températures de 21°C ± 1°C).

L'eau et la nourriture leurs 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 leurs est fournie enrichie en vitamine C (250 mg/l).

**** 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'éclairage et de 12 heures d'obscurité et maintenue à une température constante de 21°C.

L'eau et la nourriture (croquettes complètes et vitaminées M25 Extra-labo, Provins (77)) sont fournies à volonté pour les souris.

A-II) PREPARATION DES SOLUTIONS

a) Transit intestinal

Suspension de charbon (10 %) :

charbon végétal :	10 g
gomme arabique :	2,5 g
eau distillée q.s.p.	100 ml

b) duodénum et iléon isolé

Solution de tyrode:

Cette solution doit maintenir l'iléon dans un environnement ionique propice au fonctionnement des systèmes physiologiques contractiles, et lui favoriser une source énergétique (glucose) indispensable aux échanges et un pH légèrement alcalin. Cette solution est composée de la façon suivante: NaCl (40 g); KCl (3,80 g); CaCl₂ (1 g); MgCl₂ (0,5 g); NaHCO₃ (5 g); Na₂HPO₄ (0,25 g); glucose (5 g), pour un volume final de 5 litres obtenu par addition d'eau distillée.

A-III) METHODES

a) Transit intestinal

les animaux sont laissés à jeûn la veille de l'expérimentation. Ils reçoivent le sérum physiologique et les produits à tester, en i.p., 30 minutes avant l'administration de la suspension de charbon, par voie orale. 30 minutes après l'administration de la suspension de charbon, chaque animal est assommé, la cavité péritonéale est ouverte et toute la portion de l'intestin grêle (allant du duodénum au caecum) est prélevée; sa longueur totale (L) est mesurée et le trajet parcouru (T) par la suspension du charbon est également mesuré.

Pour évaluer le taux d'inhibition ou d'accélération du transit intestinal on applique la règle suivante

L : étant la longueur totale de la portion de l'intestin grêle prélevée.

T : étant le trajet parcouru par la suspension du charbon

R : étant le rapport T/L

% de variation = $R_{\text{témoin}} - R_{\text{traité}} / R_{\text{témoin}}$

Chaque lot est constitué de 10 souris par dose.

Le produit de référence utilisé est le loperamide (Imodium, Laboratoires Janssen, Paris (75))

Statistique

L'homogénéité des variances, entre les lots témoins et chaque lot traité, étant vérifiée par le test de Bartlett, la vérification de l'existence d'une significativité à l'aide de l'ANOVA nous permet de faire des comparaisons statistiques à l'aide d'un test paramétrique de comparaisons multiples, test T de Student

b) Duodénum et Iléon isolés

La technique de l'action *in vitro* de différentes substances sur la contraction du duodénum du rat ou de l'iléon de cobaye a été décrite par Barker (1981), selon la méthode de Magnus (1904). 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 (Laboratoire 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 au niveau du carrefour estomac-intestin grêle pour le duodénum du rat et dans sa portion terminale (avant le caecum) pour l'iléon de cobaye.

Le fragment est ensuite fixé par ses deux extrémités ligaturées, dans une cuve à organe isolé, d'une contenance de 50 ml et reliée à un bain-marie thermostaté dont la température est fixée à 37°C, à un dispositif d'oxygénation et de brassage, ainsi qu'à un dispositif de remplissage et de vidange permettant le maintien du contenu de la cuve à une température de 37°C. La cuve est constamment remplie de liquide physiologique (tyrode) maintenu à une température de 37°C et oxygénée en continu, à raison d'une bulle par seconde.

L'extrémité supérieure de l'organe est reliée à un capteur isotonique (Narco Bio-Systems INC) qui transmet les variations du muscle (variation de la longueur) à un transducteur (Narco bio-system Tx 77061), lui même relié à un inscripteur (physiograph Narco Bio-systems), l'enregistrement étant effectué en isotonique, une charge de 2 g est fixé à l'autre extrémité, de la tige métallique liée au capteur, de telle façon à exercer une force sur le muscle pour maintenir sa tension constante et ne mettre en évidence que la variation de sa longueur. Pour l'étude de l'influence d'un extrait végétal sur les récepteurs cholinergiques, on ajoute dans la solution de tyrode, un antagoniste histaminique (Dexchlorphéniramine (maléate); Laboratoire Unicet, Levallois-Perret : Polaramine) afin de bloquer les récepteurs histaminiques et à éviter leur mise en jeu lors de l'addition de cet extrait végétal, pour mieux spécifier son action vis-à-vis des récepteurs cholinergiques. De la même façon lors de l'étude de l'influence d'un extrait végétal vis-à-vis des récepteurs histaminiques, on ajoute un antagoniste cholinergique (atropine: sulfate d'atropine, laboratoire Aguettant, Lyon) à raison de 1 mg/ml, afin bloquer les récepteurs cholinergiques et ne mettre en évidence que les récepteurs histaminiques.

Pour l'étude des récepteurs opiacés, deux micro-électrodes sont placées en contact de l'iléon, ces micro-électrodes sont reliées à un stimulateur électrique (Stimulator SI-10, Narco bio-systems, U.S.A.), lié lui même au physiographe et permettant d'envoyer des stimulations pour induire des contractions au niveau de l'iléon.

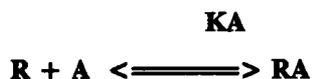
Le filtre de l'amplificateur du physiographe est réglé à 30 et la variable à 10 mv/cm, au cours des expériences sur les récepteurs opiacés, les stimulations électriques utilisées pour induire des contractions de l'iléon sont définies, par une fréquence de 0,1 - 0,2, une durée de 0,8 msec. et une tension de 80 volts (Stimulator SI-10, Narco bio-systems, U.S.A.).

L'organe isolé, duodénum du rat ou iléon de cobaye, est laissé au repos, dans la solution physiologique, pendant environ trente minutes, de façon à stabiliser ces contractions spontanées.

Les résultats obtenus avec les substances de référence ou les extraits végétaux sont reproduits 3 fois pour chaque organe et sur 3 organes différents pour évaluer et contrecarrer la variabilité des contractions au sein du même organe isolé (duodénum ou iléon) et entre différents organes isolés (différents duodénums ou iléons).

Les résultats sont exprimés selon la théorie d'ARIENS : "L'affinité de la drogue pour le récepteur peut être définie comme une capacité d'interaction drogue-récepteur et peut s'exprimer par le rapport de la quantité de molécules médicamenteuses fixées sur le récepteur à la quantité totale de molécules présentes dans le système récepteur et sa biophase".

On applique au complexe agoniste-récepteur la loi d'action de masse.



$$KA = \frac{[A][R]}{[RA]} = \text{Constante de dissociation}$$

$$\text{donc } \frac{1}{KA} = \frac{[RA]}{[R][A]}$$

$$\text{donc } \frac{[A]}{KA} = \frac{[RA]}{[R]} = \frac{[RA]}{[r] - [RA]}$$

$$\text{or } [RA] = y [r]$$

$$\text{et } [r] - [RA] = (1-y) [r]$$

$$\text{donc } \frac{[A]}{KA} = \frac{y}{1-y}$$

et sa forme logarithmique :

$$\log [A] - \log KA = \log \frac{y}{1-y}$$

r = récepteur total

R = récepteur libre

RA = récepteur occupé par l'agoniste

A = concentration de l'agoniste

y = fraction de récepteurs occupés par l'agoniste.

Si la moitié des récepteurs sont occupés, ce qui correspond à la moitié de l'effet maximum, on a : $y = 1/2$

$$\text{donc } \log [A] - \log KA = 0$$

$$\text{et } \log KA = \log [A] = -pD2 \quad \text{par définition}$$

$$\text{donc } -pD2 - \log KA = \log \frac{y}{1-y}$$

$$\text{or } \log \frac{y}{1-y} = p$$

$$\text{donc } -pD2 + pA = -p$$

et:

$$\underline{pD2 = pA + p}$$

Pour l'agoniste:

L'indice $pD2$ exprime l'affinité agoniste d'un substrat pour un récepteur, c'est le cologarithme de la concentration molaire de l'agoniste pour laquelle la contraction est la moitié de la contraction maximum.

B) TRANSIT INTESTINAL

* *Produit de référence*

Le Loperamide est pris comme produit de référence et testé

à la dose de 1 mg/kg

* *M.officinalis*

L'extrait de *M.officinalis* est testé aux doses de :

50 - 100 - 200 - 400 mg/kg

* *P.boldus*

L'extrait de *P.boldus* est testé aux doses de :

50 - 100 - 200 - 400 mg/kg

C) RECEPTEURS CHOLINERGIQUES

C-I) ACTION DES EXTRAITS VEGETAUX SUR LE PERISTALTISME

INTESTINAL:

Les contractions liées au péristaltisme intestinal sont mises en évidence au niveau du physiographe, les extraits sont ajoutés directement dans la cuve à volume de 0,1 ml et leurs effets sont observés, directement, vis-à-vis du péristaltisme intestinal.

Extraits végétaux:

les doses d'extraits végétaux ajoutées sont exprimées en plante sèche/cuve (50 ml)

a) *Melissa officinalis* L. :

1 mg/cuve ; 2 mg/cuve ; 5 mg/cuve ; 10 mg/cuve.

b) *Peumus boldus* :

10 mg/cuve ; 20 mg/cuve ; 30 mg/cuve

40 mg/cuve ; 50 mg/cuve ; 60 mg/cuve ; 100 mg/cuve

c) *Annona reticulata* L.

1 mg/cuve ; 5 mg/cuve ; 10 mg/cuve, 50 et 100 mg/cuve

d) *Fagara zanthoxylodes* Lam. :

1 mg/cuve ; 5 mg/cuve ; 10 mg/cuve

e) *Euphorbia hirta* L. :

1 mg/cuve ; 5 mg/cuve ; 10 mg/cuve

C-II) INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS-A-VIS DES CONTRACTIONS INDUITES PAR LA CARBAMINOYLCHOLINE AU NIVEAU DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES.

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 (carbaminoylcholine) est ajouté au bain, sous ce même volume constant de 0,1 ml et à des doses correspondantes:

DE100 = Dose efficace 100 induisant 100 % de contraction.

DE50 = Dose efficace 50 induisant 50 % de contraction.

DE25 = Dose efficace 25 induisant 25 % de contraction.

1) Solution de carbaminoylcholine:

A partir d'une solution mère concentrée à 10^{-1} M et par dilution dans la tyrode, sept solutions de concentrations différentes sont préparées et exprimées en M/cuve:

C1 = 10^{-2} M/cuve ; C2 = 10^{-3} M/cuve ; C3 = $4 \cdot 10^{-4}$ M/cuve
C4 = $2 \cdot 10^{-4}$ M/cuve ; C5 = 10^{-4} M/cuve ; C6 = $5 \cdot 10^{-5}$ M/cuve
C7 = $4 \cdot 10^{-5}$ M/cuve.

2) Solution de sulfate d'atropine (Antagoniste cholinergique de référence):

L'atropine est un antagoniste compétitif cholinergique qui se fixe spécifiquement au niveau des récepteurs cholinergiques et qui empêche l'acétylcholine ou la carbaminoylcholine de se fixer sur ces mêmes récepteurs et de provoquer la contraction de l'organe.

Six solutions de concentrations différentes sont préparées, à partir d'une solution mère concentrée à 5.70 mg/l et exprimées en mg/cuve.

A1 = 10^{-4} mg/cuve ; A2 = $4 \cdot 10^{-5}$ mg/cuve ; A3 = 10^{-5} mg/cuve
A4 = $4 \cdot 10^{-6}$ mg/cuve ; A5 = $2 \cdot 10^{-6}$ mg/cuve ; A6 = 10^{-6} mg/cuve.

**3) Extraits testés vis-à-vis de la contraction induite
par la carbaminoylcholine:**

La recherche d'une activité neurotrope agoniste ou antagoniste, des extraits végétaux, s'effectue vis-à-vis de la contraction induite par la carbaminoylcholine, les solutions des extraits sont préparées par dissolution du lyophilisat dans la solution de tyrode. Les doses sont exprimées en plante sèche/cuve (50 ml)

a) *Euphorbia hirta*:

Six solutions de concentrations différentes sont préparées:

100; 200; 300; 400; 500 et 600 mg/cuve

b) *Fagara zanthoxyloides*:

Quatre solutions de concentrations différentes sont préparées:

100; 200; 400; 600 mg/cuve

c) *Annona reticulata*:

Six solutions de concentrations différentes sont préparées:

100; 200; 300; 400; 600 et 800 mg/cuve

d) *Melissa officinalis*:

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées:

100; 200; 300; 400 mg/cuve

e) *Peumus boldus*

Six solutions de concentrations différentes sont préparées:

25; 50; 100; 300; 500 et 800 mg/cuve

f) *Fumaria officinalis*:

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées:

100; 150; 200; 300 et 400 mg/cuve

**4) Extraits testés vis-à-vis de la contraction induite par
le chlorure de baryum.**

a) Chlorure de Baryum

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées à partir d'une solution-mère de 5.10^{-1} M, et exprimées en M/cuve:

CB1 = 10^{-2} M/cuve ; CB2 = 3.10^{-2} M/cuve ; CB3 = 4.10^{-2} M/l

CB4 = 10^{-1} M/cuve ; CB5 = 5.10^{-1} M/cuve.

b) Papavérine (Antagoniste musculotrope):

La papavérine est le produit de référence utilisé pour son activité antagoniste, musculotrope, vis-à-vis du chlorure de baryum.

Trois solutions de concentrations différentes sont préparées à partir d'une solution-mère de concentration égale à: $5 \cdot 10^{-1}$ M.

P1 = 10^{-3} M/cuve ; P2 = 10^{-2} M/cuve ; P3 = 10^{-1} M/cuve

c) Extraits végétaux:

Peumus boldus:

Trois solutions de concentrations différentes sont préparées:

25 mg/cuve ; 50 mg/cuve ; 100 mg/cuve.

5) Extraits végétaux testés vis-à-vis de la pilocarpine, un agoniste cholinergique spécifique aux récepteurs muscariniques:

a) Pilocarpine:

La pilocarpine est un agoniste cholinergique se liant spécifiquement aux récepteurs cholinergiques de type muscarinique et provoquant, de la même façon que la carbamoylcholine, une contraction du duodénum.

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées à partir d'une solution-mère de concentration égale à: $5 \cdot 10^{-1}$ M

PI1 = 10^{-2} M/cuve ; PI2 = 10^{-3} M/cuve ; PI3 = $4 \cdot 10^{-4}$ M/cuve

PI4 = $2 \cdot 10^{-4}$ M/cuve ; PI5 = 10^{-4} M/cuve

b) Extrait végétal:

Peumus Boldus:

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées et testées vis-à-vis de la contraction induite par la pilocarpine:

100 mg/cuve ; 200 mg/cuve ; 300 mg/cuve ; 400 mg/cuve
500 mg/cuve.

REALISATION CHRONOLOGIQUE DE L'EXPERIMENTATION.

L'expérimentation est réalisée en trois étapes successives:

- Une courbe effet-dose de l'action de la carbaminoylcholine, du chlorure de baryum ou de la pilocarpine sur le duodénum du rat 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 cholinergiques, et de l'agoniste utilisé, le sulfate d'atropine et la papavérine, est étudiée vis-à-vis des contractions induites par l'agoniste (agent contracturant). Cette deuxième étude doit nous permettre d'évaluer les concentrations en antagoniste nécessaire pour réduire de 100, 50 et de 25 % (DI100, DI50 et DI25 doses inhibitrices de 100, 50 et 25 % de la contraction de l'agoniste par l'antagonite) la contraction induite par l'agoniste, ainsi que l'influence de la DI50 vis-à-vis des DE100, DE50 et DE25 (dose efficace de l'agoniste induisant respectivement 100 %, 50 % et 25 % la contraction du duodénum de rat) pour rechercher si cet antagonisme est compétitif ou non.

- Enfin, l'influence des extraits végétaux, vis-à-vis des contractions induites par la carbaminoylcholine, le chlorure de baryum et la pilocarpine, est étudiée, ainsi que la nature d'un éventuel antagonisme suivant le même protocole que le produit de référence.

*** Etude de l'action de la carbaminoylcholine sur le duodénum isolé du rat (agent neurotrope)**

Avant l'étude de la relation effet-dose de la carbaminoylcholine, le duodénum est sensibilisé par l'addition de 0,1 ml de la solution de carbaminoylcholine la plus concentrée C1 ($5 \cdot 10^1$ M, soit une concentration de 10^{-2} M/cuve de carbaminoylcholine).

Un laps de temps de 10-15 secondes est toujours respecté après l'addition de la carbaminoylcholine, après lequel si aucune contraction n'est constatée la dose est considérée inférieure au seuil de la contraction.

Plusieurs essais sont ainsi réalisés, jusqu'à l'obtention de trois contractions successives identiques.

Entre chaque essai le duodénum 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 sept solutions de carbaminoylcholine précédemment préparées, en ajoutant dans la cuve 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

Les concentrations de carbaminoylcholine ajoutées dans la cuve sont donc: 4.10^{-5} ; 5.10^{-5} ; 10^{-4} ; 2.10^{-4} ; 4.10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} M/cuve.

La courbe effet-dose permet de déterminer la concentration sensible (dose seuil:DS), à partir de laquelle apparaît la première contraction, mais aussi la concentration induisant un effet maximal (DE100). La concentration nécessaire à l'apparition d'une contraction réduite de moitié par rapport à l'effet maximal (DE50) est également déterminée par la courbe effet-dose.

*** Etude de l'action de la pilocarpine et du chlorure de baryum sur le duodénum isolé du rat**

Le protocole et la méthode d'étude pour ces deux substances contracturantes sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étude de la relation effet-dose de la carbaminoylcholine (Paragraphe précédent).

*** Influence d'un antagoniste spécifique des récepteurs cholinergiques, l'atropine, et d'un antagoniste musculotrope la papaverine :**

Avant d'envisager l'influence des antagonistes vis à vis de la contraction de l'agoniste, la quantité de l'agoniste suffisante pour provoquer un effet maximal (DE100) est à nouveau déterminée, l'expérience étant renouvelée jusqu'à l'obtention de trois contractions de même amplitude.

L'action de l'atropine est ensuite étudiée par l'addition de concentrations croissantes de cet antagoniste, préventivement à l'ajout de l'agoniste, et ceci jusqu'à l'obtention d'une inhibition totale des effets agonistiques. Pour chaque essai, 0,1 ml de l'antagoniste est ajouté dans la cuve, deux minutes avant l'apport de la concentration d'agoniste induisant une contraction maximale (DE100).

Les concentrations en antagonistes, obtenues à partir des solutions précédemment préparées et présentes dans la cuve, sont les suivantes :

*** Atropine:**

10^{-6} ; 2.10^{-6} ; 4.10^{-6} ; 10^{-5} ; 4.10^{-5} ; 10^{-4} mg/cuve

*** Papavérine:**

10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} M/cuve

La sensibilité du muscle à l'agoniste est régulièrement vérifiée, par addition d'une dose maximale d'agoniste. La concentration en antagoniste, nécessaire pour réduire de moitié l'amplitude (DI50) des contractions induites par l'agoniste, est recherchée vis-à-vis de la concentrations maximale (DE100) d'agoniste puis cette réduction de moitié est également vérifiée vis à vis des concentrations d'agoniste induisant 50 % et 25 % de contraction (DE50 et DE25).

*** Influence des extraits végétaux vis à vis des
contractions induites par les agonistes:
carbaminoylcholine, pilocarpine et chlorure de baryum.**

La procédure expérimentale utilisée est identique à celle employée pour les produits de référence: atropine et papavérine.

Chacune des solutions d'extrait végétal précédemment préparées est testée sous un volume de 0,1 ml, ajoutée deux minutes avant l'apport de la concentration d'agoniste induisant une contraction maximale (DE100).

Pour les extraits qui ont montré une activité antagoniste, la dose inhibitrice (DI50) qui réduit la contraction induite par l'agoniste de moitié est testée vis-à-vis des doses DE50 et DE25 de l'agoniste qui induisent, respectivement, 50 % et 25 % de contraction du duodénum.

STATISTIQUES

L'homogénéité des variances, entre les lots témoins* et chaque lot traité, étant vérifiée par le test de Bartlett, ainsi que la significativité obtenu par l'ANOVA, les comparaisons statistiques sont réalisées, à laide d'un test paramétrique de comparaison multiple, le test T de Student.

* les lots témoins correspondent aux amplitudes des contractions obtenues avec l'agoniste (carbaminoylcholine)

C-III) RESULTATS:

1) Action des extraits végétaux sur le transit intestinal de la souris, in vivo.

Le loperamide, pris comme produit de référence, a montré une activité inhibitrice du transit intestinal, statistiquement significative, à la dose de 1 mg/kg.

Cette inhibition se retrouve dans le cas de l'extrait de *P. boldus* à partir de 100 mg/kg avec un effet dose-dépendant et une inhibition maximum à la dose de 400 mg/kg. L'extrait de *M. officinalis* induit une inhibition du transit mais qui n'est statistiquement significative qu'aux doses de 200 mg/kg et 400 mg/kg (Fig. 1)

2) Action des extraits végétaux sur le péristaltisme intestinal

a) Effet de l'extrait de *Melissa officinalis*.

L'extrait de *M. officinalis* a montré une activité inhibitrice vis-à-vis du péristaltisme, de base, intestinal, cette inhibition n'apparaît qu'à partir de la dose de 5 mg/cuve avec une inhibition complète à 10 mg/cuve. (Enr.1)

b) Effet de *Peumus boldus*

L'enregistrement 2 nous permet de constater que l'extrait de *P. boldus* agit aussi bien au niveau de la tension musculaire qu'au niveau des ondes péristaltiques, à 10 mg/cuve, l'extrait provoque un relâchement de la tension musculaire, ce relâchement est d'autant plus important que la dose est importante jusqu'à la dose de 40 mg/cuve, en même temps l'augmentation de la dose de l'extrait provoque une diminution des ondes péristaltiques qui disparaissent complètement à 60 mg/cuve.

c) Effet d'*Annona reticulata*

L'extrait d'*A. reticulata* entraîne une inhibition totale à partir de 10 mg/cuve, cette inhibition ne disparaît qu'après le lavage de l'organe.

Tableau II-E Effet du lopéramide et des extraits de *Peumus boldus* et de *Melissa officinalis* sur le transit intestinal, *in vivo*, chez la souris.

Produits	Doses mg/kg	T/L* Moy. ET	% D'inhib- -ition	P <
Témoin	Serum physiologi.	0,54	////	////
Lopéramide	1	0,10	80 %	0,001
<i>Peumus boldus</i>	50	0,53	00 %	NS
	100	0,41	21 %	0,05
	200	0,18	66 %	0,001
	400	0,12	77 %	0,001
<i>Melissa officinalis</i>	50	0,47	14 %	NS
	100	0,40	25 %	0,05
	200	0,34	37 %	0,01
	400	0,25	54 %	0,01

* T = trajet parcouru par la suspension de charbon
L = longueur totale de la portion intestinale

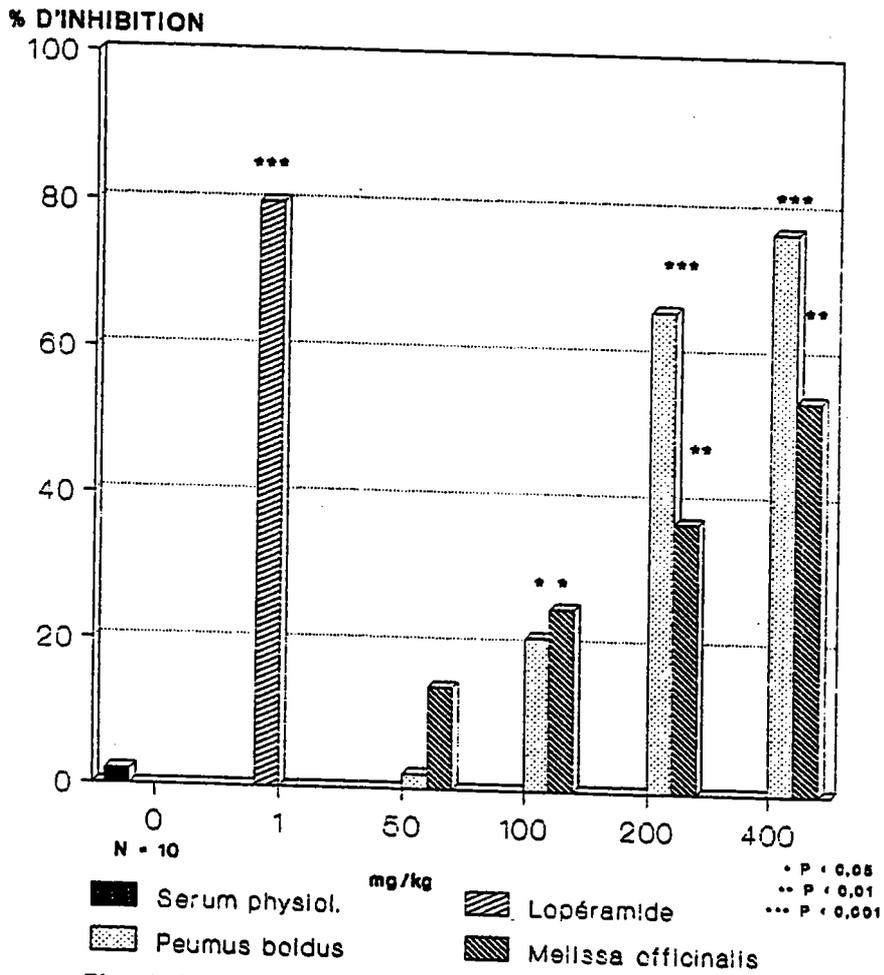
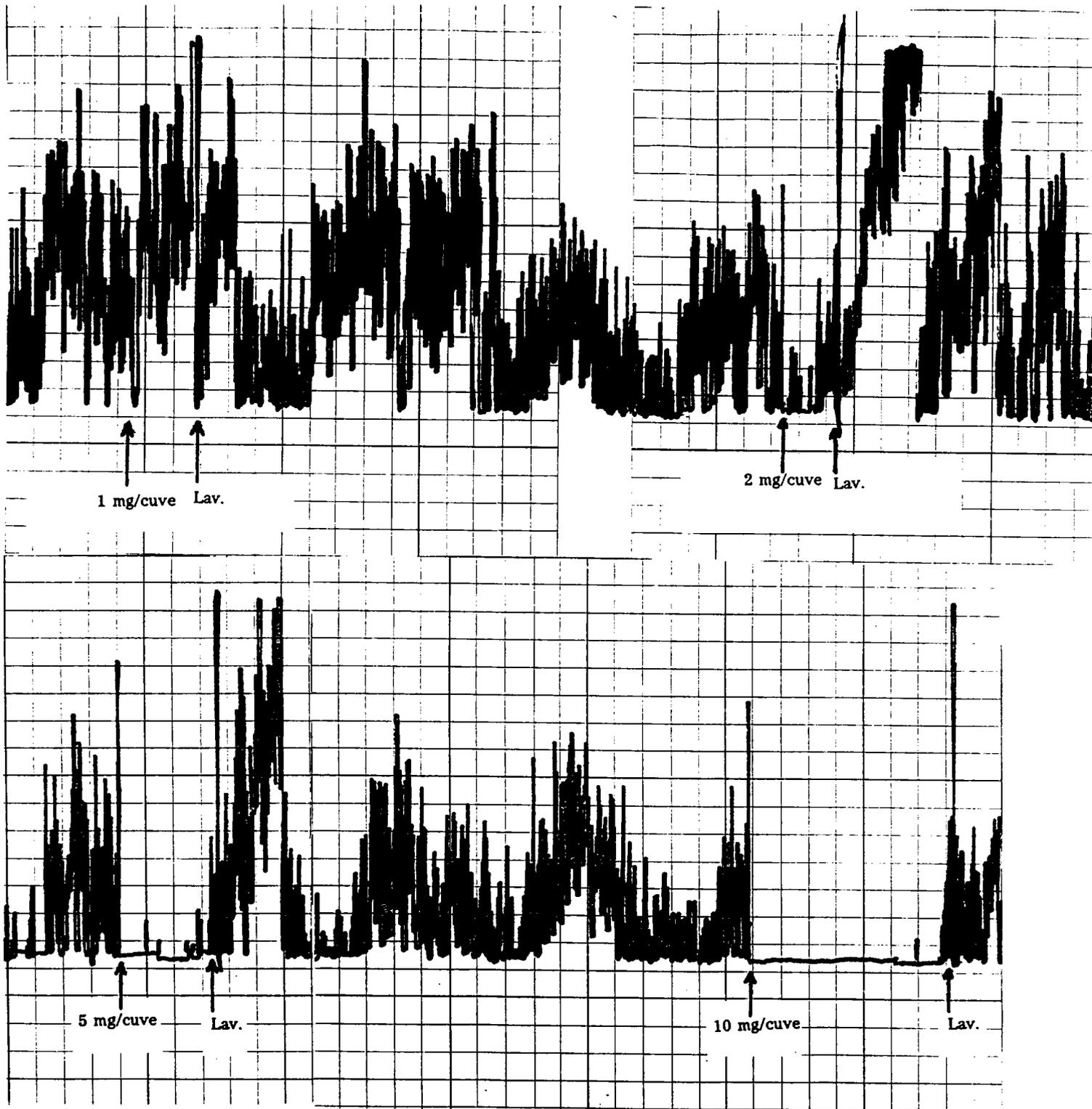
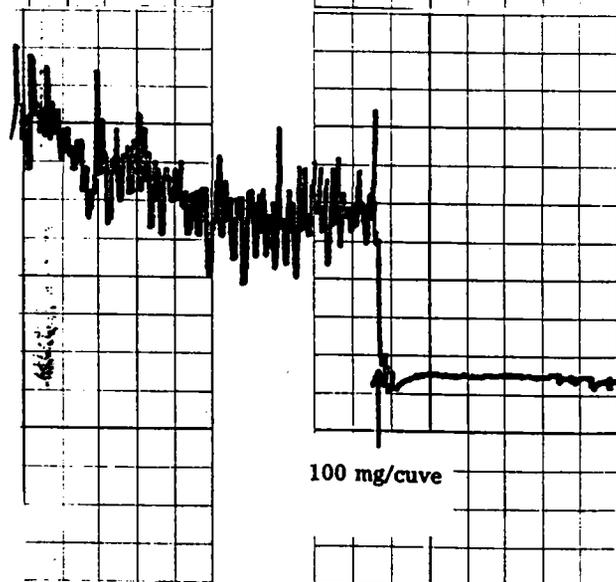
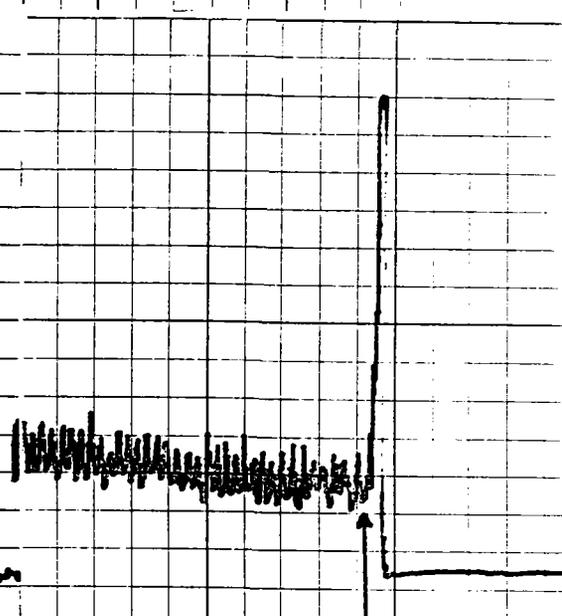
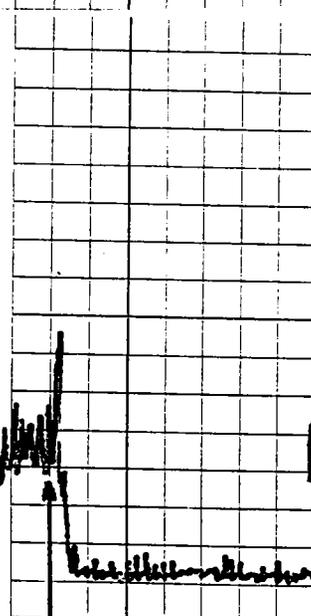
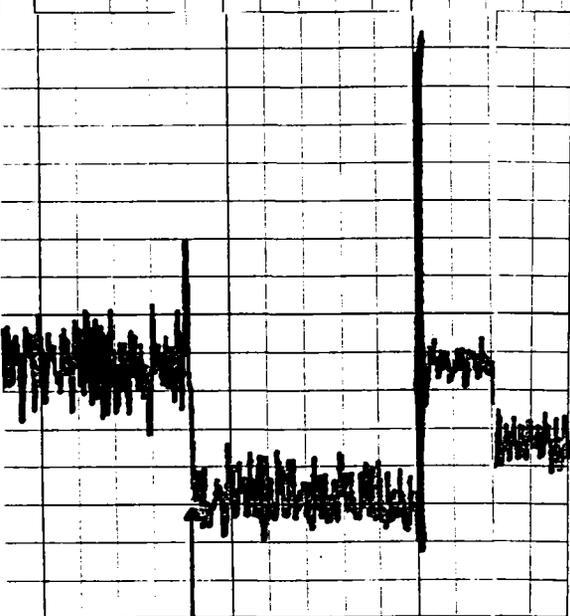
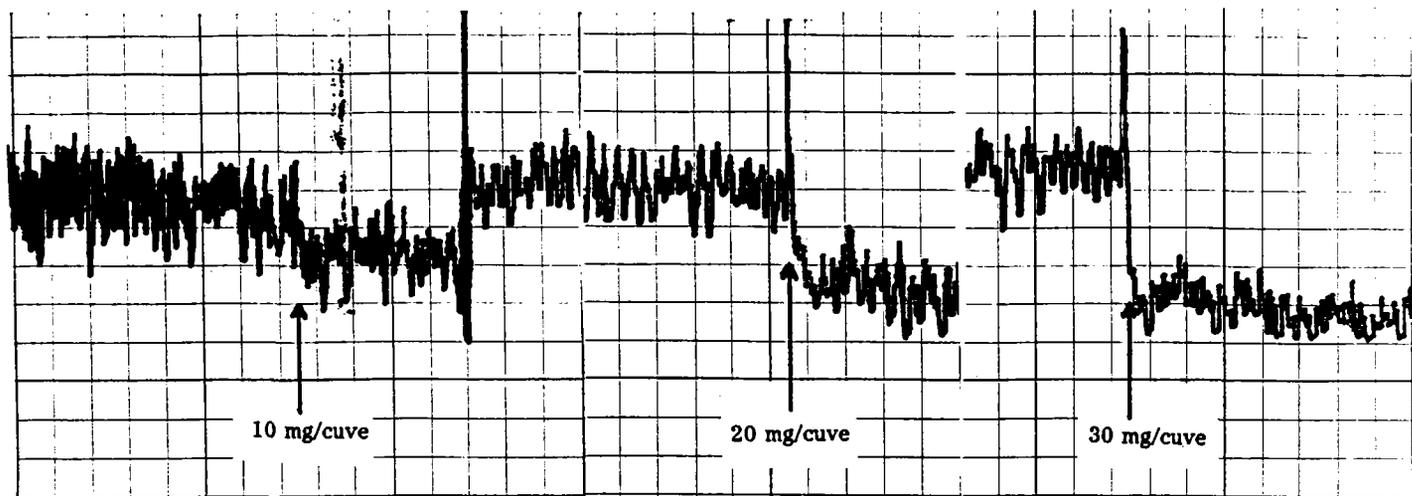


Fig.1 Effet du Lopéramide et des extraits de P.boldus et de Melissa officinalis sur le transit intestinal in vivo, chez la souris.



Enregistrement 1 Effet de *Melissa officinalis* L, vis à vis du péristaltisme du duodénum isolé de rat.



Enregistrement 2 Effet de *Peumus boldus L.*, vis à vis du péristaltisme du duodénum isolé de rat.

d) Effet de *Fagara zanthoxyloides*

L'extrait de *F.zanthoxyloides* a provoqué, à 10 mg/cuve, une forte augmentation rapide et brutale de la tension musculaire qui se contracte à son maximum, cette contraction ne disparaît qu'après le lavage de l'organe.

e) Effet de *Euphorbia hirta*

L'inhibition du péristaltisme par l'extrait végétal d'*E.hirta* ne dure que quelques secondes et les ondes péristaltiques réapparaissent avant le lavage de l'organe.

2- Etablissement de la relation effet-dose et la recherche de la DE50 de la carbaminoylcholine

La figure 2a nous permet de constater que la dose la plus faible qui permet d'obtenir la plus petite et la première contraction du duodénum correspond à $4 \cdot 10^{-5}$ M/cuve. La dose efficace, permettant d'obtenir, la moitié de la contraction maximum (DE50), donc la pD_2 est d'environ 4. A partir de 10^{-3} M/cuve on obtient une contraction maximum au delà de laquelle on n'obtient plus d'augmentation de contraction en dépit de l'augmentation de la dose. C'est la dose efficace à 100 %, (DE100 = 10^{-2} M/cuve) qui sera utilisée dans toutes les expériences afin d'évaluer l'action des différentes substances testées vis à vis de la contraction du duodénum induite par cette concentration (DE100 = C_1). (Enr.3)

3- Evaluation et détermination des doses inhibitrices de l'atropine.

A partir de 10^{-6} mg/cuve, on peut constater le début de l'inhibition de la contraction provoquée par la DE100 de carbaminoylcholine. Cette inhibition atteint 50 % à la dose de 10-5 mg/cuve d'atropine et elle est maximale (à 100 % d'inhibition = DI100) à la dose de 10^4 mg/cuve (Fig.2b) (Enr.4). Pour l'évaluation de l'activité antagoniste spécifique et compétitive, on peut observer sur la figure 3 qu'à chaque fois qu'on ajoute la dose inhibitrice 50 % d'atropine, on induit une inhibition de 50 % de la contraction provoquée par la dose efficace de carbaminoylcholine permettant d'obtenir 100 %, 50 % ou 25 % de la contraction du duodénum. (Fig.3)

4- Effet de *E.hirta* vis à vis de la contraction du duodénum induite par la DE100 de carbaminoylcholine.

Aucun effet n'a été relevé, en ce qui concerne l'action de l'extrait vis à vis des récepteurs cholinergiques *in vitro* aux doses de 100 à 500 mg/cuve, par contre à la dose de 600 mg/cuve un effet inhibiteur, significatif, des contractions a été observé.(Fig.4).

5- Effet du *F.zanthoxyloides*

Aux doses testées, de 100 à 600 mg/cuve, aucun effet n'a été observé de l'action de l'extrait de *Fagara* vis à vis de la contraction du duodénum induite par la carbaminoylcholine.(Fig.5).

6- Effet de *A. reticulata*

La figure 6, nous permet de constater que l'*annona* exerce un effet inhibiteur à partir de 200 mg/cuve, cet effet est très important (80 % d'inhibition) aux doses de 600 et 800 mg/cuve. Cet effet inhibiteur se manifeste aussi lors d'un traitement en curatif en ajoutant l'extrait juste après l'addition de la carbaminoylcholine.

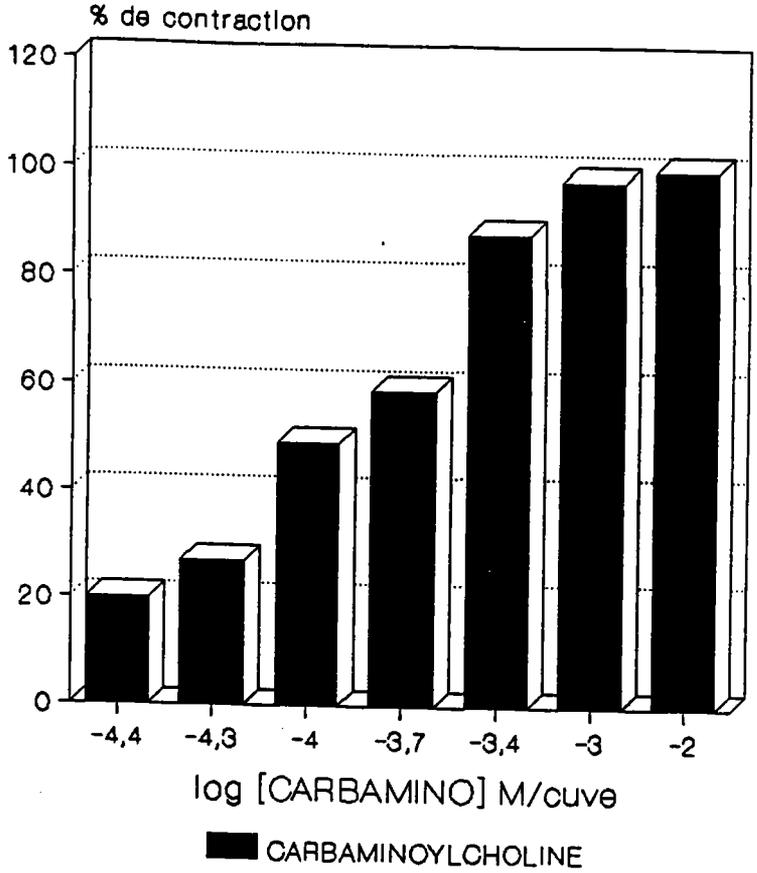


Fig.2a Effet de la carbaminoylcholine sur le duodénum de rat. In vitro.

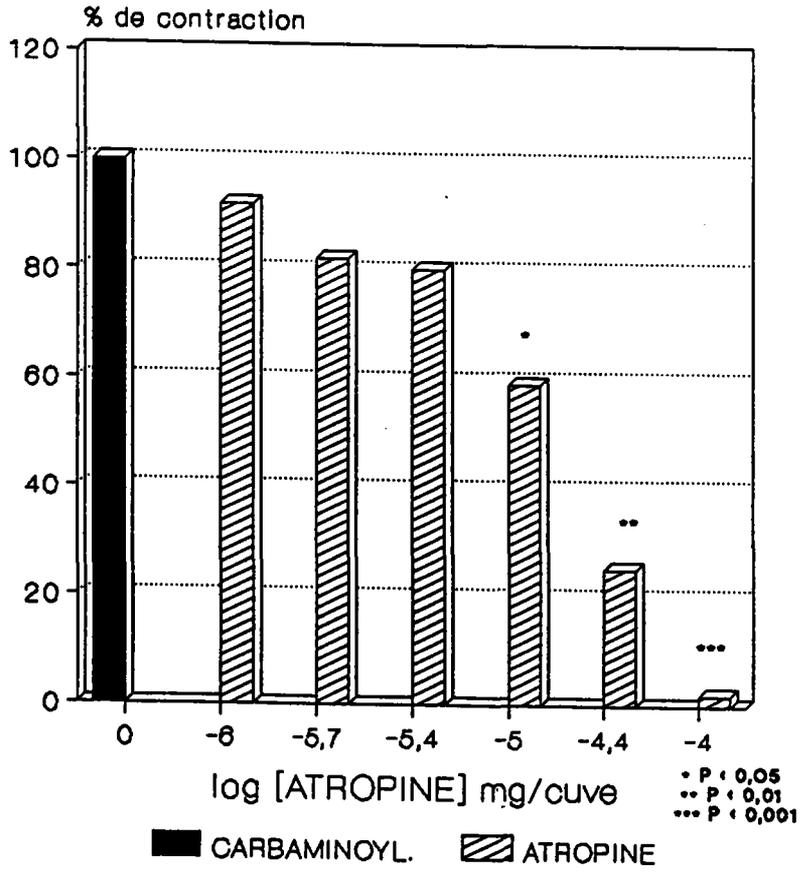
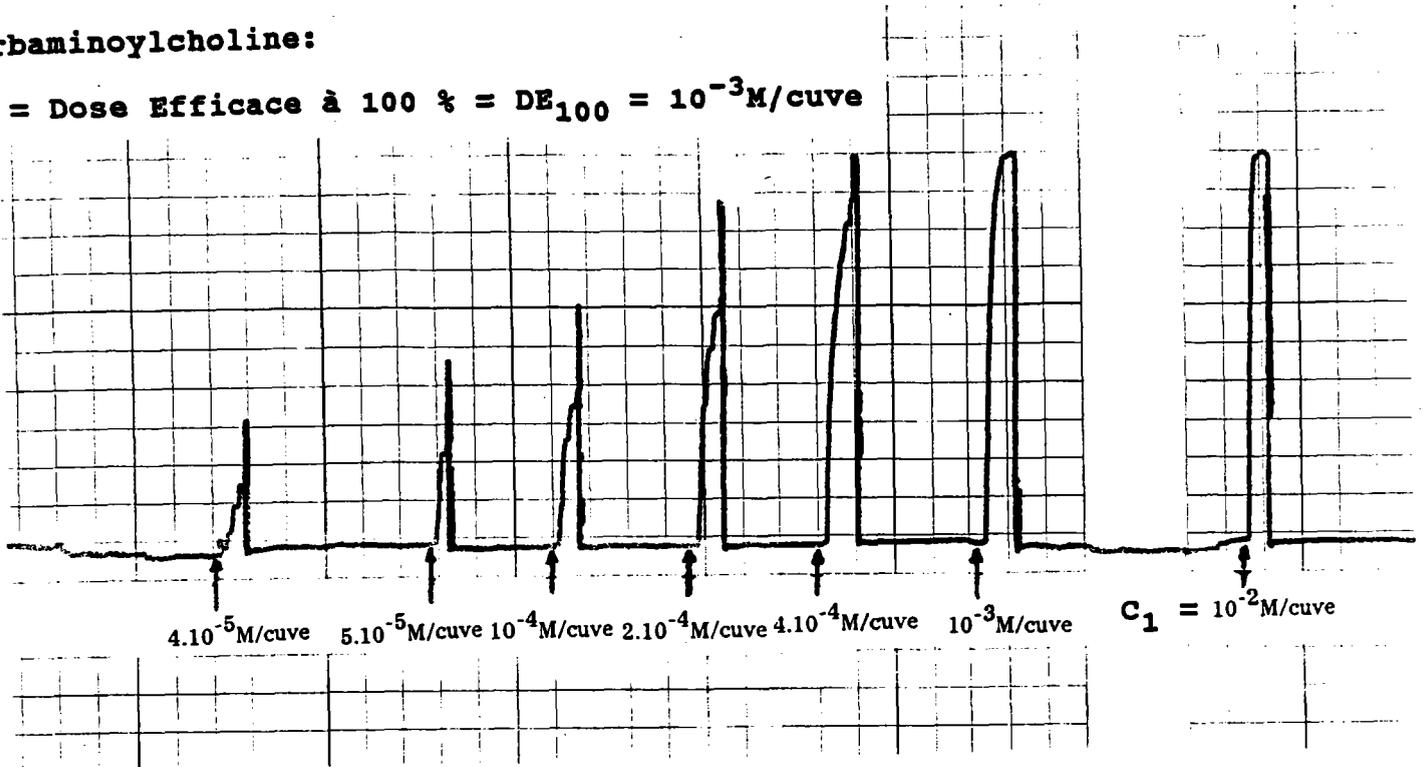


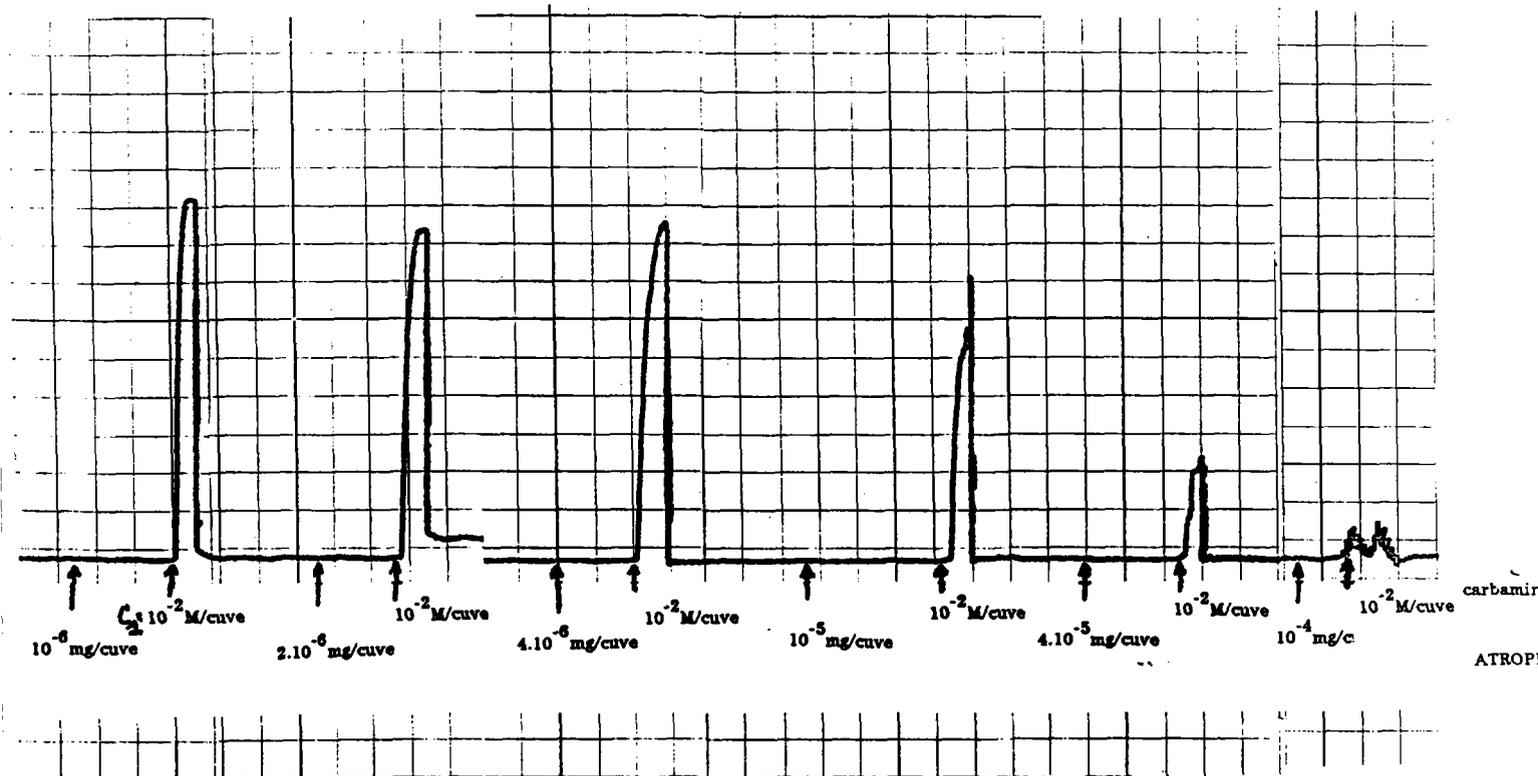
Fig.2b Effet de l'atropine vis à vis des contractions du duodénum, induites par la carbaminoylcholine. In vitro.

Carbaminoylcholine:

$C_1 = \text{Dose Efficace à } 100\% = DE_{100} = 10^{-3} \text{ M/cuve}$



Enregistrement 3 Effet et relation Effet-Dose de la carbaminoylcholine, vis à vis du duodénum isolé de rat.



Enregistrement 4 Effet et relation Dose-Effet de l'atropine, vis à vis des contractions du duodénum isolé de rat, induites par la carbaminoylcholine.

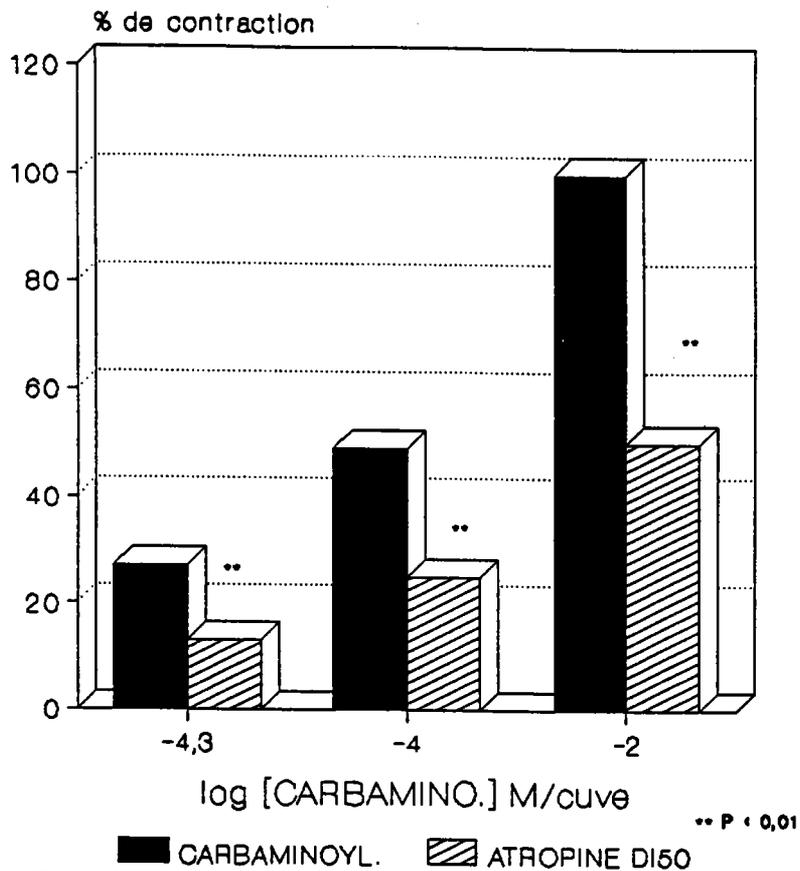


Fig.3 Effet de la D150 de l'atropine vis à vis des DE25, DE50 et DE100 de la carbaminoyl, sur le duodénum de rat,

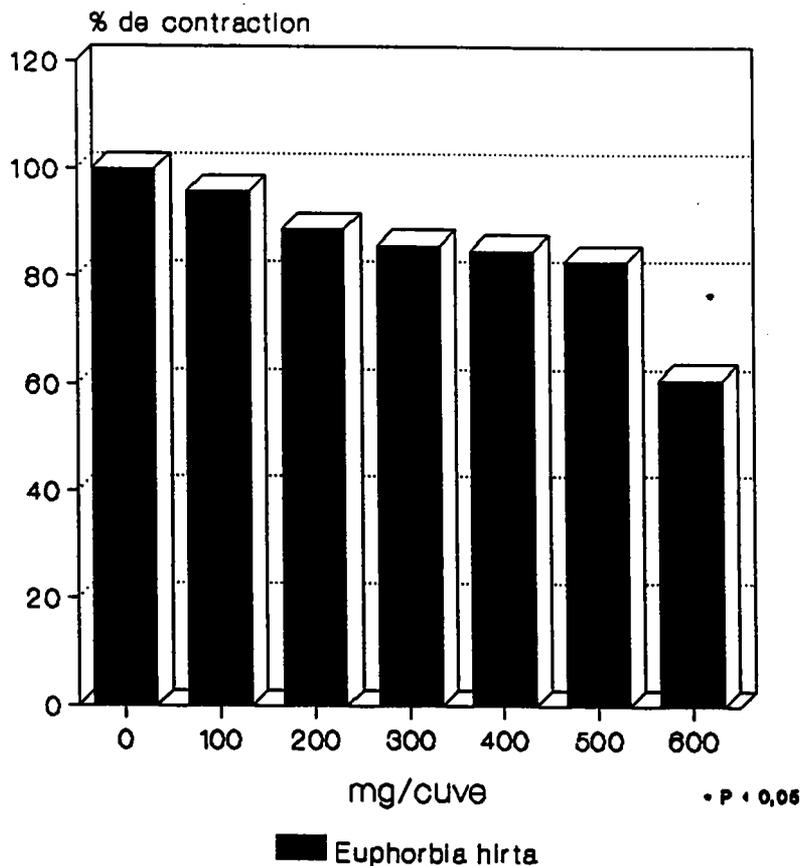


Fig.4 Effet de l'extrait d'Euphorbia hirta, vis à vis des contractions du duodénum induites par la carbaminoyl,

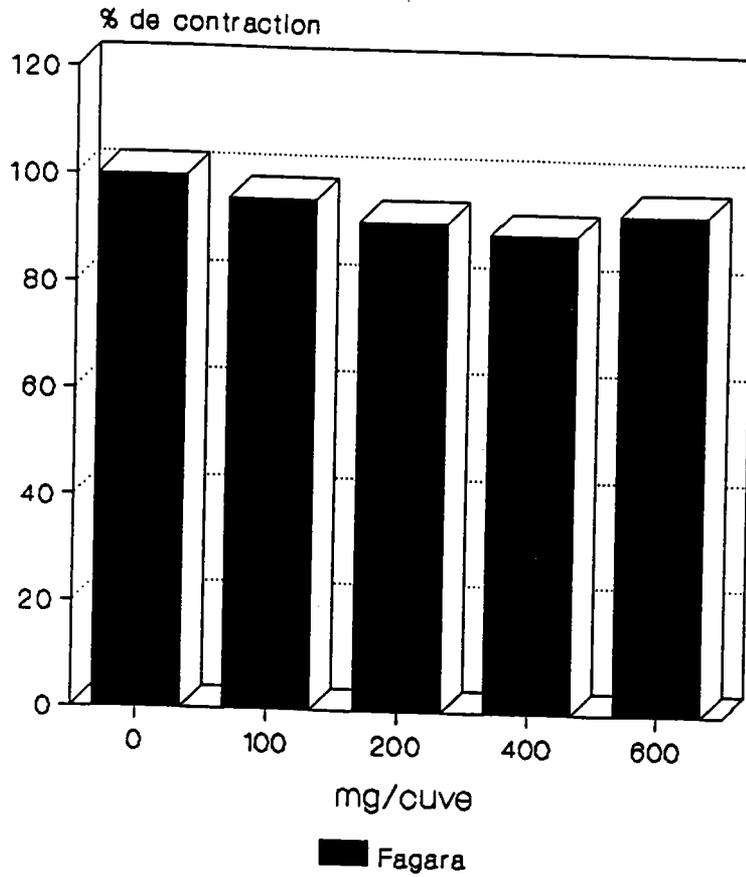


Fig.5 Effet de F.zanthoxyloides vis-à-vis des contractions du duodénum de rat, induites par la carbaminoylcholine.

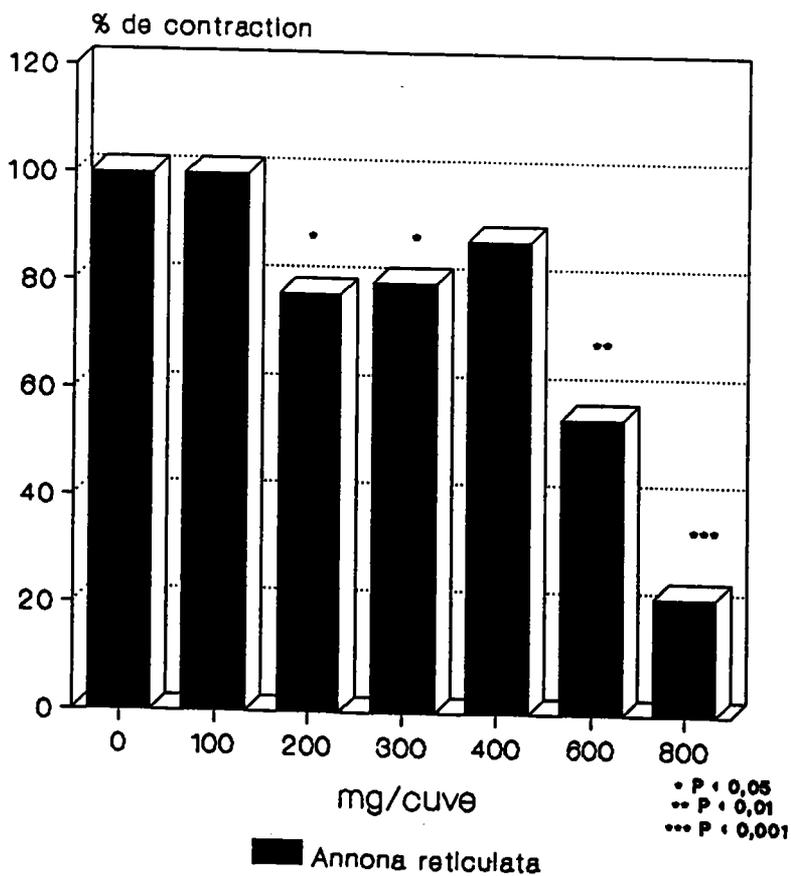


Fig.6 Effet de l'extrait de A.reticulata vis-à-vis des contractions du duodénum, induites par la carbaminoyl.

7- Effet de *M. officinalis*

La mélisse testée aux doses de 100, 200, 300, 400 et 1000 mg/cuve, aucun effet n'a pu être mis en évidence pour une éventuelle activité inhibitrice de la Mélisse vis à vis de la contraction duodénale induite par la carbaminoylcholine (Fig.7).

8- Effet de *P. boldus*.

a) Effet du *P. boldus* vis à vis de la contraction induite par la carbaminoylcholine.

L'extrait de *P. boldus* a permis d'obtenir une inhibition, de la contraction, proportionnelle à la dose additionnée dans la cuve en présence de la DE100 de carbaminoylcholine qui provoque la contraction maximum. Cette inhibition se manifeste légèrement à la dose de 100 mg/cuve et atteint son maximum à 800 mg (DI70 = Dose Inhibitrice à 70 %).(Fig.8) (Enr.5). De la même façon qu'avec l'atropine, la figure 9 nous permet de constater que la dose inhibitrice à 70 % (DI70) entraîne une inhibition à 70 % vis à vis des DE25 (Dose efficace de la carbaminoylcholine à 25 %), DE50 et DE100, ce qui permet de vérifier l'existence ou non d'un antagonisme.

b) Effet de *P. boldus* vis à vis du chlorure de baryum.

La figure 10 nous permet de constater que les doses de chlorure de baryum, agent musculotrope, induisent les contractions entre 3.10^{-2} M/cuve et 10^{-1} M/cuve, avec la DE100 = 10^1 M/cuve.(Enr.6). La papavérine, pris comme antagoniste musculotrope de référence, entraîne une inhibition proportionnelle à la dose ajoutée dans la cuve, avec la dose inhibitrice maximale DI100 = 10^1 M/cuve. (Fig.11) (Enr.7). L'extrait de *P. boldus* provoque une inhibition de la contraction induite par le chlorure de baryum à partir de la dose de 25 mg/cuve avec la dose maximale d'inhibition correspondante à 100 mg/cuve.(Fig.12) (Enr.8)

c) Effet du *P. boldus* vis à vis de la contraction duodénale induite par la pilocarpine (agoniste muscarinique)

La figure 13 montre que la pilocarpine entraîne une contraction du duodénum avec un minimum à la dose de 10^{-4} M/cuve et un maximum de 10^{-3} M/cuve au delà duquel l'augmentation de la dose 10^{-2} M/cuve ne permet plus d'augmenter les contractions (Enr.9). L'addition préventive, de l'extrait entraîne une inhibition proportionnelle à la dose avec un maximum à 500 mg/cuve, donc l'extrait a un effet inhibiteur vis à vis de la pilocarpine. (Fig.14) (Enr.10)

10- Effet de *Fumaria officinalis*

L'extrait de la fumeterre a manifesté un effet inhibiteur vis à vis de la contraction duodénale, induite par la carbaminoylcholine, cette inhibition est dose-dépendante avec un maximum à la dose de 400 mg/cuve.(Fig.15).

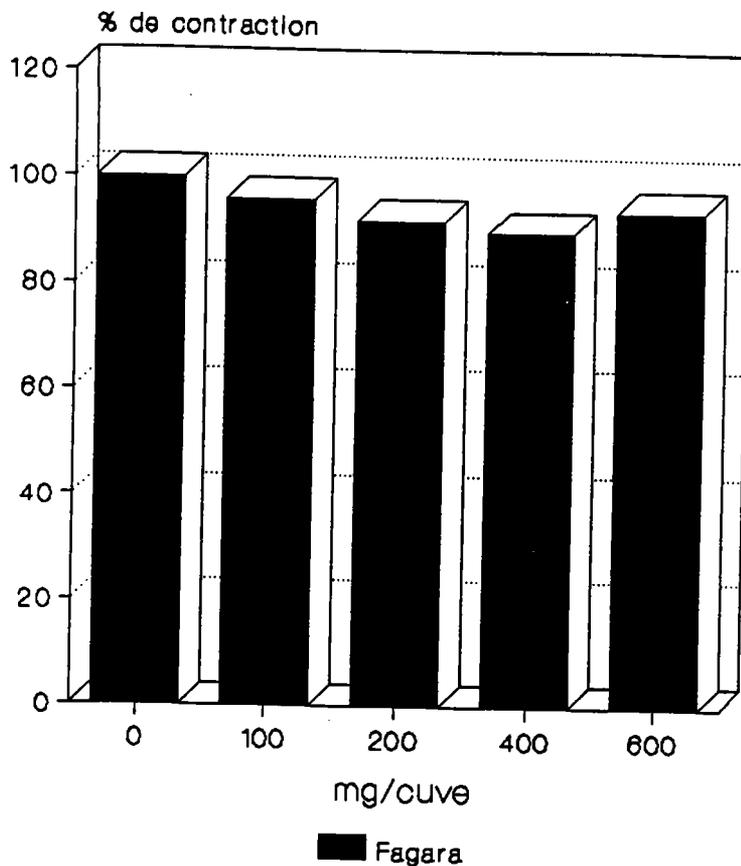


Fig.5 Effet de F.zanthoxyloides vis-à-vis des contractions du duodénum de rat. Induites par la carbaminoycholine.

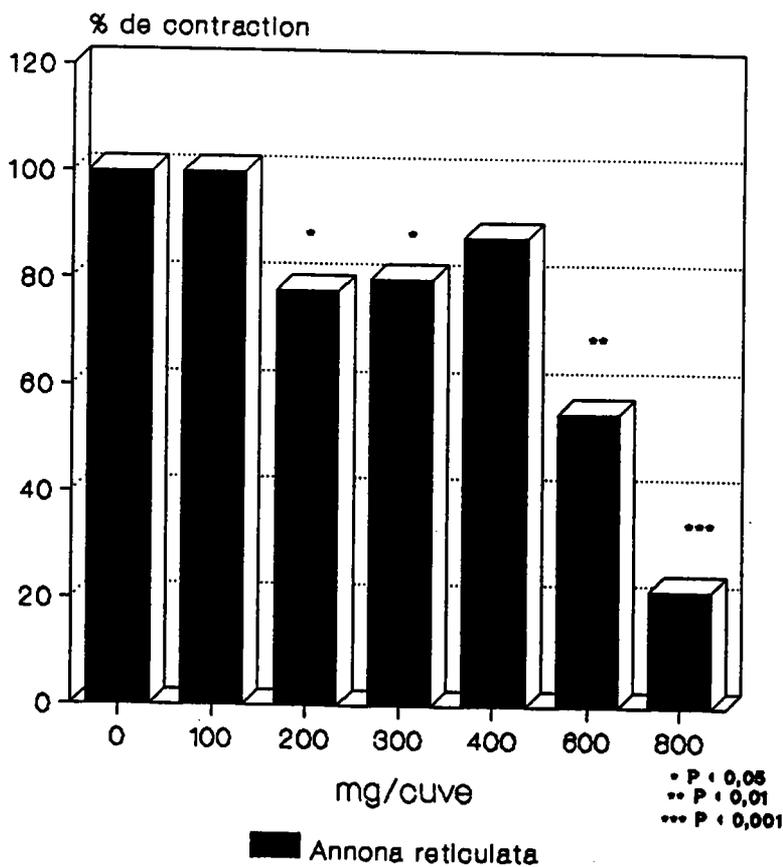


Fig.6 Effet de l'extrait de A.reticulata vis-à-vis des contractions du duodénum. Induites par la carbaminoyl.

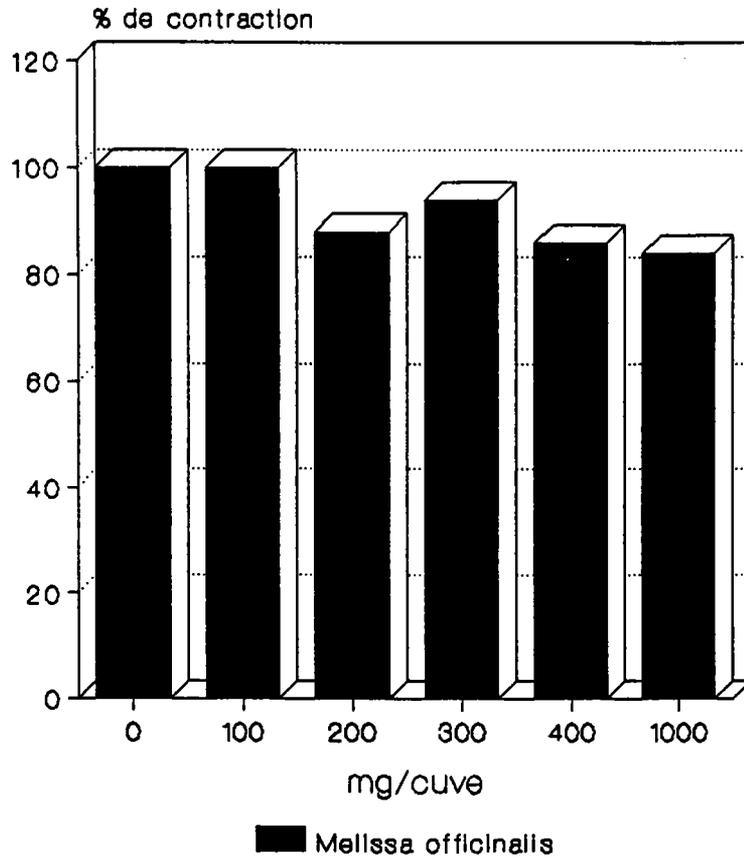


Fig.7 Effet de M.officinalis vis-à-vis du duodénum de rat, induites par la carbaminoylcho.

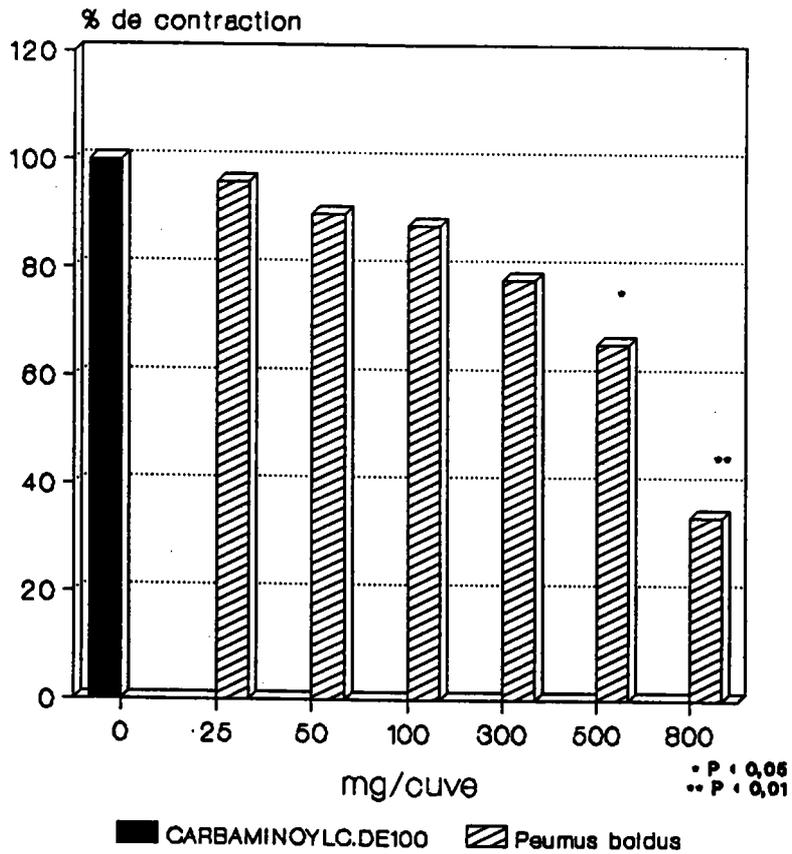


Fig.8 Effet de P.boldus, vis-à-vis de la contraction du duodénum induite par la carbaminoyl, in vitro.

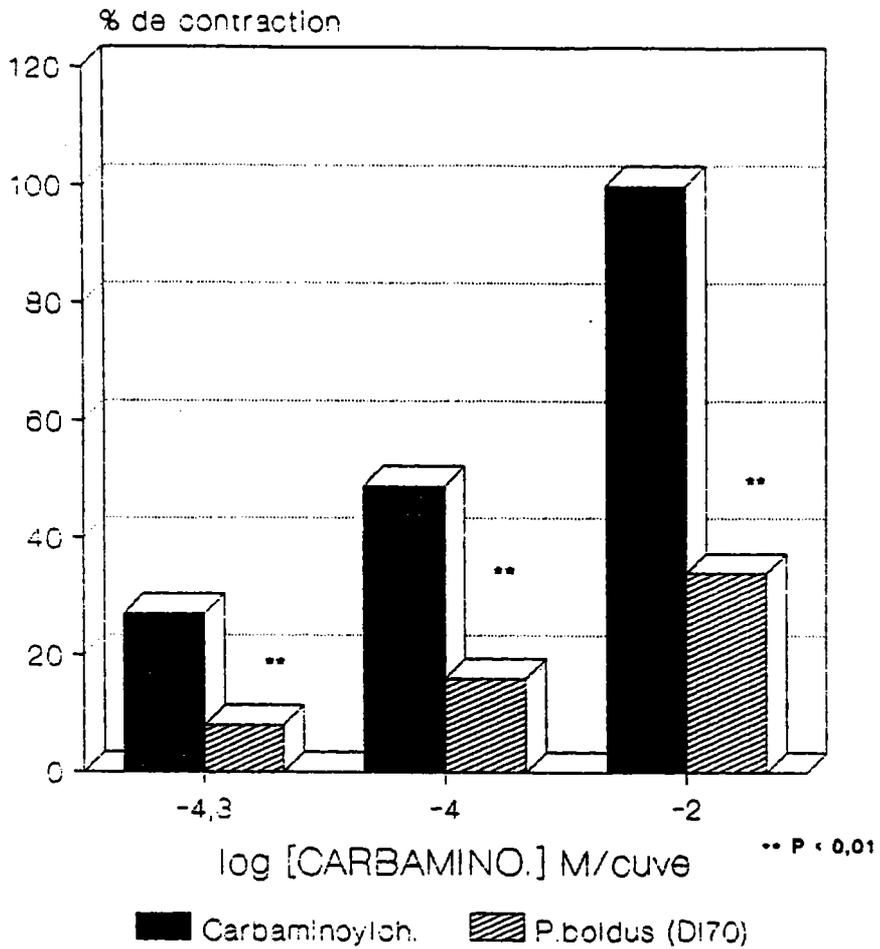


Fig.9 Effet de la DI30 de P.boldus, vis-à-vis de la contraction du duodénum, induite par les DE25, DE50 et DE100

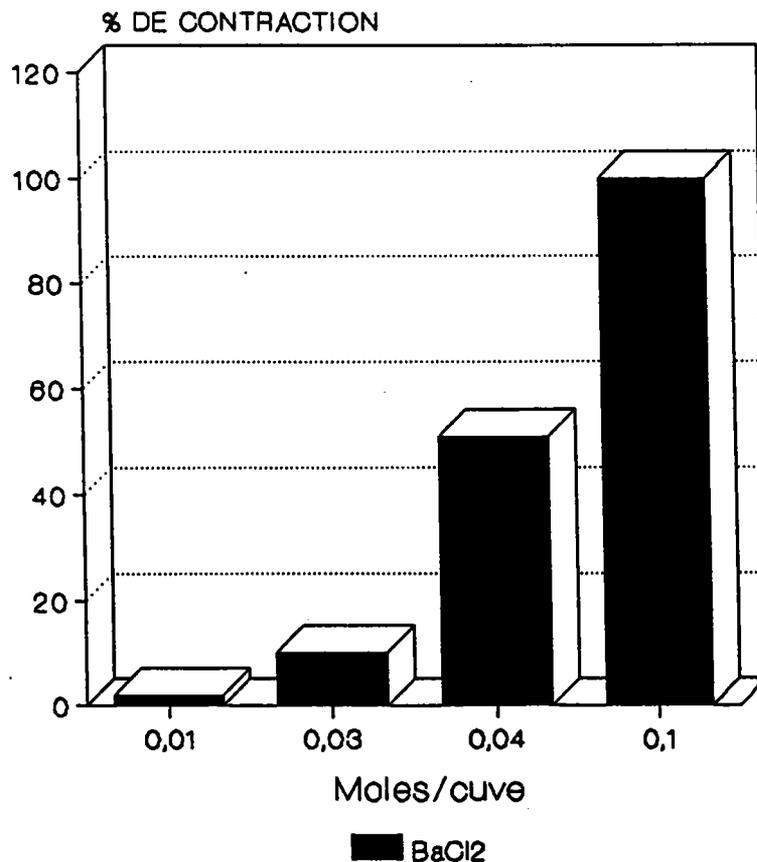


Fig.10 Effet contracturant de chlorure de baryum (BaCl2) vis à vis du duodénum isolé de rat (courbe Effet-Dose)

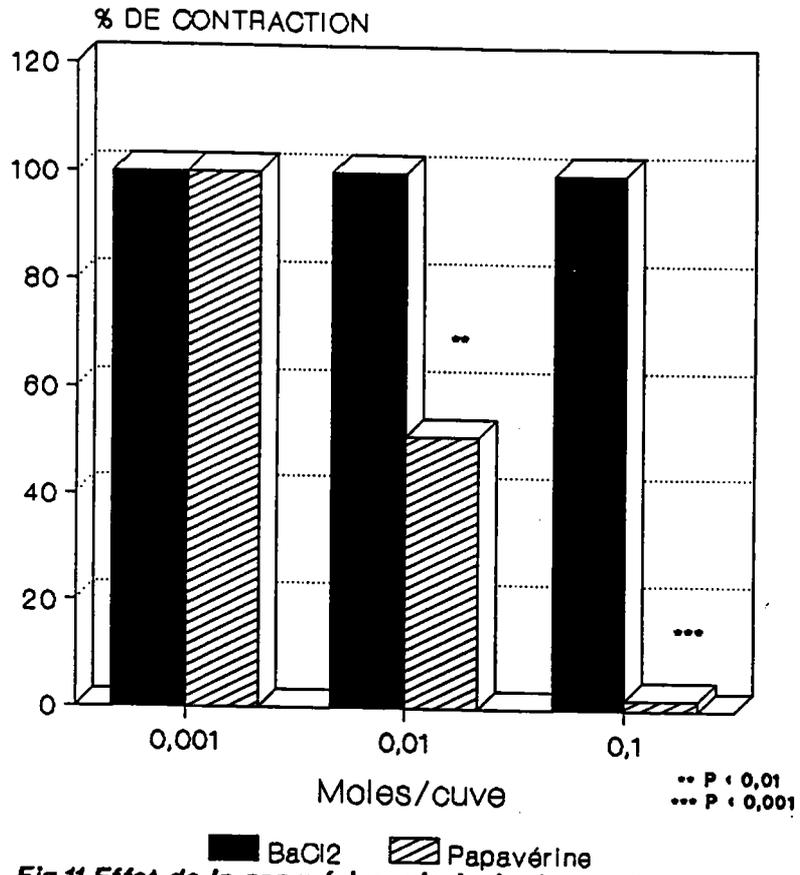


Fig.11 Effet de la papavérine, vis à vis des contractions du duodénum, induites par le chlorure de baryum (BaCl₂).

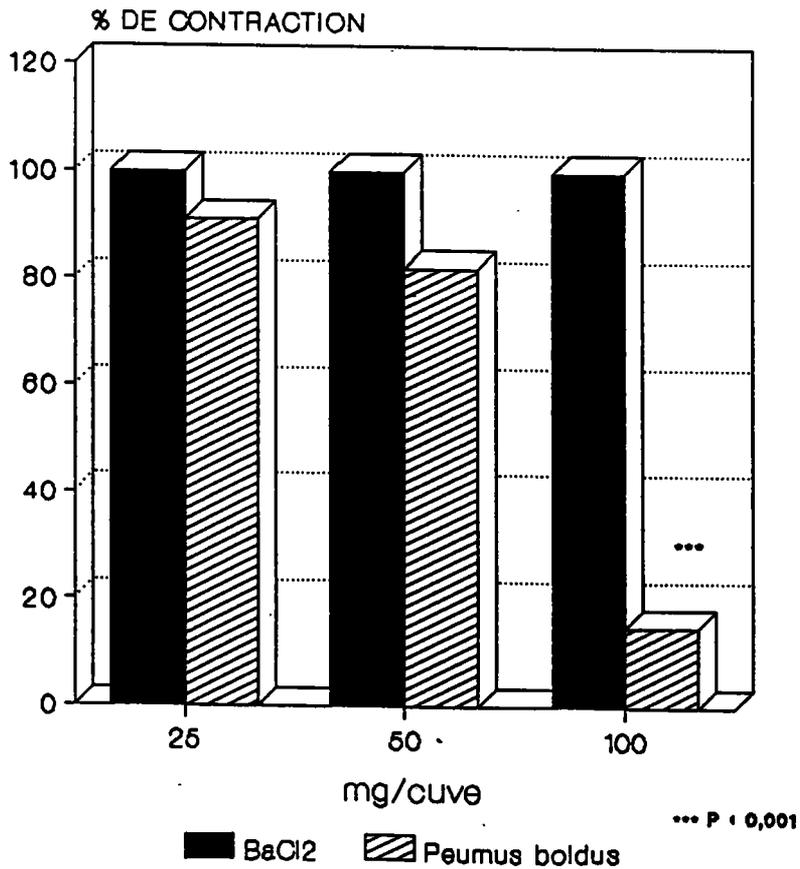


Fig.12 Effet de P.boldus, vis-à-vis des contractions du duodénum, induite par le chlorure de baryum, in vitro.

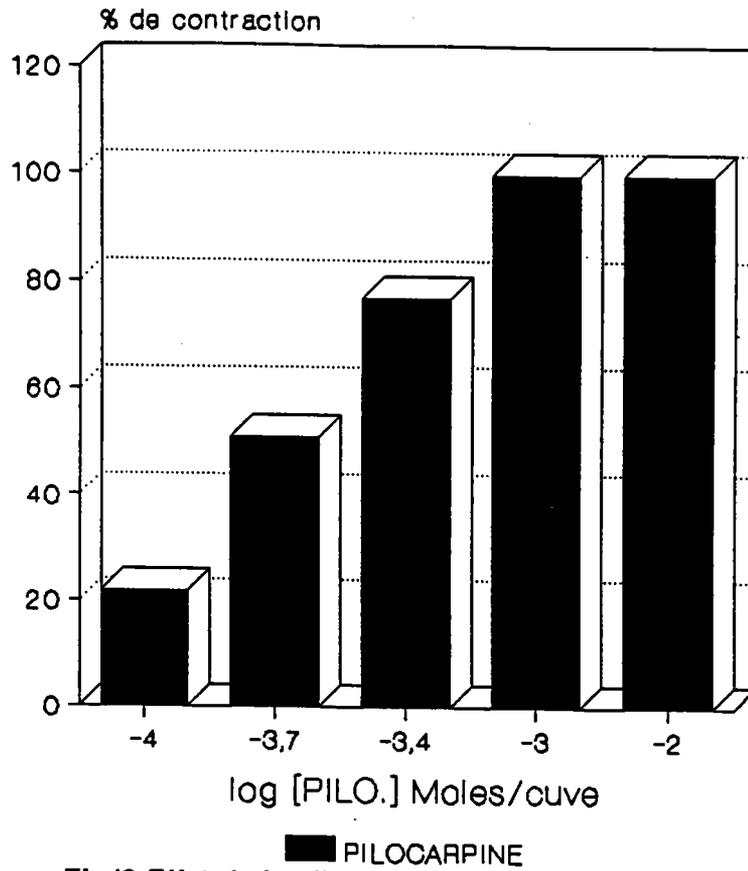


Fig.13 Effet de la pilocarpine, vis à vis du duodénum de rat, in vitro.

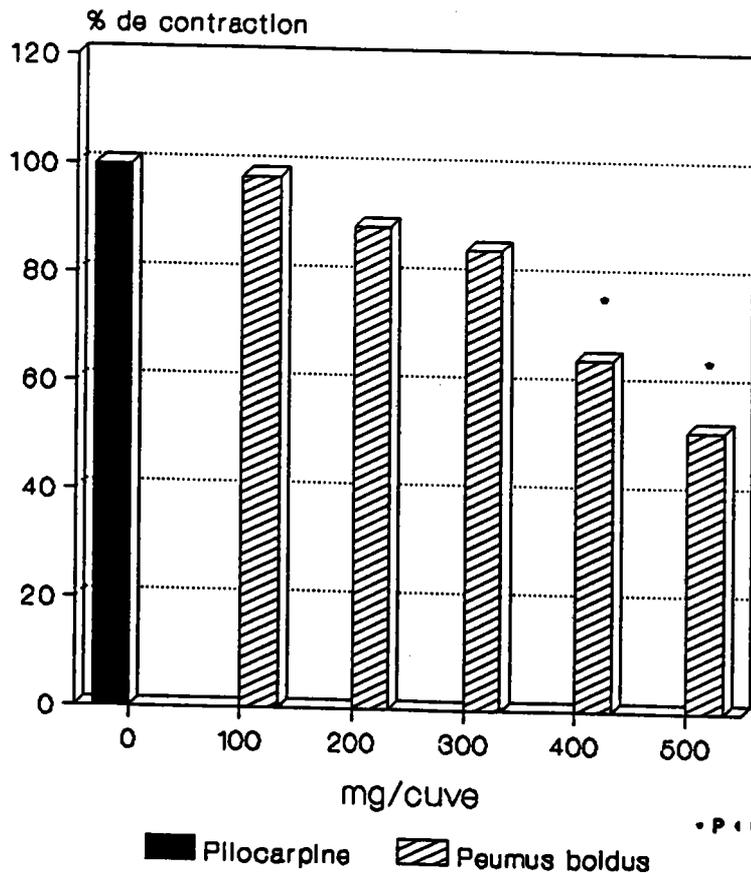
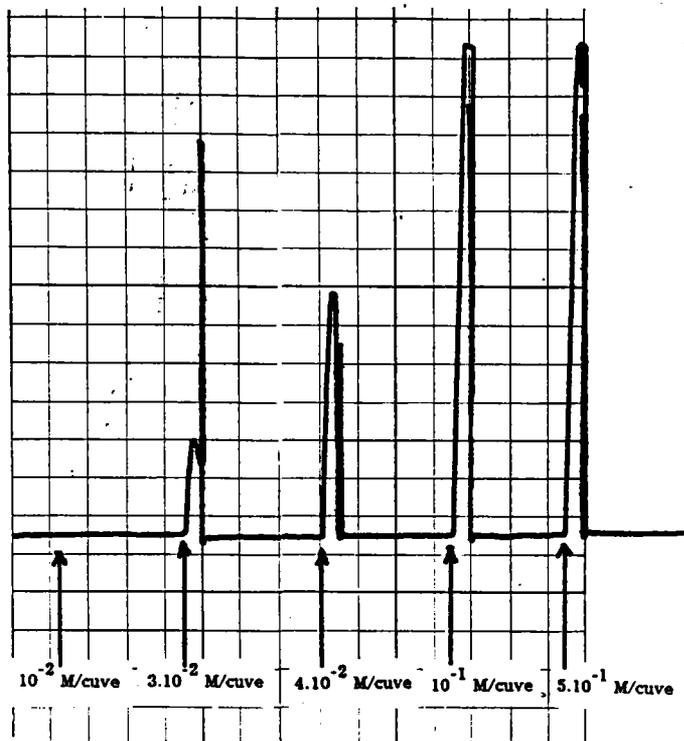
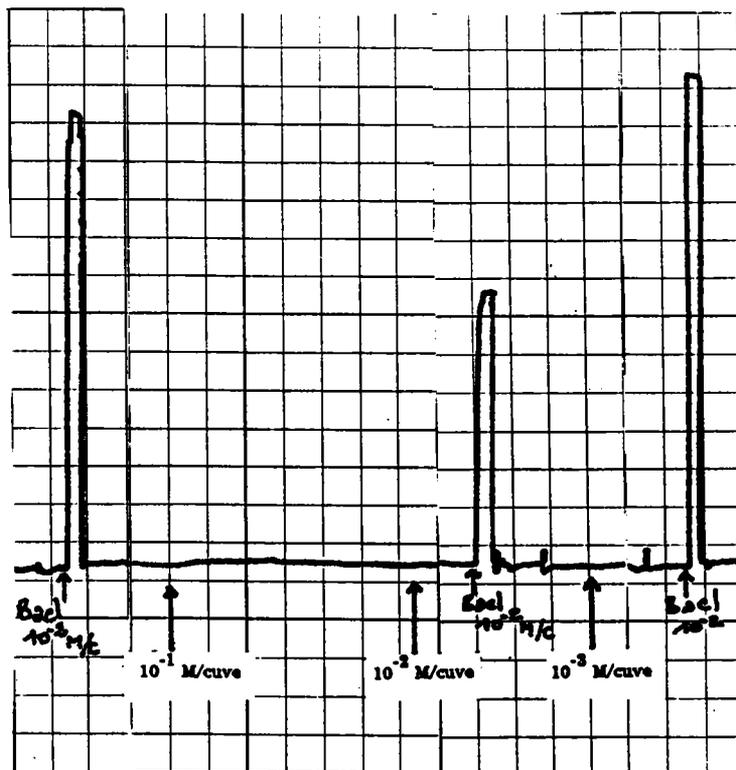


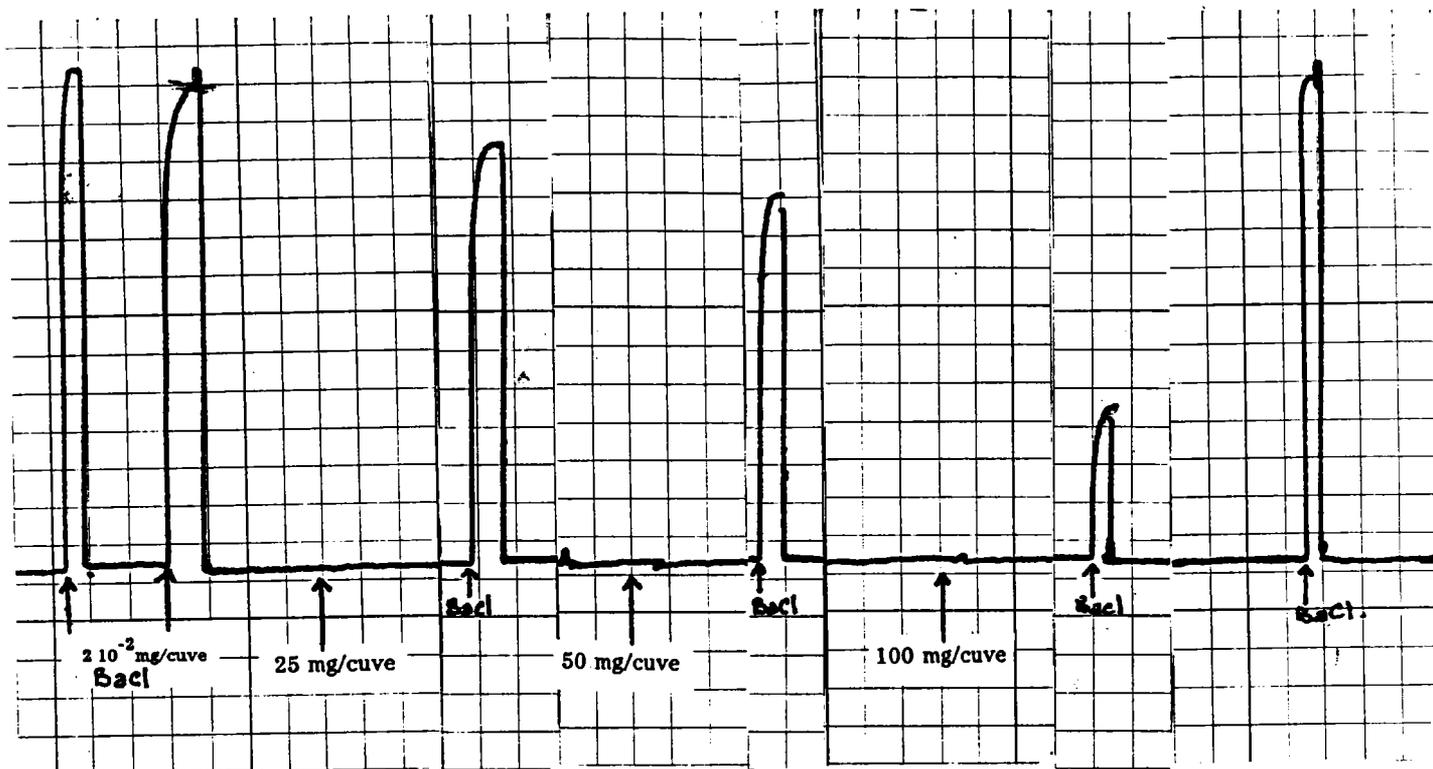
Fig.14 Effet de *P.boldus*, vis-à-vis des contractions du duodénum, induites par la pilocarpine.



Enregistrement 6 Effet et relation Effet -Dose de Chlorure de baryum, vis à vis des contractions du duodénum isolé de rat.



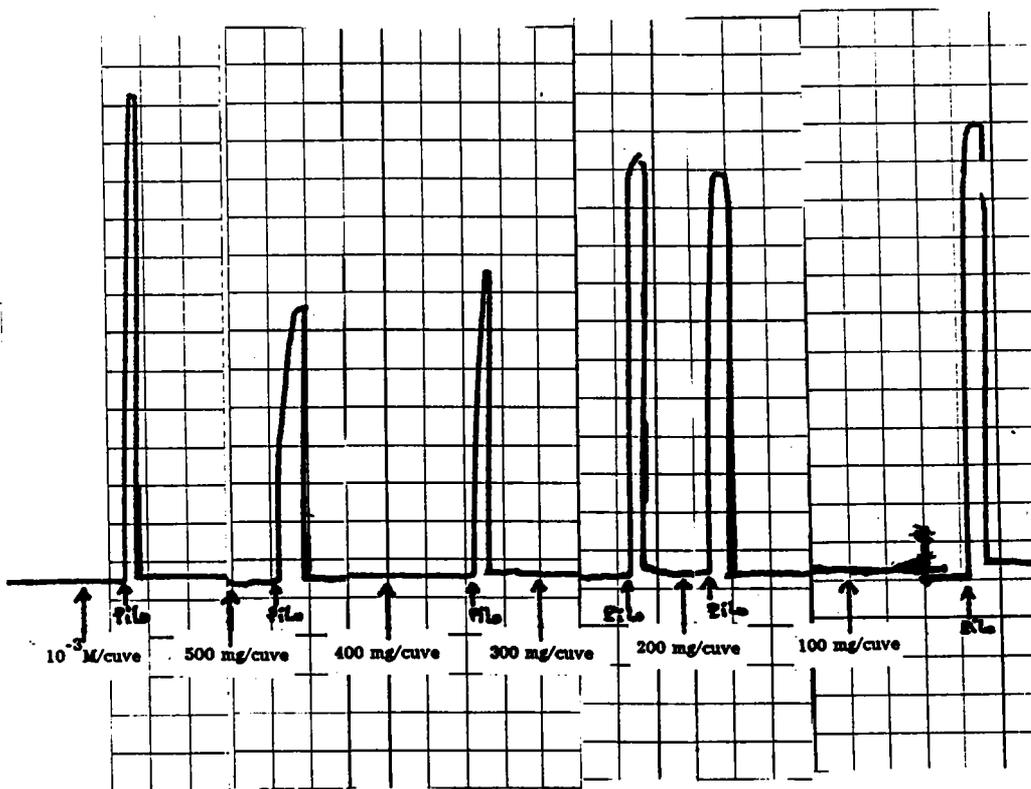
Enregistrement 7 Effet et relation Effet-Dose de Papavérine vis à vis des contractions du duodénum isolé de rat, induites par le chlorure de baryum.



Enregistrement 8 Effet de *Peumus boldus L.*, vis à vis des contractions du duodénum isolé de rat, induites par le chlorure de baryum.



Enregistrement 9 Effet et relation Effet-Dose de la pilocarpine vis à vis du duodénum isolé de rat.



Enregistrement 10 Effet de *Peumus boldus* L, vis à vis des contractions du duodénum isolé de rat, induites par la pilocarpine.

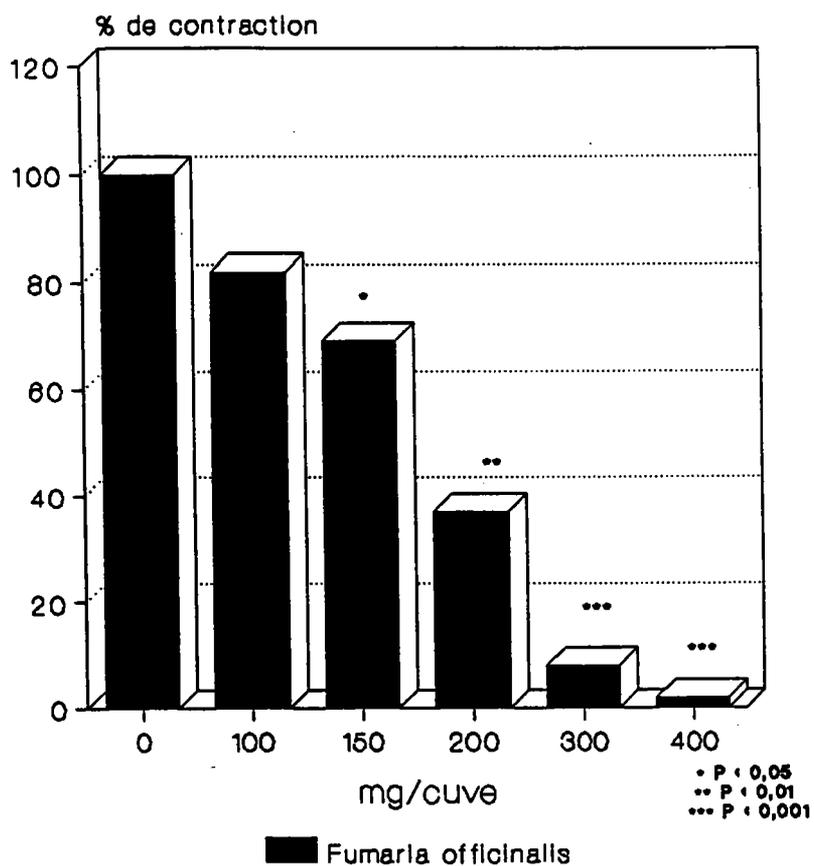


Fig.15 Effet de *F.officinalis*, vis-à-vis des contractions du duodénum, induites par la carbaminoylch., in vitro.

a)

C-IV) CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus ont permis d'évaluer l'effet et l'activité des différents extraits végétaux (Tableau II-1)

d'une part, vis-à-vis du transit intestinal, *in vivo*, et du péristaltisme intestinal, *in vitro*. Ainsi ce dernier est réduit voire supprimé par l'addition des extraits de *M.officinalis*, *A.reticulata* ou *P.boldus*, en même temps les extraits de *M.officinalis* et de *P.boldus* ralentissent d'une façon significative le transit intestinal, quand ils sont administrés en préventif, ces résultats peuvent expliquer, en partie, l'attribution d'une activité antispasmodique à ces trois plantes dans les différentes indications en bibliographie. Vis-à-vis du péristaltisme *in vitro*, *E.hirta* n'a qu'une action inhibitrice très brève, par contre l'extrait de *F.zanthoxyloides* augmente aussi bien la tension que l'amplitude des ondes péristaltiques.

D'autre part, vis-à-vis des récepteurs cholinergiques, ainsi l'atropine, pris comme antagoniste de référence, a montré, d'une part une activité inhibitrice et d'autre part une activité antagoniste compétitive, puisque la dose inhibitrice à 50 % a induit 50 % d'inhibition vis à vis des trois doses principales de carbaminoylcholine (DE100, DE50, DE25). Certains des extraits végétaux testés, *M.officinalis* et *F.zanthoxyloides* n'ont montré aucune influence vis-à-vis de la contraction du duodénum induite par la carbaminoylcholine, d'autres ont entraîné une inhibition dose dépendante, ainsi *E.hirta* à 600 mg/cuve, *A.reticulata* à 800 mg/cuve, *P.boldus* et *F.officinalis* à 200 mg/cuve ont entraîné de fortes inhibitions de la contraction duodénale induite par la carbaminoylcholine. L'extrait de *P.boldus*, testé vis à vis d'un agent contracturant musculotrope (le chlorure de baryum) a également montré une activité inhibitrice mais à des doses plus importantes par rapport à celles utilisées en présence de la carbaminoylcholine, ce qui laisserait supposer que l'extrait de *P.boldus* aurait plutôt une activité antagoniste de type neurotrope, vis à vis des récepteurs cholinergiques, que musculotrope.

Afin de déterminer la nature de cet antagonisme vis à vis des récepteurs cholinergiques, on a pu mettre en évidence, de la même façon qu'avec l'atropine, le comportement de la DI50 de l'extrait de *P.boldus* vis-à-vis des DE25, DE50 et DE100 de la carbaminoylcholine et les résultats obtenus nous permettent de supposer que cette inhibition, au même titre que celle observée avec l'atropine, est un antagonisme de type compétitif. L'extrait de *P.boldus*, testé vis à vis de la contraction induite par la pilocarpine (agoniste muscarinique) a entraîné une inhibition des contractions; Ces inhibitions sont également compétitives et analogues à celles obtenues avec de l'atropine, ceci démontre la spécificité de l'action de l'extrait végétal vis à vis des récepteurs muscariniques.

b)

Tableau II-1 Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur l'évaluation des effets des extraits végétaux vis à vis des récepteurs cholinergiques.

PRODUITS TESTES	RESULTATS	CONCLUSION
ATROPINE	INHIBITION COMPETITIVE	VALIDATION DE LA TECHNIQUE
M.OFFICINALIS	PAS D'EFFETS	ACTIVITE ANTISPASMODIQUE INDIQUEE DANS LA TRADITION LIEE A UN AUTRE MECANISME
F.ZANTHOXYLOIDES	PAS D'EFFETS	ANALGESIE PERIPHERIQUE MAIS PAS D'ACTIVITE ANTISPASMODIQUE
E.HIRTA	LEGER EFFET INHIBITEUR	LEGERE ACTIVITE ANTISPASMODIQUE LIEE PROBABLEMENT AUX EFFETS ANALGESIQUES
A.RETICULATA et F.OFFICINALIS	INHIBITION	CONFIRMATION DES INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES
PEUMUS BOLDUS	EFFET INHIBITEUR DE TYPE ATROPINE ET PAPVERINE EFFET INHIBITEUR MUSCARINIQUE	CONFIRMATION DES INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES ET MISE EN EVIDENCE D'UN EFFET SPECIFIQUE ET COMPETITIF

D) RECEPTEURS HISTAMINIQUES

D-1) INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A VIS DES CONTRACTIONS INDUITES PAR L'HISTAMINE AU NIVEAU DES RECEPTEURS HISTAMINIQUES.

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 aux doses suivantes :

DE100 = H_1 = Dose efficace 100 induisant 100 % de contraction.

DE50 = Dose efficace 50 induisant 50 % de contraction.

DE25 = Dose efficace 25 induisant 25 % de contraction.

1) Solution d'histamine:

L'histamine a une action neurotrope, par sa fixation au niveau des récepteurs histaminiques provoquant un effet contracturant de l'iléon isolé de cobaye riche en récepteurs histaminiques (H1 et H2). A partir d'une solution mère concentrée à $5 \cdot 10^{-3}$ M et par dilution dans la tyrode, neuf solutions de concentrations différentes sont préparées et exprimées en M/cuve:

H1 = $2,5 \cdot 10^{-6}$ M/cuve ; H2 = $1,25 \cdot 10^{-6}$ M/cuve

H3 = $6,25 \cdot 10^{-7}$ M/cuve ; H4 = $5 \cdot 10^{-7}$ M/cuve

H5 = $3 \cdot 10^{-7}$ M/cuve ; H6 = $2,5 \cdot 10^{-7}$ M/cuve

H7 = $1,25 \cdot 10^{-7}$ M/cuve ; H8 = $2,5 \cdot 10^{-8}$ M/cuve

H9 = $1,25 \cdot 10^{-8}$ M/cuve

2) Solution de dexchlorphéniramine (Polaramine) (Antagoniste histaminique H1 de référence)

Sept solutions de concentrations différentes sont préparées, à partir d'une solution mère concentrée à 5 g/l et exprimées en mg/cuve.

P1 = $5 \cdot 10^{-2}$ mg/cuve ; P2 = $5 \cdot 10^{-4}$ mg/cuve

P3 = $5 \cdot 10^{-5}$ mg/cuve ; P4 = $5 \cdot 10^{-6}$ mg/cuve

P5 = $5 \cdot 10^{-7}$ mg/cuve ; P6 = $5 \cdot 10^{-8}$ mg/cuve.

P7 = $5 \cdot 10^{-9}$ mg/cuve.

3) Solution de prométhazine (Phenergan) (Antagoniste histaminique H1 de référence)

Cinq solutions de concentrations différentes sont préparées à partir d'une solution mère concentrée à 2,5 g/l et exprimées en mg/cuve.

$$\text{Ph1} = 2,5 \cdot 10^{-1} \text{ mg/cuve} ; \text{Ph2} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cuve}$$

$$\text{Ph3} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cuve} ; \text{Ph4} = 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mg/cuve}$$

$$\text{Ph5} = 2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mg/cuve.}$$

4) Extraits testés vis à vis de la contraction induite par l'histamine

La recherche d'une activité agoniste ou antagoniste, des extraits végétaux, s'effectue vis-à-vis de la contraction induite par l'histamine.

a) *Euphorbia hirta*

Quinze solutions de concentrations différentes sont préparées, par dissolution du lyophilisat dans la solution de tyrode:

$$7 \cdot 10^{-4} ; 3,5 \cdot 10^{-3} ; 1,25 \cdot 10^{-2} ; 2 \cdot 10^{-2} ; 2,5 \cdot 10^{-2}$$

$$2 \cdot 10^{-2} ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 10 ; 16 ; 20 ; 40 ; 80 \text{ mg/cuve}$$

b) *Fagara zanthoxyloides*.

Huit solutions de concentrations différentes sont préparées:

$$0,1 ; 0,4 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 800 \text{ mg/cuve}$$

c) *Eschscholtzia californica*.

Onze solutions de concentrations différentes sont préparées:

$$0,064 ; 0,1 ; 0,16 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,64$$

$$1 ; 1,6 ; 3,2 ; 6,4 ; 64 \text{ mg/cuve}$$

d) *Fumaria officinalis*.

Dix solutions de concentrations différentes sont préparées:

$$0,01 ; 0,1 ; 0,4 ; 25 ; 50 ; 80$$

$$100 ; 200 ; 400 ; 800 \text{ mg/cuve}$$

e) *Melissa officinalis*

Neuf solutions de concentrations différentes sont préparées:

$$0,1 ; 0,4 ; 25 ; 50 ; 80 ; 100 ; 200 ; 400 ; 800 \text{ mg/cuve}$$

REALISATION CHRONOLOGIQUE DE L'EXPERIMENTATION.

L'expérimentation est réalisée en trois étapes successives

- Une courbe effet-dose de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye doit être établie en premier lieu, afin de vérifier le bon fonctionnement de notre modèle expérimental.
- Dans un deuxième temps, l'action de deux antagonistes spécifiques des récepteurs histaminiques, le Phénérgan et la Polaramine, est étudiée vis à vis des contractions induites par l'histamine. Cette deuxième étude doit nous permettre d'évaluer les concentrations en antagonistes nécessaires pour réduire de 100, 50 et de 25 % (DI100, DI50 et DI25 doses inhibitrices de 100, 50 et 25 % de la contraction de l'histamine par l'antagoniste) la contraction induite par l'histamine, ainsi que l'influence de la DI50 vis à vis des DE100, DE50 et DE25 (dose efficace de l'histamine induisant respectivement 100 %, 50 % et 25 % la contraction de l'iléon de cobaye) pour rechercher si cet antagonisme est compétitif ou non.
- Enfin, l'influence des extraits végétaux, vis-à-vis des contractions induites par l'histamine est étudiée, ainsi que la nature d'un éventuel antagonisme suivant le même protocole que le produit de référence.

* Etude de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye.

Avant l'étude de la relation effet-dose de l'histamine, l'iléon est sensibilisé par addition de 0,1 ml de la solution de l'histamine la plus concentrée H1 ($1,25 \cdot 10^{-4}$ M, soit une concentration de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M/cuve d'histamine).

Un laps de temps de 10-15 secondes est toujours respecté après l'addition de l'histamine, après lequel si aucune contraction n'est constatée la dose est considérée inférieure au seuil de la contraction.

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 solutions de l'histamine précédemment préparées, en ajoutant dans la cuve 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

Les concentrations de l'histamine ajoutées dans la cuve sont donc:

$$H1 = 2,5.10^{-6} \text{ M/cuve} ; H2 = 1,25.10^{-6} \text{ M/cuve}$$

$$H3 = 6,25.10^{-7} \text{ M/cuve} ; H4 = 5.10^{-7} \text{ M/cuve}$$

$$H5 = 3.10^{-7} \text{ M/cuve} ; H6 = 2,5.10^{-7} \text{ M/cuve}$$

$$H7 = 1,25.10^{-7} \text{ M/cuve} ; H8 = 2,5.10^{-8} \text{ M/cuve}$$

$$H9 = 1,25.10^{-8} \text{ M/cuve.}$$

La courbe effet-dose permet de déterminer la concentration sensible (dose seuille : DS), à partir de laquelle apparaît la première contraction, mais aussi la concentration induisant un effet maximal (DE100). La concentration nécessaire à l'apparition d'une contraction réduite de moitié par rapport à l'effet maximal (DE50) est également déterminée par la courbe effet-dose.

*** Influence d'antagonistes spécifiques des récepteurs
histaminiques (H1), la Polaramine et le Phénergan.**

Avant d'envisager l'influence des antagonistes vis à vis de la contraction par l'agoniste, la quantité de l'agoniste suffisante pour provoquer un effet maximal (DE100) est à nouveau déterminée, l'expérience étant renouvelée jusqu'à l'obtention de trois contractions de même amplitude.

L'action de la polaramine ou le phénergan est ensuite étudiée par l'addition de concentrations croissantes de cet antagoniste, préventivement à l'ajout de l'agoniste, et ceci jusqu'à l'obtention d'une inhibition totale des effets agonistiques.

Pour chaque essai, 0,1 ml de la concentration considérée est ajouté dans la cuve, deux minutes avant l'apport de la concentration d'agoniste induisant une contraction maximale (DE100).

Les concentrations en antagonistes, obtenues à partir des solutions précédemment préparées et présentes dans la cuve, sont les suivantes :

*** Polaramine :**

$$P1 = 5.10^{-2} \text{ mg/cuve} ; P2 = 5.10^{-4} \text{ mg/cuve}$$

$$P3 = 5.10^{-5} \text{ mg/cuve} ; P4 = 5.10^{-6} \text{ mg/cuve}$$

$$P5 = 5.10^{-7} \text{ mg/cuve} ; P6 = 5.10^{-8} \text{ mg/cuve.}$$

$$P7 = 5.10^{-9} \text{ mg/cuve.}$$

*** Phénergan :**

Ph1 = $2,5 \cdot 10^{-1}$ mg/cuve ; Ph2 = $2,5 \cdot 10^3$ mg/cuve

Ph3 = $2,5 \cdot 10^{-5}$ mg/cuve ; Ph4 = $2,5 \cdot 10^7$ mg/cuve

Ph5 = $2,5 \cdot 10^{-8}$ mg/cuve.

La sensibilité du muscle à l'agoniste est régulièrement vérifiée, par addition d'une dose maximale d'agoniste. La concentration en antagoniste, nécessaire pour réduire de moitié l'amplitude (DI50) des contractions induites par l'agoniste, est recherchée vis à vis de la concentration maximale (DE100) d'agoniste; cette réduction de moitié est également vérifiée vis à vis des concentrations d'agoniste induisant 50 % et 25 % de contraction (DE50 et DE25).

*** Influence des extraits végétaux vis à vis des contractions induites par l'histamine.**

La procédure expérimentale utilisée est identique à celle employée pour les produits de référence: Polaramine et Phénergan

Chacune des solutions d'extrait végétal précédemment préparées est testée sous un volume de 0,1 ml, ajouté deux minutes avant l'apport de la concentration d'agoniste induisant une contraction maximale (DE100).

Pour les extraits qui ont montré une activité antagoniste, la dose inhibitrice (DI50), qui réduit la contraction induite par l'agoniste de moitié, est testée vis à vis des doses DE50 et DE25 de l'agoniste qui induisent, respectivement, 50 % et 25 % de contraction de l'iléon.

Statistiques

L'homogénéité des variances, entre les lots témoins* et chaque lot traité, étant vérifiée par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques sont réalisées, à l'aide du test T de Student.

* les lots témoins correspondent aux amplitudes des contractions obtenues avec l'agoniste (Histamine)

D-2) RESULTATS

1) Etablissement de la relation effet-dose et la recherche de la DE50 de l'histamine

La figure 16 nous permet de constater que la dose la plus faible qui permet d'obtenir la plus petite et la première contraction de l'iléon correspond à $1,25 \cdot 10^{-8}$ M/cuve.

La dose efficace, permettant d'obtenir, la moitié de la contraction maximum (DE50), donc la PD2 est d'environ $2,5 \cdot 10^{-7}$ M/cuve. A partir de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M/cuve on obtient une contraction maximum au delà de laquelle on n'obtient plus d'augmentation des contractions en dépit de l'augmentation de la dose.

C'est la dose efficace à 100 %, DE100 = $2,5 \cdot 10^{-6}$ M/cuve qui sera utilisée pour toute la suite des expériences afin d'évaluer l'action des différentes substances testées vis à vis de la contraction du duodénum par cette concentration (DE100 = CH1).(Enr.11)

2) Influence d'antagonistes spécifiques des récepteurs histaminiques (H1), le dexchlorphéniramine (Polaramine) et la prométhazine (Phénergan).

a) Le dexchlorphéniramine.(Polaramine)

Le dexchlorphéniramine est un antagoniste spécifique des récepteurs histaminiques (H1) qui empêche l'histamine d'agir et de provoquer la contraction de l'iléon.

A partir de $5 \cdot 10^{-9}$ mg/cuve, on peut constater le début de l'inhibition de la contraction provoquée par la DE100 de l'histamine. Cette inhibition atteint 50 % à la dose de $5 \cdot 10^{-5}$ mg/cuve de dexchlorphéniramine et elle est maximale (à 100 % d'inhibition = DI100) à la dose de $5 \cdot 10^{-2}$ mg/cuve.(Fig.17) (Enr.12). L'antagonisme de la dexchlorphéniramine, vis à vis des récepteurs à l'histamine, est compétitif puisque la DI50 de l'antagoniste provoque une inhibition de 50 % vis à vis des doses, de l'agoniste, induisant 25 %, 50 % et 100 % de contraction. (Fig.18) (Enr.12)

b) La prométhazine (Phénergan).

La prométhazine est un antagoniste antihistaminique, de référence, spécifique aux récepteurs histaminiques (H1), qui s'oppose à la fixation de l'histamine au niveau de ces récepteurs donc à la contraction de l'iléon *in vitro*.

La figure 19 nous permet de constater que la prométhazine a un effet inhibiteur vis à vis de la contraction induite par l'histamine, cet effet inhibiteur est dose dépendante, il commence à la dose de $2,5 \cdot 10^{-8}$ mg/cuve avec un effet maximum à la dose de $2,5 \cdot 10^{-1}$ mg/cuve.

Cette inhibition est compétitive, puisqu'on peut constater sur la figure 20 que la DI50 de la prométhazine provoque l'inhibition à 50 % des DE25 ,50 et 100 de l'histamine.

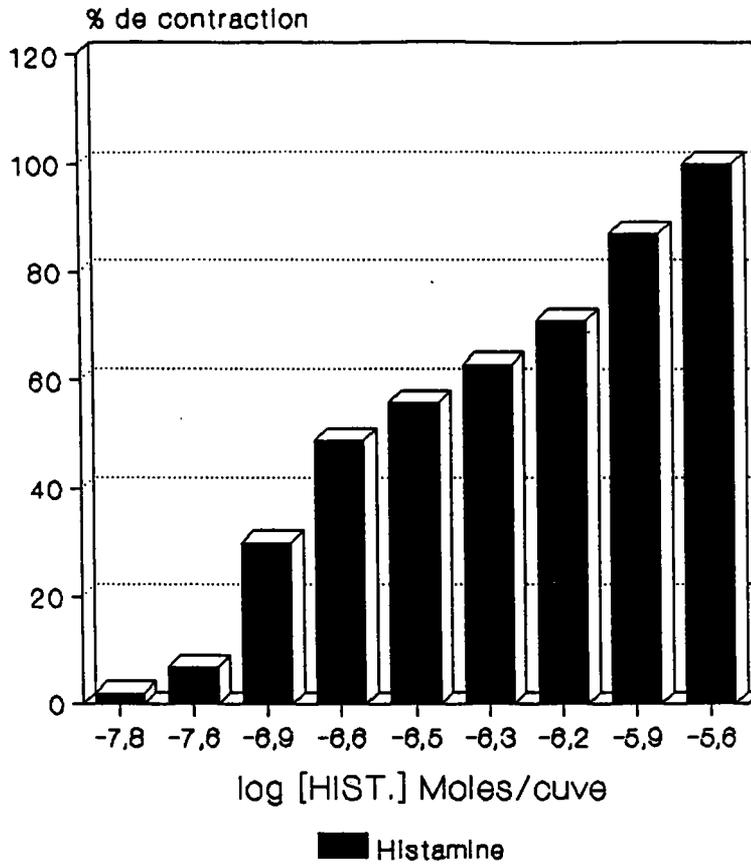


Fig.16 Effet de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye. (Courbe Effet-Dose)

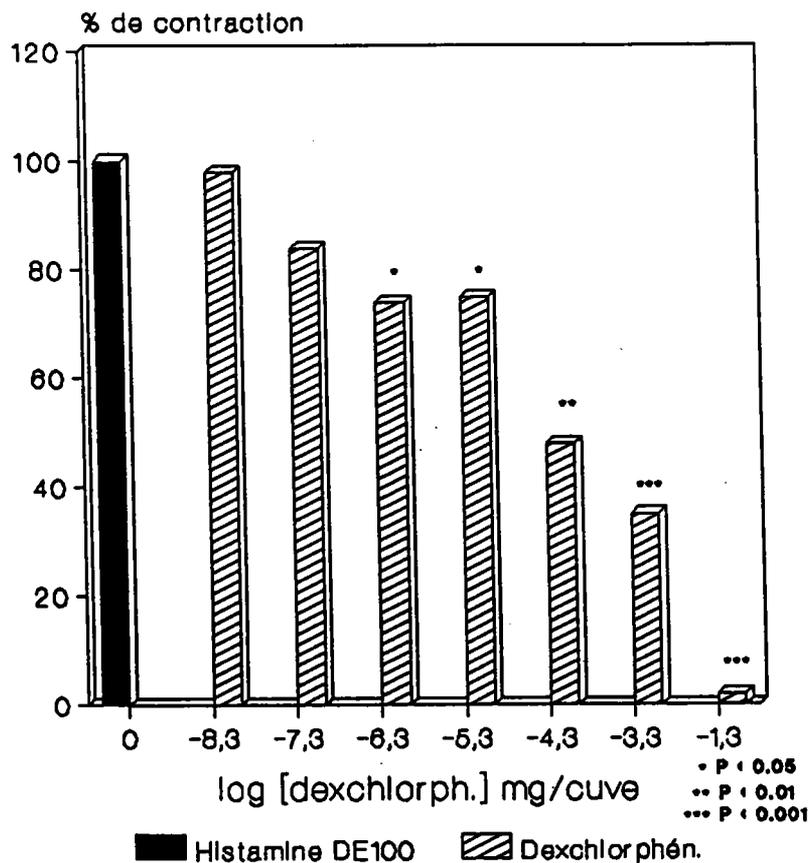
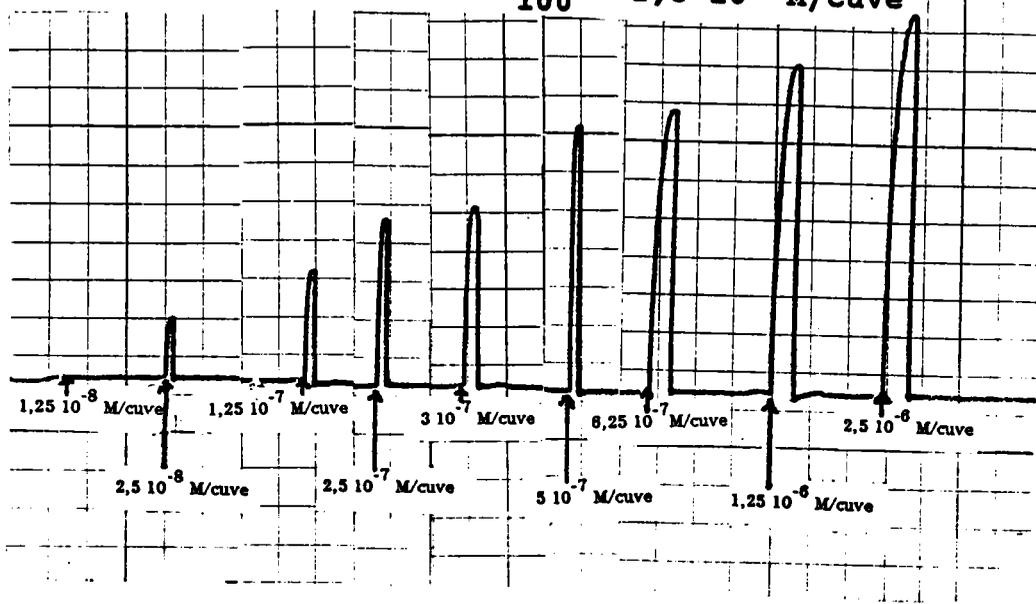


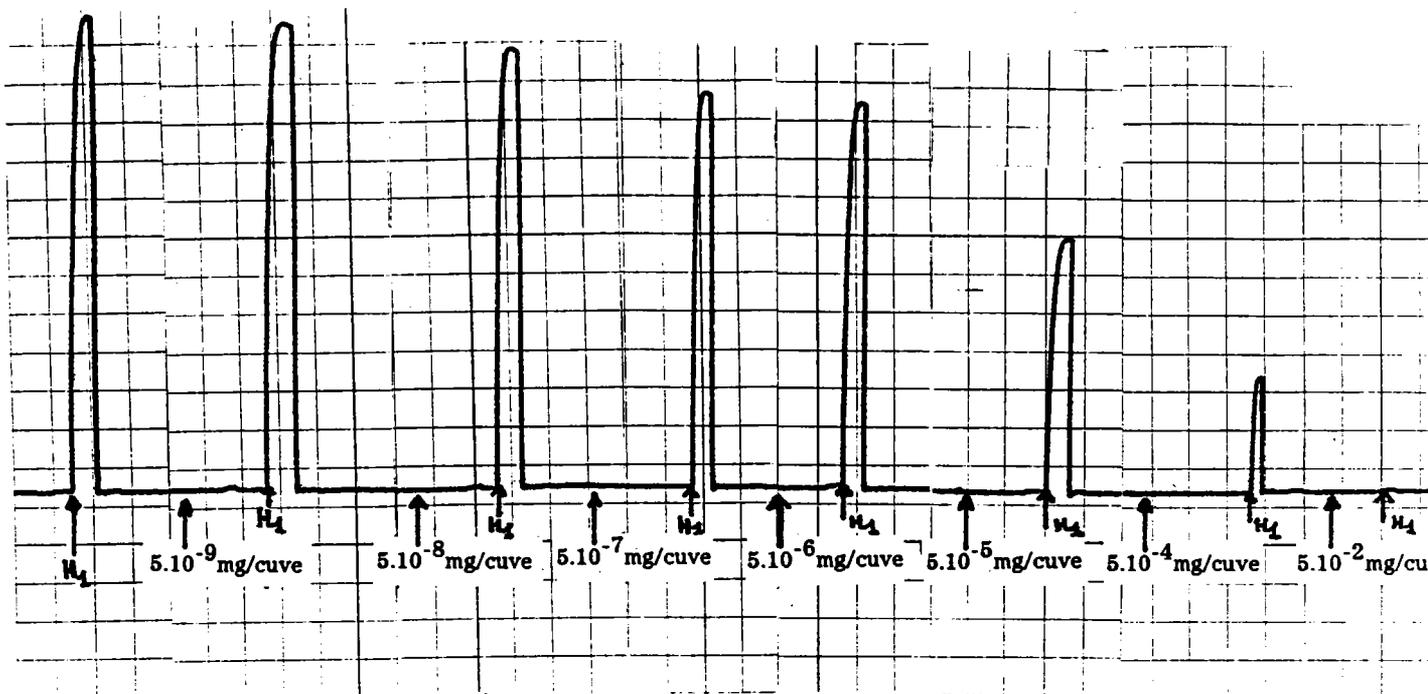
Fig.17 Effet de la dexchlorphéniramine, vis à vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine, in vitro.

Histamine:

$D_1 = \text{Dose Efficace à 100 \%} = DE_{100} = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M/cuve}$

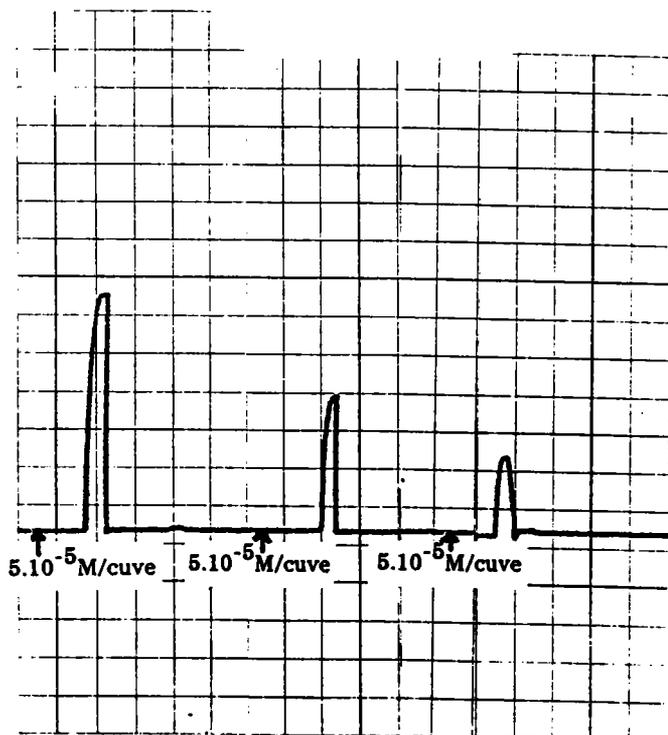


Enregistrement 11 Effet contracturant et relation Effet-dose de l'histamine, vis à vis de l'iléon isolé de cobaye.



stamine:

= Dose Efficace à 100 % = $DE_{100} = 2,5 \cdot 10^{-6} M/cuve$



Enregistrement 13 Effet inhibiteur et relation Effet-dose du Dexchlorphéniramine (Polaramine^R), vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par l'histamine.

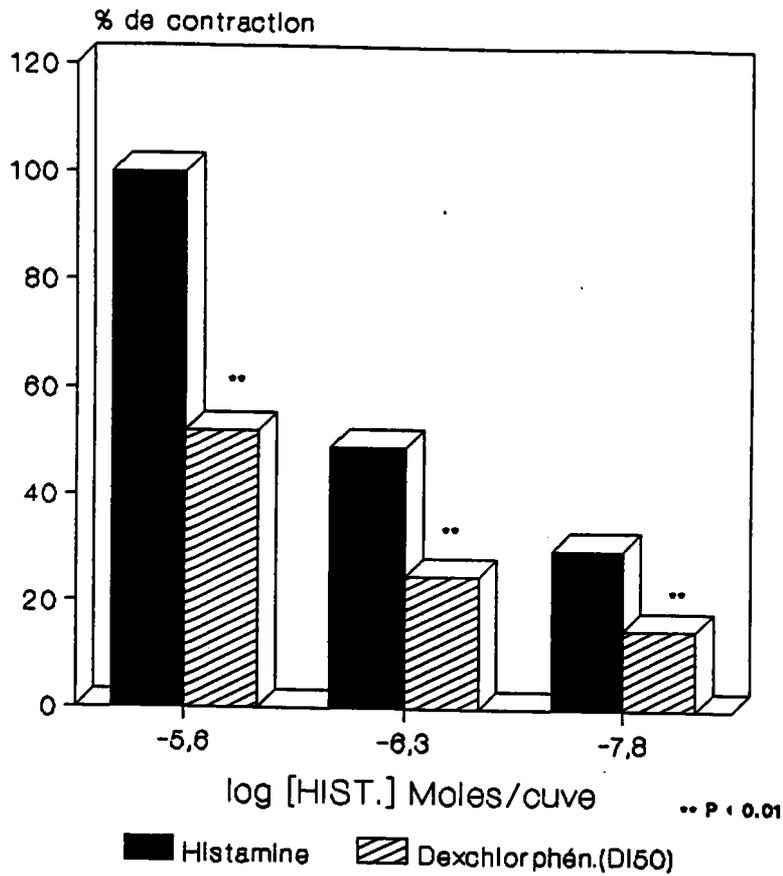


Fig.18 Effet de la D150 de dexchlorphéniramine, vis à vis des contractions de l'iléon induites par les DE100, 50 et 25

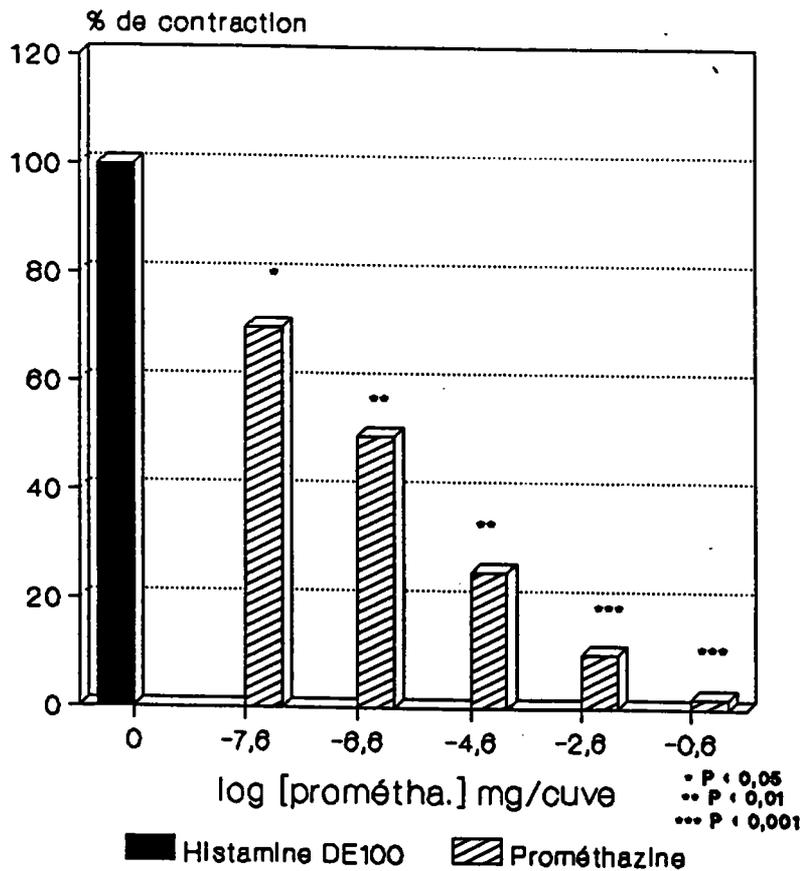


Fig.19 Effet du Prométha, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

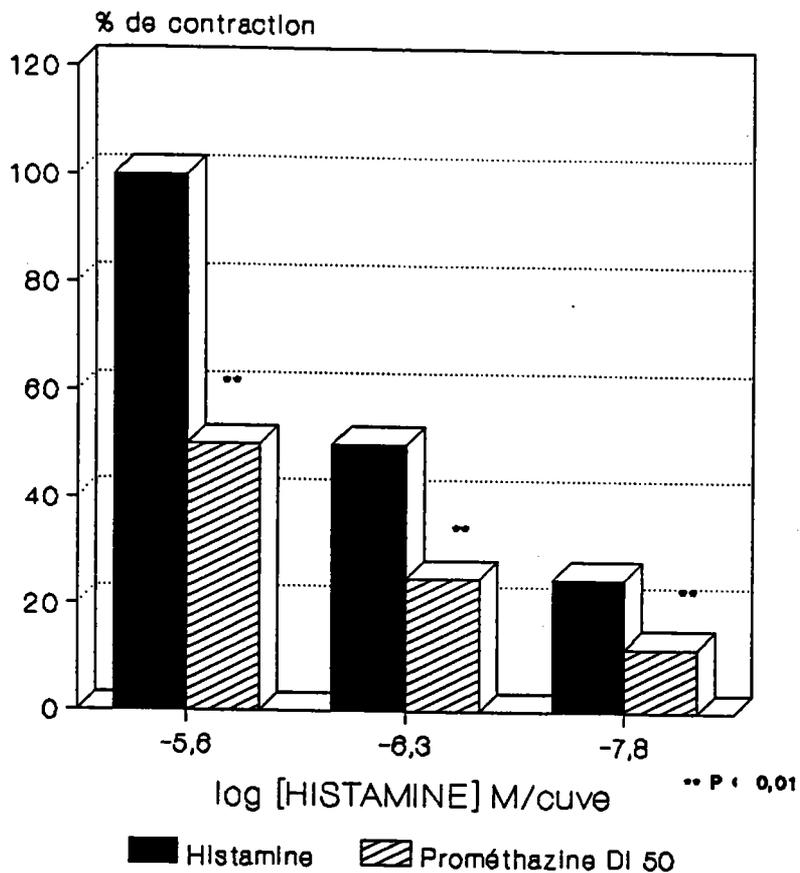


Fig.20 Effet de la DI50 de la prométhazine, vis-à-vis des contractions de l'iléon, induites par les DE25,50 et 100.

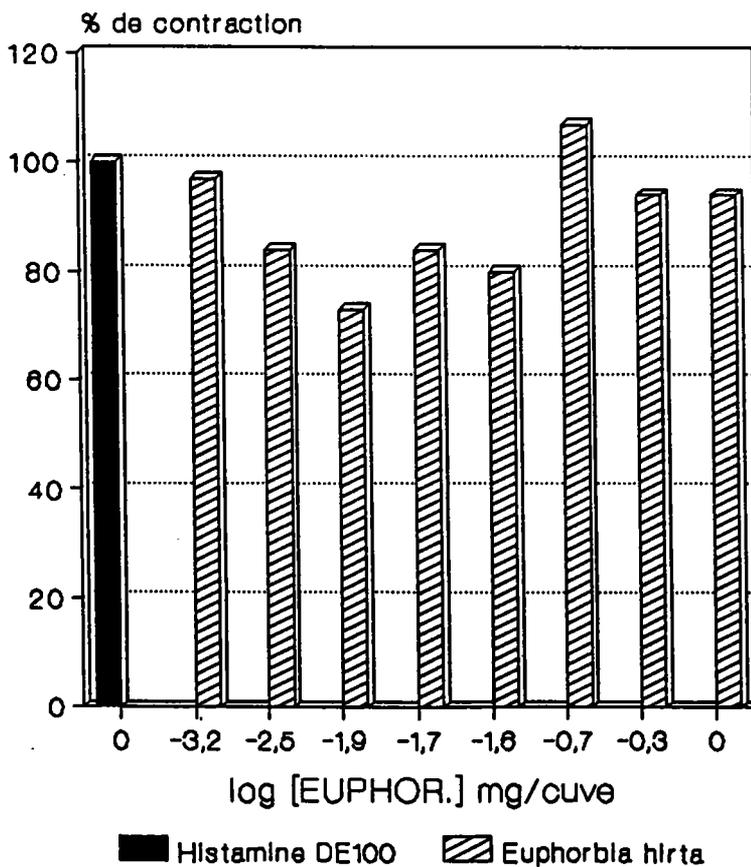


Fig.21 Effet de E.hirta, vis-à-vis des contractions de l'iléon de cobaye, induites par l'histamine.

3) Influence des extraits végétaux vis à vis des contractions induites par l'histamine.

a) Effet de *Euphorbia hirta* vis-à-vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

Aucun effet inhibiteur vis à vis de la contraction de l'iléon, par l'histamine, n'a été observé aux différentes doses utilisées; cependant une légère réduction de la contraction, vis à vis de la DE100 de l'histamine, a été constatée à la dose de $1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/cuve (réduction de 20 %).(Fig.21 et 22)

b) Effet de *Fagara zanthoxyloïdes* vis à vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

L'extrait de *Fagara* n'a aucun effet vis à vis de la contraction de l'iléon, induite par l'histamine, aux différentes doses utilisées.(Fig.23)

c) Effet de *Eschscholtzia californica* vis à vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

6,4 mg/cuve est la seule dose ayant provoqué une faible réduction de la contraction de l'iléon, par l'histamine, (20 %) l'ensemble des doses testées n'ont induit aucun changement au niveau de la contraction de l'iléon. (Fig.24 et 25)

d) Effet de *Fumaria officinalis* vis à vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

L'extrait de *Fumaria officinalis* n'a aucun effet sur la contraction de l'iléon, induite par l'histamine, aux différentes doses testées (Fig.26)

e) Effet de *Melissa officinalis* vis à vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

Les différentes doses de l'extrait de *Melissa officinalis*, utilisées, n'ont manifesté aucun effet vis à vis de la contraction de l'iléon induite par l'histamine. (Fig.27)

D-3) CONCLUSION

Les deux produits de référence utilisés, à savoir le dexchlorphéniramine (Polaramine) et la prométhazine (Phénergan) ont induit une activité inhibitrice spécifique et compétitive, vis à vis de la contraction de l'iléon, induite par l'histamine. Par contre les différents extraits végétaux, évalués dans ce test, ne nous ont pas permis de mettre en évidence une activité antihistaminique aux différentes doses utilisées.

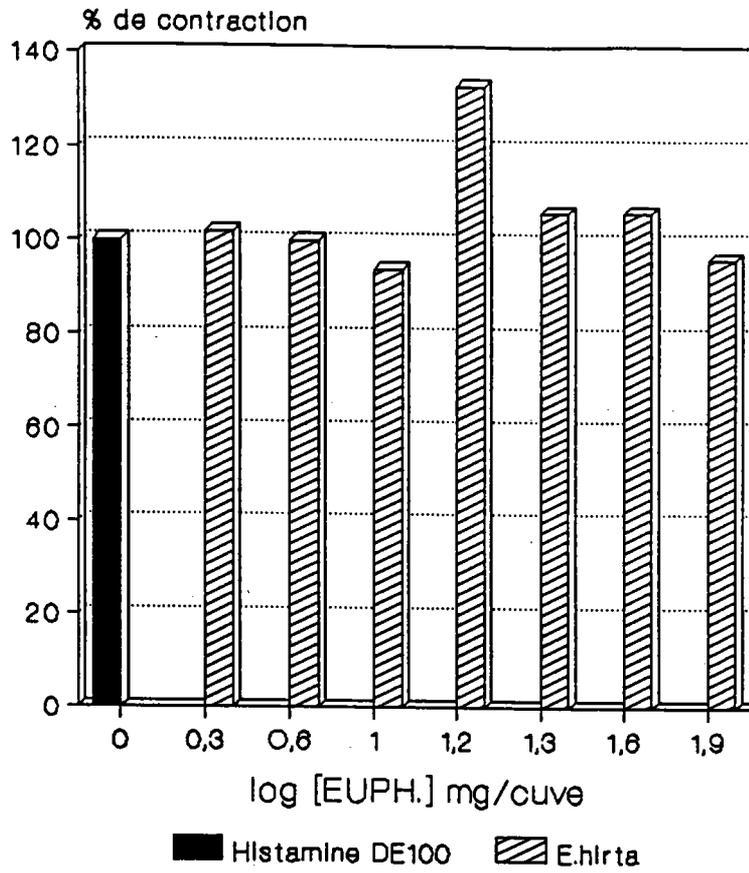


Fig.22 Effet de *E.hirta*, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

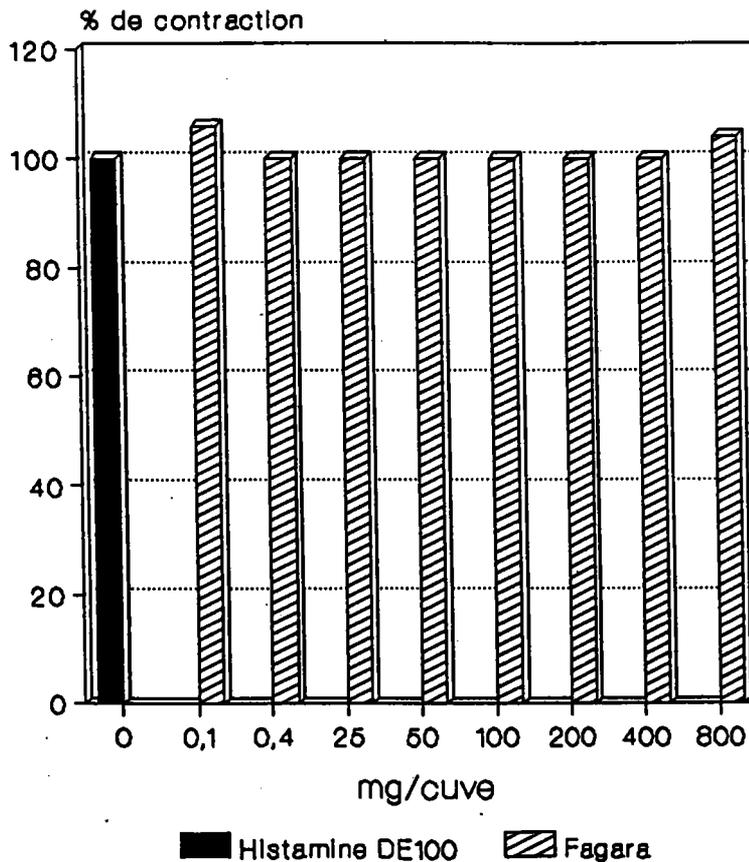


Fig.23 Effet de *F.zanthoxylodes*, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

a)

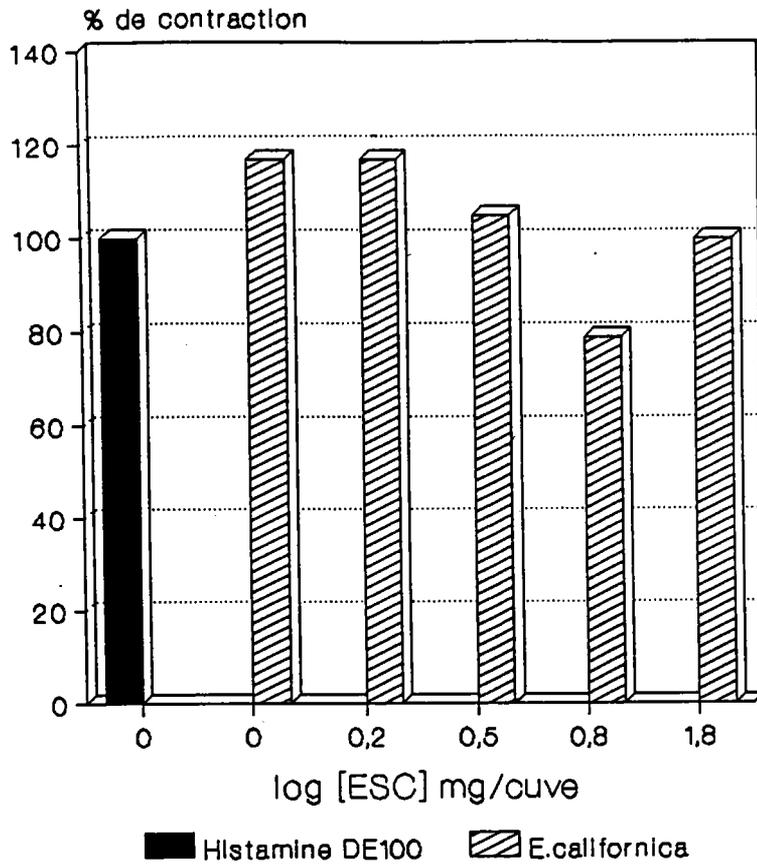


Fig.24 Effet de *E.californica*, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

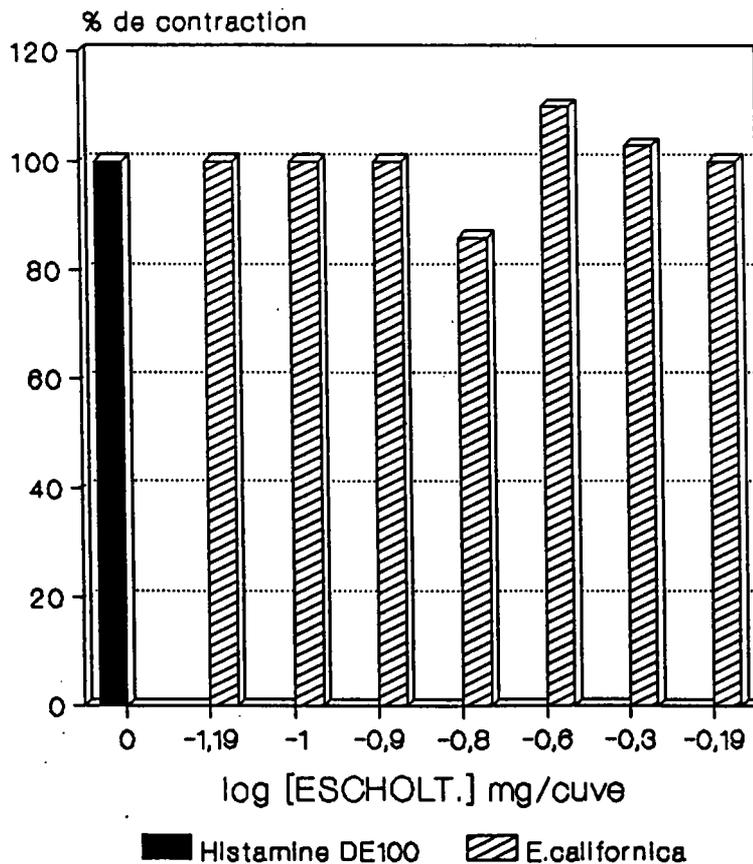


Fig.25 Effet de *E.californica* vis-à-vis des contractions de l'iléon, induites par l'histamine.

b)

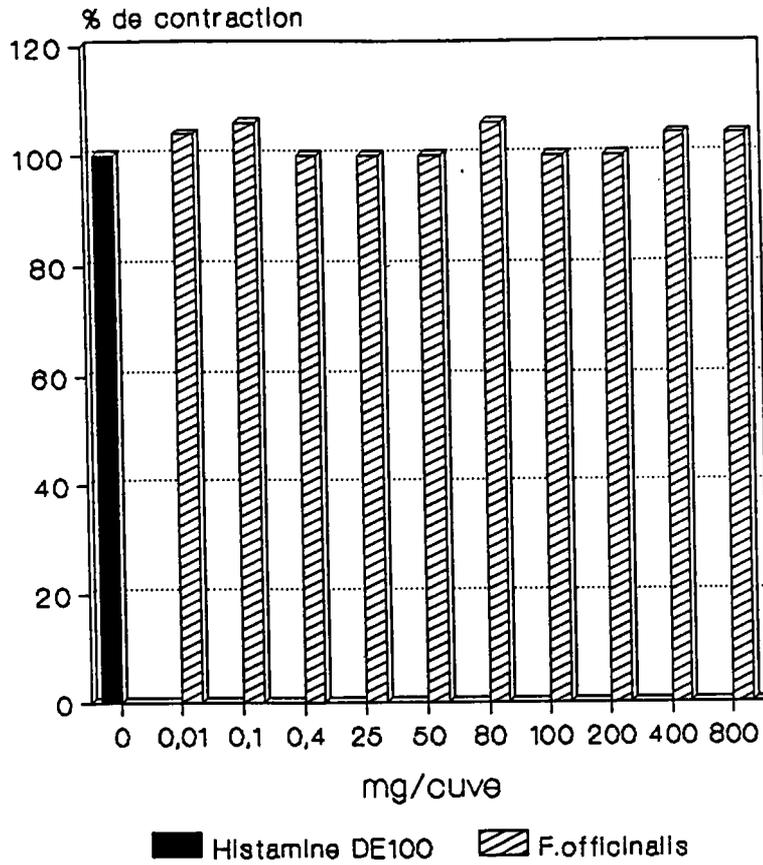


Fig.26 Effet de *F.officinalls* vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

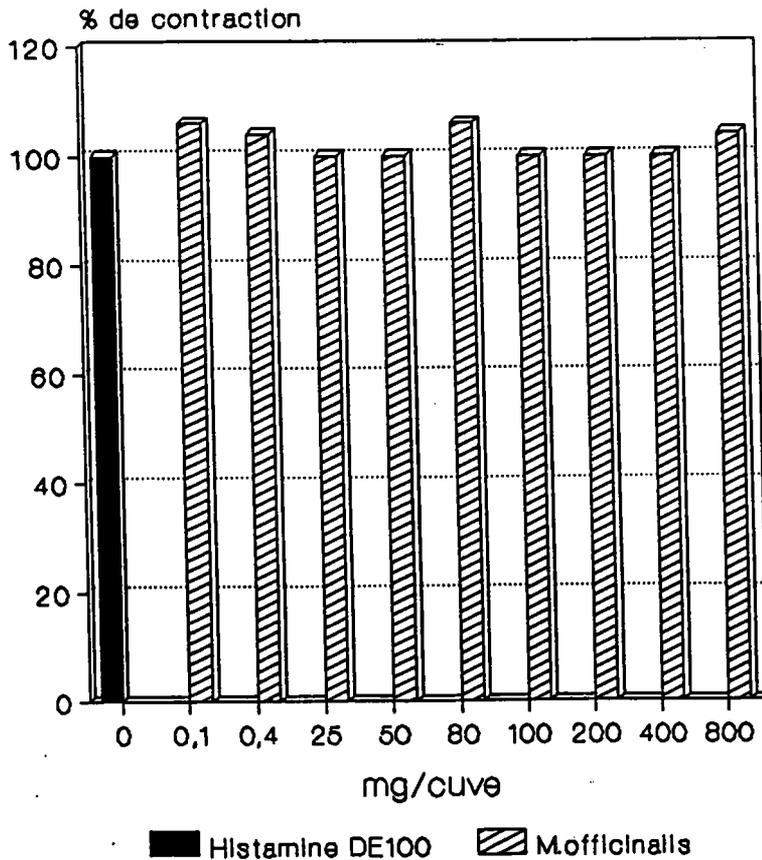


Fig.27 Effet de *M.officinalls*, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induites par l'histamine.

E) RECEPTEURS OPIACES

E-1) INFLUENCE DES EXTRAITS VEGETAUX VIS A VIS DES CONTRACTIONS INDUITES PAR LES STIMULATIONS ELECTRIQUES, METTANT EN JEU LES RECEPTEURS OPIACES, AU NIVEAU DE L'ILEON ISOLE DE COBAYE

Au moment du test, la substance étudiée est ajoutée dans la cuve sous un volume constant de 0,1 ml:

**- Pour la recherche d'une activité agoniste à la morphine, type morphine-like
(morphinomimétique).**

*** En préventif :** Deux minutes avant le début des stimulations électriques qui sont maintenues pendant, au moins une minute.

*** En curatif :** Deux minutes après le début des stimulations électriques, qui sont également maintenues pendant au moins une minute.

DI100 = Dose inhibitrice 100 entraînant 100 % d'inhibition des contractions induites par les stimulations électriques

DI50 = Dose inhibitrice 50 entraînant 50 % d'inhibition des contractions induites par les stimulations électriques

DI25 = Dose inhibitrice 25 entraînant 25 % d'inhibition des contractions induites par les stimulations électriques

**- Pour la recherche d'une activité antagoniste à la morphine type naloxone-like
(morphinolytique).**

*** En préventif :** Deux minutes après le début de la stimulation électrique et deux minutes avant l'injection de la morphine (DI100), les stimulations électriques sont maintenues deux minutes après l'injection de la morphine.

*** En curatif :** quatre minutes après le début des stimulations électriques et deux minutes après l'injection de la morphine, les stimulations électriques sont également maintenues deux minutes après l'injection de la morphine.

Solution de la morphine:

La morphine a une action inhibitrice vis à vis des contractions induites par la stimulation électrique par sa fixation au niveau des récepteurs opiacés au niveau de l'iléon isolé de cobaye riche en récepteurs opiacés.

A partir d'une solution mère concentrée à 200 mg/l et par dilution dans la tyrode, huit solutions de concentrations différentes sont préparées et exprimées en mg/cuve:

$$M1 = 10^{-5} \text{ mg/cuve} ; M2 = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cuve}$$

$$M3 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cuve} ; M4 = 10^{-3} \text{ mg/cuve}$$

$$M5 = 10^{-2} \text{ mg/cuve}$$

Solution de Naloxone (Antagoniste opiacés):

La naloxone est un antagoniste spécifique de la morphine, elle agit au niveau des récepteurs opiacés en antagonisant spécifiquement et compétitivement les molécules de la morphine et en empêchant son action. Au cours de nos recherches, les doses, de naloxone, recherchées sont celles permettant, en préventif (injectées avant la morphine) et en curatif (injectées après la morphine), de supprimer l'effet inhibiteur maximum (DI100) de la morphine, complètement (DE100), de moitié (DE50) ou de quart (DE25).

Sept solutions de concentrations différentes sont préparées, à partir d'une solution mère concentrée à 400 mg/l et exprimées en mg/cuve.

$$N1 = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cuve} ; N2 = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cuve}$$

$$N3 = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cuve} ; N4 = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cuve}$$

$$N5 = 10^{-3} \text{ mg/cuve} ; N6 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cuve}$$

$$N7 = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cuve}$$

Extraits testés vis à vis de la contraction induite par la stimulation électrique:

La recherche d'une activité agoniste ou antagoniste, des extraits végétaux, s'effectue, respectivement, vis à vis de la contraction induite par les stimulations électriques et vis à vis de l'inhibition des stimulations électriques provoquées par la morphine.

* *Fagara zanthoxyloides* : quatre solutions de concentrations différentes sont préparées:
4 ; 8 ; 20 ; 80 mg/cuve

* *Eschscholtzia californica* : deux solutions de concentrations différentes sont préparées:
50 et 100 mg/cuve.

* *Fumaria officinalis* : deux solutions de concentrations différentes sont préparées:
25 et 50 mg/cuve

* *Annona reticulata* : cinq solutions de concentrations différentes sont préparées:
0,1; 1; 10; 50 et 75 mg/cuve

* *Euphorbia hirta* : sept solution de concentrations différentes sont préparées, par dissolution du lyophilisat dans la solution de tyrode:

En préventif:

0,01 ; 0,05 ; 0,075 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 mg/cuve

En curatif:

0,1 et 1 mg/cuve

* Buprénorphine (Temgésic):

La Buprénorphine (Temgésic) est un antagoniste morphinique, pris comme produit de référence, aux doses de:

0,003 ; 0,3 ; 0,5 et 1 mg/cuve

* Trimébutine (Debridat): quatre solutions de concentrations différentes sont préparées:
0,01 ; 0,1 ; 0,25 et 0,5 mg/cuve.

* Atropine: (sulfate d') trois solutions de concentrations différentes sont préparées:
0,001 ; 0,01 et 0,1 mg/cuve.

* Papavérine: deux solutions de concentrations différentes sont préparées:
0,01 ; 0,1 mg/cuve.

* Polaramine: quatre solutions de concentrations différentes sont préparées:
0,001 ; 0,002 ; 0,01 et 0,05 mg/cuve.

* Tagamet (Cimétidine): trois solutions de concentrations différentes sont préparées:
 10^{-6} ; 10^{-3} et $5 \cdot 10^{-2}$ mg/cuve.

REALISATION CHRONOLOGIQUE DE L'EXPERIMENTATION.

L'expérimentation est réalisée en trois étapes successives

- Une courbe effet-dose de l'action de la morphine sur l'iléon isolé 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 opiacés, la Naloxone (Narcon), est étudiée vis à vis de l'inhibition de la morphine sur des contractions induites par les stimulations électriques. Cette deuxième étude doit nous permettre d'évaluer les concentrations en antagonistes nécessaires pour réduire de 100, 50 et de 25 % (DE100, DE50 et DE25 doses efficaces de l'antagoniste qui restaurent les contractions, supprimées par la DI100 de la morphine à 100, 50 et 25 %) l'effet de la dose inhibitrice maximale (DI100) de la morphine vis à vis des contractions induites par les stimulations.

- Enfin, l'influence des extraits végétaux, vis-à-vis des contractions induites par les stimulations électriques, est étudiée, ainsi que la nature d'un éventuel antagonisme suivant le même protocole que le produit de référence.

*** Etude de l'action de la morphine sur les contractions induites par les stimulations électriques de l'iléon isolé de cobaye.**

Un laps de temps de 10-15 secondes est toujours respecté après l'addition de l'agoniste ou de l'antagoniste, après lequel, si aucun effet n'est constaté la dose est considérée inférieure au seuil de la dose efficace ou inefficace.

Plusieurs essais sont ainsi réalisés, jusqu'à l'obtention de trois effets successifs 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 solutions de la morphine précédemment préparées, en ajoutant dans la cuve 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

Les concentrations de la morphine ajoutées dans la cuve sont donc:

M1 = 10^{-5} mg/cuve ; M2 = $2,5 \cdot 10^{-4}$ mg/cuve

M3 = $5 \cdot 10^{-4}$ mg/cuve ; M4 = 10^{-3} mg/cuve

M5 = 10^{-2} mg/cuve.

La courbe effet-dose permet de déterminer la concentration sensible (dose seuille:DS), à partir de laquelle apparaît la première inhibition, mais aussi la concentration induisant un effet maximal (DI100). La concentration nécessaire à l'apparition d'une inhibition réduite de moitié par rapport à l'effet maximal (DI50) est également déterminée par la courbe effet-dose.

*** Influence d'antagoniste spécifique des récepteurs opiacés, la naloxone.**

La naloxone est additionnée dans la cuve de deux façons:

- * En préventive: 2 minutes avant l'addition de la morphine, et pendant les stimulations électriques.
- * En curative: 2 minute après l'addition de la morphine.

La naloxone est également utilisée, avec les extraits qui ont montré une activité morphinomimétique, pour vérifier la spécificité ou non de l'extrait vis à vis des récepteurs opiacés suivant le même protocole qu'avec la morphine.

Un laps de temps de 10-15 secondes est toujours respecté après l'addition de l'antagoniste, après lequel si aucun effet n'est constaté la dose est considérée inférieure au seuil de la dose efficace.

Plusieurs essais sont ainsi réalisés, jusqu'à l'obtention de trois effets successifs 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 solutions de la naloxone précédemment préparées, en ajoutant dans la cuve 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

Les concentrations de la naloxone ajoutées dans la cuve sont donc:

$$N1 = 4.10^{-2} \text{ mg/cuve} ; N2 = 2.10^{-2} \text{ mg/cuve}$$

$$N3 = 8.10^{-3} \text{ mg/cuve} ; N4 = 4.10^{-3} \text{ mg/cuve}$$

$$N5 = 10^{-3} \text{ mg/cuve} ; N6 = 8.10^{-4} \text{ mg/cuve}$$

$$N7 = 8.10^{-5} \text{ mg/cuve}$$

*** Influence des extraits végétaux vis à vis de la
contraction induite par la stimulation électrique:**

Un laps de temps de 10-15 secondes est toujours respecté après l'addition de l'extrait végétal ou de la substance à tester, après lequel si aucun effet n'est constaté la dose est considérée inférieure au seuil de la dose efficace ou inefficace.

Plusieurs essais sont ainsi réalisés jusqu'à l'obtention de trois effets successifs identiques; dans le cas de l'extrait végétal et pour éviter des problèmes de tolérance de l'iléon isolé de cobaye, observé au cours des expériences, vis à vis de l'extrait utilisé, chaque organe est utilisée pour une seule dose et pour trois essais; par contre pour les substances synthétiques plusieurs doses sont testées sur le même iléon prélevé.

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 solutions de l'extrait végétal ou des substances à tester sur plusieurs iléons prélevés après que l'extrait ait montré une activité inhibitrice vis à vis des contractions induites par les stimulations électriques, en ajoutant dans la cuve 0,1 ml de la solution considérée, à chaque essai.

STATISTIQUES

L'homogénéité des variances, entre les lots témoins* et chaque lot traité, étant vérifiée par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques sont réalisées, à l'aide du test T de Student.

* les lots témoins correspondent aux amplitudes des contractions obtenues avec les stimulations électriques.

E-II) RESULTATS

1- Effet de la morphine et recherche de la DE50 et de la PD2, vis à vis des contractions induites par stimulation électrique.

La figure 28 nous permet de constater la relation effet-dose de la morphine sur l'iléon isolé stimulé électriquement, à partir de 10^{-5} mg/cuve avec un effet inhibiteur total à la dose de 10^3 mg/cuve, la DE50 de la morphine est de $25 \cdot 10^{-5}$ mg/cuve la valeur de la PD2 est de (colog $25 \cdot 10^5$).(Enr.14)

2- Effet de la naloxone (antagoniste morphinique) et recherche de la DI50, vis à vis des inhibitions, par la morphine, sur les contractions induites par stimulation électrique.

Sur la figure 29, on peut constater qu'aussi bien en curatif qu'en préventif, l'effet de la naloxone vis à vis de l'inhibition, produite par la morphine, est le même. Cet antagonisme, vis à vis de la morphine, est obtenu, dans ces deux cas aux mêmes doses; ainsi l'effet de la naloxone commence à partir de $8 \cdot 10^4$ mg/cuve avec une DI50 à 10^{-3} mg/cuve et un effet maximum à $4 \cdot 10^3$ mg/cuve, l'effet reste le même en augmentant la dose de la naloxone.(Enr.15)

3- Effet des extraits végétaux testés vis à vis de la contraction, induite par la stimulation électrique, de l'iléon de cobaye.

a) Effet de l'extrait de *Fagara zanthoxyloides* .:

L'extrait de *Fagara* entraîne une inhibition des contractions, induite par les stimulations, cette inhibition, dose-dépendante, commence à la dose de 4 mg/cuve et atteint son maximum à la dose de 80 mg/cuve avec une DI50 de 20 mg/cuve. L'addition de la naloxone ($4 \cdot 10^{-3}$ mg/cuve), en curatif, après l'extrait de *Fagara* ne permet pas le rétablissement des contractions, induites par stimulation électrique et inhibées par l'extrait végétal.(Fig.30) (Enr.16)

b) Effet de l'extrait de *Eschscholtzia c.* :

L'extrait d'*Eschscholtzia* n'a induit une inhibition, des contractions, qu'à la dose de 100 mg/cuve, à partir de la dose de 50 mg/cuve, cette inhibition n'est pas antagonisée par la naloxone (Fig.31) (Enr.17)

c) Effet de l'extrait de *Fumaria officinalis* :

La Fig.32 nous permet de constater que l'extrait de *Fumaria* n'entraîne une inhibition qu'à partir de 25 mg/cuve (DI50) avec un effet inhibiteur maximum à la dose de 50 mg/cuve, cette inhibition n'est pas antagonisée par l'administration de la naloxone.(Enr.18)

d) Effet de l'extrait d'*Annona reticulata* :

L'extrait d'*Annona* n'a entraîné une inhibition de la contraction, qu'à partir de la dose de 50 mg/cuve (DI50) avec un effet maximum à la dose de 75 mg/cuve (DI100).

Cette inhibition n'est pas antagonisée par la naloxone ($4 \cdot 10^{-3}$ mg/cuve). (Fig.33) (Enr.19)

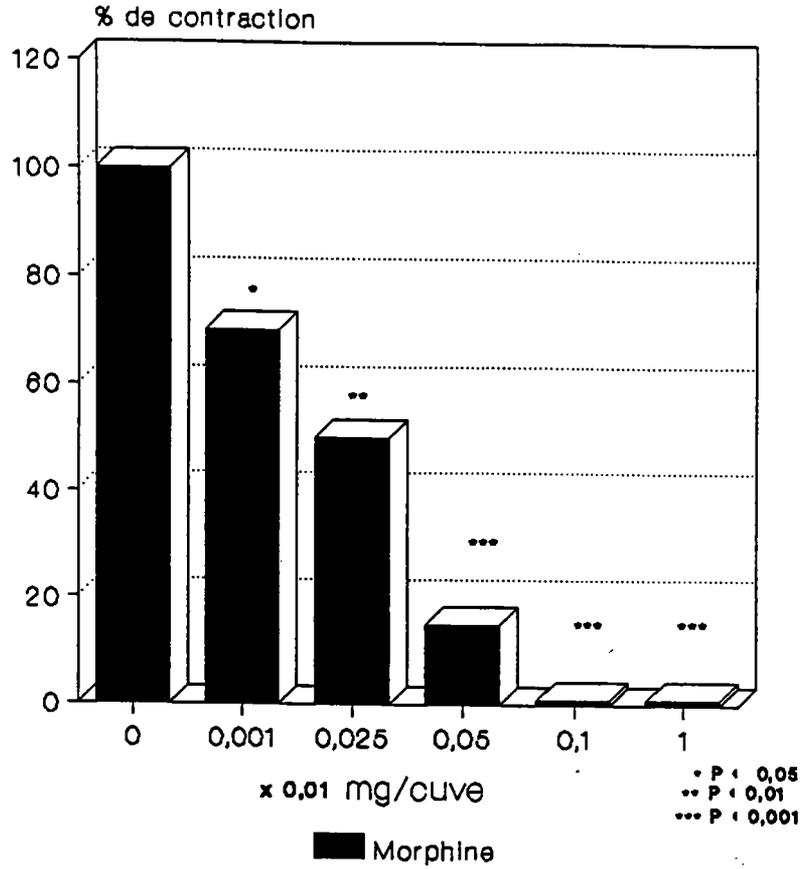


Fig.28 Effet de la morphine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.

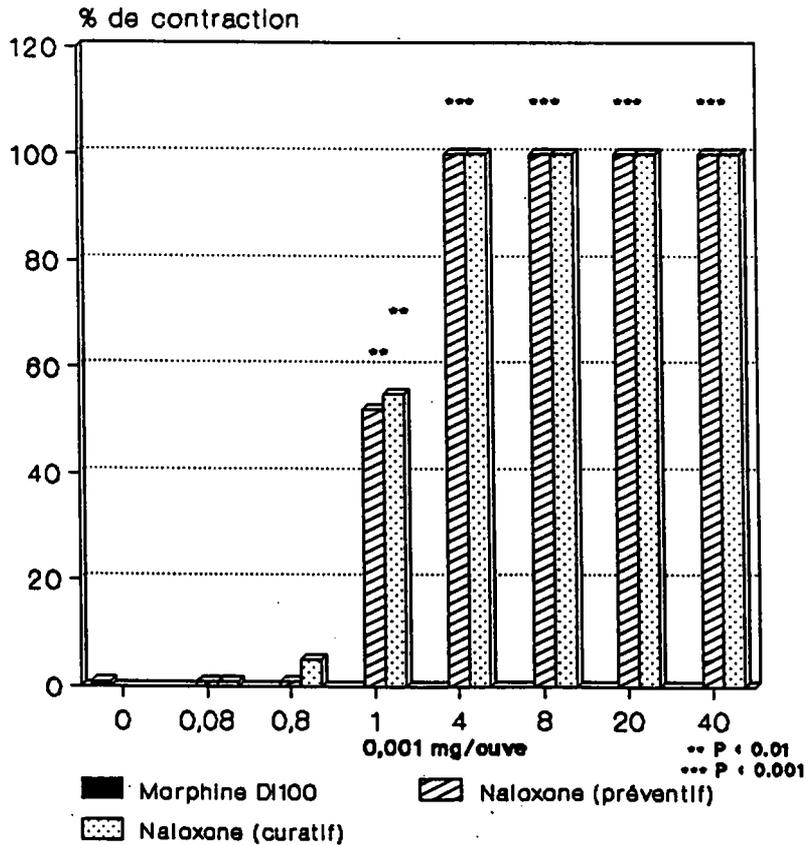
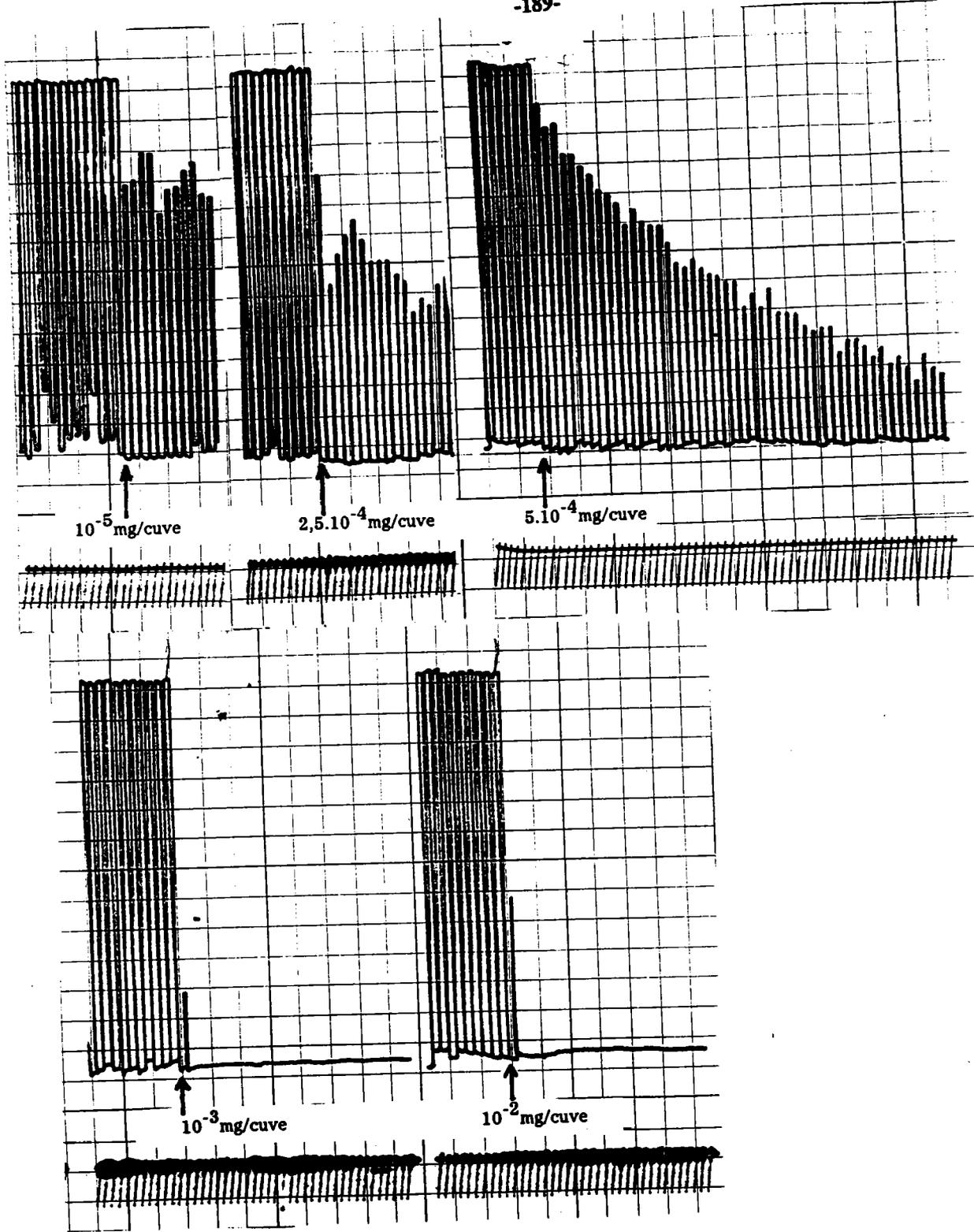


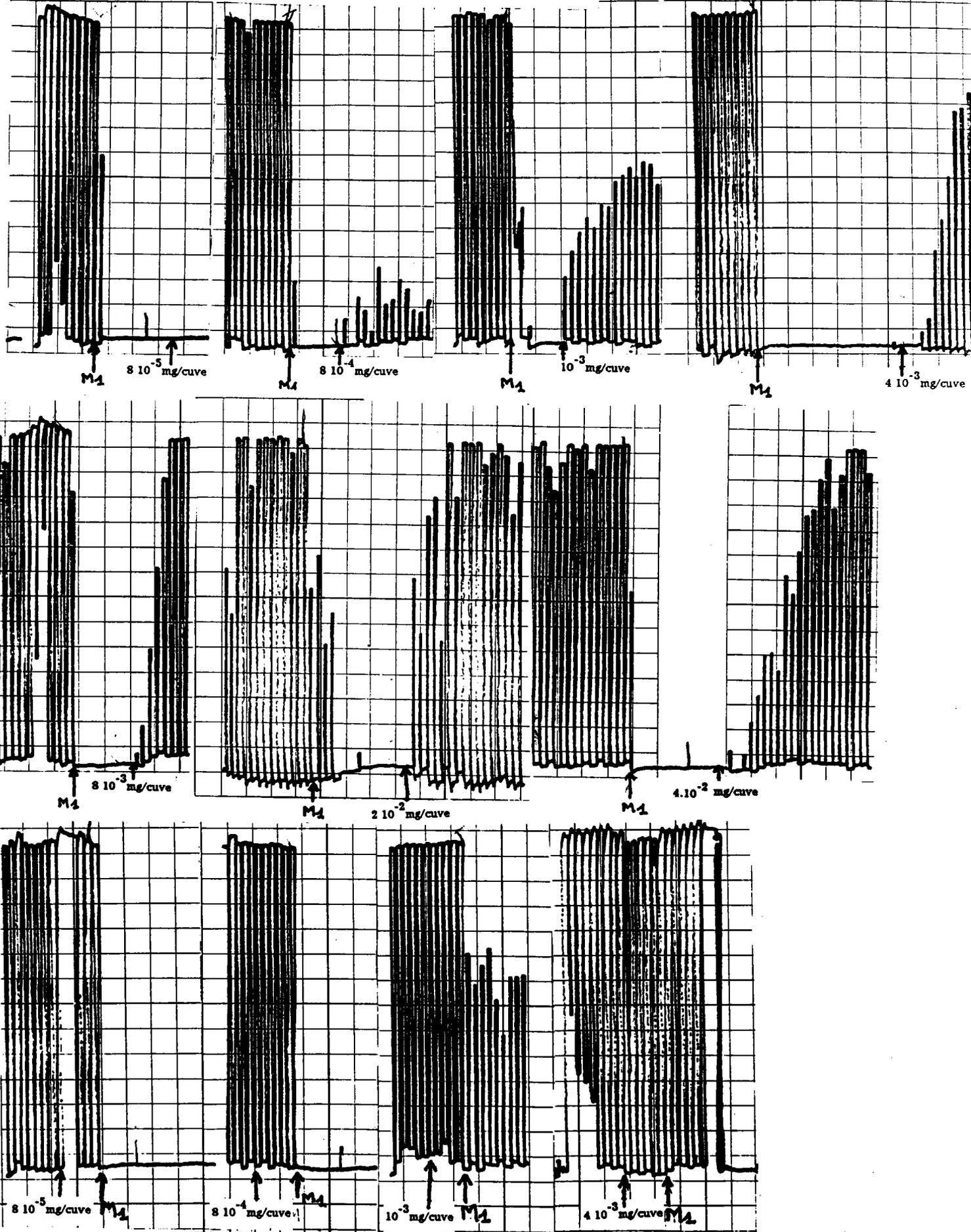
Fig.29 Effet de la naloxone, en préventif et en curatif, vis à vis des contractions de l'iléon, induites par stimulation.



Enregistrement 14 Effet inhibiteur et relation Effet-Dose de la morphine vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

Morphine:

$M_1 = \text{Dose Efficace à } 100 \% = DE_{100} = 10^{-3} \text{ mg/cuve}$



Enregistrement 15 Effet antagoniste et relation Effet-Dose de la naloxone, en curatif et en préventif, vis à vis de l'effet inhibiteur de la morphine sur les contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

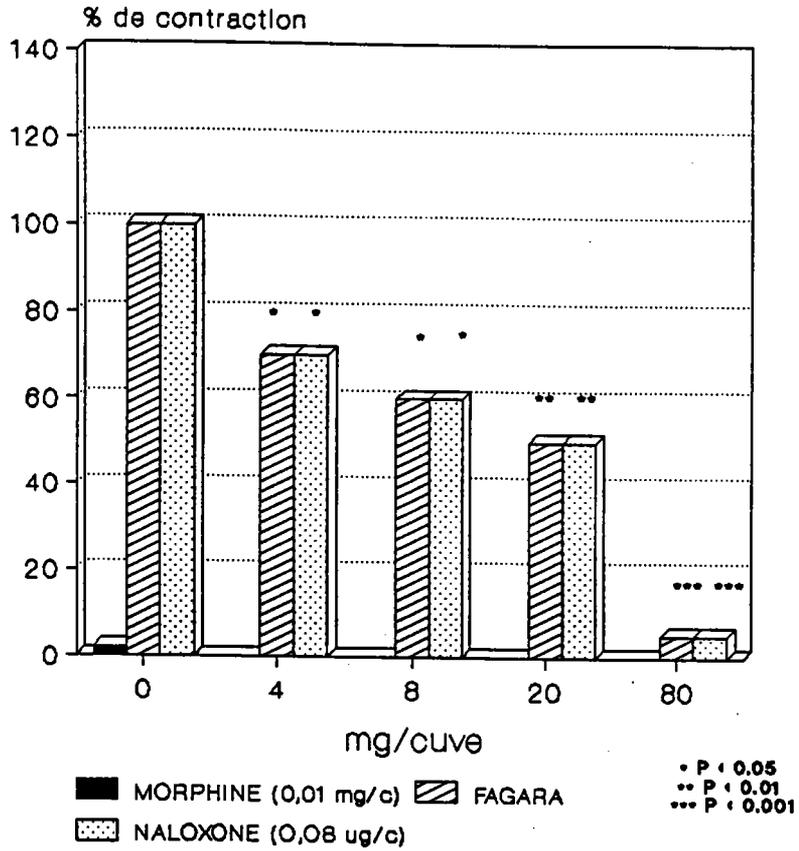


Fig.30 Effet de F.zanthoxyloides, vis-à-vis des contraction de l'iléon induites par stimulation électrique.

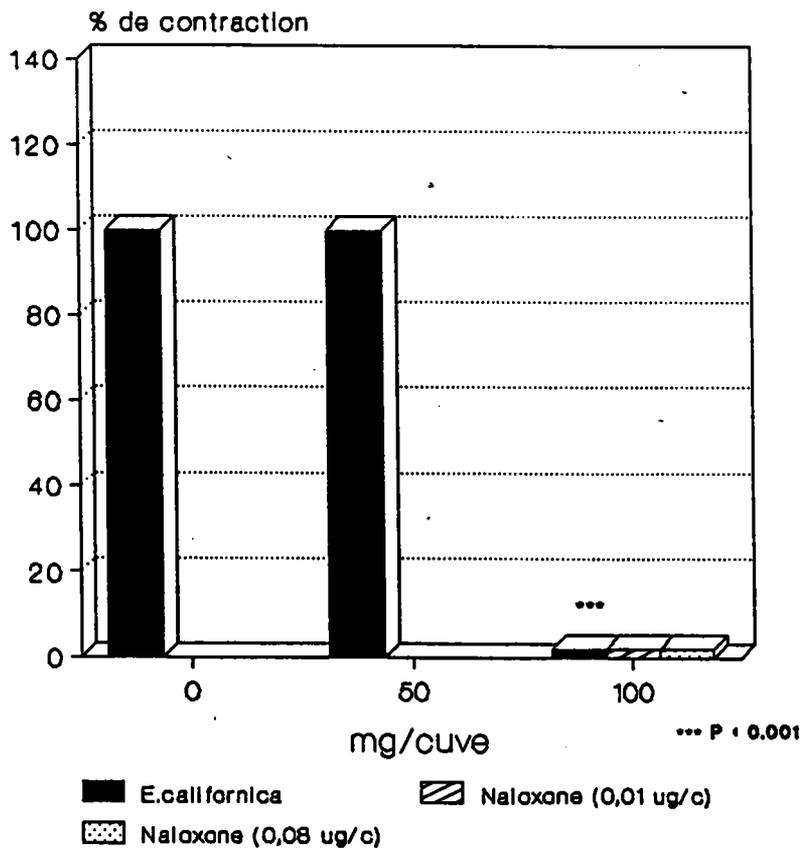
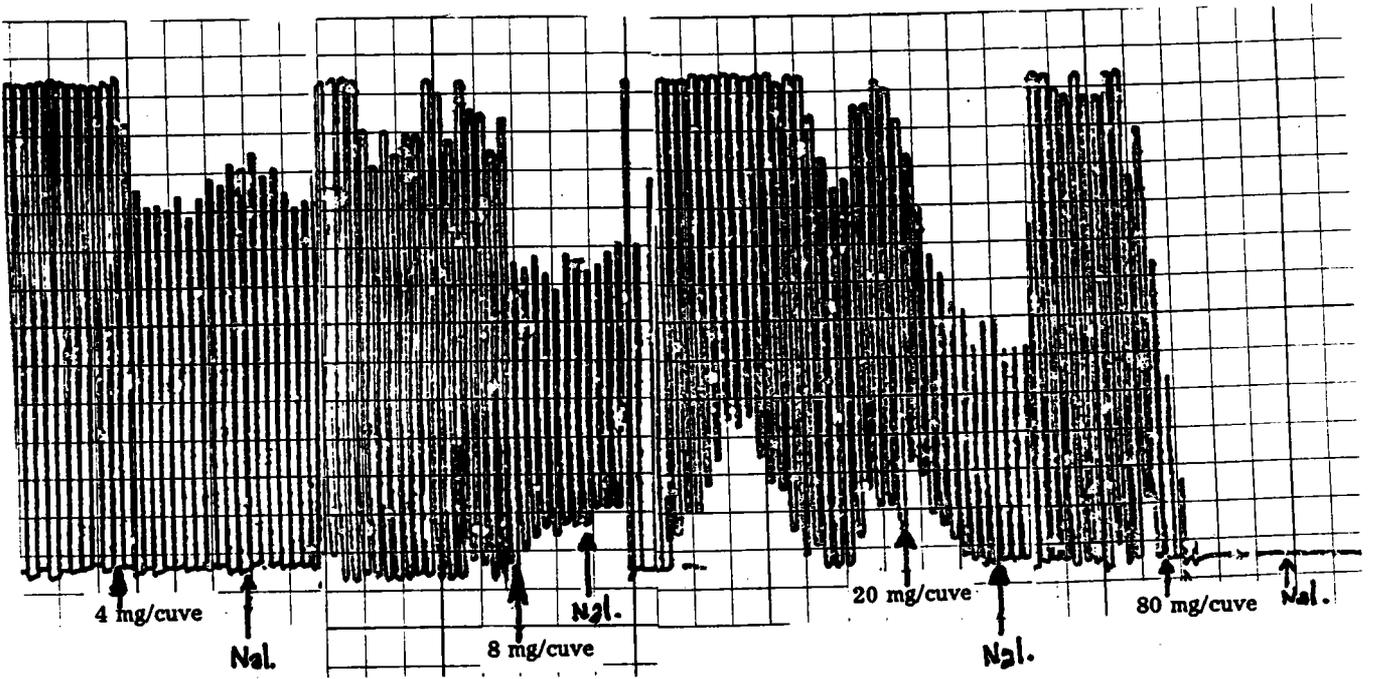
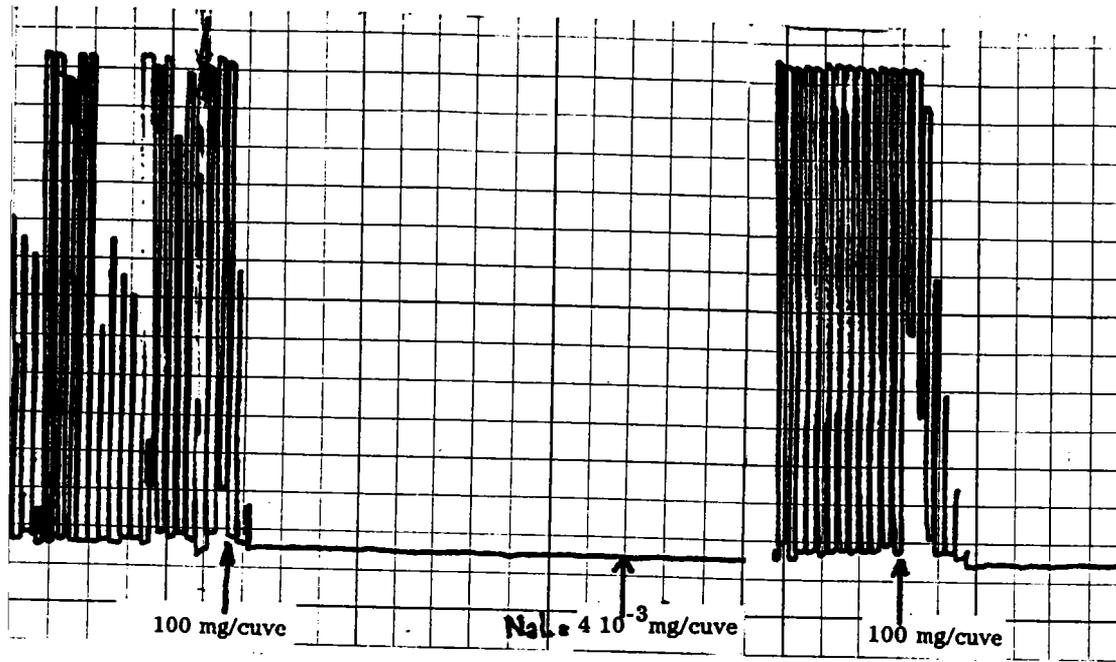


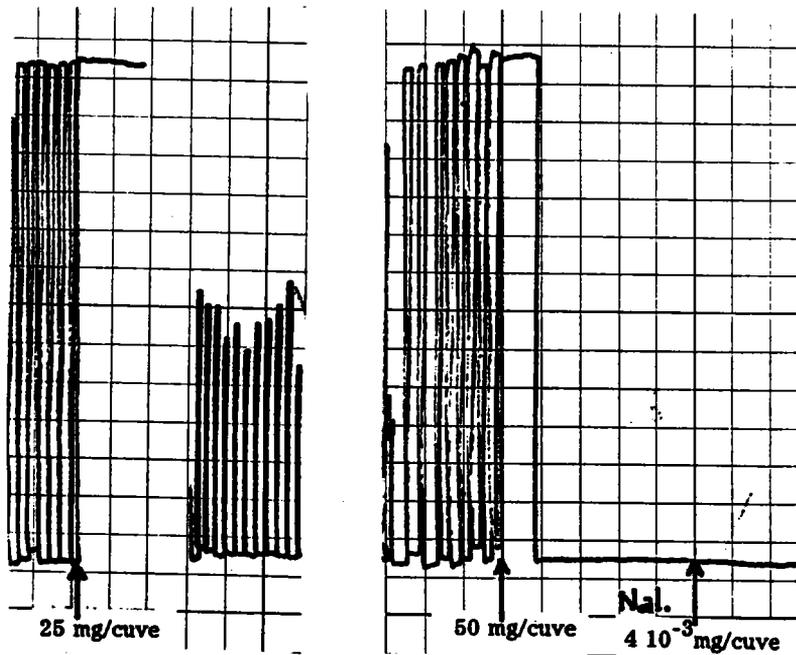
Fig.31 Effet de E.callifornica, vis-à-vis des contractions de l'iléon induites par les stimulations électriques.



Enregistrement 16 Effet de *Fagarz.*, vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.



Enregistrement 17 Effet de *Eschscholzia californica* L. vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.



Enregistrement 18 Effet de *Fumaria officinalis* L. vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

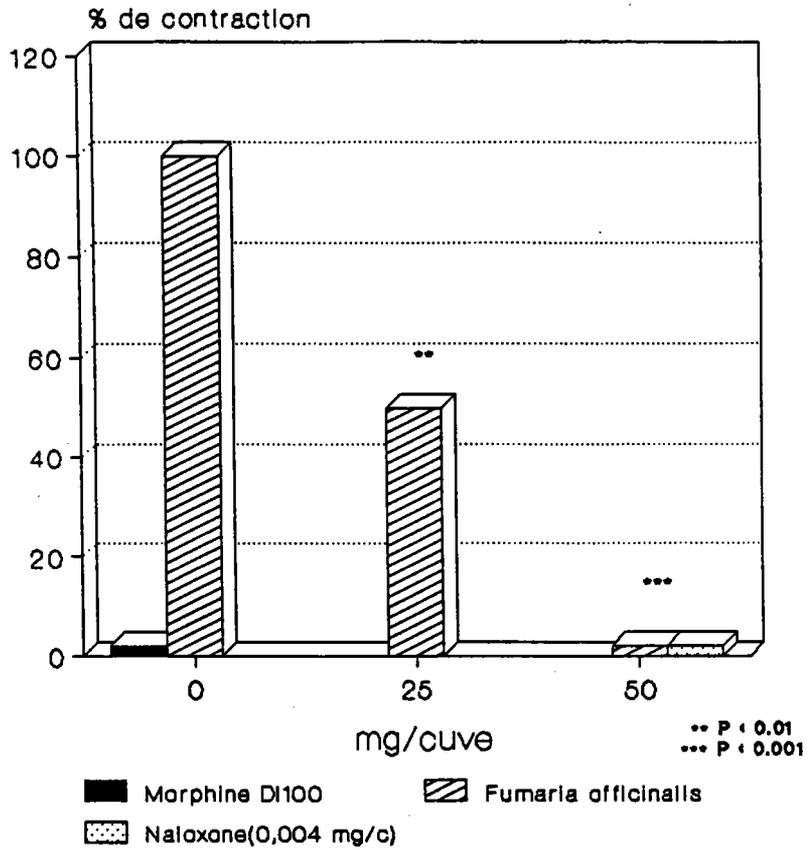


Fig.32 Effet de F.officinalis, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par stimulat.

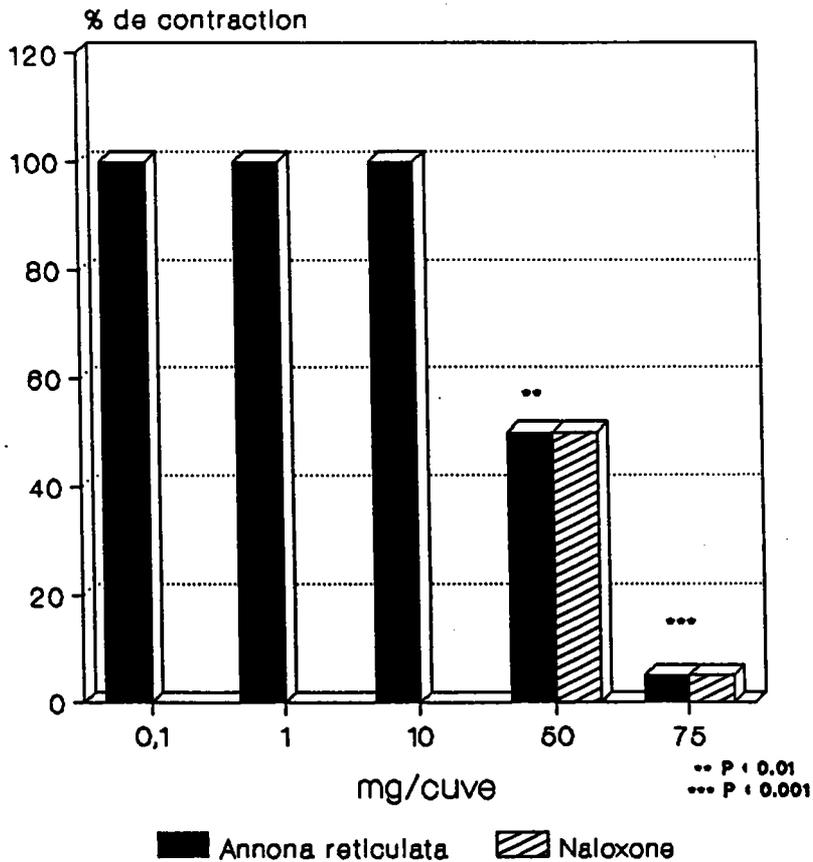
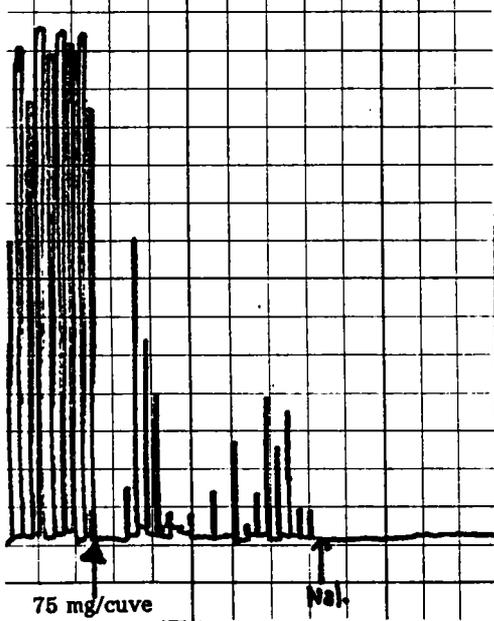
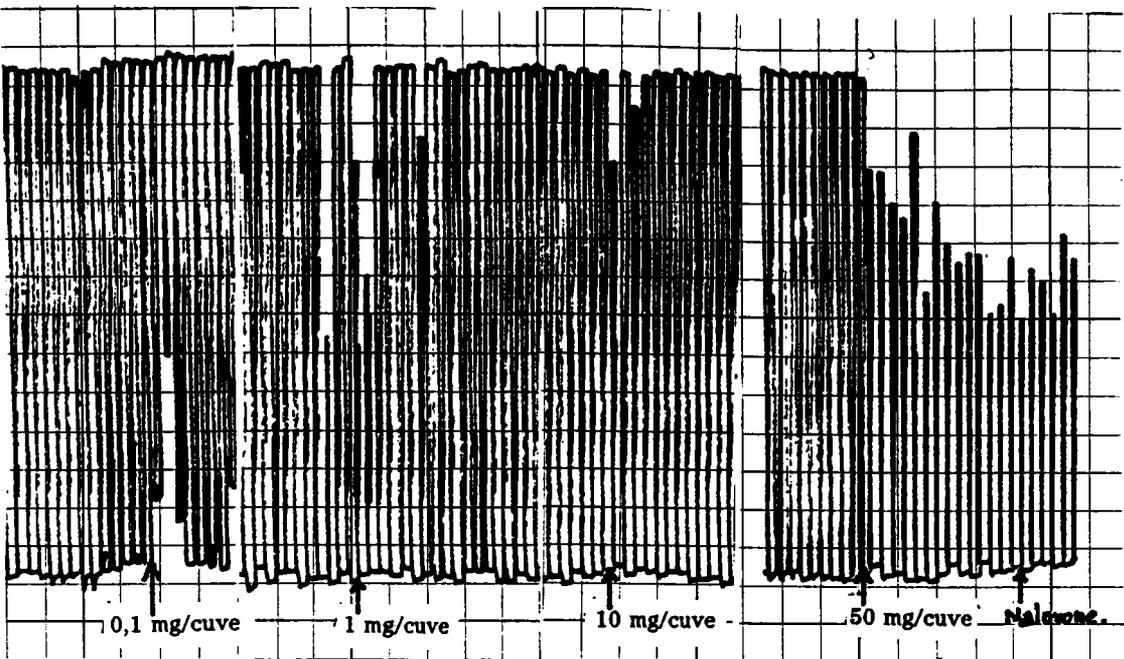


Fig.33 Effet de A.reticulata, vis-à-vis des contractions de l'iléon isolé, induite par les stimulations électriques,



Enregistrement 19 Effet de *Annona reticulata L.* vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

e) Effet de l'extrait de *Euphorbia hirta*

La figure 34 nous permet de constater que l'extrait végétal de *Euphorbia hirta*, provoque une inhibition, dose-dépendante, à partir de la dose de 0,05 mg/cuve (DI50), l'effet inhibiteur atteint son maximum à partir de la dose de 0,1 mg/cuve.

Pour l'ensemble des doses testées, l'addition de la naloxone en curatif ou en préventif, entraîne une reprise des contractions, induites par les stimulations, donc un antagonisme vis à vis des récepteurs à la morphine. (Enr.20)

f) Effet de la buprénorphine (Témgésic)

La buprénorphine (Témgésic), pris comme produit de référence, n'a permis d'obtenir une inhibition des contractions induites par les stimulations électriques qu'aux doses de 0,5 et 1 mg/cuve, alors qu'aux doses inférieures aucun effet ne s'est manifesté, cette inhibition est antagonisée complètement par la naloxone. (Fig.35) (Enr.21)

g) Effet de trimébutine (Debridat)

La trimébutine (Debridat), agent musculotrope pris comme produit de référence, a aussi induit une inhibition à partir de la dose de 0,1 mg/cuve avec une inhibition maximale à la dose de 0,25 mg/cuve, cette inhibition est également antagonisée par la naloxone mais à plus forte dose. (Fig.36) (Enr.22)

h) Effet de l'Atropine:(sulfate d')

Le sulfate d'atropine, antagoniste spécifique des récepteurs cholinergiques, entraîne une inhibition totale des contractions, induites par les stimulations électriques, de l'iléon de cobaye à partir de la dose de 0,01 mg/cuve, l'addition de la naloxone, en préventif et en curatif, ne permet pas la reprise des contractions et ne lève pas l'inhibition provoquée par le sulfate d'atropine. (Fig.37) (Enr.23)

i) Effet de la Papavérine

La papavérine provoque une inhibition totale, des contractions, à la dose de 0,1 mg/cuve. (Fig.38) (Enr.24)

j) Effet du dexchlorphéniramine (Polaramine)

Le dexchlorphéniramine (Polaramine), antagoniste antihistaminique H1, induit une inhibition, dose dépendante, à partir de la dose de 2.10^{-3} mg/cuve, avec un effet maximum à la dose de 0,01 mg/cuve, cette inhibition n'est antagonisée que partiellement par la naloxone et à des doses relativement élevées de naloxone (0,06 mg/cuve). (Fig.41) (Enr.25)

k) Effet de la cimétidine (Tagamet)

La cimétidine (Tagamet), antagoniste antihistaminique H2, n'induit une inhibition qu'à la dose de 10^{-3} mg/cuve avec un effet maximal à la dose de 5.10^{-2} mg/cuve, cette inhibition n'est que partiellement antagonisée par la naloxone et à une forte dose de cette dernière (0,04 mg/cuve). (Fig.41) (Enr.26)

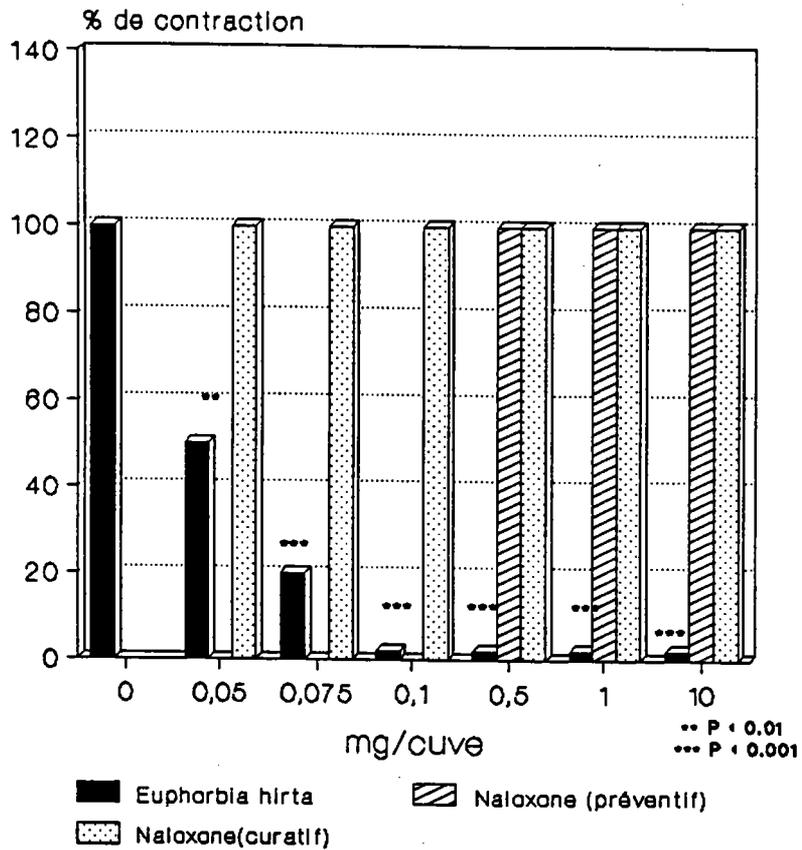


Fig.34 Effet de *Euphorbia hirta* vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.

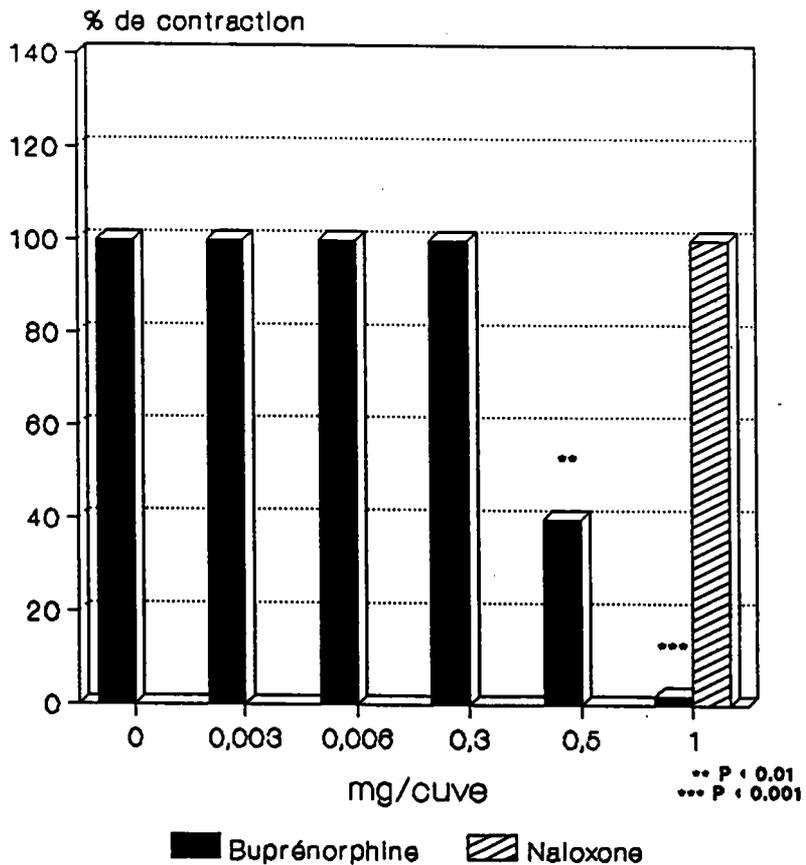
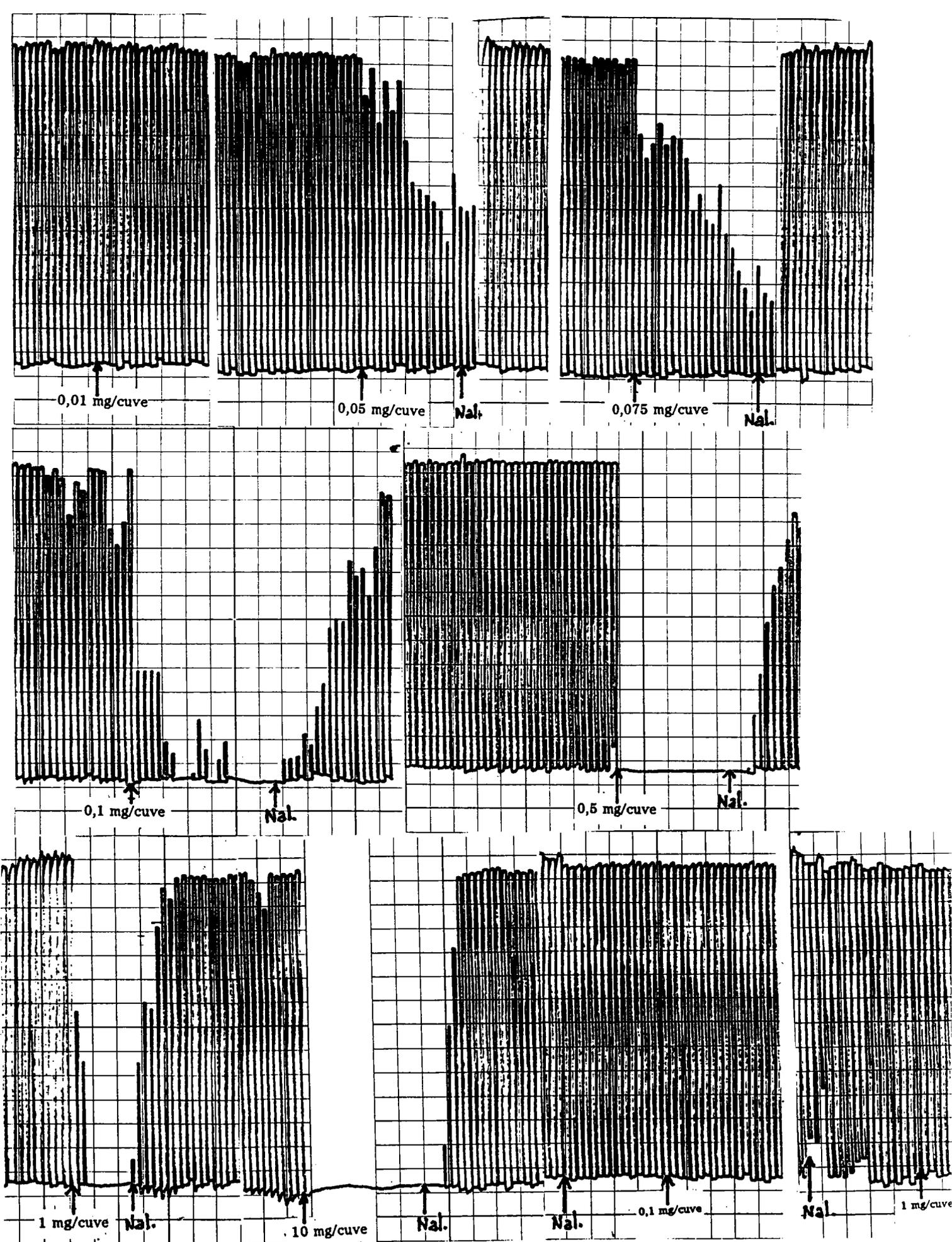
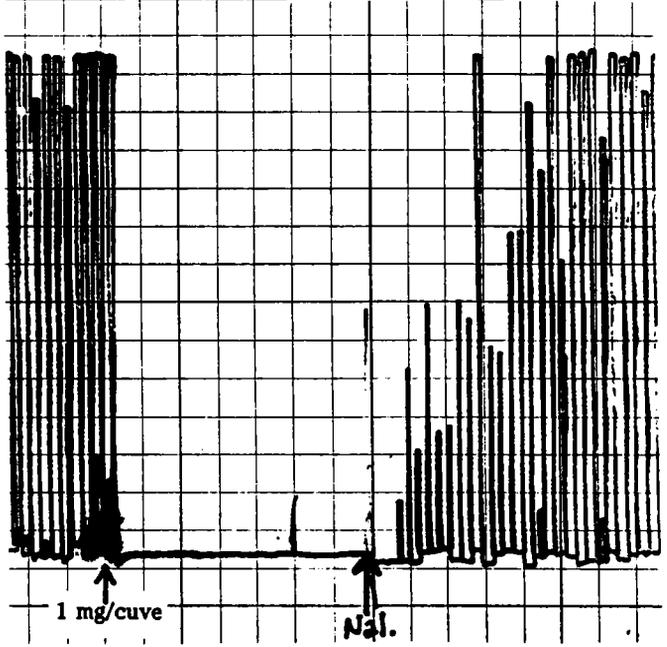
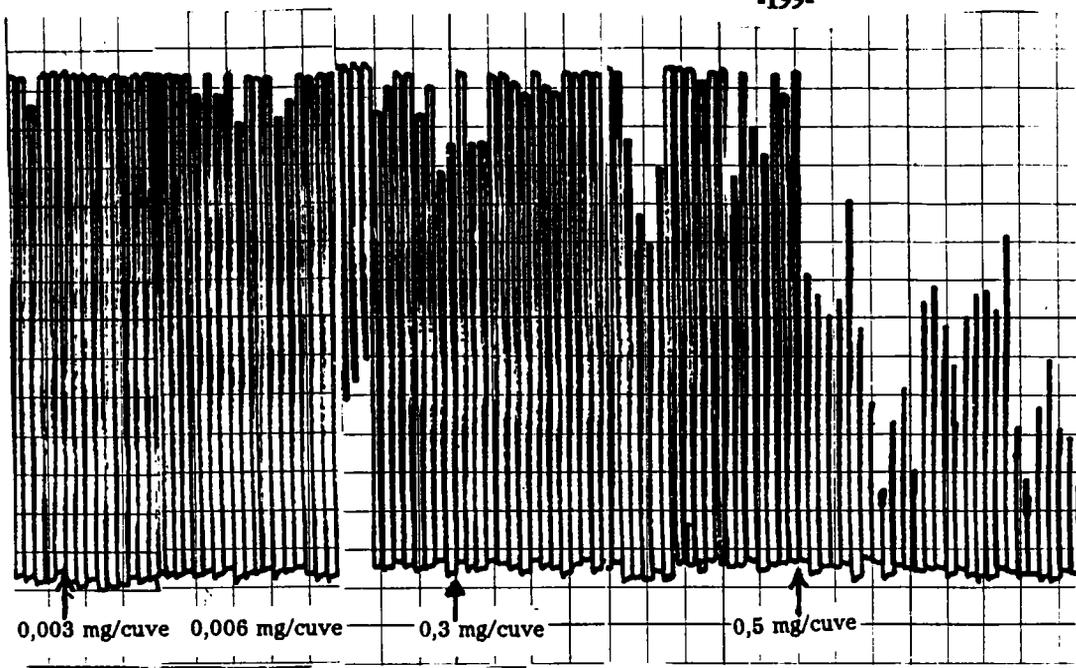


Fig.35 Effet de buprénorphine vis à vis des contractions de l'iléon, induites par stimulation électrique.



Enregistrement 20 Effet de *Euphorbia hirta* L. vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.



Enregistrement 21 Effet de la buprénorphine (Temgésic^R), vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

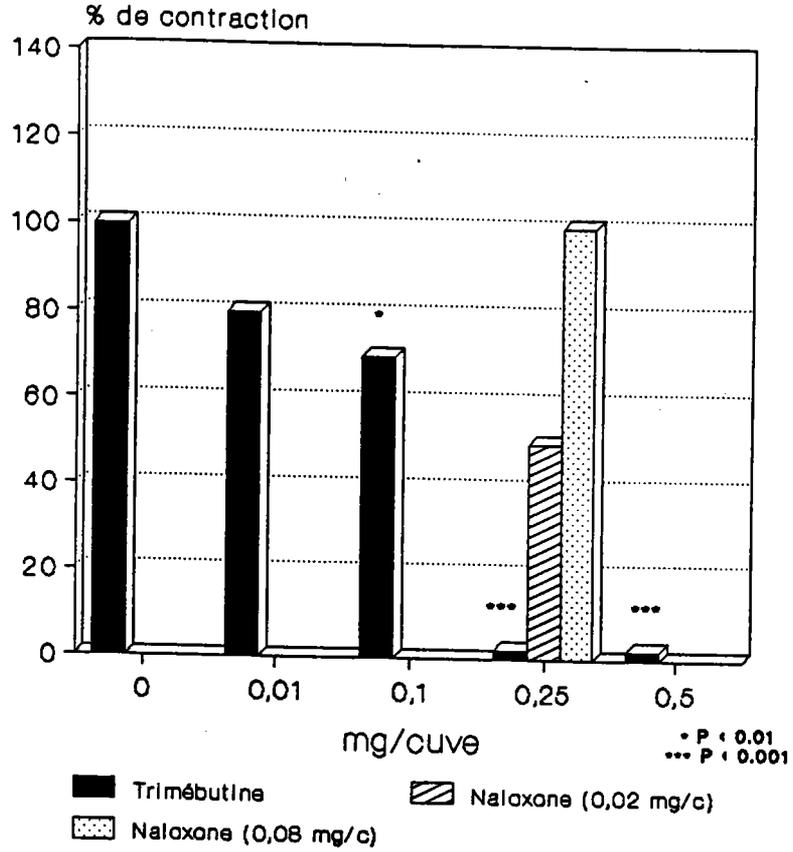


Fig.36 Effet de trimébutine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.

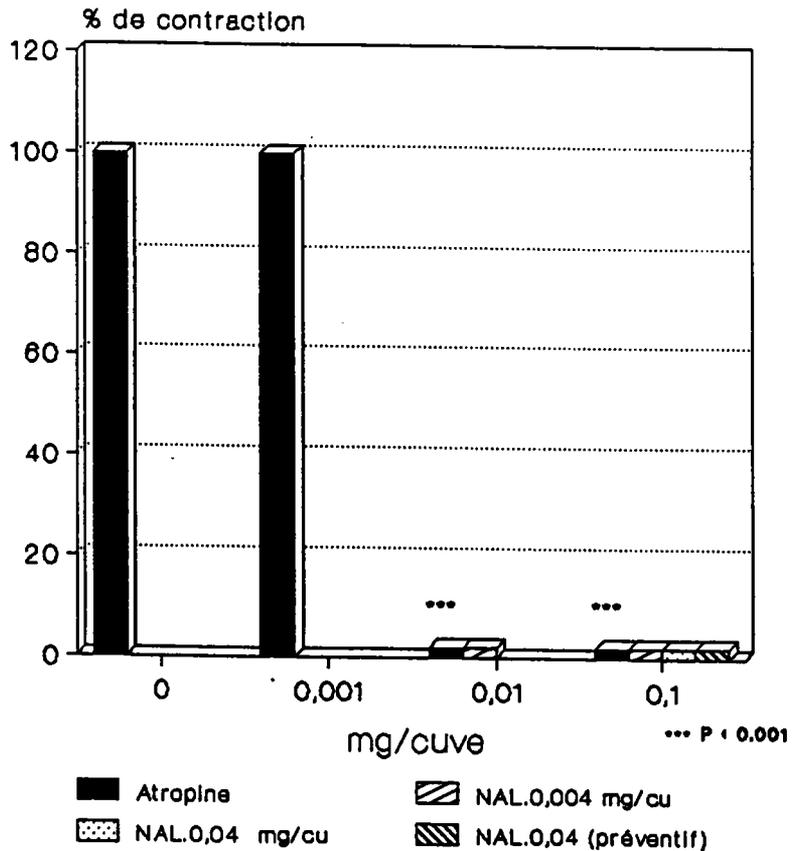
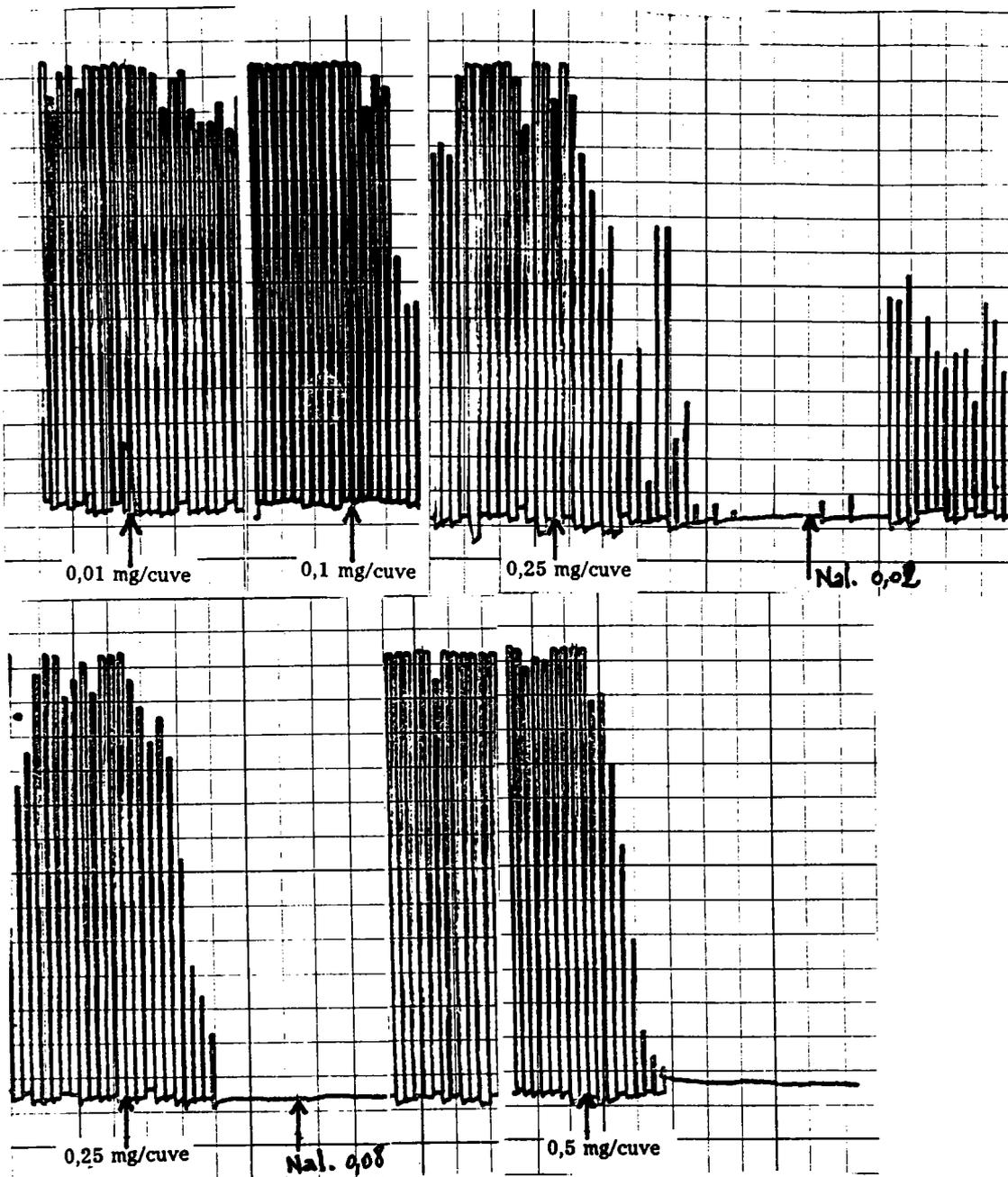


Fig.37 Effet de l'atropine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.



Enregistrement 22 Effet de Trimébutine (Debridat^R), vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

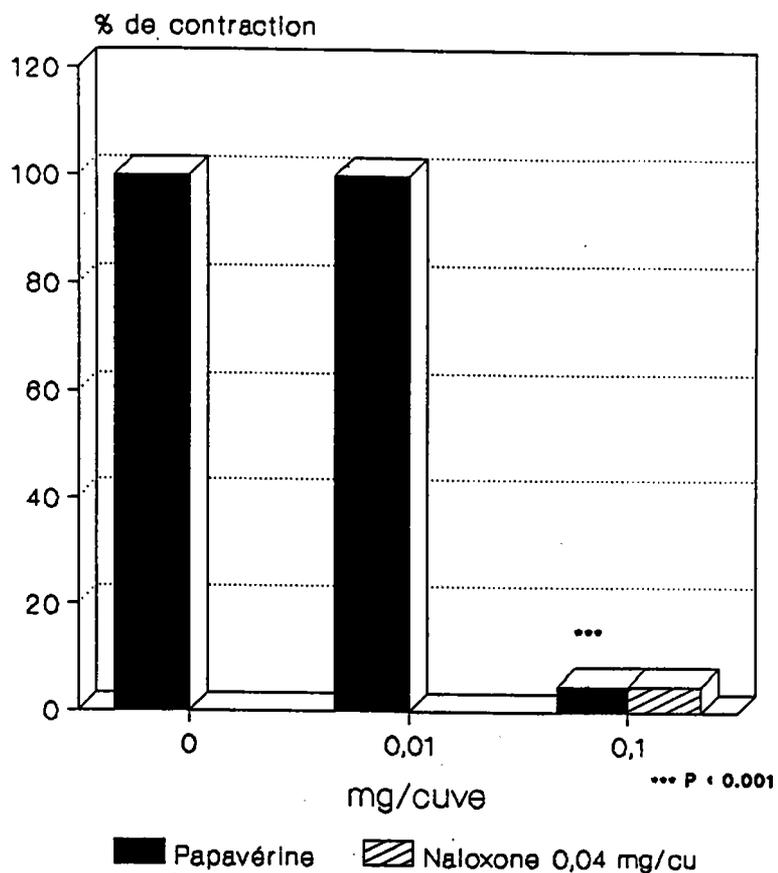


Fig.38 Effet de la papavérine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.

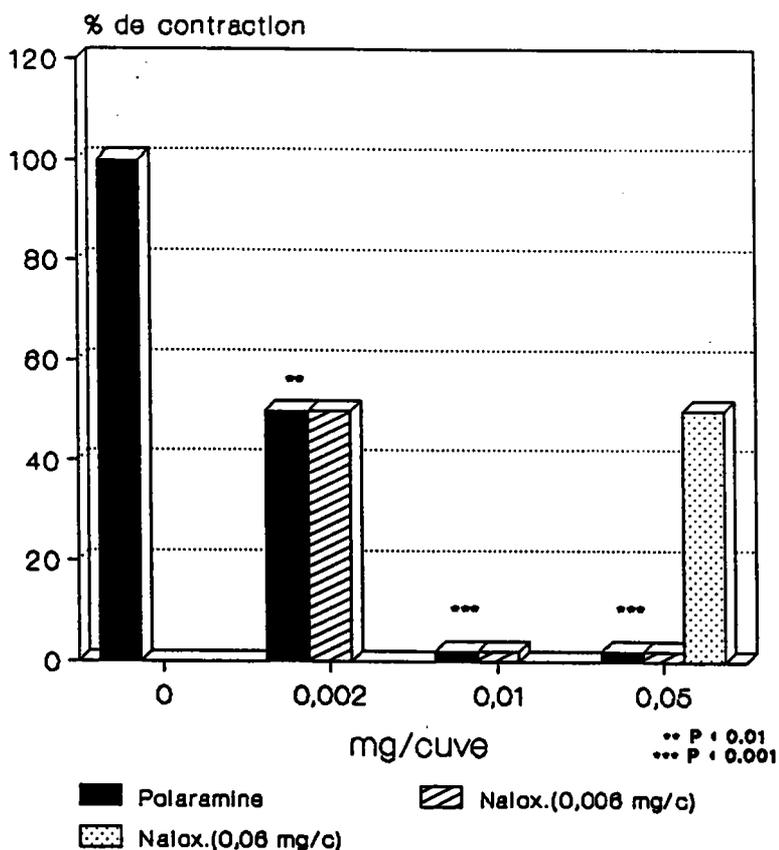
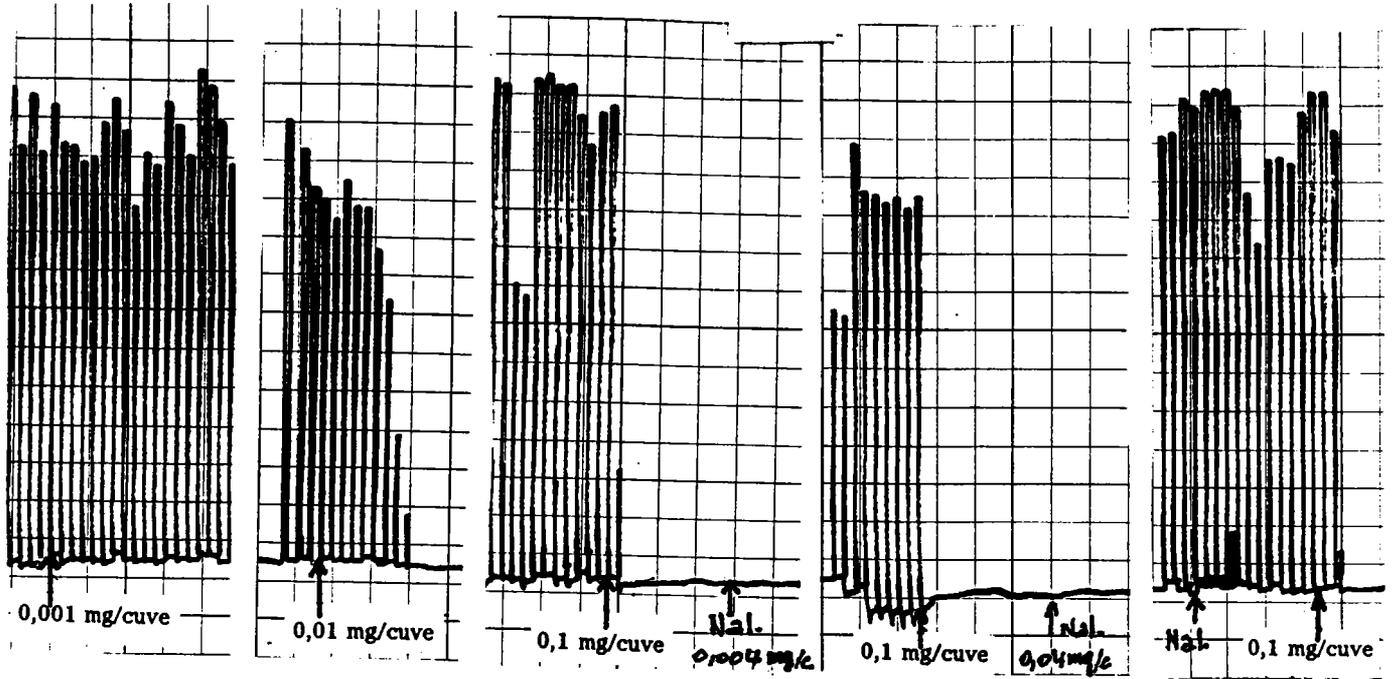
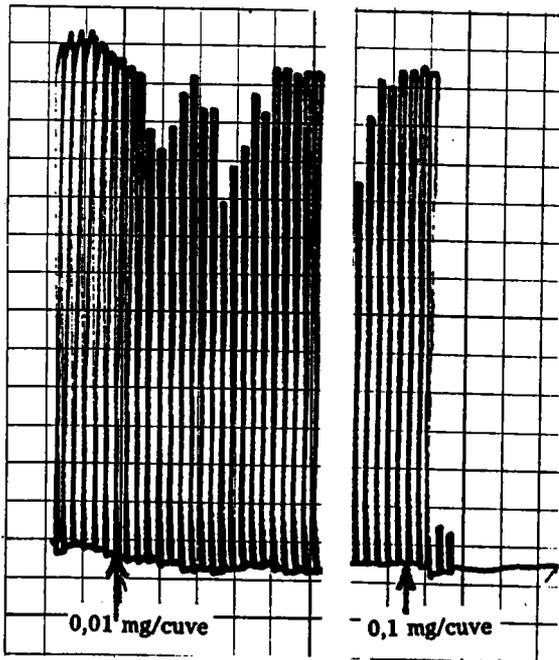


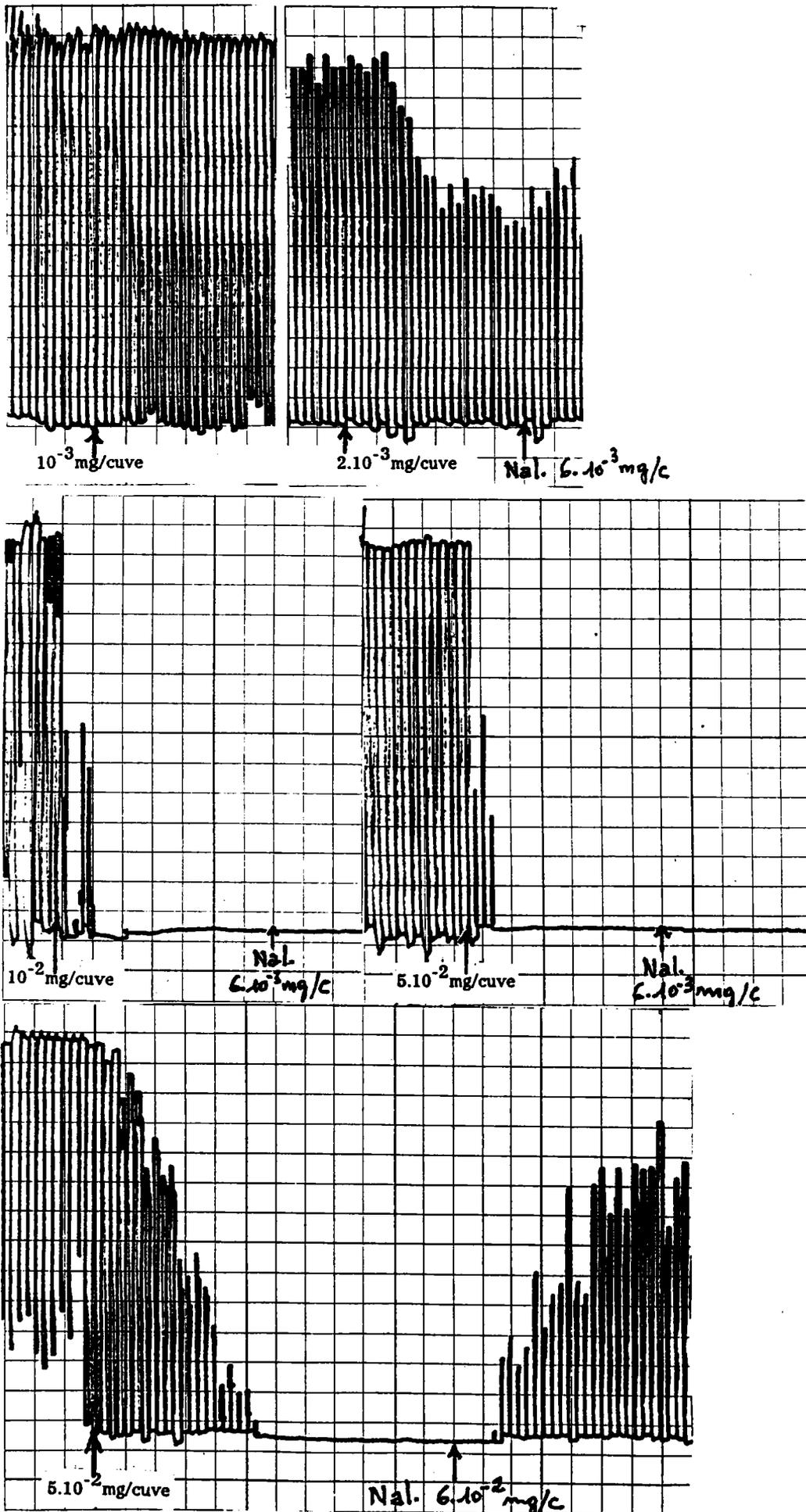
Fig.39 Effet de la polaramine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par contraction électrique.



Enregistrement 23 Effet de l'atropine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.



Enregistrement 24 Effet de la papavérine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.



Enregistrement 25 Effet du dexchlorphéniramine (Polaramine^R), vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

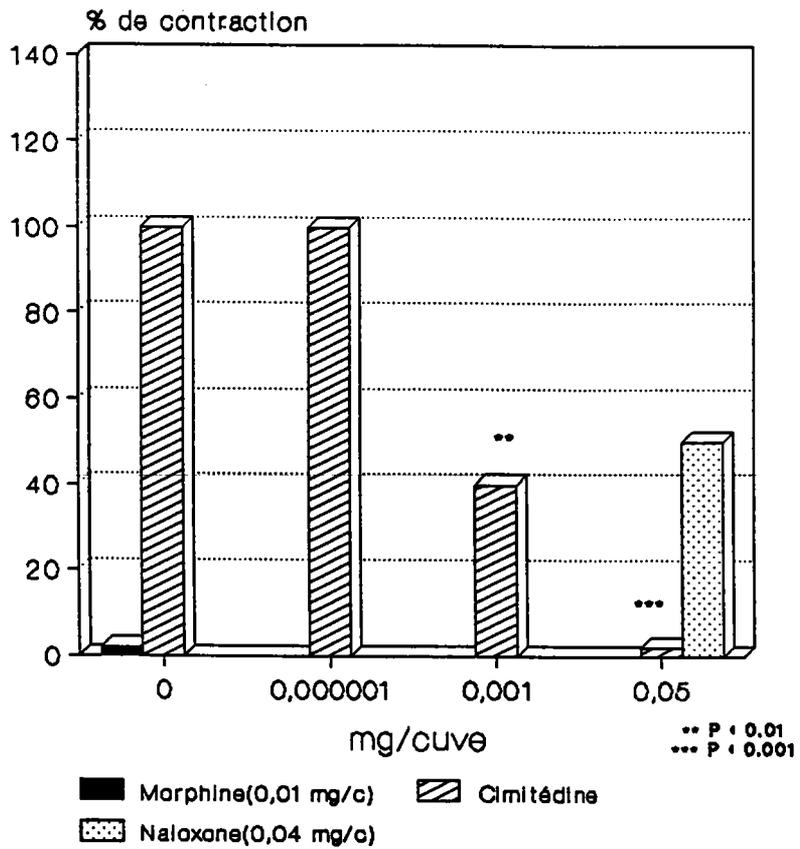
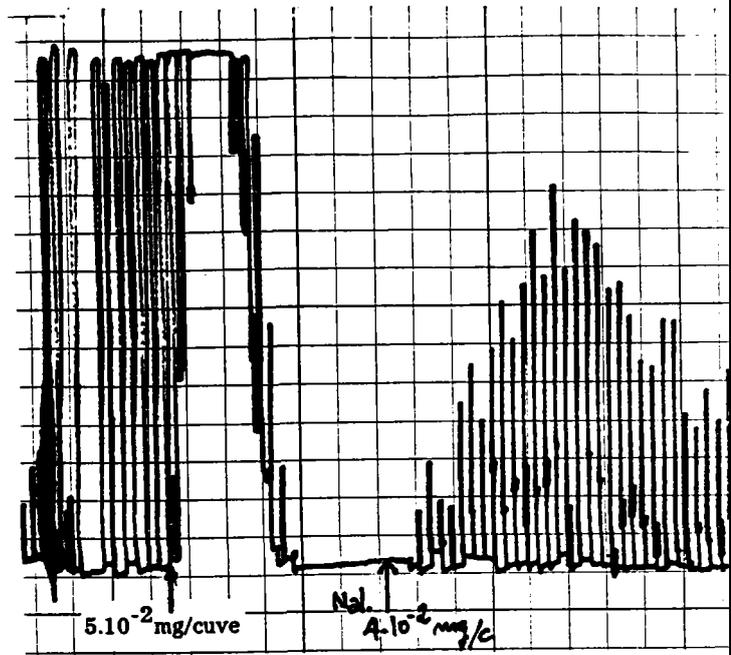
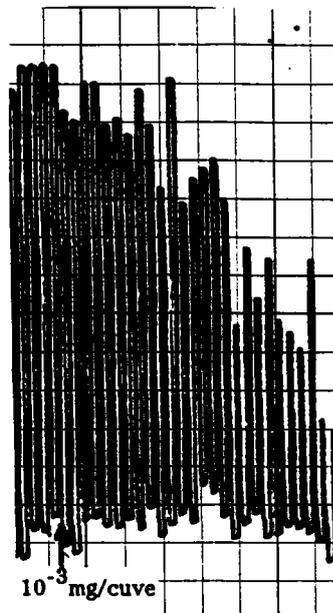
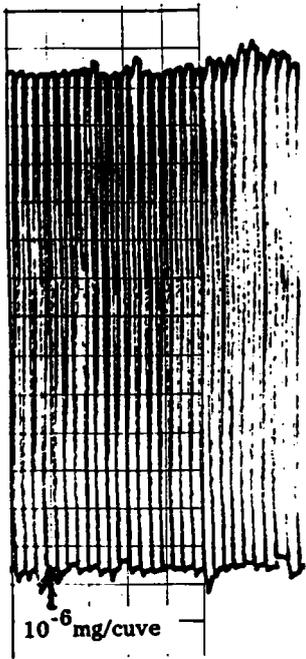


Fig.40 Effet de la cimetidine, vis à vis des contractions de l'iléon isolé, induites par stimulation électrique.



Nal.
4.10⁻² mg/c

Enregistrement 26 Effet de la cimétidine (Tagamet^R), vis à vis des contractions de l'iléon isolé de cobaye, induites par des stimulations électriques.

E-3) CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus au cours de l'évaluation de l'activité des substances de références et des extraits végétaux vis à vis des contractions de l'iléon de cobaye induites par des stimulations électriques, nous permettent de constater (Tableau II-2):

* Que la stimulation électrique de l'iléon isolé de cobaye permet la mise en évidence des récepteurs morphiniques puisque la morphine provoque la réduction et la suppression des contractions induites par ces stimulations électriques d'une part, et que la naloxone antagonise l'effet inhibiteur de la morphine vis à vis de ces contractions donc permet leur rétablissement partiel ou total, en fonction de la dose, d'autre part cette dualité agoniste-antagoniste est spécifique à la physiologie des récepteurs membranaires.

* Que certains végétaux provoquent la réduction ou la suppression des contractions, induites par stimulation électrique et que cette inhibition partielle ou complète n'est pas antagonisée par la naloxone; ce qui explique que cette inhibition n'est pas liée à une liaison aux récepteurs morphiniques mais que l'action de ces extraits végétaux réside au niveau d'un autre mécanisme lié soit à l'équilibre ionique soit à la liaison sur d'autres types de récepteurs, tel est le cas des extraits de *Fagara zanthoxyloides*, *Eschscholtzia californica*, *Fumaria officinalis*, et *Annona reticulata* qui ont provoqué l'inhibition sans être antagonisés par la naloxone.

* Que seul l'extrait d'*Euphorbia hirta* a montré une inhibition antagonisée par la naloxone, en préventif et en curatif, ce qui montre son action spécifiquement au niveau des récepteurs morphiniques sur l'iléon isolé de cobaye; cependant cette inhibition ne se manifeste plus dès lors que l'administration de l'extrait de cette même plante est réalisée au delà de trois fois sur le même organe, ce qui peut impliquer un phénomène de tolérance ou d'accoutumance de l'organe à l'extrait végétal.

Tableau II-2 Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur l'évaluation des effets des extraits végétaux vis à vis des récepteurs opioïdes.

PRODUITS TESTES	RESULTATS
MORPHINE	INHIBITION DES CONTRACTIONS ET VALIDATION DE LA TECHNIQUE
NALOXONE	MISE EN EVIDENCE D'UN ANTAGONISME COMPETETIF ET DE LA SPECIFICITE DES RECEPTEURS AUX OPIACES
BUPRENORPHINE	INHIBITION ANTAGONISEE PAR LA NALOXONE DE TYPE MORPHINE LIKE
TRIMEBUTINE	INHIBITION ANTAGONISEE PAR LA NALOXONE DE TYPE MORPHINE LIKE
E.HIRTA	INHIBITION ANTAGONISEE PAR LA NALOXONE DE TYPE MORPHINE LIKE
ATROPINE	INHIBITION NON ANATAGONISEE PAR LA NALOXONE
PAPVERINE	INHIBITION NON ANATAGONISEE PAR LA NALOXONE
F.OFFICINALIS	INHIBITION NON ANTAGONISEE PAR LA NALOXONE DE TYPE ATROPINE LIKE
A.RETICULATA	INHIBITION NON ANTAGONISEE PAR LA NALOXONE DE TYPE ATROPINE LIKE
F.ZANTHOXYLOIDES	INHIBITION NON ANTAGONISEE
E.CALIFORNICA	INHIBITION NON ANTAGONISEE
DEXCLORPHENIRAMINE ET CIMITEDINE	INHIBITION NON ANTAGONISEE

Le trimébutine (Debridat) pris comme agoniste morphinique de référence a bien induit une inhibition des contractions antagonisées par la naloxone ce qui confirme sa spécificité pour les récepteurs morphiniques. La buprénorphine (Témgésic) a également montré une activité agoniste à la morphine à une faible dose, cette inhibition est spécifiquement antagonisée par la naloxone.

L'antagoniste cholinergique, l'atropine, a bien induit une inhibition vis à vis des contractions induites par stimulation mais l'addition de la naloxone n'a pas permis de supprimer l'effet de l'atropine; ce qui suggère l'existence de deux sites d'action pour chacune des deux substances, les récepteurs cholinergiques pour l'atropine et les récepteurs morphiniques pour la naloxone. Cependant l'implication des récepteurs cholinergique lors de la stimulation électrique de l'iléon semble être évidente puisque la stimulation électrique de l'organe permettant la mise en évidence des récepteurs morphinique, et provoquant des contractions de l'organe isolé, sont réduites ou supprimées par l'atropine sans être rétablit par l'addition de la naloxone; ceci est une preuve de l'implication de l'acétylcholine dans ce mécanisme de contraction commandé à la base par les récepteurs morphiniques.

Les récepteurs histaminiques sont également impliqués dans ce mécanisme de contraction, commandé à la base par les récepteurs opiacés au niveau péréphérique mais à un degré moindre que les récepteurs cholinergiques puisque la naloxone, bien qu'elle ne soit pas spécifique aux récepteurs histaminiques, permet un rétablissement, toujours partiel des contractions, après l'addition d'un antihistaminique H1, le dexchlorphéniramine (Polaramine) ou d'un antihistaminique H2, la cimitédine (Tagamet); ce rétablissement serait probablement lié au renforcement et à la potentialisation des stimulations électriques donc à plus d'implication de récepteurs cholinergiques et autres, ce qui expliquerait la réapparition des contractions.

COMPARAISON DES METHODES *IN VIVO* ET *IN VITRO*

COMPARAISON DES METHODES *IN VIVO* ET *IN VITRO*

L'évaluation des substances de référence et des différents extraits végétaux vis à vis de ces trois types de récepteurs, cholinergiques, histaminiques et opioïdes au travers de cette technique *in vitro* sur l'organe isolé nous a permis :

- * de confirmer les activités de certains extraits végétaux connues dans la tradition ou démontrées lors de certains travaux pharmacologiques réalisés *in vivo*.
- * de démontrer la spécificité d'action des substances de référence et des extraits végétaux.
- * de vérifier la reproductibilité des résultats aussi bien pour les substance pures de référence que pour les extraits végétaux.

1) Confirmation des propriétés démontrées *in vivo* et/ou des propriétés indiquées dans la bibliographie.

L'extrait de *Fumaria officinalis*, connu comme possédant des activités antispasmodiques (Abdulhabib, 1973) s'est avéré possédant des activités inhibitrices vis-à-vis de la contraction induite par la carbamoylcholine; ce qui pourrait expliquer son utilisation traditionnelle et également son effet inhibiteur vis-à-vis de la stimulation électrique de l'iléon isolé de cobaye donc probablement son effet antagoniste vis-à-vis des récepteurs cholinergiques puisqu'il n'a montré aucun effet vis-à-vis de l'histamine. L'extrait d'*A. reticulata*, connu dans la tradition comme possédant des activité antispasmodiques, doit son activité d'une part, à son effet inhibiteur vis-à-vis du péristaltisme intestinal d'autre part, à son effet inhibiteur vis à vis de la contraction induite par la carbaminoylcholine ce qui justifie son action inhibitrice vis-à-vis des contractions de l'iléon de cobaye induites par des stimulations électrique et non antagonisées par la naloxone, donc agissant probablement via les récepteurs cholinergiques. (Rolland et coll., 1988).

Tableau A Etude comparative des effets sédatifs recherchés à l'aide des tests in vivo et in vitro.

	Tets in vivo	Test in vitro
Produits et extraits végétaux	Effets sédatifs mg/kg	Récepteurs à l'histamine (mg/cuve)
Melissa officinalis	25	Pas d'effets
Eschscholtzia californica	150	Pas d'effets
Euphorbia hirta	100	Pas d'effets
Fagara zanthoxyloides	200	Pas d'effets
Polaramine	Effet secondaire : sédatif	Effet inhibiteur antagoniste
Phenergan	Effet secondaire : sédatif	Effet inibiteur anatgoniste

L'extrait d'*Euphorbia hirta* n'a montré aucune action vis-à-vis des récepteurs cholinergiques et histaminiques; par contre au niveau des récepteurs opiacés on a pu constater que l'extrait de cette plante se fixe spécifiquement au niveau de ces récepteurs puisqu'il est antagonisé, de la même façon que la morphine, par la naloxone, ces résultats *in vitro* peuvent confirmer les travaux pharmacologiques qui ont été effectués sur l'extrait de cette plante et qui ont montré son activité analgésique et contribuer à la compréhension de son mécanisme d'action. (Lanhers et coll.; 1991)

L'action inhibitrice vis-à-vis du péristaltisme intestinal de *M.officinalis* peut justifier son utilisation traditionnelle pour son activité antispasmodique, cependant l'absence d'un effet vis à vis des récepteurs cholinergiques et histaminiques lui attribue une activité principalement sédative liée à un autre mécanisme d'action (Tableau A et C). (Soulimani et coll.; 1991)

2) Spécificité d'action des substances de référence et des extraits végétaux.

Les tableaux B et C nous permettent de relever une certaine corrélation entre les techniques *in vivo* et *in vitro*, en effet la morphine active à 10 mg/kg *in vivo* se fixe sur les récepteurs opoïdes en provoquant une inhibition des contractions *in vitro* à la dose de 0,001 mg/cuve (dose 1000 fois plus faible par rapport aux tests *in vivo*), cette inhibition est spécifiquement antagonisées par la naloxone. L'extrait d' *Euphorbia hirta* présente le même profil pharmacologique que la morphine, son effet analgésique déjà démontré *in vivo* à la dose de 100 mg/kg se confirme *in vitro* à la dose 0,1 mg/cuve (dose 1000 fois plus faible par rapport aux tests *in vivo*) par sa fixation au niveau des récepteurs aux opiacés et son antagonisme vis à vis de la naloxone.

Des effets non spécifiques sont mis en évidence par l'atropine qui inhibe les contraction sans être antagonisée par la naloxone, 3 espèces (*A.reticulata*, *P.boldus* et *F.officinalis*) présentent le même profil d'activité que l'atropine.

Donc on peut constater que les substances pures ou les extraits végétaux qui ont une activité spécifiques vis à vis d'un type de récepteurs, peuvent présenter un effet non spécifique vis à vis d'un autre type de récepteur.

Un autre type de corrélation a été mis en évidence entre les technique *in vivo* et *in vitro*, ainsi *M.officinalis* et *P.boldus* ont entraîné aussi bien une inhibition du transit intestinal *in vivo* que le péristaltisme intestinal *in vitro* .(Tableau C)

Tableau B. Etude comparative des effets analgésiques obtenus dans les tests in vivo et dans les tests in vitro.

Produits et extraits végétaux	Tests in vivo		Tests in vitro		
	Analgésie mineur doses en mg/kg	Analgésie majeure doses en mg/kg	Récepteurs opioïdes doses mg/cuve	Antagonisme par la Naloxone	Récepteur cholinergiques mg/cuve
M.officinalis	400	pas d'effets	pas d'effets	/// ///	pas d'effets
E.hirta	20	100	0,1	Oui	600
F.zanthoxyloïdes	25	400	80	Non	pas d'effets
E.californica	200	pas d'effets	100	Non	//// ////
A.reticulata	///// /////	///// /////	75	Non	800
P.boldus	///// /////	///// /////	///// /////	///// /////	800
F.officinalis	///////	////	25	Non	200
A.S.L.*	68	pas d'effets	///////	///////	///////
Morphine	1,15	10	0,001	Oui	non testé
Atropine	////	////	0,01	Non	0,0004

* Acétylsalicylate de lysine

3) Reproductibilité des résultats obtenus.

Nous avons exprimé l'ensemble des résultats avec la présence ou l'absence d'une significativité statistique, cette significativité statistique a été établie sur la moyenne de plusieurs essais qui n'ont pas présenté de problèmes au niveau de la reproductibilité, cependant un même organe ne peut être utilisé, pour reproduire les mêmes résultats, au delà de 3 à 5 fois avec la même dose de l'extrait alors qu'un produit pure peut être testé à plusieurs doses et pour plusieurs essais. Cette méthodologie de travail nous a donc permis de confirmer certaines activités ayant déjà été démontrées *in vivo* pour certains extraits et l'utilisation traditionnelle pour d'autres (Tableau D). Mais ces techniques utilisées et qui sont basées sur le travail au niveau de l'organe isolé ne peuvent trouver leur validité qu'en association avec d'autres techniques *in vivo*, d'autant plus que la mise en évidence de l'activité d'un extrait végétal, qui constitue un mélange complexe, vis à vis d'une entité moléculaire intégrée dans un système histologique et membranaire : les récepteurs, présentent beaucoup de difficultés au niveau des interprétations scientifiques. Ainsi l'évaluation de l'activité d'un extrait végétal vis à vis des récepteurs opioïdes s'est avérée très intéressante bien qu'elle présente un inconvénient à cause du nombre d'iléons prélevés puisqu' au delà de trois essais, avec la même dose de l'extrait, il devient difficile voire impossible de reproduire le même effet. En revanche au moment du changement de l'organe la même dose permet d'obtenir le même effet, ce qui rend la manipulation très coûteuse et très lourde, sans oublier, en particulier pour les récepteurs opioïdes, la difficulté de spécifier l'action de l'extrait végétal vis à vis de ces récepteurs, puisque au cours de nos expériences il s'est avéré que la stimulation de l'iléon de cobaye isolé visant à mettre en évidence les récepteurs opiacés, impliquerait probablement, par l'intermédiaire de ces récepteurs, plusieurs autres mécanisme à savoir : les récepteurs cholinergiques, les récepteurs histaminergique et probablement des récepteurs sérotoninergique et gabaergique ainsi que l'équilibre ionique transmembranaire qui est à la base de la contraction de la fibre du muscle lisse.

Il serait donc très intéressant de rechercher l'implication de l'ensemble de ces mécanismes à l'aide de ce test et de pouvoir réaliser des évaluations sur des fractions et des extraits de plantes pour mieux approcher leur mécanisme d'action aussi bien dans une activité analgésique, anti-inflammatoire (vis-à-vis des prostaglandines qui sont probablement impliqués dans la contraction de la fibre du muscle lisse), antispasmodique, antihistaminique que dans d'autres activités pouvant constituer un effet secondaire à une activité principale comme c'est le cas de la polaramine, antihistaminique de type H1, et en même temps pourvu d'un effet sédatif secondaire, cependant si cette approche comparative paraît être intéressante, elle n'est pas toujours évidente et peut même dans certain cas aboutir à des résultats contradictoires par le simple passage d'une technique *in vivo* à une technique *in vitro* en particulier pour les tests antiparasitaires (Balansard, 1991), dans d'autres cas le passage de la technique *in vivo* à la technique *in vitro* ne constitue pas en lui même la difficulté mais l'utilisation d'un extrait végétal composé d'un mélange complexe de molécules rend les interprétations difficiles voire impossibles tel était le cas au cours de la recherche de l'effet de certains extraits végétaux à propriétés sédatives, démontrées *in vivo*, vis à vis des récepteurs aux benzodiazépines par une technique du binding *in vitro*.

Tableau C Etude comparative des effets modificateurs du transit intestinal in vivo et du péristaltisme in vitro.

Produits et extraits de plantes	Test in vivo	Test in vitro
	Transi intestinal	Péristaltisme intest.
Lopéramide	1 mg/kg	//////////
Peumus boldus	160	20
Melissa officinalis	200	10

CONCLUSION

Le regain d'intérêt que connaît la phytothérapie et les médecines dites "douces" auprès des organismes publics de santé et des grands laboratoires pharmaceutiques ainsi que la constante progression de la consommation des médicaments psychotropes ont été à l'origine de notre démarche pour réaliser un travail d'évaluation pharmacologique et chimique de l'ensemble des plantes étudiées.

Tout au long de notre travail, nous avons tenté de relier les différentes étapes d'étude par une démarche fondée sur trois objectifs principaux :

Dans un premier temps, notre objectif a consisté à confirmer ou infirmer les indications thérapeutiques traditionnelles de deux plantes psychotropes et analgésiques, *Melissa officinalis* et *Passiflora incarnata* et de trois plantes antispasmodiques, *Fumaria officinalis*, *Annona reticulata* et *Peumus boldus*.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de rapprocher l'activité psychotrope de *M.officinalis* et de *P.incarnata*, démontrée par des tests pharmacologiques *in vivo*, à leur composition chimique en réalisant des fractionnements chimiques et des évaluations pharmacologiques aussi bien des fractions isolées que de marqueurs purifiés.

Dans un troisième temps, nous avons mis en place une technique *in vitro* afin d'approcher le mécanisme d'action des extraits, de spécifier leur activité et d'adapter cette technique *in vitro* à l'étude des extraits végétaux. Ainsi nous avons été amené à confronter et à comparer les résultats obtenus avec différentes plantes étudiées dans des tests *in vivo* et dans des tests *in vitro*.

Notre intérêt s'est porté sur l'intestin isolé en raison de sa richesse en trois types de récepteurs

* histaminergiques (H1) qui sont impliqués dans les phénomènes de la sédation en raison de leurs effets secondaires.

* cholinergiques qui sont impliqués dans l'activité antispasmodique.

* Opioïdes impliqués dans l'analgésie centrale et périphérique sans oublier leur effet antispasmodique et sur le transit intestinal.

Ce sont donc deux démarches qui nous ont guidé dans le choix des tests pharmacologiques *in vivo* et *in vitro* :

* Les indications thérapeutiques traditionnelles psychotropes et analgésiques pour *Melissa officinalis* et *Passiflora incarnata* et antispasmodiques pour *Melissa officinalis*, *Fumaria officinalis*, *Peumus boldus* et *Annona reticulata*.

* Les propriétés sédatives et analgésiques démontrées à l'aide de tests *in vivo* pour *Melissa officinalis* (Soulimani et coll., 1991), *Euphorbia hirta* (Lanhers et coll., 1991), *Fagara zanthoxyloides* (Bertrand, 1988), *Eschscholtzia californica* (Rolland et coll, 1991).

PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES

L'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* et l'extrait aqueux de *P.incarnata*, administrés en I.P., ont présenté chez la souris des propriétés psychotropes de nature sédative mises en évidence à l'aide de trois tests:

Le test de l'escalier (test contraignant) : l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* a entraîné une diminution des paramètres comportementaux (redressements et marches montées) à la dose de 25 mg/kg alors que cette diminution n'est obtenue qu'à la dose de 400 à 800 mg/kg pour l'extrait aqueux de *P.incarnata*.

Le test du milieu nouveau (test non contraignant) : ce test nous a permis de confirmer les activités neurotropes de type sédatives, vis-à-vis des paramètres comportementaux étudiés, exercées par l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* à la dose de 25 mg/kg et l'extrait aqueux de *P.incarnata* à la dose de 400 mg/kg.

Très souvent l'activité sédative d'une substance est associée à une activité hypnotique, c'est pourquoi dans un troisième test nous avons tenté d'évaluer l'activité inductrice et potentialisatrice du sommeil au pentobarbital par l'administration de l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* qui s'est avéré actif à la dose de 3 et 6 mg/kg dans l'induction et à 6 et 50 mg/kg dans la potentialisation, de même l'extrait aqueux de *P.incarnata* est actif sur l'induction aux doses de 400 et 800 mg/kg alors qu'il n'a aucun effet vis à vis de la potentialisation.

Nous avons complété ces résultats par l'utilisation d'un quatrième test plus spécifique à l'étude de l'activité anxiolytique (test de l'enceinte claire/obscur), car si le test de l'escalier est utilisé pour les deux activités, sédative et anxiolytique, c'est parce qu'il permet de différencier les deux activités par une diminution ou une augmentation des paramètres étudiés. Cette différenciation nous permet d'orienter notre investigation selon que l'extrait provoque une diminution ou une augmentation des paramètres.

Lorsque l'eau est utilisée comme solvant la passiflore présente des propriétés sédatives à la dose de 400 mg/kg et lorsque l'alcool est pris comme solvant, l'extrait hydroalcoolique obtenu a un profil pharmacologique anxiolytique; non seulement il ne diminue pas les paramètres comportementaux mais au contraire il les augmente dans le test de l'escalier; cette désinhibition obtenue à la dose de 400 mg/kg peut être interprétée comme un effet anxiolytique. Le solvant a donc permis un clivage de l'activité pharmacologique confirmée dans le test de la chambre claire/obscur

RECHERCHE DU SUPPORT D'ACTIVITE

La confirmation des propriétés sédatives et anxiolytique pour les extraits de ces deux plantes a suscité notre curiosité pour tenter de rechercher la relation entre ces activités pharmacologiques et la composition chimique de ces extraits, ainsi nous avons évalué l'effet de l'huile essentielle de *M.officinalis* sur les paramètres comportementaux dans le test de l'escalier, nous avons ensuite réalisé un fractionnement pour l'extrait de *M.officinalis* afin d'évaluer l'activité pharmacologique des différentes fractions isolées, nous avons également évalué l'activité pharmacologique des différents marqueurs purifiés contenus dans l'extrait de *P.incarnata*.

Les résultats obtenus, aussi bien avec l'huile essentielle ainsi que les fractions et leur association pour *M.officinalis* qu'avec les marqueurs et leur association pour *P.incarnata* n'ont permis de mettre en évidence ni une activité sédative ni anxiolytique, donc le support d'activité pour les différents extraits testés ne peut être attribué ni aux différentes fractions isolées de *M.officinalis* ni aux alcaloïdes harmaniques, aux flavonoïdes et au maltol et ethyl maltol contenus dans *P.incarnata*.

L'implication des récepteurs aux benzodiazépines dans le phénomène de la sédation ainsi que de récents travaux (Medina et coll., 1990) sur l'effet de la chrysine, flavonoïde contenu dans *Passiflora caerulea*, vis à vis de ces récepteurs nous a incité à vérifier l'effet de l'extrait aqueux de *P.incarnata*, qui a montré une activité sédative, vis à vis de ces récepteurs, nous avons ainsi utilisé un antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines (RO 15-1788) qui agit par blocage de ces récepteurs afin de vérifier le maintien de l'activité sédative de l'extrait.

Nous avons constaté que malgré l'addition de cet antagoniste l'activité de l'extrait est maintenue, ce qui exclut l'intervention des récepteurs aux benzodiazépines dans cette activité sédative de l'extrait aqueux.

La recherche des activités sédatives et anxiolytiques nous a donc permis de confirmer :

* L'activité sédative de l'extrait hydroalcoolique de *M.officinalis* lié probablement à une action synergique de plusieurs molécules renfermées dans l'extrait puisqu'aucune des fractions isolées ni leur association n'a permis de retrouver l'activité qui n'est restaurée que par l'association de la totalité des fractions isolées.

* L'activité sédative de l'extrait aqueux de *P.incarnata* qui ne doit pas impliquer les récepteurs aux benzodiazépines et qui n'est probablement pas liée à la présence des alcaloïdes harmaniques, des flavonoïdes et du maltol et ethyl-maltol.

* L'activité anxiolytique de l'extrait hydroalcoolique de *P.incarnata*, ceci permet de mettre au clair les différents travaux contradictoires quant à l'activité sédative et/ou anxiolytique de l'extrait de *P.incarnata*.

RECHERCHE DES PROPRIETES ANALGESIQUES.

Les différentes indications bibliographiques sur l'activité analgésique de *M.officinalis*, sont à l'origine de notre orientation pour la confirmation ou l'infirmité de cette activité.

Ces indications bibliographiques n'étant pas spécifiques quant à la nature de cette activité analgésique nous avons porté notre choix sur deux tests analgésiques :

* Test de la plaque chauffante qui met en jeu une douleur périphérique et sa transmission au niveau central, donc une recherche d'une analgésie de type central.

* Test du writhing ou de l'acide acétique, mettant en jeu une algie et son observation localisée au niveau périphérique donc une recherche d'une activité analgésique de type périphérique.

Nous avons démontré l'activité analgésique de type périphérique de l'extrait de *M.officinalis* mais seulement sur le test du writhing donc de type périphérique et à forte dose (800 à 1600 mg/kg).

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTISPASMODIQUE ET DE SON SITE D'ACTION.

La confirmation de l'activité analgésique de *M.officinalis*, de *Fagara zanthoxyloides* et de *Euphorbia hirta* ainsi que les indications bibliographiques sur l'activité antispasmodique de *Annona reticulata*, *Peumus boldus* et *Fumaria officinalis* ont constitué l'origine de notre recherche de l'effet de ces plantes vis à vis de trois tests :

* Le péristaltisme intestinal in vitro, ce test nous permet de localiser le site d'action soit pour préciser la nature de l'analgésie décelée in vivo soit pour confirmer ou infirmer l'indication traditionnelle.

* Le transit intestinal in vivo, pour compléter le test sur le péristaltisme et confronter les deux tests in vitro et in vivo.

* La contraction du duodénum isolé par la carbaminoylcholine, test destiné à rechercher la nature de l'analgésie des extraits étudiés in vivo ou la nature des propriétés antispasmodiques mentionnées dans la tradition.

Ainsi à l'aide de ces trois tests nous avons pu démontrer que l'extrait de *M.officinalis* n'avait aucun effet vis-à-vis des récepteurs cholinergiques, par contre son effet inhibiteur sur le péristaltisme intestinal, in vitro, à la dose de 10 mg/cuve, est corrélé à son effet inhibiteur vis à vis du transit intestinal in vivo à partir de la dose de 100 mg/kg; il est aussi probable que les effets analgésique et antispasmodique indiqués dans la bibliographie soient liés à l'effet de l'extrait vis à vis du péristaltisme de base et du transit intestinal.

L'extrait de *Peumus boldus* est connu traditionnellement pour ses propriétés antidiarrhéiques et antispasmodiques, nous avons cherché à localiser ces effets et à les confirmer : ainsi l'extrait de cette plante a montré un effet inhibiteur sur le péristaltisme intestinal in vitro corrélé, également, à son effet inhibiteur sur le transit intestinal in vivo et à son antagonisme spécifique vis-à-vis des récepteurs muscarinique in vitro par rapport à la pilocarpine, agoniste muscarinique de l'acétylcholine.

Les extraits d'*Annona reticulata* et de *Fumaria officinalis* ont conformément aux indications traditionnelles montré un effet inhibiteur sur le péristaltisme et un effet antagoniste vis à vis de la carbaminoylcholine, ce qui confirme et explique leurs effets antispasmodiques. Quant aux extraits d'*Euphorbia hirta* et de *Fagara zanthoxyloides*, leur activité analgésique confirmée in vivo n'est certainement pas liée à une activité antispasmodique.

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIHISTAMINIQUE ET DE SON SITE D'ACTION.

Les substances antihistaminiques (H1) présentent un effet secondaire de type sédatif, aussi nous avons voulu vérifier si l'effet sédatif confirmé in vivo pour certaines plantes étudiée au laboratoire n'était pas secondaire à un effet principalement antihistaminique. Ainsi nous avons recherché l'effet de *M.officinalis*, *Euphorbia hirta*, *Fagara zanthoxyloides* et *Eschscholtzia californica* vis à vis des récepteurs histaminergiques in vitro.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer l'activité principalement sédatif de ces extraits étudiés puisqu'aucun effet antihistaminique n'a été décelé.

RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANALGESIQUE, ANTIHISTAMINIQUE ET ANTISPASMODIQUE VIA LES RECEPTEURS OPIOIDES DES EXTRAITS VEGETAUX ET DE QUELQUES PRODUITS DE REFERENCES.

La confirmation des propriétés antispasmodiques de *A. reticulata* et *F. officinalis* in vitro et des propriétés analgésiques de *E. hirta*, *E. californica*, et *F. zanthoxyloides* in vivo ainsi que l'implication des récepteurs opiacés dans différents mécanismes de neuro-régulation nous ont incité à utiliser ce modèle expérimental de l'iléon isolé de cobaye afin de tenter d'expliquer le mécanisme d'action des extraits à propriétés analgésiques et de déterminer l'implication ou non des récepteurs opioïdes dans le fonctionnement des récepteurs histaminergiques et cholinergiques.

Nous avons ainsi démontré que l'activité analgésique de l'extrait d' *Euphorbia hirta*, décelée in vivo, était liée à sa fixation spécifique au niveau des récepteurs opioïdes, cette spécificité est confirmée par l'antagonisme de la naloxone vis à vis de l'extrait qui provoque au même titre que la morphine l'inhibition des contraction de l'organe stimulé électriquement à partir de la dose de 0,1 mg/cuve.

Quant à l'activité analgésique, démontrée in vivo, de *Fagara zanthoxyloides* et *Eschscholtzia californica*, elle est probablement liée à un autre mécanisme ne mettant pas en jeu les récepteurs opioïdes ou peut être mettant en jeu un sous-type de ces récepteurs absent au niveau de l'iléon de cobaye.

L'activité antispasmodique de *Annona reticulata* et *Fumaria officinalis* est liée directement à leur effet vis-à-vis des récepteurs cholinergiques, car aucun effet sur les récepteurs opioïdes n'a pu être décelé, cependant l'utilisation de l'atropine, antagoniste neurotrope des récepteurs cholinergiques nous a permis de démontrer l'implication des récepteurs opioïdes dans la libération de l'acétylcholine puisque cet antagoniste cholinergique inhibe les contractions sans être antagonisé par la naloxone ce qui exclut son action au niveau des récepteurs opioïdes. De la même façon l'utilisation des antagonistes histaminiques (H1 et H2) nous a permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs opioïdes dans le fonctionnement des récepteurs à l'histamine.

Ainsi la confrontation de ces deux méthodes, in vivo et in vitro pour l'ensemble de nos travaux nous permet de formuler plusieurs remarques :

- * **Compléter le screening des différentes techniques in vivo sur les activités sédatives et analgésiques.**
- * **Approcher et expliquer les mécanisme d'actions des différents extraits qui ont présenté une activité pharmacologique in vivo.**
- * **Rechercher la Spécificité et la reproductibilité au niveau des techniques in vitro afin de les valider pour l'étude des extraits végétaux.**
- * **Tenter de limiter l'utilisation quantitative d'animaux vivants.**

BIBLIOGRAPHIE

- AHMED M.S., HORST M.A., 1986
Opioid receptors of human placental villi modulate acetylcholine release.
Life Science., 39, 6, 535-540.
- AMBACHE N., ABOOZAR M., 1970
An inhibitory action of histamine on the Guinea-pig ileum.
Br. J. Pharmacol. 38, 229-240.
- AMBACHE N., KILLICK S.W., ABOOZAR M., 1973
Antagonism by burimamide of inhibition induced by histamine in plexus containing longitudinal muscle preparations from Guinea-pig ileum.
Br. J. Pharmacol. 48, 362-363.
- AMBUHL H., 1966
Anatomische und chemische untersuchungen an *Passiflora coerulea* L. und *Passiflora Incarnata* L.
Dissertation Nr 3830 ETH Zurich, 1966.
- ARRANG J.M., GARBANG M., SCHWARTZ J.C., 1987
Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3 receptors.
Neurosciences 23, 1, 149-157.
- ARRANG J.M., DEFONTAINE N., SCHWARTZ J.C., 1988
Phencyclidine blocks histamine H3-receptors in rat brain.
Eur. J. Pharmacol. 157, 1, 31-35.
- ARRANG J.M., GARBANG M., LANCELOT J.C., LECONTE J.M., POLLAND M., ROBBA M., SCHUNACK W., SCHWARTZ J.C., 1988
Potential interest in powerful and specific ligands for the histamine H3 receptor.
Allerg. Immunol., 20, 9, 327-329.
- ARRANG J.M., GARBANG M., LANCELOT J.C., LECONTE J.M., POLLAND M., ROBBA M., SCHUNACK W., SCHWARTZ J.C., 1989
The third histamine receptor. Highly potent and selective ligands.
Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 88, 79-81.
- ARUNLAKSHANA O., SCHILD H.O., 1959
Some quantitative uses of drug and antagonists.
B. J. Pharmac. Chemother., 14, 48-58.
- ASH A.S.F., SCHILD H.O., 1966
Receptors mediating semi action of histamine.
Brit. J. Pharmacol., 27, 427-442.
- AUF' MKOLK M., INGBAR J.C, AMIR S.M., WINTERHOFF H., SOURGENS H., HESCH R.D., INGBAR S.H., 1984
Inhibition by certain plant extracts of the binding and adenylate cyclase stimulatory effect of bovine thyrotropin in human thyroid membranes.
Endocrinology., 115, 2.
- AUF' MKOLK M., INGBAR J-C, KUBOTA K., AMIR S.M., 1985
Extracts and auto-oxidized constituents of certain plants inhibit the receptor-binding and the biological activity of Graves' immunoglobulins.
Endocrinology, 116, 5.

- AUF'MKOLK M., KOHRLE J., GUMBINGER H., WINTERHOFF H., HESCH R.D., 1984
Antihormonal effects of plant extracts : iodothyronine deiodinase of rat liver is inhibited by extracts and secondary metabolites of plants.
Hormonal Metabolism Research, 16, 188-192.
- AOYAGI N., KIMURA R., MURATA T., 1974
Studies on *Passiflora Incarnata* dry extracts. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl-maltol.
Chem. Pharm. Bull., 22, 5, 1008-1013
- BALANSARD G., 1991
Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés antibactériennes ou antiparasitaires.
1er colloque européen d'ethnopharmacologie, 22-23-24 Mars 1990, Metz, France
Ed. O.R.S.T.O.M., Bondy, France, 1991, 229-239
- BARKER L.A., 1981
Histamine H1 and muscarinic receptor antagonist activity of cimetidine lioctidine in the guinea pig isolated ileum.
Agents Actions, II, 699-705.
- BARKER L.A., EBERSOLEB J., 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., HOUGH L.B., 1983
Selectivity of four 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 the guinea pig ileum and colon.
Br. J. Pharmacol. 85, 377-381.
- BASKER P., 1978
Seasonal variation in the yields of herb and essential oil in some labiates species.
Journal of Horticultural Science, 53, 179-183.
- BELESTIN D.B., TERZIC B., SAMARDZIC R., MICIC D., 1984
Différences de l'action des enképhalines, de la bêta-endorphine et de la morphine sur les mouvements rythmiques spontanés de l'iléon isolé de lapin.
C.R.Soc.Biol., 178, 4, 392-396.
- BENNATI E. 1967
Analysis of *Passiflora Incarnata* fluid extract by thin layer chromatography.
Boll. Chim. Farm., 106, 756-760.
- BENNATI E., FEDELI E. , 1968
Gaz chromatography of the fluid extract of *Passiflora Incarnata*.
Boll. Chim. Farm., 107, 716-720.

BENNATI E., 1971

Quantitative determination of harmane and harmine in *Passiflora Incarnata*.
Boll. Chim. Farm., 110, 664-669.

BERTRAND I., 1988

Etude pharmacologique d'une Rutacée de la pharmacopée traditionnelle africaine, *Fagara zanthoxyloides* W.
Doctorat de l'Université de Metz.

BEZANGER B., 1980

Plantes médicinales des régions tempérées.
Maloine, 1980

BHARGAVA H.N., PILLAI N.P., 1985

Stereospecific opiate receptors in the actions of thyrotropin releasing hormone and morphine on gastrointestinal transit.

Life Sc. 36, 1, 83-88.

BIRDSALL N.J.M., BURGESS A.S.V., HULME E.C., WONG E.H.F., 1983

The effect of p-chloromercuribenzoate on muscarinic receptors in the cerebral cortex.
Br. J. Pharmacol., 80, 187-196.

BIRDSALL N.J.M., HULME E.C., 1985

Multiple muscarinic receptors : further problems in receptor classification.
in : Trends in Autonomic Pharmacology, ed.

Kalsner, S. Vol. 3, pp. 17-34. London : Taylor and Francis.

BLACKBURN T.P., CROSS A.J., HILLE C., SLATER P., 1988.

Autoradiographic localization of delta opiate receptors in rat and human brain.
Neuroscience, 27, 2, 497-506

BLACK J.W., DUNCAN W.A.M., DURANY C.J., GAVIELLIN C.R., PARSONS E.M., 1972.

Definition and antagonism of histamine H₂ receptor.

Nature, 236, 385-390.

BOISSIER J.R., DUMONT C., MALEN C., 1956

Action analgésique expérimentale du morpholyl-N-tertio-octylacétamide (TR 315)
Anesthésie et Analgésie, 13, 569-574.

BOISSIER J.R., SIMON P., ZACZINKA M., FICHELE J., 1972

Etude psychopharmacologique expérimentale d'une nouvelle substance psychotrope, la 2-ethylamino 6 chloro 4-methyl 4-phenyl 3-1 Benzoxazine.

Thérapie XXVI, 325-338.

BOVET D., STAUB A.M., 1937

Action protectrice des éthers phénoliques au cours de l'intoxication histaminique.

C.R. Soc. Biol., 124, 547-549.

BRIESKORN C.H., EBERHARDT K.H., BRINER M., 1953

Biogenetische Zusammenhänge Zwischen oxytriterpensäuren und athenischen Öl bei einigen pharmazentisch wichtigen Labieten 1953.

Archiv. der Pharmazie, 286/58, 10, 501-506.

Bull. Off. N°90/22 bis, 1990

Spécialités pharmaceutiques à base de plantes.

Ministère des Affaires Sociales et de l'Emploi.

BULLINGTON., 1897

Passion flower in epilepsy and other neuroses.

Nashville J. Med. Surg.

CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M., BUSSON A., 1932

L'action chorélectique des labiées.

Compte rendu de la société de biologie, 59, 4, 275-276.

COSTA E. et GUIDOTTI A., 1979

Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines,

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 19, 531-545.

CREESE I., SOLOMON H.S., 1975

Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea pig intestine.

J.Pharmacol.Exp.Ther., 1, 205-219.

CROSS A.J., HILLE C., SLATER P., 1987

Substraction autoradiography of opiate receptor subtypes in human brain.

Brain research, 418, 2, 343-348

CUCHE H., ROUX J.M., 1980

Aspects biochimiques de la douleur,

in : Neurobiochimie clinique, 93-97, ZARIFIAN E. (Ed)

L'actualité en neurologie (1), Sandoz, Rueil Malmaison.

DAVIS W.M., 1962

Day-night periodicity in pentobarbital responses of mice and the influence of psychological conditions, *Experientia* **18**, 235-236.

DELLA LOGGIA R., TUBARO A., REDAELLI C., 1981

Valutazione dell'attività sul S.C.N. del topo di alcuni estratti vegetali e di una loro associazione. *Riv. Neurol.*, **51**, 297-310.

DELAY J., DENIKER P., HARL J.M., 1952.

Utilisation en thérapeutique psychiatrique d'une phénothiazine d'action centrale élective. *Ann. Med. Psychol.*, **110**, 112.

DONNERER J., LEMBECK F., 1985

New models for the evaluation of opioid effects in the guinea pig ileum. *Br.J.Pharmacol.*, **85**, 1, 61-64.

DOODS H.N., MATHY M.J., DAVIDESCO D., VAN CHARLDROP K.J., DE JOUGE A., VAN ZWIETEN P.A., 1987

Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors.

J. Pharmacol, Exp, ther., **242**, 257-262.

EGLER R.M., WHITING R.L., 1986

Differential affinities of muscarinic antagonists at ileal and atrial receptors. *Br.J. Pharmacol.*, **87**, pp 33.

ENNIS C., WYLLIE M.G., 1984

Evidence for functionally distinct mu receptors modulating acetylcholine release. *Neuropeptides*, **5**, 1-3, 109-112.

FILE S.E., PELLOW S., 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., PELLOW S., 1986

Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist : RO 15-1788,

Psychopharmacology, **88**, 1-11.

FILE S.E., PELLOW S., 1987

Behavioral pharmacology of minor tranquilizers, *Pharmac. Ther.*, **35**, 265-290.

- FILE S.E., DINGEMANSE J., FRIEDMAN H.L., GREEBLATT D.J., 1986
Chronic treatment with RO 15-1788 distinguishes between its benzodiazepine antagonist, agonist and inverse agonist properties,
Psychopharmacology, 89, 113-117.
- FJALLAND B., 1979
Evidence for the existence of another type of histamine H₂-receptor in guinea pig ileum.
J. Pharmacol., 31, 50-51.
- FOLKOW B., MAEGER K., KAHLSON G., 1948
Observations on reactive hyperemia as related to histamine on drugs antagonising vasodilatation induced by histamine and on vasodilator properties of adenosine triphosphate.
Act. Physiol. Scand., 15, 264-278.
- FORSTER H.B., NIKLAS H., LUTZ S., 1980
Antispasmodic effects of some medicinal plants.
Planta Medica, 40, 4, 309-319.
- FOURNIER P., 1948
Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France.
Editions Paul Lechevalier.
Encyclopédie biologique, 2, 499-500.
- FRIEDMAN A.H., WALKER C.A., 1968
Circadian rhythms in rat mid-brain and caudate nucleus biogenic amine levels,
J. Physiol., 197, 77-85.
- FUJINUMA S., KAMIKAWA Y., SHIMO Y., 1985
Pharmacological characterization of the histamine receptor in the isolated muscularis mucosae of the guinea pig oesophagus.
Br.J. Pharmacol., 86; 3, 619-625.
- GAION R.M., TRENTO M., 1984
The role of adrenergic, purinergic and opiate receptors in the control of prostacyclin-induced contraction in the guinea pig ileum.
Arch.Int.Pharmacodyn.Ther., 271, 1, 33-44.
- GARNIER D., BEZANGER B., 1961
Ressources médicinales de la flore française.
Vigot, Paris, 1464 p.
- GARNIER D., BEZANGER B., DEBRAUX., 1961
" *Melissa Officinalis L. Melisse* ". *Ressources médicinales de flore française*.
Vigot, Paris, 2, 1191-1193.
- GAVASHELI N.M., 1970
Flavonoids of the lemon plant *Passiflora Incarnata*.
Soobshsh. Acad. Nauk. SSR, 60, 353-356.

- GAVASHELI N.M., 1973
Oxycoumarins of *Passiflora Incarnata*.
Khim. Prir. Soedin., 9, 552.
- GAVASHELI N.M., MONIAVA I.I., ERISTANI L.I., 1974
Flavonoids from *Passiflora Incarnata*.
Khim. Prir. Soedin., 10, 95-96.
- GEORGE H., RUGGY G.H., SMITH C.S., 1940
A pharmacological study of the active principle of *Passiflora Incarnata*.
J. AM. Pharm. Ass., 29, 245-249.
- GERARDY J., 1982
Psychopharmacology du Gaba.
J. Pharm. Belg., 37, 435-441.
- GIACHETTI A., GIRALDO E., LADINSKY H., MONTAGNA E., 1986
Binding and functional profiles of the selective M1 muscarinic receptor antagonists trinexyphenidyl and sicyclamine.
Br.J. Pharmacol., 89, 83-90.
- GIAGNONI G., PAROLARO D., CASIRAGHI L., CREMA G., SALA M., ANDREIS C., GORI E., 1984
Dermorphin interaction with peripheral opioid receptors.
Neuropeptides, 5, 1-3, 157-160.
- GLOTZBACH B., RIMPLER H., 1968
Chromatographic study on flavonoid of *P. Incarnata*.
P. Quadrangularis et *P. Pulchella*, 16, 1-7.
- GOODMAN L.S., GILMAN A., 1975
The pharmacological basis of therapeutics.
Mac Milan, New-York.
- GOYAL R.K., RATTAN S., 1978
Neurohumeral, hormonal and drugs receptors for the lower oesophagal lower sphincter.
Gastroenterology 74, 598-619.
- GYANG E.A., KOSTERLITZ H.W., 1966
Agonist and antagonist actions of morphine like drugs on the guinea pig isolated ileum.
Br.J.Pharmacol.Chemother. 27, 514-527.
- HAMMER R., 1979
Bindrungsstudien mit pirenzepin an muskarinischen rezeptor.
In : Die Behandlung der Ulcus pepticum mit pirenzepin.
Bericht uber das erste internationale pirenzepin symposium.
Demeter Verlag.
- HAMMER R., 1980
Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors.
Nature, 283, 90-92.

HAMMER R., GIACHETTI A., 1982

Muscarinic receptor subtypes : M1 et M2 biochemical and functional characterization.
Life Sciences, 31, 2991-2998.

HAMMER R., GIAGHETTI A., 1984

Selective muscarinic receptor antagonists
TIPS, 5, 18-21.

HAMMER R., GIRALDO E., SCHIAVI G.B., MONFERINI E., HADINSKI H., 1986

Binding profile of a novel cardioselective muscarine receptor antagonist AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat.
Life Science, 38, 1653-1662.

HARVEY S.C., 1975

Hypnotics and sedatives,
in : Pharmacological basis of therapeutics, 17, 345-374,
Goodman A.G et L.S Gilman (Eds.), Mac Millan, New York.

HAYES A., KELLY A., 1985

Profile of activity of kappa receptor agonists in the rabbits deferens.
Eur.J.Pharmacol., 110, 3, 317-322.

HAYES A., SHEEHAN H.J., TYERS M.B., 1985

Determination of the receptor selectivity of opioid agonists in the guinea pig ileum and mouse vas deferens by use of B-funatrexamine.
Br.J.Pharmacol., 86, 899.

HERRMANN E.C., 1954

ber den gerbstoff der Melissenblarer.
Archiv. der Pharmazie, 3, 142-147.

HIRSCHOWITZ B.I., HAMMER R., GIACHETTI A., KEIRNS J.J., LEVINE R.R., 1984.

Subtypes of muscarinic receptors.
Trends In Pharmacological Sciences.
Elsevier, Amsterdam, vol 5, 1-103

HO I.K., YAMAMOTO I., LOH H.H., 1975

A model for the rapid development of dispositional and functional tolerance to barbiturates,
Europ. J. Pharmacol., 30, 164-171.

HO. I.K., HARRIS R.A., 1981

Mechanism of action of barbiturates,
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21, 85-111.

HUGHES J., 1975

Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.
Nature, 258, 577-579.

HUGHES J., 1975

Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine.
Brain Res., 88, 295-308.

HUGHES J., KOSTERLITZ H.W., LESLIE F.M., 1975

Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist narcotic analgesics.
Br.J.Pharmacol., 53, 371-381.

HULTIN E., 1965

Partition, coefficients of ether-extractable passionflower alkaloids.
Acta. Chemica. Scandinavica, 19, 1431-1434.

IBN AL BAYTAR traduit par LECLERC L., (1877-1883)

Traité des simples.

Ed. Imprimerie Nationale, Paris, Fr. 1, 175, 478pp
3, 183-185, 492pp.

ICHINOSE M., STRETTON C.D., SCHWATZ J.C., BARNES P.J., 1989

Histamine H3- receptors inhibit cholinergic neurotransmission in the guinea pig airways.
Br. J. Pharmacol., 97, 1. 13-15.

JOHNSON S.M., COSTA M., FURNESS J.B., 1986

Morphine withdrawal in the guinea pig ileum is confined to one electrophysiologically defined class of myenteric neurone.
NIDA. Res. Monogr., 75, 571-574.

JOHNSON S.M., COSTA M., HUMPHREYS C.M, SHEARMAN R., 1987

Inhibitory effects of opioids in a circular muscle-myenteric plexus preparation of guinea pig ileum.
Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 336, 4, 419-424;

JOHNSON M.A., HILL R.G., HUGHES J., 1986

Comparison of the effects of calcium concentration on mu and kappa agonist actions in the guinea pig ileum.
NIDA Res.Monogr., 75, 69-72.

JOHNSON M.A., HILL R.G., HUGUES J., 1988

A possible role for prostaglandins in the expression of morphine dependence in the guinea pig ileum.
Br.J.Pharmacol., 93, 932-936.

JORI A., BIANCHETTI A., PRESTINI P.E., 1970

Relations between barbiturates brain levels and sleeping time in various experimental conditions,
Biochem. Pharmacol., 19, 2687-2694.

KEMPER H., 1982

Antihormonal effects of plants extracts THS and prolactin suppressing properties of lithospermum officinale and other plants.

Planta Medica, 45, 78-86.

KEMPF E., MANDEL P., OLIVERO A., PUGLISI-ALLEGRA S., 1982

Circadian variations of noradrenalin, 5-hydroxytryptamine and dopamine in specific brain areas of C 57BL/6 and BALB/C mice.

Brain res., 232, 472-478.

KENNY B.A., MICHEL A.D., WHITING R.L., 1985

The effect of dicyclomine and trifluoperazine on muscarine receptor.

Br. J. Pharmacol. 86, 451.

KILBINGER H., 1978.

Muscarinic modulation of acetylcholine release from the myenteric plexus of the guinea pig small intestine.

in : Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology. ed. Jenden, D.J., pp. 401-410. New York : Plenum Press.

KILBINGER H., 1984.

Facilitation and inhibition by muscarinic agonists of acetylcholine release from guinea pig myenteric neurones : mediation through different types of neuronal muscarinic receptors.

TIPS, 5, (Suppl), 49-52.

KILBINGER H., HALIM S., LAMBRECHT G., WEILER W., WESSLER I., 1984

Comparison of affinities of muscarinic antagonists to pre- and post-junctional receptors in the guinea pig ileum.

Eur. J. Pharmacol., 103, 313-320.

KILBINGER H., NAFZIGER M., 1985

Two types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 328, 304-309..

KILBINGER H., SCHWORER H., STEIN A., SUB K.D., 1988

Control of acetylcholine release and intestinal motility by subtypes of muscarine receptors.

In : Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity in Nervous Systems.ed. Spatz, H and Hertting, G. pp. 99-110.

Berlin, Heidelberg, New york : Springer-Verlag.

KOHRLE J., AUF'MKOLK M., HESCH R.D., WINTERHOFF H., SOURGENS H., GUMBINGER H.G., 1985

Plant inhibitors of iodothyronine deiodinases.

Biochem. Soc. Trans., 324.

KOSTOWSKI W., MALATYNSKA E., PLAZNIK A., DYR W., DANYSZ W., 1986

Comparative studies on antidepressant action of alprazolam in different animal models.

Pol. J. Pharmacol., 38, 471-481.

KUBO T., FUKUDA K., MIKAMI A., MACODA P., THAKAHASHI H., MISHIMA M., HAGA K., HAGA T., ICHIYAMA A., KANGAWA K., KOJIMA M., MATSUO H., HIROSE T., NUMA S., 1986

Cloning, sequencing and expression of complementary D.N.A encoding the muscarinic acetylcholine receptor.

Nature. 323, 411-416.

KUCERA L.S., HERMANN E.C., 1967

Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae).

" I tannin of *Melissa Officinalis* "

Proceedings of the society for experimental biology and medicine 124, 865-869.

LADINSKY H., GIRALDO E., SCHIAVI G.B., MONFERINI E., HAMMER R., 1987

Biochemical characteristics of the cardioselective muscarinic antagonist AF- DX 116.

Fed. Proc. 46, 2528-2529.

LANHERS M.C., 1988

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

Doctorat de l'Université de Metz, 629 pp

LANHERS M.C., FLEURNTIN J., CABALION P., ROLLAND A., DORFMAN P., MISSLIN R., PELT J.M., 1990

Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L. : sedative and anxiolytic properties.

Journal of Ethnopharmacology, 29, 189-198

LANHERS M.C., SOULIMANI R., FLEURENTIN J., DORFMAN P., 1991

Mise en évidence *in vivo* et *in vitro* de l'activité analgésique d'*Euphorbia hirta* L.

Phytotherapy, 34/35, 9-12

LANHERS M.C., FLEURENTIN J., DORFMAN P., MORTIER F., PELT J.M., 1991

Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of *Euphorbia hirta* L.

Planta Medica, 57, 3, 225-232

LANHERS M.C., JOYEUX M., SOULIMANI R., FLEURENTIN J., SAYAG M., MORTIER F., YOUNOS C., PELT J.M., 1991

Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plants of chile, *Peumus boldus*.

Planta Medica, 57, 2, 105-110

LANHERS M.C., SOULIMANI R., FLEURENTIN J., DORFMAN P., 1991

Activité analgésique d'*Euphorbia hirta* L.

1er colloque européen d'ethnopharmacologie, Metz 22-25 mars 1990, pp 313-315

Ed. O.R.S.T.O.M., Bondy, France, 1991

LECLERC H., 1920

" Note sur le traitement de l'insomnie consécutive à la grippe par la Passiflore ".

Bull. Mem. Soc. Thérapeut., séance du 12 mai 1920.

Bull. Sc. Pharmacol., 27, 548-553.

LECOQ R., CHAUCHARD P., MAZOU H., 1964

Etude chromaximétrique expérimentale de quelques agents psychotropes et de leur action sur les effets nerveux de l'alcool éthylique.

Thérapie, XIX, 967-974.

LEVINE R.R., BIRDSALL N.J., GIACHETTI A., HAMMER R., IVERSEN L.L., JERRDEN D.J., NORTH R.A., 1986

Subtypes of Muscarinic receptors II.

Trends in pharmacological sciences. Ebevier Amsterdam. Vol 7.

LIAO C.S., FREER R.J., 1984

Evaluation of opioid receptor heterogeneity in the isolated, field stimulated rat ileum.

Proc. West Pharmacol. Soc., 27, 439-442.

LOHDEFINK J., 1976

Untersuchungen zur flavonoiführung einiger Passiflora arten.

DTSCHE. Apoth. Ztg. 116, 557-560.

LOHDEFINK J., KATING H., 1974

Zur frage des vorkommen von harmanalkaloiden in passiflora arten, harmane alkaloid of Passiflora species.

Planta Medica, 25, 102-104.

LORD J.A.M., WATERFIELD A.A., HUGHES J., KOSTERLITZ H.W., 1977

Endogenous opioid peptides : multiple agonists and receptors.

Nature, 267, 495-499.

LUTOMSKI J., WROCINSKI T., 1960

Propriétés pharmacodynamiques des préparations de la plante *Passiflora incarnata* L. Influence des composants alcaloïdes et flavonoïdes sur la valeur pharmacodynamique du brut.

Biolely Instytut Roslin Leczniczck, 6, 176-184.

LUTOMSKI J., 1960

Isolation der wichtigsten alkaloid aus dem krante der passionblum (*P. Incarnata*)

Biolely Instytut Roslin Lecznicznych, 6, 209-219.

LUTOMSKI J., 1961

Die bedeutung der passions blume in der heilKunde.

Pharmazie in unserer Zeit, 2, 45-49.

LUTOMSKI J., KOWALEWSKI Z., DROST K., SCHMIDT K., 1967

Simple carboline alkaloids I. Thin-layer chromatography harman alkaloids occuring in plant material and in preparations.

Herba. Pol., 13, 44-52. LUTOMSKI J. Adamska M., 1968

Isolation of vitesin from flavonoid fraction of *Passiflora incarnata* L.

Herba. Pol., 14, 249.

- LUTOMSKI J., ADAMSKA M., JARUZELSKI M., 1968
Simple carboline alkaloids comparative analysis of the basic components of *Passiflora incarnata* L. grown in greenhouses and open fields.
Herba. Pol., 14, 139-147.
- LUTOMSKI J., KOWALEWSKI Z., DROST K., KUCHARSKA M., 1968
Simple carboline alkaloids IV. A methode of harman and harmine determination in plant material.
Herba. Pol., 14, 23-28.
- LUTOMSKI J., MALEK B., STACHOWIAK Z., 1974
Etudes pharmacologiques du materiel brut du genre *Passiflora incarnata* L.
Planta Medica, 26, 311-317.
- LUTOMSKI J., MALEK B., RYBACKAL L., 1975
Pharmacological investigation of the raw materials from *Passiflora incarnata* germs.
Planta Medica, 27, 112-121.
- LUTOMSKI J., SEGIET E., KUJAWA., 1980
Chemical composition of *Passiflora incarnata* L.
Herba. Pol., 26, 1, 77-84.
- MAGNUS R., 1904
Versuche an uberlebender dundarm von sauetieren.
Arch. Germ. Phys., 102, 123-349.
- MANARA L., BIANCHI G., FERRETI P., TAVANI A., 1986
Inhibition of gastrointestinal transit by morphine in rats results primarily from direct drug action on gut opioid sites.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 237, 3, 945-949.
- MARTIN W.R., EADES C.G., FRASER H.F., WIKLER A., 1964
Use of hindhimb reflexes of the chronic spinal dog for comparing analgesics.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 144, 8-11.
- MARTIN W.R., EADES C.G., 1964
A comparison between acute and chronic physical dependence in the chronic spinal dog.
J.Pharmacol.Exp.Therap., 164, 385-394.
- MARTIN W.R., 1967
Opioid antagonist.
Pharmacol.Rev., 19, 463-521.

MARTIN W.R., EADES C.G. and THOMPSON J.A., THOMPSON. W.O., FLANARY H.G., 1974
Morphine physical dependence in the dog.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 189, 759-771.

MARTIN W.R., EADES C.G., THOMPSON J.A., HUPPLER R.E., GILBERT P.E., 1976
The effect of morphine and nalorphine like drugs in the non dependent and morphine dependent chronic spinal dog.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 197, 3, 517-532;

MARTIN W.R., 1979
History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists.
Br.J.Clin.Pharmacol., 7, 2735-2795.

MARTIN W.R., 1984
Pharmacology of opioids.
Pharmacol.Rev., 35, 283-323.

MASAKOVA N. SZ., TSEREVATUY B.S., TROFIMENKO S.L., REMMER G.S., 1979
The chemical composition of volatile oil in lemon-balm as an indicator of therapeutic use.
Planta Medica, 36.

MC KNIGHT A.T., CORBETT A.D., KOSTERLITZ H.W., 1983
Increase in potencies of opioid peptides after peptidase inhibition.
European Journal of Pharmacology, 86, 393- 402.

MC KNIGHT A.T., CORBETT A.D., MARCOLI M., KOSTERLITZ H.W., 1984
Hamster vas deferens contains delta opioid receptors.
Neuropeptides, 5, 1-3, 97-100.

MC KNIGHT A.T., PATERSON S.J., CORBETT A.D., KOSTERLITZ W., 1984
Acute and persistent effects of beta-fumaltrexamine on the binding and agonist potencies of opioid in the myenteric plexus of the guinea pig ileum.
Neuropeptides, 5, 1-3, 169-172.

MEDINA J.H., PALADINI A.C., WOLFMAN C., DE STEIN M.L., CALVO D., DIAZ L.E., PENNA C., 1990
Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties.
Biochemical pharmacology, 40, 10, 2227-2231

MILLER L.G., GREENBLATT D.J., SHADER R.I., 1987
Benzodiazepine receptor binding : influence of physiologic and pharmacologic factors,
Biopharm. Drug. Disposition, 8, 103-104.

MISSLIN R., 1983
Contribution à l'étude des conduites néotiques chez la souris.
Thèse Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

MISSLIN R., HERZOG F., KORCH B., ROPARTZ P., 1982
Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse.
Psycho-neuro-endocrinology, 7, 217-221.

- MOLINENGO R., RICCI-CANALEROS S. 1970
The staircase maze "and the simple" staircase in the analysis of the psychopharmacological action of CNS depressant.
Pharmacology, **4**, 169-178.
- NAUROY J., 1954
Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine traditionnelle.
Thèse pharmacie, Université de Paris. Paris.
- NEU R. 1954
Inhaltsstoffe der Passiflora Incarnata.
Arzneimittel. Forschung, **4**, 292, 601.
- NEU R. 1954
Inhaltsstoffe der Passiflora Incarnata.
Arzneimittel. Forschung, **4**, 601-606.
- NEU R. 1956
Inhaltsstoffe der Passiflora Incarnata.
Arzneimittel. Forschung, **6**, 94-98.
- NEUGEBAUER H., 1949
Components of Passiflora with sedative action.
Pharmazie, **4**, 176-178.
- NORDBERG A., WAHLSTROM G., 1977.
Effect of long term forced oral barbital administration on endogenous acetylcholine in different regions of rat brain.
Eur. J. Pharmacol. **43**, 237-242.
- NORTH R.A., SLACK B.E, SURPRENANT A., 1985
Muscarinic M1-and M2-receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea pig enteric nervous system.
J. Physiol., **368**, 435-452.
- NORTH R.A. TOKIMASA., 1983
Depression of calcium-dependent potassium conductance of Guinea pig myenteric neurones by muscarinic agonists.
J. Physiol., **342**, 253-266.
- OISHI R., ITOH Y., NISHIBORI M., SACKI K., 1989
Effects of the histamine H3-agonist. (R)-alpha-methylhistamine and the antagonist thioperamide on histamine metabolism in the mouse and rat brain.
J. Neurochem., **52**, 5, 1388-1392.
- OKAMOTO M., 1978
Barbiturates and alcohol : comparative overviews on neurophysiology and neurochemistry,
in : *Psychopharmacology : A generation of progress*, 1575-1590,
Lipton M.A., A. Dimascio, K.F. Killam (Eds), New York Raven.
- OWEN D.A., 1975
The effects of histamine and some histamine like agonists on blood pressure in the rat.
Br. J. Pharmacol., **55**, 173.

PARIS R., 1981

" Melisse, *Melissa Officinalis* "

Abrégé de matière médicale.

Ed.Massen, Paris, 1, 231.

PARIS R., MOYSE H., 1967

Matière médicale.

Masson et Cie, Paris, 490p.

PASSOUANT P., BILLIARD M., 1978

Hypno-sédatifs

in : Thérapeutique médicale, 226-233, Fabre J. (Ed),

Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

PATON W.D.M., 1954

The response of the guinea pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes.

Proceedings of the physiological.

Society, 10-11, pp 40-41.

PATON W.D.M., 1956

The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea pig ileum.

Brit.J.Pharmacol., 11, 119-127.

PECKOLT., 1909

Untersucht wurden *P.alata*, *P.Edulis*, *P.Actinea* und *P.Eichleriana* in allen fand sich maraengin, in *P.Edulis* aber kein passiflorin.

Ber.Dt.Pharm.Ges., 19, 343.

PELLECUER J., ENJALBERT F., BESSIERE J.M., PRIVAT G., 1981

Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Melisse.

Melissa Officinalis L. (Lamiacées)

Plantes médicinales et phytothérapie, tome XV, 3, 149-153.

PERALTA E.G., WINSLOW J.W., PETERSON J.L., SMITH D.H., ASHKENAZI A., RAMACHANDRAN

J., SCHIMERHIK M.I., CAPON D.J., 1987

Primary structure and biochemical properties of a M2 muscarinic receptor.

Science 236, 600-605.

PERROT E., 1943

Matière première du règne végétal.

Massen, Paris 2304.

PERT C.B., SNYDER S.M., 1973

Opiate receptor : Demonstration in nervous tissue.
Science, 179, 1011-1014.

PHARES D.L., LINDSAY, 1867

Passiflora Incarnata a remedy fortanes.
The Richmond Medical Journal.

PHARMACOOPEE Francaise, 1976

IXe édition.

PHARMACOOPEE Homéopathique, 1981

Vol 2.

POLC P., BONETTI E.P., SCHAFFNER R., HAEFELY W., 1982

A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist RO 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, carbolines and phenocarbitone,
Naunyn-Schmiedeberg's Pharmacol., 321 , 260-264.

PORSOLT R.D., LENEGRE A., AVRIL I., LANCRENON S., STERN L., DOUMONT G., 1987

Psychopharmacological profile of new cognition enhanung agent exifene in the mousse.
Arznein. Forsch/Drug res, 37, 1, 4 , 388-393.

QUERCIA V., 1978

Identification and determination of vitexin and isovitexin in *Passiflora Incarnata* extracts.
J. Chromatography, 161, 396-402.

RACZ-KOTILLA E., RACZ G., JOZSA J., 1980.

Activity of some species belonging to labiatae on the central nervous systems of mice.
Herba Hungarica, 19 ,1 , 49-53.

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, 1984

Benzodiazepine receptors.
Neuropharmacology, 23, 2B , 233-242.

ROLLAND A., 1984

Standardisation des différents paramètres influants sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique chez la souris swiss.

DEA de toxicologie, Université de Metz, C.S.E., 49p.

ROLLAND A., 1988

Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'*Eschscholtzia californica* Cham.

Doctorat de l'Université de Metz, 441 pp.

ROLLAND A., FLEURENTIN J., LANHERS M.C., YOUNOS C., MISSLIN R., MORTIER F., PELT J.M., 1991

Behavioral effects of an american traditional plant : *Eschscholtzia Californica* Cham., (*Papaveraceae*) : Sedative and anxiolytic properties.

Planta Medica, 57, 3, 212-217.

ROLLAND A., LANHERS M.C., YOUNOS C., FLEURENTIN J., MISSLIN R., MORTIER F., PELT J.M., 1991

Effet de l'effet sédatif et anxiolytique d'*Eschscholtzia californica* CHAM.

1er colloque européen d'ethnopharmacologie, Metz 22-25 mars 1990, pp 309-312.

Ed. O.R.S.T.O.M. Bondy, France, 1991

ROLLAND A., SOULIMANI R., MARTIN A.M., YOUNOS C., FLEURENTIN J., 1988

Recherche de quelques activités pharmacologiques traditionnelles d'*Annona muricata* et d'*Annona reticulata* chez l'animal.

Séminaire TRAMIL 3, 29 Nov.- 2 Déc.1988, La Havane, Cuba.

RUBINSTEIN R., COHEN S., 1985

Histamine mediated acetylcholine release in the guinea pig ileum.

European J. Pharmacol., 111, 245.

RUBINSTEIN R., FISCHER A., COHEN S., 1985

Antihistaminic properties of AF-14, an experimental quinuclidine derivative : discrimination between two histaminergic sites in both guinea pig ileum and bladder.

Eur. J. Pharmacol., 118, 3, 263-271.

RUFF F., DRAY F., ALLOUCHE G., SANTAIS M.C., FOUSSARD C., DUBOIS F., PARROT J.L., 1976

Etude de la libération des prostaglandines au cours du choc anaphylactique chez le cobaye.

C.R. Acad. Sc., 282, 1289-1292.

SCHENCK B., 1944

Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Melisse.

Archiv. der Pharmazie, 288, 1-9.

SCHILLCHER H., 1968

Flavone C- glycosides in *Passiflora Incarnata*.

Z. Naturforsch., 23, 1393.

SCHINTGEN M., 1975

Etude de la teneur en vitamine B1 et B2 de quelques plantes à usage médicinal.

Plantes médicinales et phytothérapie, 9, 2, 107-117.

- SHOOK J.E., LEMCKE P.K., GEHRIG C.A., HRUBY R.J., BURKS T.F., 1989
Antidiarrheal properties of supraspinal mu and delta and peripheral mu, delta and kappa.
Opioid receptors : inhibition of diarrhea without constipation.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 249, 1, 83-90.
- SIEGMUND J. 1957
J. Pharmacol. Exptl. Ther., 119, 453.
- SIMIAND J., KEANE P.E., MOORE M., 1984
The staircase test in mice : a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents.
Psychopharmacology, 84, 48-53.
- SIMON E.J., 1973
Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic 3H-etorphine to rat brain homogenates.
Proc.Nath.Acad.Sci., 70, 1947-1949.
- SIMON P., 1979
Anxiolytiques
in : Pharmacologie clinique :
bases de la thérapeutique 2, 1621-1631,
- SIMON P., 1985
Intéactions hypnotiques-psychotropes : quelques aspects de pharmacologie expérimentale.
J. Pharmacol. 16, 1 ,1-5.
- SIMON P., CHERMAT R., DOARE L., BOURIN M, FARINOTTI R., 1982
Interactions imprévues de divers psychotropes avec les effets du barbital et du pento barbital chez la souris.
J. Pharmacol., 13, 2 , 241-252.
- SLATER P., CROSS A.J., 1986
Autoradiographic distribution of dynorphin 1-9 binding sites in primate brain.
Neuropeptides, 8, 1, 71-76
- SLATER P., CROSS A.J., HEWITT L., SAVAGE W.J., 1989
Autoradiographic visualization of kappa opioid receptors with labelled dynorphins in guinea pig brain.
Journal of receptor research, 9, 2, 171-180
- SMITH C.B., 1987
New approaches to the evaluation of opioid agonists and antagonists upon the isolated electrically stimulated mouse vas deferens preparation.
NIDA Res.Monogr., 76, 288-294.
- SMITH C.B., BENNETT-KELLY L., WOODS J.H., 1984
Comparison of " selective " opiate receptor antagonists on the isolated mouse vas deferens.
Neuropeptides, 5, 1-3, 161-164.
- SMITH C.F., 1984
Morphine, but not diacetylmorphine (heroina) possess opiate antagonist activity in the mouse vas deferens.
Neuropeptides, 5, 1-3, 173-176.

SMITH C.F., WALDRON C., BROOK N.A., 1988

Opioid receptors in the mouse ileum.
Arch.Int.Pharmacodyn.Ther., 291, 122-131.

SNYDER S.H., 1984

Drugs neurotransmitter receptors in the brain.
Science, 224, 22-31.

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, CSE, 104p.

SOULIMANI R., FLEURENTIN J., MORTIER F., MISSLIN R., DERRIEU G. et PELT J.M., 1991

Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa Officinalis* in the mouse.
Planta Medica. 57, 2, 105-109.

SOULIMANI R., FLEURENTIN J., MORTIER F., MISSLIN R., DERRIEU G., PELT J.M., 1991

Activité neurotrope de l'extrait hydroalcoolique de *Melissa officinalis* L. chez la souris.
1er colloque européen d'ethnopharmacologie, Metz 22-25 mars 1990.
Ed. O.R.S.T.O.M., Bondy, France, 1991, pp 316-318

SOULIMANI R., FLEURENTIN J., MORTIER F., MISSLIN R., DERRIEU G., PELT J.M., 1991

Sedative and anxiolytic effects of aqueous and hydroalcoholic extract of *Passiflora incarnata* L. in the mouse.
Soumis à Planta Medica

SPERONI E., MINGHETTI A., 1988

Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora Incarnata*.
Planta Medica, 17, 488-491.

STAPLETON., 1904

The action of *Passiflora Incarnata*.
Detroit Med. J.

STOLERMAN L.P., H.S. GARCHA H.S., ROSE I.C., 1986

Midazolam cue in rats : effects of RO 15-1788 and picrotoxin,
Psychopharmacology, 86, 183-188.

TAKEMORI A.E., MASOKO I., PORTOGHESE P.S., 1986

The mu, kappa and delta properties of various opioid agonists.
European.J.Pharmacol., 123, 357-361.

TATEOKA Y., KIMURA T., WATANABE K., YAMAMOTO I., HO I.K., 1987

Potentiation of barbiturate, induced substituted derivatives of phenobarbital, amobarbital and thiopental in mice.
Chem. Pharm. Bull. 35, , 2 , 778-794.

TERENIUS L., 1973

Characteristics of the receptors for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain.
Acta pharmacol.Toxicol., 33, 377-384.

THIEME K., 1973

Über das vorkommen von flavonoiden in *Melissa Officinalis* L.
Pharmazie, 28, 1, 69-70.

TITEL G., WAGNER H., ROS R., 1982

Iber die chemische zusammensetzung von Melissenolen.
Planta Medica, 46, 91-98.

TREUDELENBURG P., 1915

Physiologische und pharmakologische Versuche uber die Dunndarmperistaltik.
Archiv.F.Experiment.Path.U.Pharmakol., 81, 55-129.

TRZECIAKOWSKI J.P., 1987

Inhibition of guinea pig ileum contractions mediated by a class of histamine receptor resembling the M3 subtype.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 243, 3, 874-880.

UHL D., 1989

Histamine, histamine receptors and antihistaminics.
Med pharm., 12, 5, 138-140.

UNGAR G., PARROT J.L., BOVET D., 1937

Inhibition des effets de l'histamine sur l'intestin isolé de cobaye pae quelques substances sympathicomimétiques et sympatholitiques.
CR. Soc. Bio., 124, 445-446.

VAN DER VLIET A., VAN DER WERF J.F., BAST A., TRIMMERMAN H., 1988

Frequency dependent autoinhibition of histamine release from rat cortical slices; a possible role for M3 receptor reserve.
J. Pharmacol., 40, 8, 577-579.

VAN DER WERF J.F., BIRJLOO G.J., VAN DER VLIET A., BAST A., TIMMERMAN H., 1987

M3 receptor essay in electrically stimulated super fused slices of rat brain cortex; effect of N alpha-alkylated histamines and impromidine analogues.
Agents Actions, 20, 3-4, 239-243.

VESELL E.S., 1968

Genetic and environmental factors affecting hexobarbital induced sleeping time in mice.
Fedn. Proc., 27, 349-355.

WAGNER H., SPRINKMEYER L., 1973

Uber die pharmakologische wirkung von Melissengeist.
Deutsche Apotheker Zeitung, 113, 30 1159-1166.

WAROT D., ADVENIER C., ETEVENON P., BOISSIER J.R., 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.

WATANABE J., OH K.W., KIM H.S., TAKAHASHI M., KANETO

H., 1988

A non opioid mecanism in the inhibitory effects of ginseng saponins on electrically evoked contractions of guinea pig ileum and mouse vas deferens.
J.Pharmacobio.Dyn., 11, 453-458.

WATANABE J., TAKAHASHI M., KANETO H., 1988

Distinctive effect of ginseng saponins on development of morphine tolerance in guinea pig ileum and mouse vas deferens.

J.Pharmacobio.Dyn., 11, 944-948.

WAUQUIER A., VAN DER BROECK WA.E., AWOUTERS F., JANSSEN P.A.J., 1984

Further studies on the distinctive sleep-wakefulness profiles anti-histamines (Astemizole, ketotifen, terfeviaine in dogs).

Drug Development Research, 4, 617-625.

WINDAUS A., VOGT W., 1907

Synthèse des Imidazolyl Athylamins

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 40, 3691-3695

ZETTER G., SINGBARTL G., SCHLOSSER L., 1978

Cerebral pharmacokinetics of tremor-producing harmala and iboga alkaloids.

Pharmacology, 7, 237-248.

SUM-UP

A bibliographical study permitted us to select 8 species, *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica* and *Fagara zanthoxyloïds* for their sedative, anxiolytic and analgesic effects; *Annona reticulata*, *Peumus boldus* and *Fumaria officinalis* for their antihistaminic and antispasmodic effects.

Sedative, anxiolytic and analgesic therapeutic indications of *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica* and *Fagara zanthoxyloïdes* have been scientifically confirmed by pharmacological investigation in vivo in the mouse. Antispasmodical effects of *Melissa officinalis*, *Peumus boldus*, *Annona reticulata* and *Fumaria officinalis* have been confirmed by pharmacological tests in vivo and in vitro for .

Several fractions obtained from *Melissa officinalis*' extract or the pure natural substances contained in the *passiflora incarnata* did not allowed to find the sedative and anxiolytic properties observed with crude extracts.

Sedative properties of 4 plants were not related to antihistaminical effects demonstrated wick isolated guinea pig ileum.

The effect of plant extracts with analgesic properties demonstrated in vivo have been tested in vitro in guinea-pig ileum towards opioid receptors. Thus, *Euphorbia hirta* was the single plant which bind with opioid receptors.

Eschscholtzia californica, *Fagara zanthoxyloïdes* and *Melissa officinalis*' extracts are probably not related with opioid receptors wick probably not be involved in the mechanism of action of actio of their analgesic activity.

KEY WORDS

Behaviourals tests, *in vivo*, *in vitro*, Staircase test, Two compartment's test, Light/dark choice situation test, Sleep induction test, sleep potentialisation test, sedative, anxiolytic, analgesic, antispasmodic, antihistaminic, laxative, antidiarrheic, gastrointestinal transit's test, cholinergic receptors, histaminic receptors, opioids receptors, guinea-pig ileum, rat duodenum.

Division into fractions, Alcaloïdes, Flavonoïdes, Harmane, Harmine, Harmol, Harmaline, Harmalol, Vitexin, Isovitexin, Orientin, Isoorientin, Maltol, Essential oil, Chromatographie.

Tradition, *Passiflora incarnata*, *Melissa officinalis*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica*, *Fagara zanthoxyloïdes*, *Annona reticulata*, *Peumus boldus*, *Fumaria officinalis*.

RESUME

Une étude bibliographique nous a permis de répertorier 8 espèces, *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica* et *Fagara zanthoxyloides* pour leurs effets sédatifs, anxiolytiques et analgésiques; *Annona reticulata*, *Peumus boldus* et *Fumaria officinalis* pour leurs effets antihistaminiques et antispasmodiques.

Les effets sédatifs, anxiolytiques et analgésiques mentionnés par la tradition ont été confirmés scientifiquement par des tests *in vivo* pour *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica* et *Fagara zanthoxyloides* alors que les effets antispasmodiques ont été confirmés par des tests *in vivo* et *in vitro*, pour *Melissa officinalis*, *Peumus boldus*, *Annona reticulata* et *Fumaria officinalis*.

Le fractionnement pour la recherche du support d'activité sédatif et anxiolytique de *M. officinalis* et *P. incarnata* n'a pas permis d'identifier un principe actif, l'activité ne se trouve qu'au niveau des extraits totaux

Aucune des plantes sédatives testées n'a manifesté un effet antihistaminique sur les tests *in vitro*.

Il a été mis en évidence, à l'aide de tests *in vitro*, le comportement des plantes à propriété analgésique vis à vis des récepteurs opioïdes, ainsi l'*euphorbia hirta* était la seule plante qui s'apparentait à la morphine quant à son activité analgésique, alors que le mécanisme d'action de l'activité analgésique des extraits d'*Eschscholtzia californica*, *Fagara zanthoxyloides* et *Melissa officinalis* ne se fait probablement pas via les récepteurs opioïdes.

MOTS CLEFS

- Tests comportementaux, Tests *in vivo*, Tests *in vitro*, Test de l'escalier, Test du milieu nouveau, Test de l'enceinte claire/obscur, Test de l'induction et de la potentialisation du sommeil barbiturique, Sédatifs, Anxiolytiques, Analgésique, Antispasmodiques, Antihistaminiques, Laxatifs, Antidiarrhéiques, Transit intestinal, Récepteurs cholinergiques, Récepteurs histaminergiques, Récepteurs opioïdes, Organes isolés, Duodénum de rat, Iléon de cobaye.
- Fractionnement, Alcaloïdes, Flavonoïdes, Harmaline, Harmine, Harmol, Harmalol, Harmaline, Vitexine, Isovitexine, Orientine, Isoorientine, Huile essentielle, Chromatographie.
- Tradition, *Passiflora incarnata*, *Melissa officinalis*, *Euphorbia hirta*, *Eschscholtzia californica*, *Fagara zanthoxyloides*, *Annona reticulata*, *Peumus boldus*, *Fumaria officinalis*.